

R-11549

T. 931

104

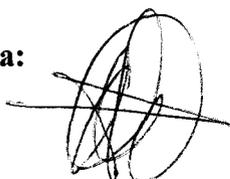
308

27 JUN. 1996

Recebo RGF/VP

**MELATONINA Y FUNCIÓN INMUNE EN HUMANOS.
MECANISMOS DE REGULACIÓN**

Autora:



María Gil González-Haba

Directores:



Juan Miguel Guerrero Montávez



Raimundo Goberna Ortiz

Tutor:



Joaquín Herrera Carranza

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Universidad de Sevilla

Junio 1996

LOS 785545

En la financiación de este trabajo han colaborado las siguientes instituciones y grupos de investigación:

1.- Departamento de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla

2.- Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla

3.- Grupo consolidado de la Junta de Andalucía denominado "Neuroendocrinología Molecular" (3296)

4.- Los proyectos de investigación que se citan a continuación:

a.- Interacción glándula pineal-sistema inmune: Estudios de los mecanismos directos de acción de la melatonina sobre células de estirpe linfoide y su efecto biológico.

Organismo: DGICYT

Fecha de concesión: 1992

Investigador principal: Juan Miguel Guerrero Montávez

Referencia: PB91-0616

Duración: 3 años

Financiación: 7.550.000 ptas

b.- Interacción entre señales neuroendocrinas y sistema inmune: Estudio de los mecanismos de acción y los efectos biológicos de la melatonina y el péptido intestinal vasoactivo en células de estirpe linfoide humanas, de rata y ratón.

Organismo: FIS

Fecha de concesión: 1993

Investigador principal: Juan Miguel Guerrero Montávez

Referencia: 93/0210

Duración: 3 años

Financiación: 7.470.000 ptas.

AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar desde aquí para mostrar mi agradecimiento más sincero a todos aquellos que, directa o indirectamente, han contribuido a la realización de este trabajo. De una manera especial quiero mencionar:

- Al Profesor Goberna, responsable último de mi estancia en el Departamento de Bioquímica del Hospital Virgen Macarena, por su apoyo en todo momento en la realización de todo el trabajo que presento en esta tesis.

- A Juan Miguel Guerrero, que fue el que me inició en la investigación sobre la melatonina, por su apoyo, dedicación y buen saber, así como la confianza que depositó en mí en todo momento.

- A Joaquín Herrera, que desde siempre me animó a realizar mi tesis doctoral durante mi período de residencia en el hospital.

- A todo el personal del Departamento de Bioquímica del Hospital Virgen Macarena, que en todo momento se prestó a colaborar en la realización de todos mis experimentos, donando su sangre. Particularmente, a Isabel Torres Ortega y a Manolo García Perea, que colaboraron muy directamente en la extracción de las muestras.

- A los integrantes del Departamento de Bioquímica Médica de la Facultad de Medicina, por la ayuda prestada en todo este tiempo.

- A la Dra. Wiesenbergl, que me proporcionó el CGP-52608 para mis experimentos y con el que he obtenido muy buenos resultados.

- A Sofía García-Mauriño, una mención especial y mi mayor agradecimiento por su inestimable ayuda en la realización de este trabajo en todos sus aspectos. En todo momento, su compañía y su gran experiencia en la investigación, me estimularon en la realización de este trabajo, haciendo más grato y divertido el tiempo que pasamos juntas.

A mis padres

A Javier

ABREVIATURAS UTILIZADAS

a. C.: antes de Cristo

AC: adenilato ciclasa

ACD: adenina-citrato-dextrosa

ACTH: hormona adrenocorticotropa

ADCC: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

ADN: ácido desoxirribonucleico

al: colaboradores

AMPe: Adenosínmonofosfato cíclico

BSA: albúmina sérica bovina

C: Carbono

CCDA: citotoxicidad dependiente de anticuerpos

DG: diacilglicerol

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNasa: desoxirribonucleasa

EDTA-K₃: etilen-diamin-tetraacetato tripotásico

ELISA: enzimoimmunoensayo (*enzyme-linked-immuno-sorbent-assay*)

Fig.: figura

FITC: isotiocianato de fluoresceína

FSC: dispersión frontal

FSH: hormona estimulante del foliculo

G_s: proteína G estimuladora
GABA: ácido gamma-amino-butírico
G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos
GH: hormona del crecimiento
GIS: sustancia inhibidora de gonadotropinas
GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
G-MSF: factor estimulante de colonias de macrófagos
GMPc: guanosín-monofosfato-cíclico
GTP: guanosín-trifosfato
H: hidrógeno
HEPES: ácido (N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico)
HIOMT: hidroxindoloximetiltransferasa
5-HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT: 5-hidroxitriptamina (serotonina)
IFN-γ: interferón-gamma
IL-2: interleuquina-2
IL-4: interleuquina-4
IL-6: interleuquina-6
IP₃: inositol-trifosfato
K_d: constante de disociación
LH: hormona luteinizante
LHRH: factor liberador de hormona luteinizante
LPS: lipopolisacárido
mg: miligramos
MAO: monoaminoxidasa
MHC: complejo mayor de histocompatibilidad
MIOS: péptidos opioides inducidos por melatonina

MSH: hormona estimulante de melanocitos
Mel: melatonina
Mon: monocito
N: nitrógeno
NA: noradrenalina
NAT: N-acetiltransferasa
NK: "natural killer"
nM: nanomolar
NO: óxido nítrico
NOS: sintasa del óxido nítrico
O: oxígeno
PBS: tampón de sales de fosfato
PE: ficoeritrina
PerCP: fluorocromo derivado de la clorofila (*peridinin chlorophyll protein*)
PHA: fitohemaglutinina
PI: fosfatidil-inositol
PKC: Proteínkinasa-C
PLC: fosfolipasa-C
pM: picomolar
PRL: prolactina
SE: error estándar
SSC: dispersión lateral
t_{1/2}: vida media
TNF- α : factor de necrosis tumoral α
TNF- β : factor de necrosis tumoral β
TRH: hormona liberadora de tirotrópina
TSH: hormona estimulante del tiroides

VIP: péptido intestinal vasoactivo

μg: microgramos

μM: micromolar

ÍNDICE

	Página
I.- INTRODUCCIÓN GENERAL	1
I.1.- GLÁNDULA PINEAL	3
I.1.1.- Breve reseña histórica	3
I.1.2.- Anatomía y embriología funcional	5
I.2.- MELATONINA	7
I.2.1.- Biosíntesis, transporte y metabolismo	7
I.2.2.- Regulación de la síntesis de melatonina	10
I.3.- ACCIONES FISIOLÓGICAS DE LA MELATONINA	13
I.3.1.- Acciones sobre la función reproductora	14
I.3.2.- Efecto sincronizador del metabolismo con el ritmo circadiano	15
I.3.3.- Efectos sobre el sistema nervioso central	16
I.3.4.- Efecto sobre el envejecimiento y la duración de la vida	17
I.3.5.- Acción antioxidante	19
I.4.- MELATONINA Y SISTEMA INMUNE	21
I.4.1.- Efecto de la melatonina sobre el sistema inmune	21
I.4.2.- Efecto de los mediadores inmunológicos sobre la glándula pineal	27
I.4.3.- Efecto de la melatonina sobre la respuesta inmune inespecífica	29
I.4.4.- Melatonina e inmunoterapia	30
I.4.5.- Función inmune y ritmos biológicos	31

I.5.- RECEPTORES DE MELATONINA	34
I.5.1.- Receptores cerebrales de melatonina	35
I.5.2.- Receptores periféricos de melatonina	45
I.5.2.1.- Receptores en el sistema inmune	47
I.5.3.- Hipótesis del receptor nuclear de melatonina	55
I.6.- MELATONINA Y CALMODULINA	58
II.- OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO	60
III.- MATERIAL Y MÉTODOS	62
III.1.- AISLAMIENTO DE LINFOCITOS T	63
III.1.1.- Obtención de la muestra	63
III.1.2.- Método	63
III.2.- AISLAMIENTO DE LINFOCITOS B	64
III.2.1.- Obtención de la muestra	64
III.2.2.- Método	64
III.3.- AISLAMIENTO DE CÉLULAS CD4+	64
III.3.1.- Obtención de la muestra	64
III.3.2.- Método	65
III.4.- AISLAMIENTO DE CÉLULAS CD8+	65

III.4.1.- Obtención de la muestra	65
III.4.2.- Método	66
III.5.- AISLAMIENTO DE CÉLULAS CD14+	66
III.5.1.- Obtención de la muestra	66
III.5.2.- Método	67
III.6.- UNIÓN DE MELATONINA A LINFOCITOS	67
III.6.1.- Obtención de la muestra	67
III.6.2.- Método	68
III.7.- DETERMINACION DE 6-SULFATOXIMELATONINA	68
III.7.1.- Obtención de la muestra	68
III.7.2.- Método	69
III.8.- CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA	69
III.9.- CULTIVOS CELULARES	70
III.9.1- Cultivos puros de células mononucleares	70
III.9.2.- Cultivos mixtos de células mononucleares	71
III.10.- DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS	71
III.10.1.- Obtención de la muestra	71
III.10.2.- Determinación de IL-2	71
III.10.3.- Determinación de IL-4	71
III.10.4.- Determinación de IL-6	72
III.10.5.- Determinación de IFN- γ	72

III.11.- DETERMINACIÓN DE CÉLULAS CD4+ Y CD8+	72
III.11.1.- Obtención de la muestra	72
III.11.2.- Determinación de subpoblaciones CD4+ y CD8+ por técnicas de citometría de flujo	72
IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	74
IV.1.- UNIÓN DE MELATONINA A LINFOCITOS	75
IV.1.1.- Unión de melatonina a linfocitos T y B	75
IV.1.2.- Correlación entre la unión de 2-[¹²⁵ I]-iodomelatonina a linfocitos T y B y la excreción urinaria de 6-sulfatoxi-melatonina	76
IV.1.3.- Curva asociación-disociación de la unión de la 2-[¹²⁵ I]-iodomelatonina a linfocitos T humanos	78
IV.1.4.- Isoterma de saturación de la unión de la 2-[¹²⁵ I]-iodomelatonina a linfocitos T humanos	80
IV.1.5.- Unión de melatonina a linfocitos CD4+ y CD8+	81
IV.1.6.- Perfil farmacológico de los lugares de unión de la 2-[¹²⁵ I]-iodomelatonina en linfocitos T humanos	83
IV.1.7.- Discusión	85
IV.2.- INFLUENCIA DE LA MELATONINA SOBRE EL COCIENTE CD4/CD8	
IV.2.1.- Efecto de la melatonina sobre el cociente CD4/CD8 en cultivos de células mononucleares humanas de sangre periférica	89
IV.2.2.- Discusión	91

IV.3.- EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS EN CULTIVOS DE CÉLULAS MONONUCLEARE HUMANAS DE SANGRE PERIFÉRICA	92
IV.3.1.- Producción de citoquinas a distintas concentraciones de PHA	92
IV.3.2.- Efecto de la melatonina sobre la producción de interleuquina-2 en cultivos de células mononucleares humanas de sangre periférica	94
IV.3.3.- Efecto de la melatonina sobre la producción de interleuquina-4 en cultivos de células mononucleares humanas de sangre periférica	96
IV.3.4.- Efecto de la melatonina sobre la producción de interleuquina-6 en cultivos de células mononucleares humanas de sangre periférica	98
IV.3.5.- Efecto de la melatonina sobre la producción de interferón- γ en cultivos de células mononucleares humanas de sangre periférica	100
IV.3.6.- Efecto de la melatonina sobre la producción de interleuquina-2, interleuquina-4, interleuquina-6 e interferón- γ en cultivos mixtos de células mononucleares humanas de sangre periférica	102
IV.3.7.- Efecto de la melatonina sobre células CD4+/CD14+ (monocitos/macrófagos)	104
IV.3.8.- Discusión	106
 IV.4.- EFECTO DEL CGP-52608 SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS EN CULTIVOS PUROS Y MIXTOS DE CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS DE SANGRE PERIFÉRICA	 115
IV.4.1.- Efecto del CGP-52608 sobre la producción de interleuquina-2 en cultivos puros y mixtos de células mononucleares humanas de sangre periférica	116
IV.4.2.- Efecto del CGP-52608 sobre la producción de interleuquina-6 en cultivos puros y mixtos de células mononucleares humanas de sangre periférica	118

IV.4.3.- Efecto del CGP-52608 sobre la producción de interferón- γ en cultivos puros y mixtos de células mononucleares humanas de sangre periférica	120
IV.4.4.- Discusión	122
V.- CONCLUSIONES	123
VI.- PUBLICACIONES	126
VII.- BIBLIOGRAFÍA	133

I.- INTRODUCCIÓN

En los últimos años venimos asistiendo a una verdadera revolución en lo que se refiere a la hormona secretada por la glándula pineal denominada melatonina. Varios estudios científicos de reciente aparición han llevado al conocimiento del público esta hormona, cuya existencia es conocida hace mucho tiempo, pero a la que no se le había prestado la debida atención en los medios científicos. Vivimos en una sociedad donde el stress, la ansiedad, las enfermedades degenerativas, el cáncer, etc., ocupan un lugar importante, aunque nos pese. Los numerosos males que hasta hace pocos años causaban miles y miles de víctimas entre personas jóvenes y de mediana edad han sido dominados. La población está envejeciendo y, por tanto, cada vez hay más personas con enfermedades malignas o crónicas que se asocian a la vejez. El hombre de hoy intenta buscar soluciones rápidas a todos los problemas de salud que se le presentan. Y parece, que la llegada de la melatonina podría colaborar en retrasar la aparición de algunos de ellos. Descubierta hace cuarenta años, esta hormona es conocida en la actualidad como una de las más ubicuas de los seres vivos. Está presente en un amplio espectro de organismos vivos, desde protozoos hasta vertebrados superiores, por lo que se supone que su antigüedad se remonta a, aproximadamente, mil millones de años. Su secreción es cíclica y se realiza, en el caso de los vertebrados, en la glándula pineal o epífisis. Se sabe que es la hormona que sincroniza los ritmos día-noche y de las estaciones, regula el tiempo de sueño, marca la reproducción de los animales e, incluso la migración de ciertas aves y el cambio de piel de algunas especies de ranas. Sin embargo, los científicos han descubierto que la melatonina tiene funciones más importantes, o al menos más prácticas e interesantes para el hombre de nuestros días. Este efecto es la protección de los seres vivos de los efectos tóxicos de la oxidación. Este efecto ocurre en todos los procesos metabólicos y genera los denominados radicales libres,

implicados de forma importante en el envejecimiento. De igual manera, los procesos oxidativos pueden contribuir a la génesis de múltiples enfermedades degenerativas, entre ellas el cáncer. El organismo humano es capaz de producir sustancias capaces de inhibir la oxidación, aunque su actuación se limite a determinadas células. A diferencia de ellas, la melatonina puede penetrar fácilmente en cualquier célula de cualquier parte del cuerpo. Igualmente, el envejecimiento lleva parejo un deterioro de la función del sistema inmunológico, encargado de la defensa frente a cualquier agresión externa. Pues bien, se ha visto que la melatonina tiene también una función inmunoestimuladora, habiéndose demostrado que esta hormona puede conservar, o incluso restaurar, este mecanismo de defensa. De la misma manera, puede proteger contra la inmunodepresión asociada al stress. Actualmente, esta función inmunomoduladora es una de las más estudiadas. Ella será el centro y el objetivo de este trabajo, en donde se intentarán aportar algunas ideas que ayuden a dilucidar el mecanismo de acción de esta hormona sobre el sistema inmune humano.

I.1.- GLÁNDULA PINEAL

I.1.1.- Breve reseña histórica: Hasta hace aproximadamente cuarenta años, pocos científicos habían investigado seriamente acerca de esta glándula. En este espacio de tiempo ha pasado a ser considerada como un órgano muy interesante desde el punto de vista fisiológico. Sin embargo, su descripción anatómica ha precedido, con mucho, a la de otros órganos o glándulas endocrinas. En el siglo III a. C. fue Herófilo de Alejandria el primero en describirla y la vinculó con funciones valvulares que supuestamente regulaban el flujo de la memoria, idea que persistió hasta el siglo XIX, en el que Magendie consideró a la glándula pineal como reguladora del flujo del líquido cefalorraquídeo. Fue Galeno, en el siglo II, el primero en estudiar su anatomía en detalle, y a él se le debe el nombre actual, que proviene del vocablo griego *konareion* (Susemihl, 1892), latinizado *conarium* (piña);

Galeno suponía que la glándula pineal era el sostén de las venas cerebrales que se extienden por la parte posterior y dorsal del diencéfalo (Singer, 1956). Esta idea fue apoyada siglos más tarde por Vesalio, al cual se le atribuye la primera representación gráfica conocida de la glándula pineal en el hombre (Fig. 1).

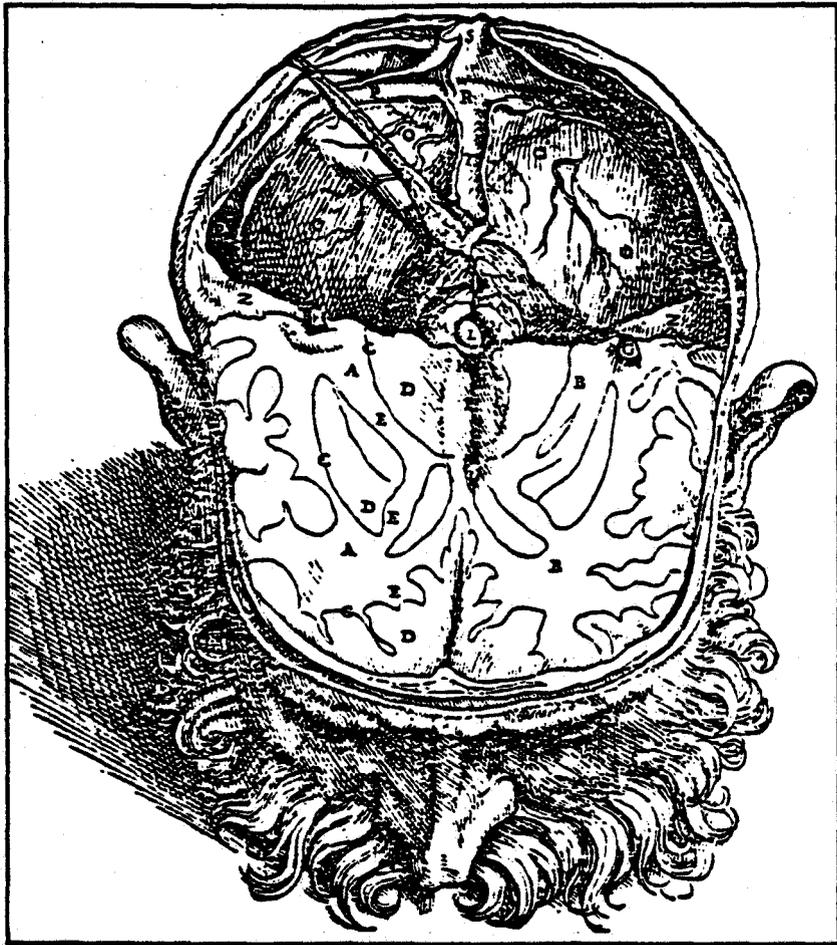


Fig. 1: Representación de la glándula pineal (L) según Andreas Vesalius. Tomada de Pineal Research Reviews, (1985) Vol. 3, R. J. Reiter ed., Alan R. Liss, Inc., Nueva York, 11.

Una de las concepciones más antiguas sobre la función pineal se remonta al tiempo de los Vedas. Fue popularizada en occidente por Descartes y hasta nuestros días nos ha llegado a través de Kappers (1980; 1981). Esta teoría afirma que el alma o ánima está localizada en la pineal, e indudablemente influyó en la vinculación posterior de la misma con las enfermedades mentales, si bien también hizo que el interés por esta glándula disminuyera hasta casi desaparecer durante los dos siglos siguientes, dada las críticas recibidas, tanto en vida de Descartes como posteriormente.

Es a partir de la segunda mitad del siglo XIX cuando se empiezan a realizar los auténticos avances en el conocimiento de esta glándula, fundamentalmente mediante estudios de morfología comparada con los que se llegan a vislumbrar nuevos aspectos funcionales. Así, se descubre su carácter de órgano sensible a la luz comparable al de los ojos laterales (Ahlborn, 1883), y se estudia la inervación de la glándula en gran número de especies y su conexión con el sistema endocrino.

Ya en el siglo XX, en el año 1954, se publica el libro *The Pineal gland* (Kitay y Altschule), en el que se recoge de una forma crítica todo el saber anterior sobre la glándula pineal, esto es, relación con la regulación de la función gonadal, intervención en la transformación de las oscilaciones periódicas de la iluminación ambiental y vinculación con la conducta.

Fue en el año 1958 cuando se inició su estudio como órgano endocrino a partir del descubrimiento de su principal producto de secreción, la melatonina, por el dermatólogo americano Lerner (Lerner et al, 1958). A partir de aquí y hasta nuestros días, las investigaciones sobre glándula pineal y melatonina han crecido de forma exponencial y se las ha relacionado con una gran variedad de sistemas fisiológicos.

I.1.2.- Anatomía y embriología funcional: La glándula pineal pertenece al grupo de órganos circunventriculares. Se origina a partir de una evaginación

neuroepitelial del techo del diencéfalo, la cual es evidente en el hombre desde el segundo mes de vida intrauterina. En el hombre adulto pesa entre 100 y 200 miligramos, y está ubicada en el borde posterior e inferior del cuerpo caloso, entre ambos tubérculos cuadrigéminos superiores. Se halla encapsulada por la piamadre, desde la cual le llegan vasos sanguíneos, fibras nerviosas amielínicas y estroma del tejido conjuntivo.

La glándula pineal se caracteriza por una gran variabilidad anatómica a lo largo de la escala filogenética. En peces, anfibios y reptiles lacértidos contiene células fotorreceptoras semejantes a las retinianas, que también se encuentran en otros grupos zoológicos más inferiores. En mamíferos, la pineal es típicamente una glándula endocrina y carece de fotorreceptores desarrollados, observándose rudimentos de éstos en algunas aves y serpientes.

Los pinealocitos son las células principales de la glándula pineal de los mamíferos. En su origen filogénico eran auténticos fotorreceptores directamente sensibles a luz, conectados al cerebro por medio de neuronas de segundo orden. Posteriormente, estos fotorreceptores fueron evolucionando y desaparecieron las neuronas de conexión. Finalmente, en los mamíferos, los pinealocitos han perdido la capacidad de detectar directamente la luz, convirtiéndose en células secretoras. Constituyen el 85% de la masa pineal, estando el resto constituido por células gliales, que se distribuyen como células de sostén, y por terminaciones nerviosas.

La pineal se encuentra abundantemente vascularizada por ramas de las arterias coroidales posteriores, siendo la sangre drenada directamente a los senos venosos longitudinal y transversos.

Las aferencias nerviosas están constituidas principalmente por ramas de origen simpático provenientes del ganglio cervical superior, las cuales van a regular en gran medida la función pineal. En algunas especies también se da una inervación parasimpática con origen en los núcleos salivares superiores. También se han descrito conexiones centrales directas a través del tracto habénulo-pineal (Villanúa et al, 1989).

Se han descrito varios tipos de compuestos que parecen tener actividad hormonal, y que se han obtenido de extractos pineales (Reiter y Vaughan, 1977) . Entre ellos, indolaminas del tipo de la melatonina, como serotonina, 5-hidroxi-indol-acético, 5-metoxitriptamina, 5-metoxitriptofol, etc. Algunas de ellas son productos intermedios en la síntesis de melatonina. También se han hallado péptidos como arginina-vasotocina, vasopresina con sus respectivas neurofisinas, MSH, TRH, LHRH, VIP, somatostatina, etc.

I.2.- MELATONINA

I.2.1.- Biosíntesis, transporte y metabolismo: La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) se sintetiza a partir del triptófano en la glándula pineal (Fig.2).

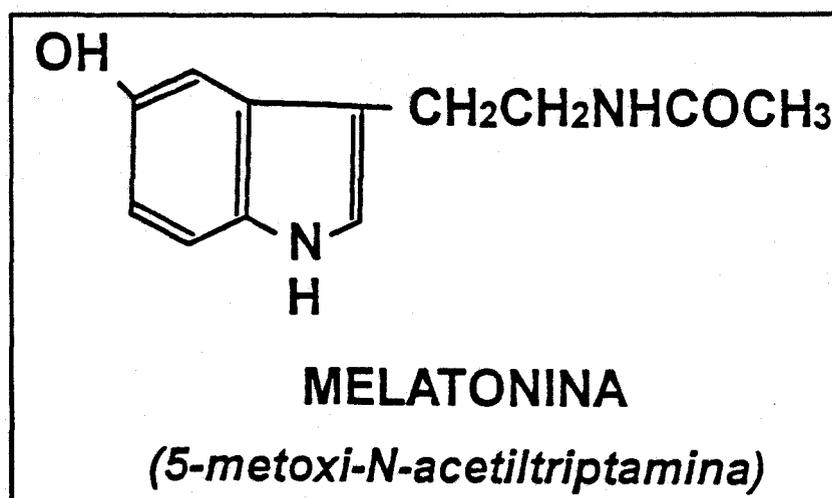


Fig. 2: Estructura química de la melatonina (5-metoxi-N-acetilriptamina)

Otros órganos contribuyen, aunque en menor medida, a su producción. Entre ellos, la retina (Leino y Airaksinen, 1985; Wiechmann, 1986; Pang y Allen, 1986), la glándula harderiana intra-orbital (Bubenik et al, 1976a), las glándulas lacrimales extra-orbitales (Mhatre et al, 1988), el tracto gastrointestinal (Quay y Ma, 1976), el sistema nervioso central (Bubenik et al, 1974) y los hematíes (Rosengarten et al, 1972).

La ruta biosintética de la melatonina en la glándula pineal es bien conocida (Ebadi, 1984). El precursor de dicha síntesis es el triptófano (Fig. 3).

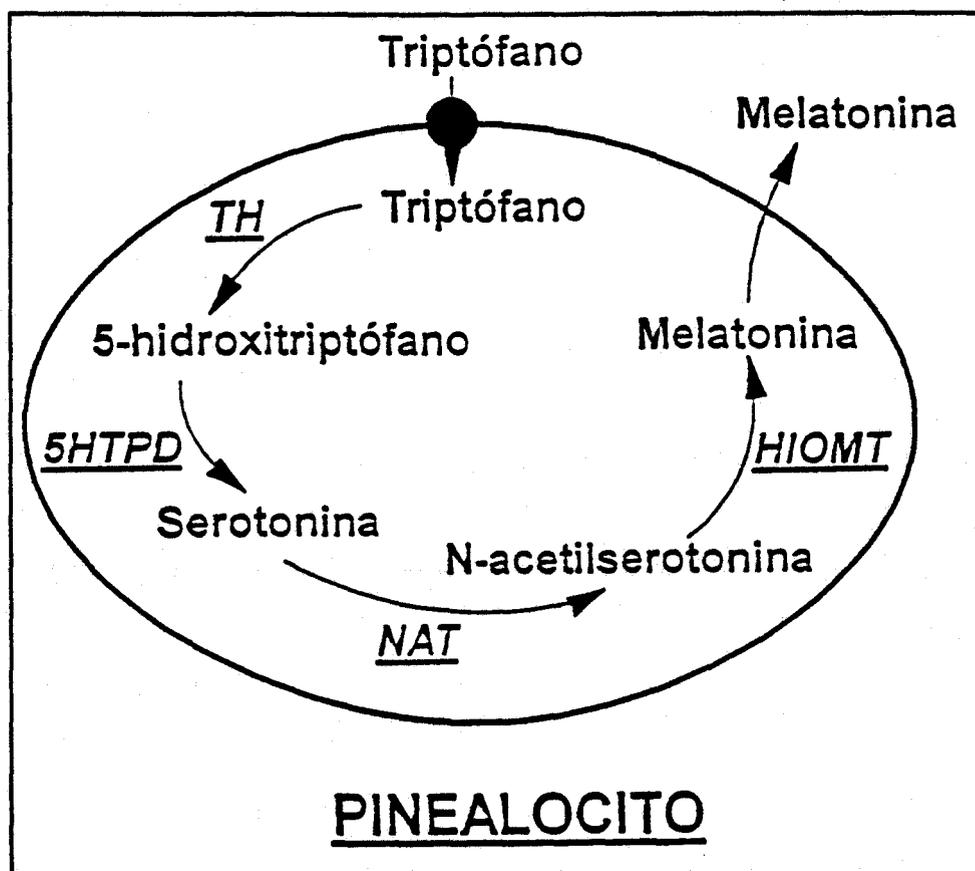


Fig. 3: Esquema de la ruta biosintética de la melatonina en el pinealocito.

Este aminoácido penetra en el pinealocito, procedente de la circulación sanguínea,

a través de un mecanismo de transporte activo que está regulado por receptores noradrenérgicos. Tras su entrada en la glándula pineal, es hidroxilado a 5-hidroxi-triptófano mediante la enzima triptófano hidroxilasa, controlada a su vez por un receptor β -adrenérgico. Posteriormente, éste derivado del triptófano, mediante descarboxilación por una descarboxilasa de aminoácidos aromáticos, forma la 5-hidroxi-triptamina o serotonina. El siguiente paso es la acetilación de la serotonina por la N-acetiltransferasa (NAT), enzima limitante de la síntesis de melatonina, para formar N-acetil-serotonina, inmediato precursor de melatonina. Ésta se forma por o-metilación y requiere la presencia de la enzima hidroxindol-oxi-metil-transferasa (HIOMT), que en este caso utiliza como dador de grupos metilos a la S-adenosil-metionina.

A diferencia de muchas otras hormonas, la melatonina no parece almacenarse durante tiempo apreciable en la pineal. Así pues, tras su síntesis abandona rápidamente la glándula, principalmente hacia la circulación sistémica y, secundariamente, hacia otros fluidos biológicos, como el líquido cefalorraquídeo (Reiter, 1986). Dado su carácter altamente lipofílico, se ha propuesto un mecanismo de simple difusión para el transporte hacia la sangre (Cardinali, 1981).

Una vez en la sangre, la melatonina se une a la albúmina en un 60-70%, y el resto circula libremente (Pardridge y Mietus, 1980). Su vida media en sangre es corta (10-40 minutos) y sufre metabolismo de primer paso a nivel del hígado (90%) y, en menor extensión, en el sistema nervioso central. Aproximadamente, el 75% de la melatonina se transforma en 6-hidroxi-melatonina por los enzimas microsomales hepáticos y, posteriormente, se conjuga con sulfato para formar 6-sulfatoxi-melatonina (70%) o con glucurónido en menor proporción (6%), formas en las que se elimina por orina. Existe una clara correlación entre los niveles plasmáticos de melatonina y los de 6-sulfatoxi-melatonina, por lo que este metabolito resulta un buen índice de su patrón de producción. Sólo un 1% de la hormona se elimina por orina sin sufrir ninguna transformación. En el cerebro, la melatonina (12%) se convierte en N-acetil-5-metoxikenurenamina (Kopin et al, 1961).

I.2.2.- Regulación de la síntesis de melatonina: La producción de melatonina está fundamentalmente regulada por los ciclos luz/oscuridad. La glándula pineal es el lugar en donde la información acerca del ritmo luz/oscuridad se transforma en un mensaje químico. En peces, anfibios, reptiles y aves, dicha información llega directamente a la glándula. Sin embargo, en mamíferos, este mensaje llega a través de la retina que comunica con la pineal por medio de una ruta neuronal que incluye el haz retinohipotalámico, el núcleo supraquiasmático y fibras pre- y post-ganglionares del sistema nervioso simpático cuyos cuerpos celulares se encuentran en el ganglio cervical superior (Moore y Klein, 1974).

La secreción y la síntesis de melatonina está determinada principalmente por la liberación nocturna de noradrenalina por las terminaciones simpáticas post-ganglionares (Axelrod, 1974) y posterior unión a receptores α_1 y β_1 situados en la membrana del pinealocito. Como consecuencia de la interacción con estos receptores se produce la activación de la NAT con el consecuente aumento de la producción de melatonina (Fig. 4).

Bajo condiciones de total oscuridad, por ejemplo en individuos ciegos, el ritmo de producción de melatonina se mantiene, aunque diferente del ritmo día/noche, gracias a un ritmo impuesto por el propio núcleo supraquiasmático (Lewy y Newsome, 1983). Por el contrario, no se observa ningún ritmo de melatonina bajo condiciones de luz continua.

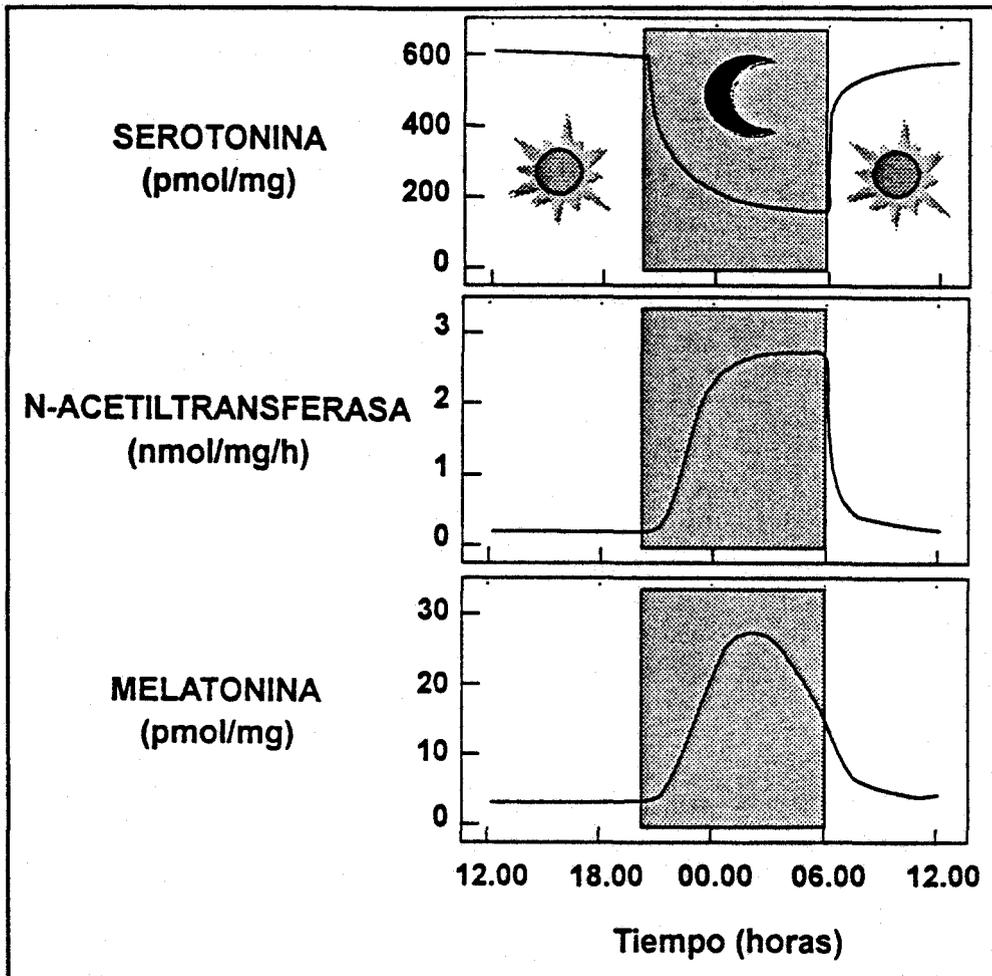


Fig. 4: Ritmos diarios de serotonina, N-acetiltransferasa y melatonina.

Fundamentalmente, la noradrenalina se une a los receptores β -adrenérgicos (Craft et al, 1985), que estimulan la activación de la adenilato ciclasa a través de su interacción con una proteína Gs, resultando en un aumento en la síntesis de AMPc que activará la NAT, principal enzima reguladora de la síntesis de melatonina, por un mecanismo que aún es desconocido (Fig. 5).

Los receptores α_1 también participan en la regulación de la actividad NAT potenciando el efecto de los receptores β (Klein et al, 1983, Rubio et al, 1991, Rubio et al,

1993). Este mecanismo implica la hidrólisis del fosfatidil inositol para formar diacilglicerol, el activador endógeno de la PKC, cuya activación probablemente amplifique la estimulación β -adrenérgica por fosforilación de una Gs o de la misma adenilato ciclasa. Por otra parte, la unión de noradrenalina a los receptores α_1 también aumenta la concentración de Ca^{2+} intracelular por apertura de un canal dependiente de ligando que también colabora en la activación de la PKC.

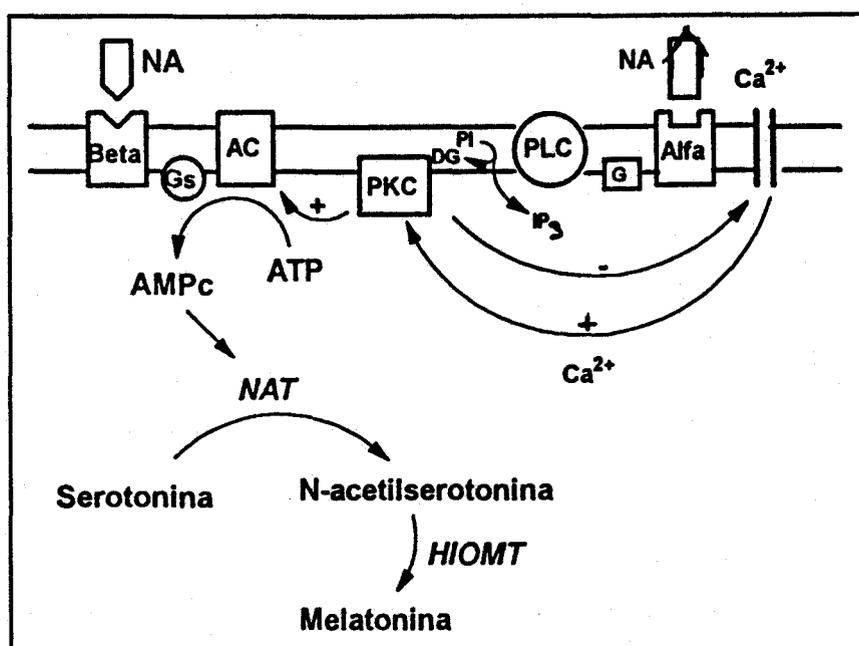


Fig. 5: Esquema de la activación del receptor β -adrenérgico.

Algunos neuropéptidos también pueden intervenir en el control de la actividad de la glándula pineal. Se ha observado que muchos de ellos son liberados en dicha glándula por fibras nerviosas de origen central y periférico. De todos ellos, el VIP es el más conocido. Este estimula la producción de AMPc e induce la activación de la NAT a través de su unión a receptores específicos. Sin embargo, no se conoce la naturaleza del estímulo que libera el VIP, ni si esta estimulación juega un papel fisiológico en la regulación de la producción de

melatonina (López-González et al, 1992b).

I.3.- ACCIONES FISIOLÓGICAS DE LA MELATONINA

El primer efecto que se describió para la melatonina fue su capacidad de producir la condensación de los gránulos de melanina en la piel de anfibios (McCord y Allen, 1917). Durante mucho tiempo este aclaramiento de la piel de los anfibios fue usado como un bioanálisis específico y sensible de melatonina.

El estudio sistemático de las acciones biológicas de la melatonina se inicia a principio de la década de los setenta. Desde entonces, se han descrito muchas acciones biológicas de la hormona tanto *in vivo* como *in vitro*. Se ha encontrado que la melatonina puede regular un gran número de procesos metabólicos en casi todos los sistemas del organismo, entre los que destacan el propio sistema endocrino, el sistema nervioso central, el sistema inmune y el sistema cardiovascular. No obstante, muchas de estas acciones tienen lugar a concentraciones farmacológicas o son difíciles de explicar en términos fisiológicos.

De todas las posibles funciones, tres están plenamente aceptadas: la regulación de la maduración sexual y la actividad reproductora, el ajuste de la actividad metabólica al ritmo circadiano y el efecto sedante e inductor del sueño. Otras, como la acción antitumoral, inmunoestimuladora y antioxidante están siendo estudiadas actualmente de forma preferencial, existiendo ya bastante base experimental que las acredita. Es importante considerar que algunos de estos efectos, probablemente, sean casos particulares de una sola acción biológica más general que los englobe. Pero la falta de conocimiento del mecanismo de acción de la melatonina hace por el momento difícil sistematizar adecuadamente sus acciones biológicas.

I.3.1.- Acciones sobre la función reproductora: A principios de los años sesenta se encontró que la melatonina producía un ligero retraso en el desarrollo ovárico de las ratas (Wurtman et al, 1963). Pero, quizás, la demostración de su capacidad para suprimir totalmente el eje neuroendocrino-reproductor en hamsters sirios (*Mesocricetus auratus*) (Tamarkin et al, 1976) fue el hecho que convenció a muchos científicos de su capacidad inhibidora. Por ello, en un principio se consideró que su acción era eminentemente antigonadotrófica, dado su efecto inhibidor sobre la función sexual.

Por otra parte, en especies como el hamster turco (*Mesocricetus brandti*), la presencia de la pineal y la melatonina son esenciales para mantener la actividad reproductora (Carter et al, 1982). Igualmente, en el carnero, la melatonina es necesaria para una adecuada sincronización del ciclo reproductor anual (Arendt, 1986). En este contexto, pues, la melatonina tiene efectos progonadotróficos.

A la vista de estos resultados, sería erróneo clasificar a la melatonina como un factor exclusivamente antigonadotrófico. Por ello, muchos investigadores consideran a la melatonina como un mediador de los efectos del fotoperíodo en el eje neuroendocrino-reproductor, sin especificar su acción predominante. Todo esto se produce gracias a los cambios, que a lo largo del año, se producen en los niveles de melatonina. Así, cuando las noches son más largas y la producción de melatonina es mayor, induce regresión gonadal. Por el contrario, en primavera y verano, cuando los días son más largos y la producción de melatonina menor, se recupera la actividad gonadal y reproductora (Reiter, 1973).

En humanos, la disminución en la producción de melatonina que tiene lugar justo antes de iniciarse la pubertad, parece ser uno de los factores que desencadenan la aparición de la misma (Silman et al, 1979). De hecho, la presencia de pinealomas hiperproductores de melatonina, pueden provocar retrasos en la maduración sexual (Vaughan et al, 1978). Por el contrario, tumores de la región pineal que se acompañen de una destrucción de la glándula con pérdida de la capacidad de producir melatonina, pueden ser la causa de notables

adelantos de la pubertad.

Se ha visto también que algunas patologías del eje hipotalámico-hipófiso-gonadal están asociadas a niveles plasmáticos de melatonina alterados. Así, por ejemplo, en casos de amenorrea de origen hipotalámico se observan niveles nocturnos de melatonina elevados (Berga et al, 1988). También ocurre en el hipogonadismo hipotalámico (Puig-Domingo et al, 1992).

I.3.2- Efecto sincronizador del metabolismo con el ritmo circadiano: La melatonina puede considerarse como un sincronizador interno que facilita la adaptación del organismo a las modificaciones ambientales (Reiter, 1981). Esto se consigue gracias a que su patrón de secreción presenta un marcado ritmo circadiano, consiguiéndose niveles superiores durante la noche.

Los desajustes que se producen entre el medio externo y el metabolismo son los responsables del malestar que acompaña a los viajes transoceánicos, fenómeno conocido como *jet-lag*. En estudios realizados en humanos, se ha visto una rápida resincronización sobre el ritmo endógeno de melatonina hasta adaptarse a la nueva situación, normalmente a una velocidad de dos horas por día, hasta que el *jet-lag* desaparece (Arendt et al, 1987).

El mecanismo a través del cual la melatonina sincroniza el mundo exterior con la actividad metabólica todavía no está claro. No obstante, se supone que la gran cantidad de efectos descritos para la hormona sobre los diferentes componentes del sistema endocrino colaboran en esta sincronización (Fèvre-Montagne et al, 1981). Así pues, la melatonina, además de los efectos sobre la reproducción, modula la liberación de factores pertenecientes a la función endocrina (Wright et al, 1986). Así, se ha estudiado la modulación sobre prolactina, FSH y LH (Waldhauser et al, 1987). También se ha visto que la melatonina regula la producción de TSH, MSH, ACTH, y GH (Petterborg et al, 1991), aunque la importancia fisiológica de estas acciones no está bien definida. Otras hormonas que pueden

ser también reguladas por la melatonina son insulina, progesterona y hormonas gastrointestinales. Todos estos factores, además de los posibles efectos directos sobre el sistema nervioso central, pueden ser responsables del efecto sincronizador.

I.3.3.- Efectos sobre el sistema nervioso central: La melatonina realiza diversos efectos a nivel del sistema nervioso central. Uno de los más estudiados y de más candente actualidad es su efecto sedante y ansiolítico. En vertebrados, tanto en reptiles como en mamíferos, la administración de melatonina inhibe la actividad motora y aplaca los comportamientos agresivos. Ya en 1964, Marczynski et al estudiaron la capacidad de la melatonina para facilitar o inducir el sueño en animales agresivos. En 1981, Lakin et al estudiaron, también en animales, la disminución de la sensibilidad al dolor que producía esta hormona. En humanos, la melatonina tiene un efecto inductor del sueño que se acompaña de sedación. En 1985, Wurtman y Lieberman postularon que la melatonina actúa como un mediador de las variaciones circadianas en el sueño y la somnolencia. Por otra parte, la melatonina reduce la capacidad de atención y de manipulación de objetos, disminuyendo las puntuaciones obtenidas en tests de control y coordinación psicomotora (POMS) (Lieberman et al, 1984). Aunque se desconocen los mecanismos de acción que median este efecto hipnótico, la breve duración del mismo hacen de la melatonina una posible alternativa a los sedantes clásicos, tipo benzodiazepinas, dado que no produce los efectos residuales clásicos del día después.

Otro aspecto importante a nivel del sistema nervioso central es la conducta y el comportamiento. Se ha visto que alteraciones del ritmo de melatonina parecen acompañarse de alteraciones conductuales. Así, por ejemplo, se ha descrito el síndrome de depresión invernal o desorden afectivo estacional (SAD), que se acompaña de una tríada de síntomas típicos como aumento de peso, gran apetencia por los carbohidratos e hipersomnias. Lewy et al. sugirieron en 1982 que este síndrome depresivo era una consecuencia de una secreción

inapropiada de melatonina (alta o desfasada), siendo la fototerapia a primeras horas de la mañana uno de sus principales tratamientos. Se han hecho múltiples estudios, incluso comparativos con los tratamientos clásicos, consiguiéndose excelentes resultados (Rosenthal et al, 1988). De igual manera, niveles anormalmente elevados se presentan en enfermos con anorexia nerviosa (Brambilla et al, 1988). Se ha visto también cómo los altos niveles de la hormona que se presentan en los pacientes anoréxicos, podrían ser la causa de los fallos que se producen a nivel del eje neuroendocrino-reproductor. Si esto es así, nuevamente estaría justificada la fototerapia, que disminuye la producción y secreción de melatonina (Reiter, 1985). Contrariamente, en pacientes que sufren migrañas repetidas (Claustrat et al, 1989) se han descrito niveles anormalmente bajos de producción de melatonina.

I.3.4.- Efecto sobre el envejecimiento y la duración de la vida:

Este es uno de los efectos de la melatonina que mayor interés ha despertado en medios científicos. Está basado en que la producción de melatonina no es constante a lo largo de la vida. Los primeros estudios se han realizado en animales, fundamentalmente en ratas, y se ha visto que los niveles nocturnos de la melatonina disminuyen con la edad (Reiter et al, 1981).

En humanos (Iguchi et al, 1982), la producción rítmica de melatonina empieza a partir de los tres o cuatro meses de edad. A partir de este momento, la producción aumenta de forma espectacular hasta alcanzar su máximo entre los ocho y diez años de edad, para disminuir con relativa brusquedad coincidiendo con los cambios puberales (Fig. 6). Ya en el adulto, los niveles nocturnos van disminuyendo lentamente hasta la vejez, de forma que, por encima de los setenta años, las tasas de producción pueden ser alrededor de un 10% del de los máximos prepuberales (Waldhauser et al, 1988).

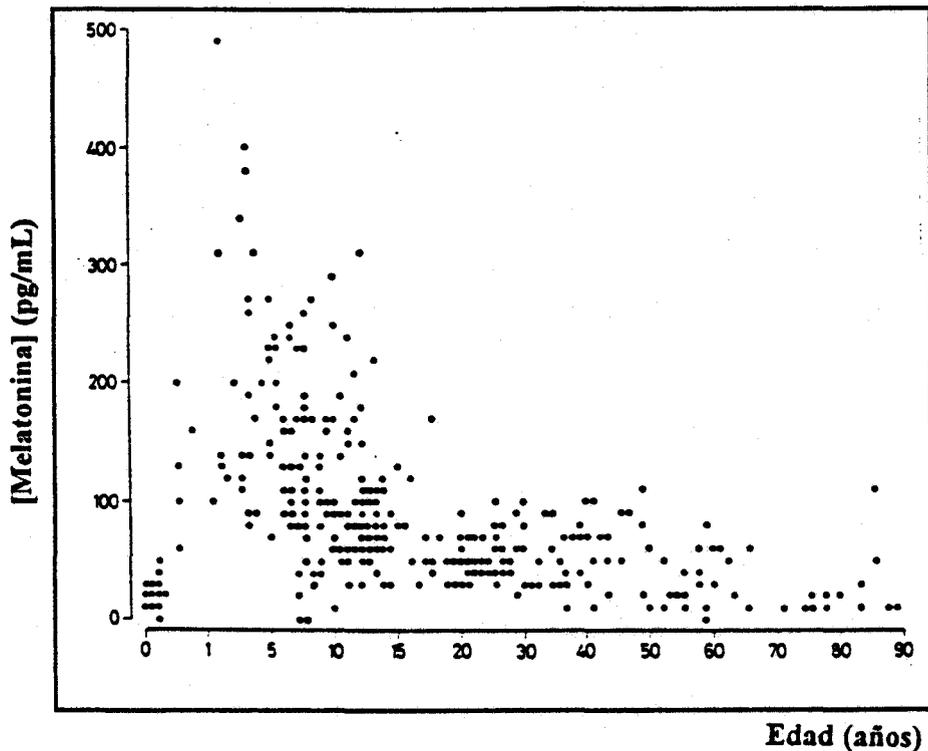


Fig. 6: Promedio por edades de los máximos nocturnos de melatonina, en pg/mL de sangre. Tomada de Waldhauser y Steger (1986), *J. Neural Transm. [Suppl.]*, 21,192.

Todos estos hallazgos sirvieron de pista para considerar a la melatonina involucrada, ya sea como causa o como efecto, en el proceso de envejecimiento. Así, diversos grupos de investigadores han coincidido en describir que la administración de melatonina a roedores adultos puede prolongar la vida de los mismos entre un 10 y un 15% (Maestroni et al, 1989). Igualmente, Pierpaoli y Regelson en 1994, realizaron injertos de pineal de ratas jóvenes en ratas adultas viendo que la vida de éstas últimas se prolongaba. Pero los resultados más interesantes no se refieren a los cambios en la duración máxima de la vida debidos a la melatonina. Lo que más llama la atención a los investigadores es el aumento espectacular de

animales que alcanzan edades avanzadas sin padecer enfermedades tradicionalmente asociadas al proceso de envejecimiento. Las explicaciones a esto parten de la importancia de la melatonina en un número importante de funciones biológicas (Reiter, 1992), las cuales se deterioran con la edad al disminuir los niveles de la hormona. Armstrong y Redman (1991) proponen que la melatonina tiene efectos beneficiosos en enfermedades relacionadas con el envejecimiento debido a su asociación con los ritmos circadianos, cuya estabilidad se pierde con la edad al disminuir los niveles de hormona, creándose una desincronización que conduce a distintas patologías y a un deterioro generalizado de la salud. Por último, la teoría más reciente que sugiere un papel para la glándula pineal y la melatonina en el envejecimiento es la elaborada por Poeggeler et al en 1993. En ella, consideran a la melatonina como un potente secuestrador de radicales libres, los cuales de un tiempo a esta parte están siendo considerados como los principales responsables del daño celular que conduce al envejecimiento.

I.3.5.- Acción antioxidante: Los radicales libres, y en particular los derivados del oxígeno, juegan un papel muy importante en una gran variedad de procesos biológicos. Mientras que algunos de estos papeles son claramente beneficiosos, sus efectos nocivos son numerosos y devastadores. Así, los radicales libres inactivan enzimas, dañan el ADN y, fundamentalmente, inician reacciones en cadena que producen la peroxidación de lípidos en las membranas celulares y otros muchos lugares. Como consecuencia de esto, tejidos, células y componentes subcelulares quedan seriamente dañados, se compromete su función y terminan muriendo.

El organismo, obviamente, tiene un poderoso sistema biológico de defensa contra los agentes oxidantes. Destacan el glutatión, las vitaminas E y C, enzimas detoxificantes como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, y algunos agentes neutralizadores de metales de transición como la albúmina, ferritina y transferrina. En otro

apartado de este sistema de defensa antioxidante del organismo se incluye actualmente a la glándula pineal, con su principal producto, la melatonina. Esta hormona, posee propiedades únicas como secuestradora de radicales libres, lo cual le confiere un papel protector muy importante. Debido a sus características físico-químicas puede difundir en todas las células (Hardeland et al, 1993), con lo cual este efecto de la melatonina se produce a nivel de numerosos órganos proporcionando una defensa importante frente al ataque oxidativo.

En estudios iniciales, Chen et al, encontraron en 1993 que la bomba de Ca^{2+} en el corazón estaba influenciada por melatonina, aumentando su actividad por la noche. Incubando con melatonina los cardiomiocitos aumentaba la actividad de la bomba de forma dosis-dependiente. A su vez, Kaneko et al, en 1989 habían visto que la actividad de la bomba disminuía en presencia de radicales libres. Se ha especulado, por tanto, que la melatonina altera el estado redox de las células cardíacas, neutralizando radicales libres. A partir de estos hechos empieza a estudiarse la capacidad de la hormona para actuar como *scavenger* (secuestradora) de radicales libres y como antioxidante.

Tan et al, en 1993, realizaron estudios *in vitro* con el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), considerado el radical libre más tóxico producido por el organismo. En este trabajo, vieron que la melatonina fue 5 y 14 veces más efectiva que el glutatión y el manitol, respectivamente, en neutralizar este radical. Experimentos *in vivo* también confirman estos resultados. Así, el daño en el ADN inducido por safrol, un potente cancerígeno que induce la formación de radicales de oxígeno, puede ser evitado mediante la administración de melatonina. Es importante señalar que la melatonina actuó en concentraciones muy pequeñas, casi fisiológicas frente a las altas concentraciones de safrol, lo cual sugiere que la melatonina endógena es suficiente para proteger frente a la toxicidad producida por xenobióticos en general (Tan et al, 1994).

Pieri et al. (1994) realizaron un estudio *in vitro* con el radical peroxilo ($\text{R-COO}\cdot$) y vieron que la melatonina fue más eficaz que la vitamina E para neutralizar este tipo de radicales.

Por último, considerar que la melatonina también es capaz de activar enzimas detoxificantes, como la glutathion peroxidasa (principal enzima antioxidativa en el cerebro), proporcionando así una protección indirecta frente al ataque de radicales libres (Barlow-Walden et al, 1995). Por otra parte, también es capaz de inhibir la sintasa del óxido nítrico (NOS), limitando así la producción de radicales libres a partir del óxido nítrico, producto de la reacción que cataliza este enzima (Pozo et al, 1994). Esta última acción puede relacionarse con la interacción de la melatonina con la calmodulina (ver apartado I.6).

I.4.- MELATONINA Y SISTEMA INMUNE

I.4.1.- Efecto de la melatonina sobre el sistema inmune: La glándula pineal a través de su principal hormona, la melatonina, es capaz de transformar información luminosa del exterior en señales que modulan, como ya se ha visto, la función reproductora, adrenal y otras interacciones neuroendocrinas. También influye, y de manera importante, sobre la función inmune. De la misma manera, el sistema inmunológico realiza conexiones con la glándula pineal.

Desde el inicio del siglo XX se sospechó la relación entre la glándula pineal y el sistema inmune. Berman (1921) sostenía que el timo y la pineal actuaban conjuntamente en la regulación de células, tejidos y crecimiento del organismo. En 1943, Milcu y Pitis encontraron que la administración de extractos pineales a largo plazo, producía un incremento de peso del timo y una hiperplasia de las células linfoides a nivel medular y cortical en la glándula. Veinte años después, Devecerski (1963) vio que la pinealectomía neonatal conducía a una atrofia del timo. Otros autores, en esta época, observaron también que la supresión de la pineal conllevaba una lesión del sistema inmune, manifestada tanto en una reducción de la producción de anticuerpos (Csaba et al, 1966) como en una reacción

de Arthus positiva a BSA (Jankovic et al, 1970). Poco después, estudios cronobiológicos de la función inmune aportaron nuevos datos al estudio de la interrelación entre glándula pineal y sistema inmune. Así, por ejemplo, Fernandes et al. (1979) observaron un ritmo circadiano en la actividad de las células NK de bazo de rata. En humanos, igualmente se estableció que tanto el sistema inmune como el hematopoyético tenían ritmos circadianos, no sólo en el número de células circulantes sino también en la función de las mismas (Haus et al, 1983) .

Ahora bien, los primeros resultados positivos que demostraron un efecto claro de melatonina en la función inmune fueron los de Maestroni y Pierpaoli. Estos autores han realizado numerosos estudios y observado que el desarrollo embriológico y postnatal del sistema inmune en mamíferos está bajo control de la maduración del sistema endocrino. A la inversa, la exposición a células histoincompatibles, alogénicas o antígenos en mamíferos inmaduros retrasa la progresión de la maduración endocrina (Pierpaoli et al, 1977). Esta dependencia del timo también se manifiesta en la vida adulta y durante el envejecimiento (Maestroni y Pierpaoli, 1981). El siguiente paso fue tratar de identificar el órgano que controla la acción endocrina del timo. Y el candidato fue la glándula pineal, la cual controla la periodicidad circadiana del sistema neuroendocrino completo a través de la liberación cíclica de neurohormonas, siendo la principal la melatonina. Para su estudio, los experimentos se realizaron produciendo una perturbación del ritmo circadiano de la hormona, inducido por diferentes métodos, e investigando cómo se afecta el sistema inmune, tanto morfológica como funcionalmente.

Uno de los primeros experimentos realizados por estos autores fue mantener un grupo de ratones durante cuatro generaciones bajo condiciones de iluminación constante, hecho que produce una inhibición funcional de la síntesis de melatonina (Reiter, 1985), después de lo cual observaron que los ratones tenían dificultades para sintetizar anticuerpos frente a antígenos T-dependientes. En otros estudios, la síntesis de melatonina se inhibió farmacológicamente administrando a un grupo de ratones un β -bloqueante, propranolol,

observándose una respuesta inmune humoral deprimida sin alterarse la respuesta inmune mediada por células (Maestroni y Pierpaoli, 1981). Estos resultados se confirmaron en un estudio más sistemático, también con ratones, en el que se administró propranolol por la noche, lo cual presumiblemente producía una disminución del incremento nocturno en la producción de melatonina junto con una reducción en la respuesta primaria a hematíes de carnero (SRBC) y reacciones mixtas de linfocitos autólogas disminuidas (Maestroni et al, 1986). Resultados similares se obtuvieron utilizando un inhibidor de la síntesis de serotonina, p-clorofenilalanina. En estos experimentos la administración nocturna de melatonina contrarrestó la depresión de la función inmune, hecho que demostró claramente la interrelación entre la glándula pineal y el sistema inmune. (Maestroni et al, 1986 ; Becker et al, 1988).

Otros ensayos de estos autores estuvieron encaminados a ver los efectos de la administración farmacológica de melatonina (Maestroni et al, 1987). Una vez más se observó un incremento en la respuesta de anticuerpos frente a hematíes de carnero, pero solamente en ratones normales previamente sensibilizados con los antígenos. La administración de la hormona se realizó por la noche. Según esto, la melatonina se comporta como un agente inmunoestimulador afectando fundamentalmente las respuestas T-dependientes sin afectar las respuestas de los anticuerpos frente a los antígenos.

Todos estos estudios fueron realizados *in vivo*. Maestroni y Conti han realizado también ensayos *in vitro* utilizando [³H]-melatonina ó 2[¹²⁵I]-iodomelatonina, no encontrando ningún tipo de unión a células inmunocompetentes tanto activadas como no activadas (Maestroni y Conti, 1991). Es por eso que estos autores proponían un efecto más bien indirecto de la melatonina sobre la función inmune, en donde está implicado el sistema opioide endógeno. De hecho algunos trabajos apuntan hacia una posible relación entre la pineal y este sistema (Lissoni et al, 1986). Para confirmar esta hipótesis, Maestroni et al (1988a) trataron un grupo de ratones con naltrexona, un antagonista específico de los receptores opioides, y encontraron que este fármaco era capaz de contrarrestar los efectos

inmunoestimuladores de la melatonina. En esta misma línea, mostraron que péptidos opioides como β -endorfina, dinorfina 1-13, Met-enkefalina y Leu-enkefalina eran capaces de reproducir en parte algunos de los efectos de la melatonina sobre el sistema inmune. En contraste con la melatonina, la β -endorfina y la dinorfina 1-13 fueron efectivas sobre animales no sensibilizados previamente (Maestroni y Conti, 1989). Este último hecho muestra que la melatonina podría estimular la liberación de agonistas opioides de células inmunocompetentes activadas previamente. De hecho, estos mismos autores han demostrado en otros experimentos en ratones y en humanos que concentraciones fisiológicas de melatonina estimulan a células T colaboradoras (T_H) a liberar agonistas opioides que son los que estimularían la respuesta inmune. Esto no excluye que la melatonina también podría inducir la liberación de estos péptidos de otras células no inmunocompetentes (Maestroni y Conti, 1990a).

Actualmente, la existencia de receptores específicos para la melatonina en células inmunocompetentes afirma la idea de un efecto directo de la hormona tanto en células activadas como no activadas (Calvo et al, 1995). Este aspecto se trata con detalle en el apartado I.5.

Existen numerosos trabajos de distintos grupos que defienden una acción directa de la melatonina sobre células inmunocompetentes, las cuales liberan una serie de citoquinas que constituyen los principales mediadores del efecto inmunológico de la hormona (Fig. 7).

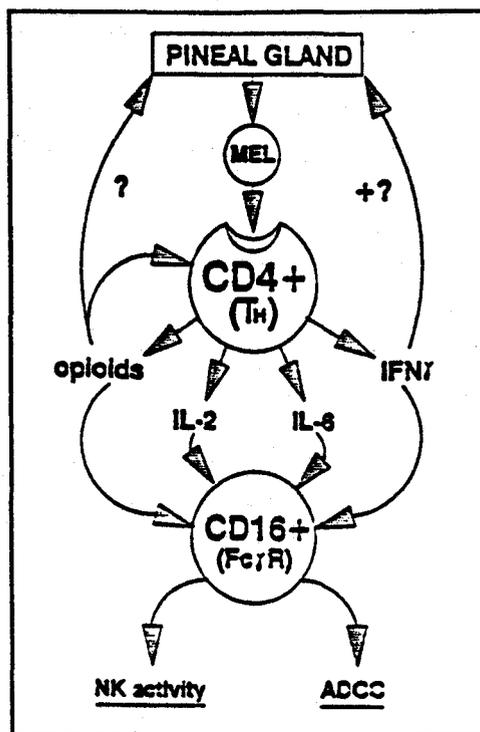


Fig. 7: Esquema de posibles relaciones entre el sistema inmune y el sistema neuroendocrino.

Así, Del Gobbo et al (1989) mantienen que la pinealectomía reduce la producción de interleuquina-2 y la actividad NK asociada, en ratones. El hecho de que las células NK estén bajo control directo de las células T a través de la producción de interleuquina-2 sugiere que la melatonina actúa directamente sobre linfocitos T. Por otra parte, Giordano y Palermo (1991) encontraron que inyectando melatonina por la noche, aumentaba la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) en esplenocitos de ratón, hecho no antagonizado por naloxona. Esto indicaría que la melatonina no actúa a través de un mecanismo opiatérgico sensible a naloxona. Dado que en la ADCC juega un papel importante el receptor para la fracción F_c de la inmunoglobulina G y que citoquinas como

interleuquina-6 e interferón- γ contribuyen activamente en la activación del mismo, podrían estos dos mediadores estar implicados en el mecanismo de acción del aumento de ADCC por melatonina. Colombo et al. (1992) han mostrado que la melatonina aumenta la producción de interferón- γ en esplenocitos murinos, pero por una vía independiente de interleuquina-2. En esta misma línea de modulación positiva por parte de la melatonina se encuentran otros autores que han comprobado que la melatonina es capaz de amplificar señales, tanto específicas como no específicas, de la proliferación de las células T (Pioli et al, 1993).

La melatonina también parece activar la función monocítica. Morrey et al (1994) han estudiado la acción de la melatonina sobre monocitos humanos. Sus resultados han mostrado que la hormona pineal es capaz de activar monocitos e inducir la secreción de interleuquina-1, radicales derivados del oxígeno y citotoxicidad frente a células tumorales. Parece ser que esta activación monocítica se realiza a través de una vía en la que está implicada una proteína-kinasa-C. Además de esta acción directa, observan que la melatonina puede aumentar la sensibilidad de los monocitos a LPS así como sensibilizar a las células para una subsiguiente activación por este mitógeno.

Algunos grupos apoyan efectos inhibidores de la melatonina sobre la liberación de citoquinas. Así, Di Stefano y Paulesu (1994) han descubierto que la melatonina inhibe la producción de interferón- γ y TNF- α en cultivos de células mononucleares de sangre periférica, procedente de individuos sanos, estimuladas con PHA. Esto ocurrió en el 22% de los casos de los individuos. Coinciden por tanto con la idea sobre la acción inmunomoduladora de la melatonina sobre células previamente activadas por estímulos apropiados o células procedentes de individuos inmunodeprimidos (Lissoni et al, 1993). Sin embargo, la naloxona no fue capaz de contrarrestar este efecto inhibitor de la melatonina sobre el interferón- γ , lo cual puede sugerir una acción directa de la melatonina sobre la producción de citoquinas y no a través del sistema endógeno opioide (Maestroni et al, 1988a). Ya en 1988, Artz et al habían publicado que la melatonina inhibía la producción de interferón- γ en cultivos de células mononucleares de sangre periférica.

A la vista de estos resultados, la melatonina parece modular el sistema inmune sólo bajo ciertas condiciones que todavía no están muy claras. Las diferencias observadas en las respuestas de los distintos individuos podrían ser debidas a factores desconocidos como el estado hormonal y/o inmunológico del individuo (Lissoni et al, 1993), expresión de los receptores de melatonina en las membranas celulares (Morgan y Williams, 1989) o factores conocidos como pueden ser la edad del donante o el momento del día en que se extrae la sangre (Ritchie et al, 1983).

Se ha propuesto también para la melatonina un papel regulador sobre un efecto del VIP en células linfoides. Concretamente, se ha visto cómo la melatonina potencia la producción de AMPc estimulada por VIP en linfocitos humanos (López-González et al, 1992b).

I.4.2.- Efecto de los mediadores inmunológicos sobre la glándula pineal: Otro aspecto interesante se refiere a los efectos que el sistema inmune desempeña sobre la función pineal. Varios hechos respaldan la hipótesis sobre los dos posibles mecanismos implicados en la regulación del eje pineal-sistema inmune. El primero de ellos se basa en la presencia de linfocitos y células plasmáticas en la glándula pineal fetal y neonatal, y su disminución con la edad (Boya y Calvo, 1978). El segundo trata de la acción del interferón- γ sobre la producción de serotonina, N-acetilserotonina y melatonina en linfocitos T y macrófagos humanos (Finocchiaro et al, 1988).

Acerca de esta última idea, Withyachumnarnkul et al. (1990a, 1990b, 1991) han realizado numerosos estudios. Este grupo se ha centrado fundamentalmente en la influencia de los interferones en la ruta biosintética de la melatonina. Otros estudios han mostrado ya cómo el sistema inmune envía señales humorales, por ejemplo estos mismos interferones, para modular otras funciones endocrinas como síntesis y liberación de hormonas sexuales, tiroxina, hormona del crecimiento, insulina, esteroides, etc. (Goldstein et al, 1987). Los

interferones son sustancias producidas por distintas células inmunocompetentes. Entre ellas se encuentran los linfocitos T colaboradores (T_H), células de la serie monocito/macrófago, células infectadas por virus, fibroblastos, etc. Tienen, por tanto, una función primaria como componentes del sistema inmunológico, aunque también modulan funciones endocrinas. En algunos casos, pueden inducir una función inmunológica sobre células del sistema endocrino. Así pues, pueden estimular la producción de moléculas MHC en células del cuerpo lúteo (Fairchild y Pate, 1989).

Un subtipo de interferón, interferón- γ , aumentó la producción de melatonina en cultivos de pineal de rata estimuladas con isoproterenol, un agonista del receptor β -adrenérgico capaz de activar la enzima N-acetiltransferasa (Reiter, 1989). Sorprendentemente, este incremento de melatonina se acompañó de una reducción en la actividad de la enzima N-acetiltransferasa (Withyachumnarnkul et al, 1990a). Los autores suponen que esta acción del interferón sobre la melatonina debe ir por una vía distinta de la activación de la N-acetiltransferasa.

Nuevos experimentos en cultivos de pineal pusieron de manifiesto que el interferón- γ suprime el metabolismo de la serotonina (5-HT) a ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) por inhibición de la MAO, lo cual produce un exceso de serotonina que se desvía a la formación de N-acetilserotonina y en último término a la producción de melatonina (Withyachumnarnkul et al, 1990b). Con esto puede verse que la baja actividad de la principal enzima reguladora de la síntesis de melatonina no compromete la producción de la misma por la pineal. Asimismo hay que señalar que esta acción del interferón requiere la integridad de la terminación nerviosa simpática a nivel de la pineal (Withyachumnarnkul et al, 1991)

Los mecanismos por los que el interferón- γ limita la actividad de la enzima N-acetiltransferasa no están todavía muy claros. Withyachumnarnkul et al. (1990a) proponen dos posibles maneras de actuar de esta citoquina. Por una parte, el interferón- γ facilita la entrada del triptófano en el interior de la célula y aumenta la producción del cofactor de la enzima triptófano hidroxilasa; esto se ha visto en células mononucleares humanas (Schoedon

et al, 1986). Suponiendo que tenga un efecto similar en otras células, incluyendo el pinealocito y la terminal nerviosa, producirá en ambos tipos de células un aumento de serotonina. Esta síntesis de serotonina en la terminal nerviosa y posterior liberación, con la subsecuente acción en los receptores de la membrana del pinealocito, pueden estar implicadas en la supresión de la actividad de la N-acetiltransferasa (King et al, 1982). La otra posible explicación parte de la capacidad del interferón- γ para producir un efecto denominado transmodulación de receptor (Karasaki et al, 1989), de modo que su unión a receptores específicos para interferón- γ existentes en la membrana del pinealocito causan una inhibición del receptor β_1 , implicado como se sabe en la estimulación de la actividad de la N-acetiltransferasa vía adenilato ciclasa. Igualmente, la serotonina en exceso liberada al espacio sináptico puede interaccionar con sus receptores de la membrana del pinealocito, originando asimismo la transmodulación del receptor β_1 y consiguiéndose un efecto aditivo con el del interferón- γ . El resultado final de este efecto del interferón va a depender de la dosis del mismo y del nivel de estimulación noradrenérgica del pinealocito.

Como resumen, Withyachumnarnkul et al (1990a) proponen que el interferón- γ liberado inicialmente por células T colaboradoras va a producir un incremento en la producción de melatonina. Ésta actuaría mediante un mecanismo de retroalimentación positiva aumentando la respuesta inmune, probablemente vía estimulación linfocitos T colaboradores, que a su vez producirían más interferón- γ y otras citoquinas que modularían, igualmente, la síntesis de melatonina y otras funciones endocrinas. Este conjunto de eventos ayudaría al organismo a alcanzar la respuesta inmune óptima en el menor intervalo de tiempo posible tras una infección.

I.4.3.- Efecto de la melatonina sobre la respuesta inmune inespecífica: Al igual que la glándula pineal se relaciona con la respuesta inmune

específica, tanto humoral como celular, de forma bidireccional como ya se ha visto, también conecta con la respuesta inmune inespecífica o innata. Así, se han realizado experimentos en pollos para ver si la glándula pineal influye en el ritmo diurno de factores característicos de la inmunidad inespecífica, tales como los niveles de lisozima o el número de granulocitos, observándose que la melatonina puede tener efectos directos e indirectos sobre estos parámetros (Rosolowska-Huszcz et al, 1991). En ratas, se han estudiado los posibles efectos de los factores estimuladores de colonias de granulocitos y macrófagos (G-CSF, M-CSF y GM-CSF) sobre la función pineal. Estos factores son glucoproteínas responsables de la diferenciación, producción y activación de las células fagocíticas, neutrófilos y macrófagos, elementos indispensables en la respuesta del huésped frente a las infecciones. *In vivo*, GM-CSF y G-CSF estimularon la secreción de melatonina por la pineal. *In vitro*, sólo GM-CSF indujo la liberación de la hormona de forma dosis-dependiente (Zylinska et al, 1995).

Por otra parte, el sistema opioide-melatonina puede actuar sobre la célula primordial hematopoyética en la médula ósea. Se ha visto que la melatonina fue capaz de modular el número de células progenitoras de granulocitos y macrófagos en la médula ósea (Maestroni y Conti, 1990b). Recientemente, Maestroni et al (1994) han descubierto que la melatonina estimula la producción endógena de GM-CSF en las células T de la médula ósea de rata.

I.4.4.- Melatonina e inmunoterapia: Debido a las múltiples acciones que se han encontrado para la melatonina en el sistema inmune humano, actualmente se propone su posible papel en la inmunoterapia, asociada de forma concomitante con otros tratamientos. De esta manera, se han hecho pruebas para evaluar los efectos terapéuticos, endocrinos e inmunológicos de la melatonina en pacientes con metástasis tumorales resistentes a otros tratamientos. En aquellos pacientes en los que la enfermedad no progresó, el cociente CD4/CD8 aumentó significativamente, mientras que disminuyó en aquellos pacientes en los que avanzó la enfermedad, lo cual sugiere que la melatonina puede ser útil

para reparar lesiones de la función inmune en pacientes con cáncer (Lissoni et al, 1989). Igualmente, se ha empleado la melatonina para modular la activación de los macrófagos que se produce en el tratamiento antineoplásico con interleuquina-2. La neopterina es un marcador específico de la actividad de los macrófagos. Así pues, la melatonina disminuyó la liberación de neopterina en un grupo de pacientes con cáncer en fase avanzada, lo cual indica su capacidad de modulación de la respuesta inmune del huésped durante la terapia antineoplásica (Lissoni et al, 1991).

Ben-Nathan et al (1995) han descubierto recientemente efectos protectores de la melatonina en ratones infectados con virus causantes de encefalitis. La administración diaria de la hormona, 10 días después de la inoculación del virus, durante un período de 3 días redujo la viremia y pospuso el inicio de la enfermedad y la muerte de forma significativa. Estos autores no observaron efecto de la melatonina en el crecimiento de los virus, cuando se cultivaban adecuadamente en cultivos de tejidos, con lo cual defienden una acción de la melatonina sobre la resistencia del huésped a los virus más que sobre la replicación viral. Esta capacidad moduladora de la melatonina estaría en consonancia con su capacidad para contrarrestar el efecto inmunodepresor del tratamiento con glucocorticoides (Maestroni et al, 1986), los cuales aumentan de forma característica en una infección viral (Blalock, 1987). Por otra parte, la melatonina estimula la producción de interferón- γ (Withyachumnarnkul et al, 1990a), el cual se sabe tiene una importante acción antiviral.

Esta eficiencia de la melatonina en la protección frente a infecciones virales letales justifica la posibilidad de su utilización en el tratamiento de infecciones varias, así como otros estados patológicos relacionados con el sistema inmune.

I.4.5.- Función inmune y ritmos biológicos: La integración y sincronización de varios sistemas biológicos es un requisito fundamental para la adaptación de un organismo a su entorno ambiental. Estas interacciones complejas incluyen la

modulación de la función inmune por el sistema neuroendocrino, un concepto que ha ido consiguiendo un soporte experimental importante en los últimos años (Blalock y Smith, 1985).

Como ya se ha señalado en apartados anteriores, la glándula pineal y las concentraciones séricas de melatonina muestran una periodicidad circadiana y estacional en muchas especies, el hombre incluido (Arendt et al, 1977). Igualmente, los elementos que intervienen en la respuesta inmune están sometidos a variaciones circadianas y circanuales (Abo et al, 1981). Muchos autores han revisado este tema y destacan la bioperiodicidad de los linfocitos y de las subpoblaciones linfocitarias (MacMurray et al, 1994). Este es el motivo fundamental por el que no pueden olvidarse las consideraciones cronobiológicas en la experimentación que se refiere a las interacciones entre el sistema neuroendocrino y la función inmune.

En los experimentos realizados por el grupo de Maestroni con β -bloqueantes tipo propranolol, se ha comprobado que la administración nocturna del fármaco es mucho más efectiva en reducir los niveles circulantes de melatonina y afectar a la respuesta inmune. Igualmente, la melatonina fue capaz de revertir los efectos sobre la función inmune, se administró por la noche, indicando claramente que la glándula pineal ejerce su acción inmunomoduladora a través de la secreción circadiana de su principal hormona (Maestroni et al, 1986). Otro trabajo llevado a cabo por Kuci et al (1988) demuestra abiertamente que la conexión de la glándula pineal con las respuestas inmunes humoral y celular está relacionada con la ritmicidad circadiana que presentan las mismas. Así, mientras la proliferación de las unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos fue dependiente de melatonina, dado que los picos de proliferación están sincronizados con el de melatonina, otros parámetros como la capacidad proliferativa de células tímicas y esplénicas en respuesta a mitógenos, o la producción de inmunoglobulina-M, no se relacionaron con la periodicidad circadiana de melatonina. McNulty et al. (1990) realizaron un análisis circadiano de células mononucleares de rata tras pinealectomía y ganglionectomía

del ganglio cervical superior. Sus resultados hablan en favor de un ritmo circadiano paralelo a los niveles de corticoides, en lo que se refiere a monocitos. Sin embargo, la ritmicidad circadiana de las células NK está en relación con la de la pineal, lo cual indica que la glándula pineal no ejerce una función tan general como a priori pudiera pensarse, sino más bien ejerce efectos más específicos y finos sobre elementos concretos de la respuesta inmunológica. Otras investigaciones que corroboran esta idea son las que estudian la producción de citoquinas inducidas por melatonina. Di Stefano y Paulesu (1994) encontraron que la melatonina inhibía la producción de interferón- γ y TNF- α en cultivos de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PHA, y esto sólo ocurría en el 22% de los casos. Ellos defienden que las variaciones estacionales en la toma de muestra puede influir sobre el efecto inhibitorio de la melatonina en la producción de citoquinas. Colombo et al (1992) observaron que la producción de interferon- γ inducida por melatonina fue mayor en esplenocitos murinos aislados nocturnamente. Consideran que las células esplénicas obtenidas durante la noche tienen mayor sensibilidad a la melatonina que las aisladas durante el día y que esto es debido a la regulación de los receptores de la hormona. Giordano et al (1993) también apuntan a la existencia de diferencias estacionales en la expresión y/o función de los receptores de melatonina implicados en la modulación inmune. Advierten que la sensibilidad del ratón a la melatonina varía en el transcurso del año, al menos en lo que se refiere a la regulación de la ADCC.

I.5.- RECEPTORES DE MELATONINA

Una vez conocido el papel de la glándula pineal como transductor de las señales luminosas del medio ambiente en una señal química circulante, la melatonina, surge la necesidad de determinar las células diana de la hormona. Con la ayuda de diversas técnicas analíticas, farmacológicas, fisiológicas, inmuno-histoquímicas, etc., se han logrado importantes avances en dilucidar los distintos sitios de unión para la hormona pineal.

La utilización de radioligandos dentro de los estudios farmacológicos ha sido decisiva. Los isótopos más comúnmente empleados para marcar la hormona han sido el ^3H y el ^{125}I . En el caso de la melatonina tritiada (^3H -melatonina), el átomo de tritio se encuentra sustituyendo a uno o varios átomos de hidrógeno en la molécula, con lo que su estructura química no se halla alterada, conservando las mismas propiedades químicas que la melatonina endógena y manteniendo igual configuración espacial. A pesar de ello, su actividad específica es pequeña (Cardinali et al, 1985). Esto, unido al hecho de que la primera melatonina tritiada disponible proporcionara resultados inconsistentes y difícilmente reproducibles, ha llevado al uso del radioligando iodado, esto es, 2- $[\text{I}^{125}]$ -iodomelatonina. Este radioligando se forma por la inclusión de un átomo de yodo, elemento de gran radio atómico, comparado con los de H, C, O y N que forman parte de la estructura de la molécula de melatonina, por lo que introduce una gran distorsión en la configuración espacial de la molécula, no pudiéndose asegurar que queden preservadas las propiedades químicas de la hormona (Vakkuri et al, 1984 a y b). Aún así, como luego se verá, este radioligando ha dado resultados muy positivos en los estudios de receptores y, de ahí, su amplio uso (Stankov et al, 1993).

I.5.1.- Receptores cerebrales de melatonina: En 1979, Cardinali et al demuestran la existencia de lugares de unión específicos para melatonina tritiada en membranas de cerebro bovino. Hasta este momento no se había hablado de la existencia de uniones saturables y de alta afinidad de la hormona a nivel cerebral. Sí existían datos preliminares que apoyaban la hipótesis de la distribución de melatonina tritiada en el hipotálamo y, en menor extensión, en el cerebro completo, a través de estudios realizados *in vivo* donde se había visto incluso cómo la administración de la hormona fría disminuía la difusión de la [³H]-melatonina (Cardinali et al, 1973). De igual manera, Wurtman et al (1964) habían mostrado la presencia de melatonina tritiada en tejido nervioso de gato tras administración intravenosa. Con la ayuda de estos descubrimientos, Cardinali et al (1979) encontraron receptores para melatonina en preparaciones de membrana cerebral definiéndolos por sus características de unión. Los resultados obtenidos fueron compatibles con los esperados para el receptor de melatonina y la localización fue fundamentalmente a nivel del hipotálamo medio basal, zona considerada como lugar primario de acción para la melatonina de origen pineal (Cardinali, 1974). Al mismo tiempo, Niles et al (1979) realizan experimentos utilizando fracciones citosólicas de cerebro, con la ayuda igualmente del radioligando tritiado

Paralelamente, aparecen publicaciones que tratan sobre uniones de alta afinidad de la melatonina a fracciones citosólicas preparadas a partir de ovario, útero e hígado de varias especies de mamíferos, lo cual sugiere la existencia de lugares de acción de la hormona a nivel periférico, de probable significación fisiológica (Cohen et al, 1978). Este aspecto se trata con más detalle en el apartado I.5.2.

Un hecho importante en esta línea de investigación de receptores fue el descubrimiento de la existencia de melatonina en la retina de varias especies de vertebrados (Hamm y Menaker, 1980). En retina de conejo la melatonina es un potente modulador de la liberación de dopamina dependiente de Ca²⁺, como lo demuestra un trabajo de Dubocovich, publicado

en Nature (1983). Los resultados del mismo sugieren que, si la melatonina se encuentra en la retina, la luz podría modular indirectamente, a través de melatonina, la actividad de células amacrinas de la retina que contienen dopamina, ya que su síntesis vía NAT es regulada por la luz ambiental (Binkley et al, 1979). Posteriormente, Dubocovich y Takahashi (1987) han mostrado que las concentraciones de melatonina del orden de picomolar inhiben selectivamente la liberación de dopamina dependiente de Ca^{2+} , en retina de pollo y ratón, a través de un sitio de unión que posee las características farmacológicas y funcionales propias de un receptor, y que es diferente al sitio de unión de serotonina. Además, este efecto inhibitorio es contrarrestado por un antagonista del receptor de melatonina denominado luzindol, hecho que sugiere que la hormona estimula un receptor presináptico (Dubocovich, 1988a). La caracterización del receptor de retina se realizó con la ayuda del radioligando 2-[^{125}I]-iodomelatonina, que demostró ser selectivo y de alta afinidad para la identificación y caracterización de los posibles receptores de melatonina, tanto en el tejido neuronal como extraneuronal de distintas especies de vertebrados, incluido el hombre (Morgan et al, 1993). Las características de la unión específica de la melatonina iodada a membranas de retina de pollo cumplía con todos los criterios de unión a receptores, esto es, estabilidad, reversibilidad, saturabilidad y alta afinidad. La 2-[^{125}I]-iodomelatonina parecía ligarse a un tipo único de receptor. Con respecto a estudios similares que emplean el radioligando tritiado, realizados en este mismo órgano, la retina, pero con otros animales como trucha y rana, el número de sitios de unión encontrados fue casi idéntico en ambos casos, si bien en este último la afinidad fue significativamente menor, y no se relacionó con ninguna respuesta funcional a melatonina (Wiechmann et al, 1986). Esto puso de manifiesto cómo la baja actividad específica del radioligando tritiado, comparada con la de radioligandos iodados podía haber impedido, tiempo atrás, la detección de sitios de unión de alta afinidad en tejidos con una baja densidad de receptores. Por otra parte, el orden de potencia de melatonina e indoles relacionados con respecto al sitio de unión de [3H]-melatonina en hipotálamo bovino (Cardinali et al, 1979) difirió considerablemente con las características

farmacológicas del receptor de melatonina en retina de pollo y conejo. Similares discrepancias se observaron en el caso del estudio de la retina de vertebrados inferiores (Wiechmann et al, 1986). Estas diferencias en las características farmacológicas de los lugares unidos por melatonina iodada y tritiada, en preparaciones de membranas de tejidos del sistema nervioso central, parecen reflejar sitios de unión diferentes.

Estas controversias surgidas por el uso de distintos radioligandos y distintos tejidos en la búsqueda de receptores de melatonina, llevó al grupo de Dubocovich a investigar sitios de unión específicos para melatonina en membranas cerebrales de hamster sirio (*Mesocricetus auratus*), utilizando 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina (Duncan et al, 1988). Los resultados de este experimento mostraron que la unión del radioligando a membranas cerebrales de hamster cumplía con todos los criterios de sitio de unión: rapidez, reversibilidad, saturabilidad, alta afinidad y selectividad farmacológica. Este último aspecto resultó ser de una gran importancia debido a que nunca se había estudiado. La constante de afinidad resultó ser del orden nanomolar, rango en que se encuentran los niveles circulantes de melatonina en esta especie, hecho que habla en favor de la importancia fisiológica de este receptor en el hamster. Lo más interesante de este caso fue la comparación de estos resultados con los obtenidos por este mismo grupo en preparaciones de membranas de retina de pollo (Dubocovich y Takahashi, 1987). Así, tanto en aspectos de afinidad como en características cinéticas existían discrepancias en los distintos tejidos. Lo primero que esto hizo sospechar fue la existencia de lugares de unión para 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina diferentes. Esta hipótesis fue apoyada al comparar los perfiles farmacológicos de ambas uniones y ver que también existían diferencias. Éstas podían estar motivadas por la utilización de distintos animales y distintas regiones del sistema nervioso central encontradas. Ahora bien, las características de los sitios de unión en retina de conejo eran muy similares a las de retina de pollo, lo cual hablaba en favor de dos receptores iguales. A esta controversia se unió una publicación sobre receptores en cerebro de rata, utilizando también el radioligando iodado (Laudon y Zisapel, 1986). Según ella, la constante de afinidad obtenida era diez veces

menor a la obtenida en los estudios con el cerebro del hamster sirio. Esto hacía desechar la idea de los dos tipos de receptores antes comentada. Sin embargo, no pudieron establecerse comparaciones adecuadas, dado que la actividad específica de la 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina utilizada era cien veces menor a la utilizada anteriormente. En los estudios de membrana cerebral de hamster sirio la distribución regional de los receptores abarcó todas las zonas examinadas: corteza cerebral, cerebelo, hipotálamo, tallo cerebral, bulbo olfatorio, striatum e hipófisis, siendo hipotálamo y tallo cerebral las zonas más ricas.

Otro experimento interesante en esta línea fue el estudio y localización de receptores en membranas de cerebro de hamster djungarian (*Phodopus sungorus*), también un mamífero fotoperiódico (Duncan et al, 1989). Una vez más se empleó el radioligando iodado, 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina, y se identificaron dos tipos de sitios de unión. Por una parte, a nivel de membranas cerebrales completas, se encontró un lugar de unión con características cinéticas y perfil farmacológico idénticos al encontrado en cerebro de hamster sirio, descubrimiento realizado por este mismo grupo de investigadores (Duncan et al, 1988). Por otra parte, y a nivel hipotalámico, se localizó un receptor de características similares al encontrado en retina de pollo, ya comentado anteriormente (Dubocovich y Takahashi, 1987). En este mismo trabajo, la localización de 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina en estudios de autorradiografía incluye zonas como núcleo paraventricular y núcleo reuniens, a nivel del tálamo; núcleo supraquiasmático y eminencia media, a nivel hipotalámico, y pars tuberalis en la hipófisis anterior. En el caso del hamster djungarian, es interesante la presencia del radioligando en la pars tuberalis, ya que esta región exhibe cambios morfológicos inducidos fotoperiódicamente (Wittkowski et al, 1984). Puede ser este hecho de gran importancia, debido a la ya conocida influencia de la melatonina sobre el sistema reproductor del hamster djungarian (Bartness y Goldman, 1988). Ya Williams y Morgan (1988) habían encontrado sitios de unión para la melatonina en pars tuberalis de rata. También Morgan et al. (1989c) caracterizaron autorradiográficamente receptores de melatonina en esta zona en la especie ovina, así como lo hicieron Stankov et al (1991) en pars tuberalis de caballo. Es bastante

difícil asignar una función específica a la unión de melatonina a la pars tuberalis. Ésta es una región de la hipófisis anterior situada en la base de la eminencia media y constituida fundamentalmente por células gonadotrofas y tirotrofas. A veces resulta difícil distinguir entre la pars tuberalis y la zona externa de la eminencia media, que también se ha sugerido como posible diana de melatonina (Vanecek et al, 1988). Sí se sabe que la eminencia media está íntimamente relacionada con la función del eje hipotálamo-hipófisis y que la hormona pineal parece ser capaz de disminuir la liberación y el contenido de LHRH en la eminencia media e hipotálamo de distintas especies animales (Jackson et al, 1982). Otros estudios anteriores también apoyan una acción reguladora de la melatonina sobre la función reproductora por su acción en el eje hipotálamo-hipófisis (Glass y Lynch, 1981). Experimentos realizados con ratones mostraron que, al administrarles parches de melatonina, se les producía regresión gonadal sólo y exclusivamente cuando esto se hacía sobre el hipotálamo, concretamente en áreas supraquiasmáticas preópticas y retroquiasmáticas, y no sobre otras zonas cerebrales (Glass y Lynch, 1982). Hay que señalar con respecto a esta zona cerebral (pars tuberalis-eminencia media), que la melatonina ha sido capaz de suprimir la producción de AMPc en ratón (Weaver et al., 1990), hamster (Morgan et al, 1989a) y carnero (Morgan et al, 1989b), con lo que este nucleótido pudiera ser un segundo mensajero intracelular que mediase las acciones de melatonina.

El núcleo supraquiasmático del hipotálamo es una de las zonas cerebrales más frecuentemente citadas como posible lugar de acción de la melatonina. Inicialmente, se describió en ratas (Vanecek et al, 1987) utilizando melatonina iodada. Asimismo, esta unión se ha descrito en lagartija y otros vertebrados inferiores (Rivkees et al, 1989) y en conejo y caballo (Stankov et al, 1991). En todos los casos la caracterización dio como resultado propiedades concordantes con sitios de unión de alta afinidad, excepto en rata en donde la afinidad tan sólo fue intermedia. En humanos, se han hecho estudios *in vitro* tanto en adultos como en fetos (Reppert et al, 1988). La afinidad de los receptores encontrados fue del orden picomolar, coincidente con las concentraciones fisiológicas de melatonina encontradas

normalmente durante la noche, en la sangre y el líquido cefalorraquídeo de humanos. El hecho de encontrar receptores específicos en el núcleo supraquiasmático evidencia que los efectos de la melatonina sobre los ritmos circadianos humanos pueden estar también mediados por una acción directa sobre el reloj biológico del hipotálamo (Goldman y Darrow, 1983). De la misma forma, la hormona influye eficientemente en la ritmicidad circadiana de reptiles, pájaros y mamíferos, por acción sobre este núcleo del hipotálamo (Armstrong, 1989). La densidad de los receptores de melatonina en esta zona sufre variaciones diurnas que, aparentemente no son el resultado de la regulación por los elevados niveles nocturnos de la hormona (Laitinen et al, 1989).

Otra zona del hipotálamo anterior, el área preóptica, se ha descrito como blanco de alguna función de melatonina. La densidad de sitios de unión encontrados fue menor que en el caso de núcleo supraquiasmático ó pars tuberalis-eminencia media. Tan sólo en el conejo se han estudiado las características cinéticas del posible receptor en este área cerebral que parece estar relacionada con el control de hibernación en distintas especies como hamsters y ardillas. El hallazgo de posibles receptores de melatonina a este nivel apunta a una posible relación de la hormona con este fenómeno (Kilduff, 1987).

El área postrema es una región del plexo coroideo del cuarto ventrículo cerebral. Es un órgano circunventricular diferente en las distintas especies. Está implicado en la regulación de funciones autónomas, como control cardiovascular, ingesta de alimentos y ciclos vigilia-sueño. Se han encontrado sitios de unión en esta zona en roedores, tanto en ratas (Vanecek, 1988) como en ratones de pies blancos (Weaver et al, 1990). Esto habla en favor de un posible papel de melatonina en el control de algunas funciones autónomas.

Otro modelo animal utilizado para el estudio y caracterización de los receptores de la hormona melatonina a nivel central es el conejo (*Oryctolagus cuniculus*). La corteza cerebral de conejo, fundamentalmente la región parietal, es rica en sitios de unión para la melatonina. Stankov et al (1992) han caracterizado receptores mediante estudios *in vitro* de uniones ligando-receptor y estudios electrofisiológicos y bioquímicos. Los resultados obtenidos

indicaron que la unión de la 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina a zonas de la corteza cerebral de conejo posee parámetros cinéticos y farmacológicos que son fisiológicamente relevantes y, por tanto, indicativos de un receptor funcional. Además, éste está aparentemente unido a un segundo mensajero a través de una proteína G_i sensible a la toxina pertúsica. Nucleótidos de guanina, GDP y GTP, fueron capaces de inhibir la unión específica del radioligando, de forma dosis-dependiente. Estos hechos sugieren que la regulación de la adenilato ciclasa, y por tanto, del AMPc, parece ser el primer paso del mecanismo molecular de la acción de melatonina en la corteza de conejo. Estos resultados concuerdan con efectos conocidos de los nucleótidos de guanina sobre el estado de afinidad del receptor de melatonina en otras áreas cerebrales de distintas especies (Laitinen et al, 1990). Igualmente, tanto la melatonina como la 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina exhibieron efectos similares al GABA utilizadas en concentraciones del orden nanomolar, para disminuir la actividad excitadora neuronal. Esto da a entender que la melatonina pueda estar implicada en el control de funciones corticales fundamentales y que actúa de forma similar al GABA, uno de los principales neurotransmisores inhibidores del sistema nervioso central.

Otros sitios de unión se han detectado en las arterias cerebrales que conforman el polígono de Willis y en la arteria caudal de rata (Viswanathan et al, 1990; Capsoni et al, 1994). Estos lugares de unión son al menos de dos tipos, unos de baja afinidad y otros de alta afinidad, que al parecer están unidos a una proteína-G sensible a la toxina pertúsica, y relacionados por tanto con la producción de AMPc, segundo mensajero implicado en la contracción de las células musculares lisas de los vasos sanguíneos. Teniendo en cuenta que la melatonina actúa directamente sobre la musculatura lisa vascular, como se ha visto en conejos (Shibata et al, 1989) y ratas (Satake et al, 1991; Weekley, 1991), e induce una disminución del tono vascular permitiendo así un mayor flujo sanguíneo, con el consiguiente intercambio calorífico, puede sugerirse un efecto modulador de la melatonina sobre la función cardiovascular y la temperatura. En humanos se ha demostrado que la luz induce cambios en la temperatura corporal central y que este efecto está mediado por la melatonina

(Cagnacci et al, 1993).

En la Tabla 1 se exponen de manera resumida los distintos estudios de receptores para la melatonina, indicando el área cerebral, la especie y el valor de la constante de afinidad (K_d).

Tabla 1: Características de los principales receptores cerebrales para la melatonina.

ÁREA	ESPECIE	K_d (pM)	REFERENCIA
EM/PT	rata	21-60	<i>Vanecek, 1988; Vanecek et al, 1987; Weaver et al, 1989.</i>
	hámster sirio	3000	<i>Duncan et al, 1988.</i>
		27-59	<i>Vanecek y Jansky, 1989; Williams y Morgan, 1988.</i>
	hámster djungarian	43/1480	<i>Duncan et al, 1989.</i>
	conejo	24	<i>Stankov et al, 1991.</i>
	carnero	21-33	<i>Stankov et al, 1991; Morgan et al, 1989c.</i>
	caballo	22	<i>Stankov et al, 1991</i>
NS	rata	$40/5 \times 10^4$	<i>Laitinen et al, 1989.</i>
	hombre	120	<i>Reppert et al, 1988.</i>
AP	rata	46	<i>Laitinen et al, 1990.</i>
APO	conejo	25	<i>Stankov et al, 1991</i>
CÓRTEX	conejo y carnero	21	<i>Stankov et al, 1991.</i>
HIP	hámster sirio	2200	<i>Pickering y Niles, 1990.</i>
RETINA	pollo	434	<i>Dubocovich y Takahashi, 1987.</i>

Abreviaturas: EM/PT eminencia media/pars tuberalis; NS núcleo supraquiasmático; AP área postrema; APO área preóptica; HIP hipocampo.

Mencionar asimismo que actualmente se estudia la estructura molecular de los receptores de melatonina. Se ha conseguido aislar un DNA_C que codifica un receptor de alta afinidad para el radioligando iodado de melatonina. Esto se ha hecho utilizando ARN_m de melanóforos dermales de la especie *Xenopus laevis* (Ebisawa et al, 1994). Igualmente se ha clonado el DNA_C que codifica receptores de alta afinidad en humanos y en carneros. Todos estos receptores son miembros de una nueva subfamilia de receptores capaces de unir proteína G, que muestran cierta homología en su secuencia con respecto a otros receptores conocidos.

Por último, y a modo de resumen, comentar la nomenclatura utilizada para hablar de los sitios de unión específicos para la 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina. Los avances realizados en el campo de la biología molecular han hecho posible el comenzar a clasificar los receptores funcionales de la melatonina. Dubocovich (1995) clasificó dichos receptores, atendiendo a su perfil farmacológico y a sus propiedades cinéticas, en dos clases que denominó como ML₁ y ML₂. En la Tabla 2 se resumen las principales características de estas dos clases de receptores.

La combinación de técnicas de biología molecular y de aproximaciones farmacológicas ha permitido la identificación de otros subtipos de receptores de los anteriores (ML₁ y ML₂). Así, Reppert y Weaver (1995) han clonado recientemente tres subtipos del receptor ML₁, denominándose éstos como ML_{1A}, ML_{1B} y ML_{1C}. Han visto asimismo que entre estos tres subtipos sólo existe un 60% de homología en sus secuencias aminoacídicas. A raíz del descubrimiento de estos tres subtipos y para identificar fármacos selectivos de cada uno de ellos, se determinaron los perfiles farmacológicos de los receptores ML_{1A}, ML_{1B} y ML_{1C} expresados en células COS 7. Cabe señalar que se ha identificado el receptor funcional presináptico de melatonina, presente en la retina de conejo, como subtipo ML_{1B} (Dubocovich, 1996).

Tabla 2: Características de los receptores de la 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina. (Tomado de Dubocovich (1995), TIPS, 16, 50-55).

	ML ₁	ML ₂
Denominación común	alta afinidad (pM)	baja afinidad (nM)
Estados de afinidad	alta (10-300 pM) baja (0.3-5 nM)	alta (0.9-10 nM)
Cinéticas:		
Asociación	lenta (t _{1/2} = 9-60 min)	rápida (t _{1/2} = 1-2 min)
Disociación	lenta (t _{1/2} = <40 min)	rápida (t _{1/2} = 1-2 min)
Regulación		
GTP	si	no
Na ⁺	si	no
Ca ²⁺	si	no
Mg ²⁺	si	no
Temperatura	si (aumenta la afinidad)	si (disminuye la afinidad)
Clasificación por orden de afinidad	2-IMEL>MEL>OH-MEL>> NAS>>Prazosín>5-HT	2-IMEL>Prazosín>NAS> OH-MEL□MEL>>5-HT
Localización	retina, NS, NPVT, CS, PT AP, AC, arterias CW	cerebro de hamster y ratón, testículos y riñón de hamster

OH-MEL, 6-hidroximelatonina; 2-IMEL, 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina; MEL, melatonina; NAS, N-acetilserotonina; AP, área postrema; AC, arteria caudal; CW, círculo de Willis; PT, pars tuberalis; NPVT, núcleo paraventricular del tálamo; CS, colículo superior; NS, núcleo supraquiasmático.

I.5.2.- Receptores periféricos de la melatonina:

Recientemente se ha publicado acerca de la caracterización de sitios de unión para melatonina en distintos órganos y tejidos de animales (Guerrero y Reiter, 1992). Esta búsqueda de receptores en diferentes lugares puede proporcionar un medio muy valioso de identificar nuevas funciones para esta hormona. Lee y Pang (1992) identificaron sitios de unión para melatonina en el tracto gastrointestinal de pato (*Anas platyrhynchos*). Con la ayuda del radioligando iodado de melatonina caracterizaron lugares de unión en yeyuno, tanto en fase de luz como en fase de oscuridad, no existiendo diferencias significativas en los valores de K_d diurnos y nocturnos, existiendo discrepancias con respecto a lo que ocurría en receptores a nivel neural (Vanecek y Jansky, 1989). El perfil farmacológico de los lugares de unión indicó alta afinidad, comparable a la de los receptores centrales (ver apartado I.5.1). Los autores de este trabajo sostienen que podrían ser receptores disponibles para promover actividades paracrinas para la melatonina, sintetizada localmente a nivel gastrointestinal (Raikhlín et al, 1975; Huether et al, 1992), o bien para colaborar con acciones hormonales vía interacción con la melatonina de origen pineal. A nivel subcelular, los lugares de unión se localizan fundamentalmente en la fracción nuclear, lo cual puede sugerir un efecto de la hormona sobre la síntesis proteica a nivel nuclear, sobre la transcripción y/o traducción. Estos datos son confirmados en un trabajo posterior realizado por Pontoire et al (1993). Este grupo ha caracterizado receptores para melatonina en membranas de duodeno de pollo (*Gallus domesticus*), siendo la zona más rica la capa muscular. La K_d obtenida fue del mismo orden que la encontrada por el grupo anterior. En este caso, además, el valor de la constante se incrementó 2-4 veces por la presencia de un análogo de GTP, sugiriendo este hecho que los lugares de unión pueden estar unidos a una proteína G. Este cambio de afinidad por influencia de GTP coincide con el observado en retina de pollo (Dubocovich y Takahashi, 1987) y no con el señalado por Rivkees et al

(1989) en cerebro de lagartija (*Anolis carolinensis*). Puede cuestionarse si estas discrepancias son debidas a condiciones experimentales diferentes o si reflejan diferencias importantes en los distintos tejidos, relacionadas con el receptor propiamente dicho o su entorno en la membrana. Este mismo grupo ha estudiado la existencia de sitios de unión en el yeyuno humano, a nivel de la capa mucosa y submucosa. Se advierte en este estudio una K_d bastante mayor que la de los animales estudiados y una menor cantidad de sitios de unión, lo cual apunta a la necesidad de más estudios para determinar la funcionalidad de estos posibles receptores y compararlos con receptores homólogos identificados en otros tejidos.

Otros posibles receptores para melatonina se han encontrado en riñón, hecho que sugiere la existencia de una acción directa de la melatonina sobre el sistema renal (Song et al, 1993). Como modelo animal se empleó la hembra del cobaya (*Dunkin hartley*), descubriéndose un único tipo de receptor con K_d comparable a los descritos como de alta afinidad (Dubocovich y Takahashi, 1987). Una vez más, no se vieron diferencias significativas en la afinidad y número de receptores encontrados en muestras nocturnas y diurnas. El estudio de distribución regional mostró que la unión específica de 2- $[^{125}\text{I}]$ -iodomelatonina fue ocho veces superior en la región cortical que en la medular, siendo mayoritaria la unión del ligando a nivel nuclear. En cuanto al significado fisiológico de estos receptores, su presencia en el tejido renal apoya la hipótesis de una secreción de renina regulada por melatonina junto con funciones excretoras renales vía receptores de melatonina. Ya en 1984, Acuña-Castroviejo et al habían visto que la pinealectomía inducía alteraciones en la actividad de la renina plasmática acompañada de hipertensión. En estudios recientes, también se ha recogido que la administración de melatonina influye sobre la osmolalidad urinaria, así como sobre las concentraciones de sodio y potasio (Richardson et al, 1992). Otros modelos animales, que se han empleado para caracterizar posibles receptores en riñón, son el pollo (Song y Pang, 1992) y el pato (Song et al, 1992).

En preparaciones de membranas de glándula adrenal de pato también se han caracterizado sitios de unión para melatonina (Pang et al, 1994). Los lugares de unión

encontrados son de alta afinidad y parece ser que es un único tipo de receptor. En este caso, la fracción mitocondrial fue la que presentó mayor unión. En 1989, Persengiev et al mostraron un incremento significativo de progesterona en glándula adrenal de rata tras la perfusión de bajas dosis de melatonina. Los resultados concuerdan con la hipótesis de una acción directa de la hormona pineal sobre la glándula adrenal (Lesniewska et al, 1990).

Existen otros órganos y tejidos en donde también se ha investigado la existencia de receptores de melatonina. Señalar, por ejemplo, fracciones de membrana cruda de glándula harderiana de rata (López-González et al, 1991), gónadas de gallo (*Gallus domesticus*) (Ayre et al, 1992), glándula tiroides de hamster (*Phodopus sungorus*) (Rivkees y Reppert, 1991), pulmón de pollo (Pang et al, 1993), etc.

A nivel del sistema inmune también se han caracterizado receptores para la melatonina. Por ser este sistema el objetivo y centro de este trabajo se analiza con detalle en apartados posteriores.

I.5.2.1.- Receptores en el sistema inmune: En los últimos años ha comenzado a investigarse la existencia de lugares de unión para melatonina en los distintos tejidos y células del sistema inmune. La extensa bibliografía existente acerca del posible efecto de la melatonina en el sistema de defensa ha contribuido a esta búsqueda. Una vez más, el radioligando 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina ha sido una valiosa ayuda en todos estos estudios. El conjunto de todos los trabajos publicados acerca de este tema, contribuye a reiterar más en la idea de que la melatonina tiene una acción directa sobre las que células inmunocompetentes.

En primer lugar se tratará la caracterización de receptores para melatonina en el sistema inmune humano, ya que todos los experimentos que se presentan en este trabajo se han realizado en la especie humana. Así, se han caracterizado sitios de unión en linfocitos y

neutrófilos de sangre humana. En el caso de linfocitos, López-González et al (1992a) han visto que la 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina se une específicamente a linfocitos de sangre periférica. Los análisis de Scatchard (1949) muestran que los datos son compatibles con la existencia de dos tipos de lugares de unión, uno de alta y otro de baja afinidad. Los resultados del trabajo indican que los sitios de unión de alta afinidad están unidos a la potenciación del efecto del VIP en la producción de AMPc y los de baja afinidad están relacionados con la activación de la producción de GMPc. Los estudios de saturación mostraron un único tipo de sitio de unión, compatible con el de alta afinidad y con un valor de K_d ligeramente superior a las concentraciones de melatonina nocturnas en adultos, tanto humanos como animales (200 pM). Si se considera que los niveles de melatonina humanos, justo antes de la pubertad, pueden alcanzar el rango de nanomolar (Waldhauser y Dietzel, 1985), posiblemente esto permita que la melatonina circulante reconozca estos lugares de unión en linfocitos. Por otro lado, estos mismos autores han demostrado que la unión del radioligando iodado a membranas crudas de linfocitos humanos disminuyó en presencia de nucleótidos de guanina, lo cual sugiere una vez más que estos posibles receptores estén unidos a una proteína-G (Calvo et al, 1995).

En neutrófilos, se ha encontrado un tipo simple de lugar de unión (López-González et al, 1993a). Es la primera vez que se estudian posibles receptores en neutrófilos y tanto las características cinéticas como estequiométricas fueron similares en células completas y en membranas, lo cual sugiere una unión de melatonina a nivel de membrana. La afinidad obtenida es del orden de la encontrada para los sitios de baja afinidad en linfocitos humanos. Por tanto, los resultados obtenidos en leucocitos humanos, en general, sugieren que la existencia de posibles receptores de alta afinidad esté restringida a linfocitos. Es más, puede ser que los sitios de unión de baja afinidad encontrados en linfocitos se deban a contaminación con granulocitos en las preparaciones de células mononucleares. Por esto, el papel fisiológico de los sitios de unión de la melatonina en células neutrófilas es aún desconocido, aunque no se descarte que pueda haberlo, dada la influencia que la hormona

tiene en algunas funciones del sistema inmune.

En mamíferos del tipo de los roedores existe también una extensa bibliografía, incluso anterior a la que habla sobre trabajos en humanos, acerca de la presencia de posibles lugares de unión para la melatonina en el sistema inmune. Ya en 1989, Niles et al encontraron sitios de unión de alta afinidad en bazo de hamster. En el caso del cobaya, Poon y Pang (1992) vieron que la exposición a la luz de forma constante aumentaba el número de sitios de unión para la 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina en los esplenocitos, sin afectar la afinidad de la unión, comparado con animales sometidos a condiciones normales de luz y oscuridad. Este aumento del número de receptores podría ser consecuencia de los bajos niveles séricos de melatonina encontrados en presencia de la luz. Esta influencia de la luz observada en bazo, apoya un efecto inmunomodulador directo de la hormona en el tejido linfoide. Estos mismos autores continúan estudiando la modulación de los sitios de unión por la hormona melatonina, y demuestran que la administración exógena de ésta, dependiente de la dosis, disminuye el número máximo de receptores y aumenta la afinidad (Poon y Pang, 1994). Igualmente, esta modulación de los sitios de unión esplénicos por administración de melatonina apoya, una vez más, la acción directa sobre el sistema inmune para afectar su función. Cabe señalar en este trabajo el estudio hecho con naltrexona, la cual no afectó a la unión de la 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina propiamente dicha, aunque sí fue capaz de suprimir el efecto inmunomodulador de la melatonina (Maestroni et al, 1988), hecho que apoya la idea de que los péptidos opioides actúen como mediadores de la función y no como moduladores de la interacción melatonina-receptor.

En membranas purificadas de timo de rata, López-González et al (1993b) han caracterizado sitios de unión de alta afinidad para la 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina. La peculiaridad de este estudio radica en el hallazgo de dos tipos de lugares de unión, uno de alta y otro de baja afinidad, cuando se realizó el análisis de Scatchard (1949). Es la primera vez que se observa este hecho en timo de rata. Sin embargo, los estudios de saturación mostraron

únicamente un tipo de lugar de unión, coincidente con el de alta afinidad anterior. La K_d correspondiente al receptor de alta afinidad tiene un valor ligeramente superior a las concentraciones de melatonina nocturnas en ratas adultas (200 pM). Si se tiene en cuenta que, durante el estado prepuberal, los niveles circulantes de melatonina nocturnos en la rata pueden alcanzar cifras del orden de nanomolar (Reiter et al, 1985), éstos podrán ser reconocidos por los sitios de unión en el timo, con lo cual este receptor puede estar relacionado con un papel fisiológico de la hormona en el timo, al menos durante la noche cuando los niveles de la hormona pineal son altos. No ocurre lo mismo con el lugar de unión de baja afinidad, al cual no se ha relacionado todavía con ningún papel biológico de la hormona en el timo. Siguiendo con estudios en timo de rata, Martín-Cacao et al (1993) han mostrado que la unión de 2-[125 I]-iodomelatonina a timo de rata cambia durante el desarrollo postnatal, de forma que es máximo en el animal recién nacido, disminuye en las primeras semanas de vida y alcanza un mínimo en el adulto. Esto debe ocurrir por cambios en la capacidad de unión, más que por variaciones en la afinidad del receptor por el ligando. Estas modificaciones en la capacidad de unión relacionadas con la edad podrían ser la consecuencia de cambios en los niveles séricos de melatonina durante el mismo período de tiempo. Así, en las primeras semanas de vida estos niveles son bajos debido a una inmadurez de la glándula pineal, y los sitios de unión en timo aumentan por un mecanismo de retroalimentación negativa. Entre la primera y segunda semana ésta madura y se inician los ritmos propios de la hormona y normalización de los sitios de unión. La conclusión de este trabajo lleva a implicar a la melatonina en una regulación específica de la función tímica durante el inicio del desarrollo.

Recientemente, Rafii-El-Idrissi et al (1995) han caracterizado receptores específicos en esplenocitos de rata, obteniendo resultados concordantes con sitios de alta afinidad y una K_d de orden similar a las concentraciones de melatonina nocturnas que se han encontrado en ratas adultas (0.2-0.3 nM) (Reiter, 1986). Esto permite que los sitios de unión en el bazo reconozcan la hormona circulante y pueda hablarse a favor de un papel fisiológico de

melatonina en bazo de rata. En este mismo estudio la unión de 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina a las células esplénicas se incrementó tras mantener a los animales bajo condiciones de luz continua durante varios días. El aumento se observó en la capacidad de unión más que en la afinidad, que no cambió. Estos resultados sobre estudios en lugares de unión y respuestas diurnas de los animales a administración exógena de melatonina muestran que la sensibilidad a la hormona parece estar relacionada de forma inversa con los niveles de melatonina endógenos en las distintas especies. Reiter et al (1980) proponen que se producen alteraciones en las respuestas de los receptores en función de los niveles circulantes. Por ello, cuando éstos son altos, se produce una desensibilización de receptores. Esto ocurre por ejemplo en períodos de oscuridad. Sin embargo, en fase de luz, cuando los niveles de hormona son escasos, los receptores está especialmente sensibles. Por otra parte y en este mismo trabajo, se ha estudiado la influencia de la melatonina sobre la producción de AMPc, y se ha visto que dosis farmacológicas de la hormona inhibieron la producción del nucleótido cíclico en presencia de forskolina, potente activador del sistema adenilato ciclasa (Niles y Hashemi, 1990).

Así mismo, en distintas especies de aves se han encontrado receptores para la melatonina en células linfoides. Por ejemplo, se han realizado experimentos de unión específica en membranas de esplenocitos de pollo (*Gallus domesticus*) (Pang y Pang, 1992). Se encontraron sitios de unión de alta afinidad con K_d del orden de picomolar, de características similares a los denominados como ML_1 por Dubocovich (1988). Los datos obtenidos por análisis de Scatchard (1949) hablan en favor de un tipo único de receptor en bazo de pollo. Aunque las cifras de K_d y número máximo de sitios de unión disminuyen por la noche con respecto al día, las variaciones no son estadísticamente significativas y no puede hablarse, por tanto, de ritmos diurnos en los lugares de unión en el bazo de pollo. Llama la atención, puesto que la existencia de estos ritmos se han recogido en otras especies (Laitinen et al, 1989; Yuan et al, 1990), cuyos sitios de unión para la 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina

son de características similares al caso de bazo de pollo. Hay que tener en cuenta que el bazo puede considerarse como un sitio de almacenamiento de células rojas y blancas de la sangre. Son los cambios en el número de alguna de estas células las que pueden haber confundido los datos y haber disminuido los valores de K_d y número máximo de sitios de unión. De la misma forma, Yu et al en 1991 habían hecho estudios en bazo de aves.

En membranas de bazo de paloma también se han caracterizado los lugares de unión con la ayuda del radioligando iodado (Poon et al, 1993). La unión específica cumple con todos los criterios de receptor y parece ser un único tipo. La K_d fue del orden picomolar, encontrándose en el mismo rango que los niveles circulantes de melatonina y, por tanto, con posible función fisiológica. Las características farmacológicas son semejantes a las recogidas en otros órganos y tejidos de paloma, retina (Dubocovich y Takahashi, 1987), cerebro (Stankov y Reiter 1990), gónadas (Ayre et al, 1992), riñón (Song et al, 1992), intestino (Lee y Pang, 1992), etc. Esto apunta a la presencia de receptores de melatonina similares en tejido nervioso y no nervioso y concuerda con la existencia de múltiples efectos periféricos de la hormona en las distintas especies animales. Por otra parte, esta unión específica a bazo de paloma fue inhibida por un análogo de GTP, lo cual puede apoyar la existencia de una proteína-G ligada al receptor. Wang et al (1993) vieron también que, cuando se deprimía la función inmune en la paloma por administración de hidrocortisona en bazo, los sitios de unión para la 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina en esplenocitos aumentaron significativamente, y no así a nivel cerebral. Esto sugiere que la regulación de receptores de melatonina mediante incremento de los mismos no está mediado por el sistema nervioso central, consolidándose así el bazo como un órgano diana importante fuera del cerebro.

Poon et al (1994) han estudiado los sitios de unión para 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina en timo de pato (*Anas platyrhynchos*) tras la administración de corticoides para inmunodeprimir al animal. El tratamiento con cortisol disminuyó el número de sitios de unión para la hormona marcada, pero no afectó a la afinidad. Con esto se demuestra que los glucocorticoides pueden modular los posibles receptores de melatonina en el timo. Esto apoya la hipótesis

que habla del timo como diana para las interacciones inmunomoduladoras entre la melatonina pineal y los esteroides adrenales (Persengiev et al, 1991). Sin embargo, si la administración de esteroides reduce la melatonina plasmática (Desmichi et al, 1985; Monteleone et al, 1992), habría que esperar un aumento en el número de sitios de unión en el tejido linfoide. En este estudio en timo de pato se demuestra lo contrario, el cortisol disminuye el número de lugares de unión. Esto muestra que los efectos de los esteroides adrenales en la secreción de melatonina pineal y los efectos en los tejidos probablemente, no tienen relación. Así, los esteroides pueden inhibir el efecto inmunoestimulador de melatonina disminuyendo su secreción y disminuyendo sus receptores en los tejidos linfoides. También hay que señalar la caracterización de lugares de unión para la 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina en bolsa de Fabricio observándose una vez más variaciones diurnas (Liu y Pang, 1992a).

En la Tabla 3 se representan de forma resumida las características de los principales sitios de unión de la melatonina en células linfoides:

Tabla 3: Características de los sitios de unión de melatonina en células linfoides. (Tomado de Calvo et al. (1995), J. Pineal Res., 18, 119-126).

	NÚMERO	K _D (nM)	REFERENCIA
<u>MAMÍFEROS</u>			
linfocitos sanguíneos humanos	2	1.01/208	<i>López-González et al, 1992a.</i>
granulocitos humanos	1	2100	<i>López-González et al, 1993a.</i>
timo de rata	2	0.47/1226	<i>López-González et al, 1993b.</i>
bazo de rata	1	0.34	<i>Rafii-Eldrissi et al, 1995.</i>
bazo de cobaya	1	0.049	<i>Poon y Pang, 1992b.</i>
<u>AVES</u>			
bazo de pato	1	0.073	<i>Yu y Pang, 1991.</i>
timo de pato	1	0.040	<i>Liu y Pang, 1992b.</i>
bazo de pollo	1	0.041	<i>Pang y Pang, 1992.</i>
bolsa de Fabricio de pollo	1	0.043	<i>Liu y Pang, 1993.</i>
bolsa de Fabricio de paloma	1	0.073	<i>Liu y Pang, 1993.</i>
bolsa de Fabricio de codorniz	1	0.035	<i>Liu y Pang, 1993.</i>

I.5.3.- Hipótesis del receptor nuclear de melatonina: Durante mucho tiempo se pensó que la melatonina actuaba únicamente a nivel de la membrana celular. Como se ha comentado en apartados anteriores, la existencia de sitios de unión de alta afinidad en preparaciones de membranas purificadas se ha estudiado a nivel cerebral y a nivel periférico. Sin embargo, la hormona ejerce también un papel importante en otras áreas, como hígado y corazón (Chen et al, 1993), en donde los receptores no han sido totalmente caracterizados. Publicaciones recientes revelan una localización nuclear de melatonina en diferentes tejidos (Menéndez-Peláez y Reiter, 1993). El estudio de la localización celular de melatonina ha estado sujeto a la calidad de los anticuerpos disponibles. En los últimos años se han desarrollado anticuerpos específicos que presentan baja reactividad cruzada con otros indoles (Arendt et al, 1977). El primer estudio que recoge la localización inmunohistoquímica de la melatonina y su precursor N-acetilserotonina fue realizado por Bubenik et al en 1974. Los lugares de estudio en este caso fueron la glándula pineal, la retina y el cerebelo. Estudios subsecuentes revelaron mediante técnicas de inmunofluorescencia la presencia de melatonina en el nervio óptico, quiasma óptico y núcleo supraquiasmático de rata (Bubenik et al, 1976b). Con esta misma metodología, este grupo de investigadores encontraron melatonina en la capa nuclear externa de la retina y en la glándula harderiana de ratas recién nacidas y adultas, siendo la cantidad mayor en la fase de oscuridad (Bubenik et al, 1978).

El empleo de anticuerpos altamente específicos junto con procedimientos inmunohistoquímicos más sofisticados ha resultado en una mejora en la resolución de la localización tisular de la melatonina. Así, mediante inmunofluorescencia y técnicas que emplean peroxidasa y anticuerpos anti-peroxidasa se detectó melatonina en pineal y glándula harderiana de visón (Tillet et al, 1989; Meusy-Desolle and Tillet, 1992). Dos estudios que han utilizado métodos inmunocitoquímicos basados en la reacción avidina-biotina, han sido claves por haber mostrado la localización de melatonina en núcleo de pinealocitos y

fotorreceptores de ratas y palomas (Mennenga et al, 1990; 1991) . Estos autores sostienen que la unión de melatonina está restringida al núcleo, presumiblemente a la cromatina, lo cual apunta a la posibilidad de un efecto de la melatonina sobre la transcripción génica, al igual que otras hormonas liposolubles.

La confirmación de esta localización nuclear de la hormona pineal se realizó con ayuda de estudios de fraccionamiento celulares (Menendez-Pelaez y Reiter, 1993), de acuerdo con el método de aislamiento de membranas y núcleos, descrito por Blum y Roberts (1989). Se eligieron tres tejidos diferentes: glándula harderiana, por la amplia experiencia desarrollada con este órgano (Menéndez-Peláez et al, 1987; 1988), hipotálamo, dado su alto contenido de melatonina (Grotta et al, 1982) y el hígado, órgano no utilizado previamente para estudios de caracterización de receptores. Los datos obtenidos en este estudio proporcionan una cierta seguridad de que el núcleo celular puede ser un sitio importante para la acumulación de melatonina. También se han utilizado técnicas de radioinmunoensayo para evidenciar la localización nuclear de la hormona (Hoffman et al, 1985).

El hecho de la acumulación preferente de melatonina en el núcleo sugiere la existencia de lugares específicos de unión en este compartimento celular. La interacción entre la hormona y los receptores de glucocorticoides (Persengiev et al, 1991) así como el efecto de la castración en los sitios de unión de melatonina se han observado en varios tejidos (Anis y Zisapel, 1991). Estos datos apoyan el posible papel nuclear de la melatonina, con lo que tanto su administración exógena como su producción endógena originaría la entrada de la hormona en el interior celular, dada su alta lipofiliidad, acumulándose fundamentalmente en el núcleo. En esta zona podría unirse a sitios específicos e ,incluso, regular la expresión génica. Estos efectos sobre el genoma se han propuesto en tejidos tan diferentes como glándula adrenal y glándula harderiana (Menendez-Pelaez et al, 1991; Persengiev et al, 1991). Otra función adicional parece ser actuar como secuestradora de radicales libres protegiendo al ADN de efectos citotóxicos (Tan et al, 1993).

Acuña-Castroviejo et al. (1994) han caracterizado lugares de unión de alta afinidad para

2-[¹²⁵I]-iodomelatonina en núcleos de hígado de rata, purificados según método de Blum et al, (1987). La unión resultó ser rápida, reversible, saturable y selectiva farmacológicamente. La peculiaridad del experimento está en la mejora de la unión cuando los núcleos puros se preincubaron con DNasa antes de los experimentos de unión, lo cual apunta a una posible asociación de esta unión específica de 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina con proteínas nucleares. La correlación entre la K_d y el número máximo de sitios de unión con las concentraciones nucleares de melatonina sugieren que estos lugares de unión pueden ser receptores fisiológicos de melatonina, lo cual podría explicar los efectos de la melatonina sobre la regulación génica, anteriormente comentados.

Por último, hay que comentar que se ha visto que la melatonina es un ligando natural de los receptores RZR α , su variante ROR α_1 (Wiesenberg et al, 1995) y RZR β (Becker-André et al, 1994). Los dos subtipos del receptor retinoide Z (RZR α y RZR β) y las tres variantes del receptor retinoide *huérfano* (ROR), α_1 , α_2 y α_3 , forman un subfamilia dentro de la superfamilia de los receptores hormonales nucleares. El receptor RZR β se expresa en el cerebro y la melatonina puede unirse a concentraciones del orden de nanomolar, hecho que hace sospechar que funciones de la hormona a nivel cerebral pueden estar, al menos en parte, mediadas por este receptor RZR β . Del mismo modo, la melatonina se une a los receptores RZR α y ROR α_1 con afinidad del orden nanomolar. Estos receptores se expresan en muchos tejidos y células fuera del cerebro, como sangre periférica, hígado, músculo liso y testículo. Por ello, se ha propuesto que estos receptores pueden estar implicados en la regulación transcripcional modulada por melatonina en tejidos periféricos. Al mismo tiempo, el descubrimiento de esta familia de receptores nucleares RZR/ROR, que tienen por ligando natural a la hormona pineal puede ayudar a comprender como ésta realiza sus múltiples funciones biológicas.

Wiesenberg et al (1995), igualmente, han identificado un ligando sintético del receptor RZR, esto es, una tiazolidin diona denominada CGP-52608 (1-[3-alil-4-oxo-tiazolidin-2iliden]-4-metil-tiosemi-carbazona). Este compuesto es un análogo funcional de melatonina

y su receptor nuclear pero no se une al receptor de membrana de alta afinidad. Por tanto, este compuesto puede ser una herramienta importante para discernir entre efectos mediados a nivel nuclear y a nivel de membrana.

I.6.- MELATONINA Y CALMODULINA

Como se ha visto en apartados anteriores, actualmente se apoya la existencia de receptores nucleares y de membrana específicos para melatonina, hecho que abre una vía importante para explicar el mecanismo de acción de esta hormona. Sin embargo, la descripción de múltiples respuestas celulares y metabólicas descritas tras la administración de la hormona, apuntan a que ésta puede actuar a través de otros mecanismos.

Benítez-King y Antón-Tay (1993) han propuesto que uno de ellos es a través de la interacción de la melatonina con la calmodulina. Ésta es una proteína capaz de unir Ca^{2+} y transmitir las señales de este ion a muchas proteínas diana, como por ejemplo, la adenilato ciclasa cerebral y la fosfodiesterasa. Una de las bases que apoya esta hipótesis es la característica físico-química de alta lipofilidad de la hormona, lo cual le permite atravesar la bicapa lipídica de las membranas de las distintas células y distribuirse a los distintos compartimentos celulares. La interacción de la melatonina con calmodulina se dedujo inicialmente de la observación realizada sobre ciertas líneas celulares, que al ser cultivadas con melatonina mostraron una reorganización de microfilamentos y microtúbulos compatibles con cambios en la actividad intracelular de calmodulina (Benítez-King et al, 1990). Posteriormente, estudios *in vivo* e *in vitro* confirmaron esta interacción. Se vio, por tanto, que el efecto de la hormona pineal en la polimerización de la tubulina y cambios en el citoesqueleto de células cultivadas con melatonina están mediados por antagonismo con el complejo Ca^{2+} -calmodulina, de modo que a bajas concentraciones de melatonina, ésta

revierte de forma completa la inhibición de la polimerización de los microtúbulos provocada por el complejo Ca^{2+} -proteína, no ocurriendo a altas concentraciones de melatonina, que sí provoca una anulación de este antagonismo específico con el citado complejo (Benítez-King y Antón-Tay, 1993).

Por otra parte, la melatonina también fue capaz de inhibir *in vitro* la fosfodiesterasa dependiente de calmodulina (Benítez-King et al, 1991). Se midió fosfodiesterasa dependiente del complejo Ca^{2+} -calmodulina en presencia de varias concentraciones de la hormona y se observó cómo la fosfodiesterasa basal no se modificó y sí lo hizo la activación enzimática por calmodulina, que fue inhibida por melatonina de forma dosis-dependiente.

En 1994, Pozo et al publicaron que concentraciones fisiológicas de melatonina eran capaces de inhibir la actividad de la sintasa del óxido nítrico en cerebelo de rata, hecho observado únicamente en presencia de Ca^{2+} . Si se tiene en cuenta, que la actividad de la sintasa del óxido nítrico ha mostrado ser dependiente del complejo Ca^{2+} -calmodulina, la acción de la melatonina sobre esta enzima podría realizarse a través de la calmodulina.

Para confirmar los resultados anteriores, se ha valorado la unión de melatonina a calmodulina con la ayuda de [^3H]-melatonina (Benítez-King et al, 1993). Esta unión cumple todos los criterios fundamentales para considerar la proteína como un receptor, esto es, saturabilidad, reversibilidad, selectividad y dependencia de Ca^{2+} . Parece ser que el radioligando tritiado se une a un tipo simple de receptor, siendo éste de alta afinidad y presenta una K_d del orden de picomolar, la cual sugiere la posibilidad de la melatonina module la actividad celular por unión a calmodulina, a nivel intracelular y a concentraciones fisiológicas. Si se tiene en cuenta, a su vez, que tanto la melatonina como la calmodulina presentan estructuras muy bien conservadas filogenéticamente, presentes incluso en organismos primitivos (Balzer y Hardeland, 1991), su interacción para modular funciones intracelulares de Ca^{2+} puede representar un mecanismo primario de regulación y sincronización de la fisiología celular.

II.- HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Actualmente, está ampliamente aceptado que la melatonina, principal hormona secretada por la glándula pineal, tiene efectos moduladores sobre el sistema inmune. Se le atribuyen diversos mecanismos de acción a este nivel, que incluyen tanto efectos directos como indirectos sobre las células inmunocompetentes. El mayor número de estudios se ha realizado utilizando modelos animales, fundamentalmente roedores. En la especie humana, prácticamente no existen estudios acerca de la interacción entre la glándula pineal y la función inmune. Solamente se ha publicado un estudio en neutrófilos humanos, en donde se caracterizaron posibles sitios de unión para la melatonina (López-González et al, 1992a; 1993a).

Por lo anteriormente expuesto, los principales objetivos a cumplir en este trabajo son:

1.- Identificar qué subpoblación linfocítica del sistema inmune humano puede unir melatonina, y caracterizar posibles receptores para la citada hormona en dichas células. Para ello se estudian:

- a) Posible unión de melatonina a células mononucleares de sangre periférica, linfocitos T, linfocitos B, células CD4+ y células CD8+,
- b) Caracterización farmacológica y cinética de la unión de melatonina a linfocitos T,
- c) Correlación entre la unión de linfocitos T y B y la excreción urinaria de 6-sulfatoxi-melatonina.

2.- Estudiar la regulación de la producción de citoquinas (IL-2, IL-4, IL-6 e IFN-gamma) por melatonina en cultivos, tanto puros como mixtos, de células mononucleares humanas de sangre periférica.

3.- Investigar acerca de una posible acción nuclear de la melatonina en células mononucleares humanas de sangre periférica.

III.- MATERIAL Y MÉTODOS

III.1.- AISLAMIENTO DE LINFOCITOS T

III.1.1.- Obtención de la muestra: El aislamiento se realizó a partir de sangre total extraída a las 18:00 horas en tubos con anticoagulante ACD según el sistema VACUTAINER® de Becton Dickinson. Las muestras se obtuvieron de voluntarios sanos, adultos de edades comprendidas entre 30 y 55 años.

III.1.2.- Método: El método FLUOROBeads® - T (One Lambda, Los Angeles, California) utiliza microesferas de hierro recubiertas de anticuerpo monoclonal anti-CD2. Las microesferas tienen un diámetro menor de 1 μ y, al estar recubiertas de anticuerpo monoclonal específico de células T, no presentan adherencias con linfocitos B, granulocitos o plaquetas. A partir de 2 mL de sangre completa en contacto con las microesferas, se consiguió un rendimiento final aproximado de $0.5-1.0 \times 10^6$ células T/mL. La separación de las células T unidas a las microesferas se consiguió con la ayuda de un separador magnético, con posterior eliminación del resto del contenido del tubo por aspiración. Después de tres lavados sucesivos con tampón PBS de Dubelcco, pH 7.4, el producto del aislamiento se resuspendió en dicho tampón para conseguir la concentración de células deseada. Éstas deben ser aisladas dentro de las 24 horas tras la extracción, para conseguir el mayor rendimiento. La pureza en las células aisladas fue >98% y la viabilidad, determinada por exclusión con azul de tripán, fue >95%.

III.2.- AISLAMIENTO DE LINFOCITOS B

III.2.1.- Obtención de la muestra: Se procedió del mismo modo que para las células T.

III.2.2.- Método: El método FLUOROBeads®-B (One Lambda, Los Angeles, California) utiliza microesferas de hierro recubiertas de anticuerpo monoclonal anti-CD19, marcador de linaje de las células B. A partir de 5 mL de sangre completa en contacto con las microesferas se consiguió un rendimiento final aproximado de $1.0-2.5 \times 10^6$ células/mL. El procedimiento de separación de las células B es básicamente igual que el de las células T, consiguiéndose la misma pureza y viabilidad de las células.

III.3.- AISLAMIENTO DE CÉLULAS CD4+

III.3.1.- Obtención de la muestra: En este experimento se utilizaron células mononucleares de sangre periférica obtenidas mediante separación por centrifugación en gradiente de densidades, con ficoll-hypaque (Seromed Biochrom, KG, Alemania) según el método de Boyum (1968). La extracción de la muestra se realizó, al igual que en experimentos anteriores, a las 18:00 horas en tubos de EDTA-K₃ según el sistema VACUTAINER® de Becton Dickinson y a partir de donantes sanos, de edades comprendidas entre 30 y 55 años.

III.3.2.- Método: El método DYNABEADS® M-450 CD4 (células T-colaboradoras/inductoras) (Dynal, A. S., Oslo, Noruega) emplea microesferas magnéticas de 4.5 μ de diámetro recubiertas de anticuerpo monoclonal específico para la molécula CD4, marcador de linaje de las células T colaboradoras (T_H) en humanos. El anticuerpo monoclonal se une a las esferas Dynabeads M-450 a través de un segundo anticuerpo para favorecer una orientación óptima del primero. Las esferas se encuentran formando una suspensión que contiene 1.4×10^8 microesferas/mL en un tampón PBS, pH 7.4, con BSA 0.1% y azida sódica 0.02% (Funderud et al, 1987). Una suspensión de células mononucleares que contenía una concentración final de 10^6 células/mL se puso en contacto con las microesferas que contenían 1.27×10^7 /mL de las mismas. La separación de las células CD4+ unidas a las esferas se consiguió con la ayuda de un separador magnético y con la aspiración del resto del contenido del tubo. Después de cinco lavados sucesivos con un tampón calcio-magnesio deficiente pH 7.4 que contenía BSA, el producto del aislamiento se resuspendió en un tampón PBS, 1 mM $CaCl_2$ y 1 mM $MgCl_2$, para conseguir la concentración de células CD4+ deseada. La pureza conseguida en este aislamiento fue >99% y la viabilidad, determinada por exclusión con azul de tripán, fue >95% (Brinchmann et al, 1988).

III.4.- AISLAMIENTO DE CÉLULAS CD8+

III.4.1.- Obtención de la muestra: Se realizó de la misma manera que en el caso de las células CD4+.

III.4.2.- Método: El método DYNABEADS® M-450 CD8 (células T citotóxicas/supresoras) (Dynal, A. S., Oslo, Noruega) utiliza microesferas magnéticas de 4.5 μ de diámetro recubiertas de anticuerpo monoclonal específico para la molécula CD8, expresada por las células T citotóxicas/supresoras en humanos. El anticuerpo monoclonal está absorbido directamente sobre la superficie de las esferas dynabeads-450. Las esferas se encuentran formando una suspensión que contiene 1.4×10^8 microesferas/mL en un tampón PBS, pH 7.4, BSA 0.1% y azida sódica 0.02% (Gaudernack et al, 1986). Una suspensión de células mononucleares que contenía una concentración final de 10^6 células/mL se puso en contacto con las microesferas que contenían 0.97×10^7 microesferas/mL. La separación de las células CD8+ unidas a las esferas se realizó de forma similar al caso de las células CD4+, consiguiéndose el mismo grado de pureza y viabilidad celular (Lea et al, 1986).

III.5.- AISLAMIENTO DE CÉLULAS CD14+

III.5.1.- Obtención de la muestra: Se emplearon células mononucleares humanas de sangre periférica obtenidas mediante separación por centrifugación en gradiente de densidades con ficoll-hypaque (Seromed Biochrom, KG, Alemania) según el método de Boyum, 1968. La extracción de la muestra se llevó a cabo a las 10:00 horas en tubos con anticoagulante EDTA-K₃, según el sistema VACUTAINER®. Las muestras se obtuvieron a partir de voluntarios sanos, de edades comprendidas entre 30 y 55 años.

III.5.2.- Método: El método DYNABEADS® M-450 CD14 (monocitos/macrófagos) (Dynal A.S., Oslo, Noruega) se utiliza para el aislamiento o depleción de forma rápida de células que presentan el antígeno de membrana CD14, mayoritariamente expresado por macrófagos y monocitos humanos (Wright et al., 1990). Está formado por microesferas magnéticas de 4.5 μ de diámetro recubiertas por un anticuerpo monoclonal específico de la clase Ig G_{2a} para la molécula CD14. El anticuerpo se une a las esferas dynabeads M-450 a través de un segundo para favorecer una orientación óptima del primero. El producto se presenta en forma de suspensión que contiene 4×10^8 microesferas/mL en un tampón PBS, pH 7.4, BSA 0.1% y ázida sódica 0.02%.

Tras el aislamiento de las células mononucleares, se añadieron las microesferas a una concentración de 20×10^6 /mL. Se incubaron durante 60 minutos, en rotación y a 4 °C para prevenir uniones inespecíficas de células fagocíticas a las esferas. Con una hora de incubación se consigue aproximadamente un 98% de células deplecionadas. Posteriormente, se añadió tampón PBS calcio-magnesio deficiente suplementado con suero fetal al 0.3% y se mantuvieron las muestras durante tres minutos en el separador magnético. Transcurrido este tiempo se tomaron las células CD14-, esto es, las no retenidas por el imán, para su posterior cultivo.

III.6.- UNIÓN DE MELATONINA A LINFOCITOS

III.6.1.- Obtención de la muestra: Las muestras utilizadas en este caso, fueron las células mononucleares sanguíneas y las distintas subpoblaciones celulares anteriormente aisladas, es decir, células T, B, CD4+ y CD8+. Cada una de ellas se

resuspendió en un tampón PBS, pH 7.4, para conseguir la concentración apropiada en cada caso.

III.6.2.- Método: El experimento consistió, básicamente, en una incubación de las células en un tampón PBS, pH 7.4, 1 mM CaCl₂ y 1 mM MgCl₂, con 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina a una concentración de 100 pM. Ésta fue proporcionada por Radiochemical Centre (Amershan, Reino Unido). La actividad específica del radioligando fue de 1900-2175 Ci/mmol y se utilizó durante 60 días. La pureza del radioligando se obtuvo mediante cromatografía en columna con sílica gel (SGCC) y fue superior al 95%. La incubación se realizó a temperatura ambiente y en rotación, y después se añadió tampón PBS, pH 7.5, frío, para parar la reacción. Posteriormente, se centrifugó, se aspiró el sobrenadante y se midió la radiactividad del precipitado en un contador gamma, modelo LKB 1261 Multigamma, de la casa comercial WALLAC. La unión no específica de la melatonina a las células se definió como la que ocurre en presencia de melatonina fría a una concentración final de 10 µM. Ésta fue proporcionada por SIGMA (San Luis, MO, USA).

Para el caso de células T y B se utilizó una concentración de 10⁶ células/mL y para las subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺ se empleó una concentración final en el medio de incubación de 0.5x10⁶ células/mL.

III.7.- DETERMINACIÓN DE 6-SULFATOXI-MELATONINA

III.7.1.- Obtención de la muestra: El análisis de 6-sulfatoximelatonina se realizó en muestras de orina procedentes de voluntarios sanos. Se recogió la orina de 12

horas (20:00 - 08:00) en frascos de plástico que contenían 2 gramos de ácido bórico como conservante. Se tomaron alícuotas de 5 mL y se congelaron a -20°C hasta su cuantificación posterior.

III.7.2.- Método: Se empleó un radioinmunoensayo directo para la determinación de 6-sulfatoximelatonina en las muestras de orina (Stockgrand Ltd., Guilford, Surrey, Reino Unido). Las muestras se diluyeron previamente y se analizaron por duplicado. La concentración de 6-sulfatoximelatonina se determinó con una curva standard dosis-respuesta (Aldhous y Arendt, 1988). El coeficiente de variación intra-ensayo a concentraciones de 8 y 50 ng/mL fue de 3.6 (n=10) y 8.1 (n=10), respectivamente. El coeficiente de variación inter-ensayo a las mismas concentraciones fue de 9.8 (n=8) y 11.1 (n=8), respectivamente. La sensibilidad del método se establece en 2 ng/mL, el valor mínimo utilizado en la curva standard.

III.8.- CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA

Se incubaron las células T, separadas según procedimiento anterior, con 2- ^{125}I iodomelatonina a una concentración 100 pM y en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de melatonina o diferentes metabolitos implicados en la ruta biosintética de la hormona. Las concentraciones empleadas de los distintos intermediarios fueron de hasta 0.1 mM y la incubación se llevó a cabo a 25°C durante 20 minutos. La unión se inhibió por concentraciones crecientes de melatonina fría. La melatonina, 6-hidroxi melatonina, N-acetilserotonina, 5-hidroxitriptofol, 5-metoxitriptofol, triptamina, 5-hidroxitriptamina, 5-hidroxi-L-Triptófano, 5-metoxi-DL-triptófano, 5-metoxitriptamina,

ácido 5-hidroxiindol-3-acético, ácido 5-metoxiindol-3-acético y DL-triptófano fueron proporcionados por la casa comercial SIGMA (San Luis, MO, USA).

III.9.- CULTIVOS CELULARES

III.9.1- Cultivos puros de células mononucleares: A partir de donantes sanos se obtuvieron muestras de sangre en tubos con anticoagulante EDTA-K₃ según el sistema VACUTAINER®. Se cultivaron células mononucleares de sangre periférica obtenidas mediante separación por centrifugación en gradiente de densidades con ficoll-hypaque (Seromed Biochrom, KG, Alemania), según el método de Boyum (1968), consiguiéndose una concentración final de 10⁶ células/mL. La pureza conseguida en las células aisladas fue >98% y la viabilidad, determinada por exclusión con azul de tripán, fue >95%. Los cultivos se realizaron en microplacas de 96 pocillos (GREINER, Labortechnik). El medio de cultivo empleado fue RPMI-1640 (GIBCO, Grand Island, Nueva York) con HEPES 25 mM, suplementado con suero fetal de ternera (10%), inactivado con calor a 56° C durante 60 minutos, L-glutamina (1%), penicilina/estreptomicina (0.2%) y PHA a concentraciones variables de 0.5, 2.0, 4.0 y 8.0 µg/mL, según el caso. Éste fue proporcionado por SIGMA (St. Luis, MO, USA). También se añadió melatonina a los cultivos a concentraciones de 10⁻⁶ y 10⁻⁹ M. La hormona fue suministrada, igualmente, por SIGMA. Cuando procedió, se utilizó un análogo del receptor nuclear de melatonina, CGP-52608, que se incorporó a los cultivos a una concentración de 10⁻⁶ M. Este producto constituye el primer ligando sintético del receptor nuclear de la hormona. Se trata de una tiazolidin-diona (1-[3-alil-4-oxo-tiazolidin-2iliden]-4-metil-tiosemi-carbazona) y fue cedido por la Dra. Irmgard Wiesenberg, de los laboratorios Ciba-Geigy AG (Basel, Suiza).

La siembra se llevó a cabo con una concentración de 10⁶ células/mL y la incubación se realizó en estufa a 37°C, con CO₂ al 5% durante 72 horas. Tras este período, se separaron las células por centrifugación y se congelaron los sobrenadantes a -80°C para posteriores

análisis.

III.9.2.- Cultivos mixtos de células mononucleares: Estos cultivos se hicieron con una concentración final de 10^6 células productoras/mL y 0.5×10^6 /mL de células alogénicas estimuladoras irradiadas con luz ultravioleta durante 5 horas (Quan et al, 1993). El resto de las condiciones de cultivo fueron similares a las de los cultivos puros.

III.10.- DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS

III.10.1.- Obtención de la muestra: Se utilizaron los sobrenadantes de los cultivos celulares, tanto de cultivos puros, como de cultivos mixtos que se habían congelado a -80°C . Todas las muestras se procesaron por duplicado.

III.10.2.- Determinación de IL-2: La concentración de esta citoquina se midió con técnicas de ELISA tipo sandwich, utilizando un kit comercial (Immunotech Internacional, Marsella, Francia). La sensibilidad de la técnica fue de 10 pg/ml (Gearing y Thorpe, 1988).

III.10.3.- Determinación de IL-4: Se utilizó un inmunoensayo específico tipo ELISA de Immunotech Internacional cuya sensibilidad fue de 1.5 pg/mL.

III.10.4.- Determinación de IL-6: Se empleó, igualmente, una técnica de ELISA tipo sandwich de Immunotech Internacional, cuya sensibilidad fue de 3 pg/mL (Honda et al, 1990).

III.10.5.- Determinación de IFN- γ : Se utilizó un enzoinmunoanálisis específico de ELISA de la casa comercial CLB (CLB, Amsterdam, Holanda), con una sensibilidad de 5 pg/mL.

III.11.- DETERMINACIÓN DE CÉLULAS CD4+ Y CD8+

III.11.1.- Obtención de la muestra: Se utilizaron células mononucleares de sangre periférica cultivadas durante 8 días con PHA a una concentración de 4 μ g/mL, en presencia o ausencia de melatonina a una concentración de 1 μ M, a las que a las 96 horas de cultivo se les había renovado el medio.

III.11.2.- Determinación de subpoblaciones CD4+ y CD8+ por técnicas de citometría de flujo: Se empleó un citómetro de flujo modelo FACSORT™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Inc., Mountain View, CA), equipado con un láser de argón que emite a 488 nm., capaz de excitar FITC, PE, y PerCP. El solapamiento entre los fluorocromos fue corregido utilizando compensaciones electrónicas. Otros parámetros utilizados fueron la dispersión frontal (FSC) y la dispersión lateral (SSC). Los datos fueron almacenados en un ordenador CONSORT™ 32 (Becton Dickinson) y analizados utilizando el programa LYSIS™ II.

El estudio de los marcadores CD4 y CD8 se realizó utilizando el reactivo Simultest™ CD4/CD8 (Leu™- 3a/2a) para citómetro FACSORT™ (Becton Dickinson) (Landay y Muirhead, 1989). Contiene dos anticuerpos monoclonales murinos, uno conjugado con FITC y otro conjugado con PE, permitiendo la determinación de los porcentajes de células CD4+ y CD8+ para calcular posteriormente el cociente CD4/CD8.

IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1.- UNIÓN DE MELATONINA A LINFOCITOS

IV.1.1.- Unión de melatonina a linfocitos T y B: Se realizó inicialmente la separación de linfocitos T y B según se detalla en el apartado de material y métodos. Utilizando una concentración de 1×10^6 células/mL, se incubaron las células con 2- ^{125}I -iodomelatonina a una concentración de 100 pM, durante 20 minutos a 25°C . En la Fig. 8 se representan los resultados de esta unión, en donde cada punto es la media \pm SE de 8 experimentos realizados por duplicado. Como puede verse, la unión a linfocitos T es claramente superior a la unión a linfocitos B, aunque ésta última no puede descartarse.

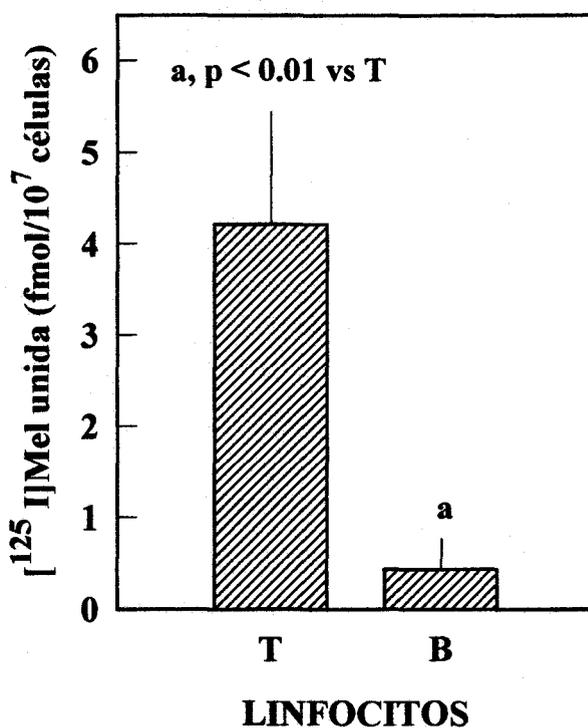


Fig. 8: Unión de la 2- ^{125}I -iodomelatonina a linfocitos T y B.

IV.1.2.- Correlación entre la unión de melatonina a linfocitos

T y B y la excreción urinaria de 6-sulfatoxi-melatonina: Se realizó este experimento con el fin de investigar si la producción de melatonina podía afectar a la expresión de los sitios de unión de la misma. Así, se observó una correlación inversa entre la producción de la hormona, expresada como excreción nocturna de uno de sus principales metabolitos en orina, la 6-sulfatoxi-melatonina, y la unión de 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina a linfocitos T. Esto se muestra en la Fig. 9, en donde se expone también la correlación respecto a los linfocitos B. En ésta última, no hubo unión a melatonina, incluso cuando los valores de 6-sulfatoxi-melatonina fueron bajos.

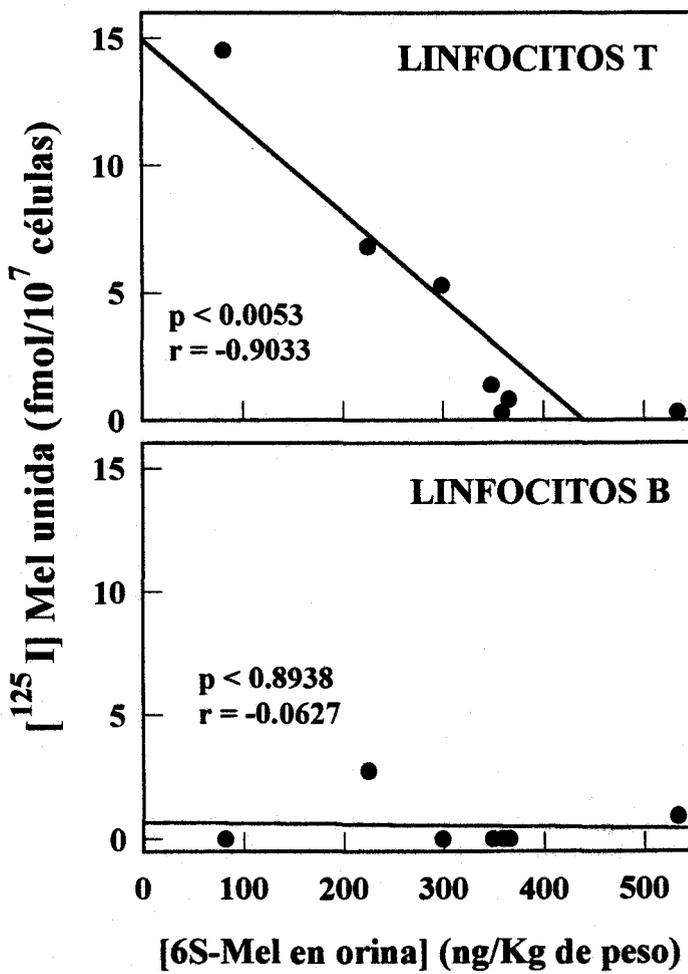


Fig. 9: Correlación entre la unión de 2-[¹²⁵I]-iodo melatonina a linfocitos T y B y la excreción urinaria de 6-sulfatoxi-melatonina.

IV.1.3.- Curva asociación-disociación de la unión de 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina a linfocitos T humanos: Se aislaron los linfocitos T y se incubaron con el trazador a una concentración de 100 pM, observándose la unión a distintos tiempos, tal y como se indica en la Fig. 10. La unión alcanzó su valor máximo a los 20 minutos y permaneció estable durante 30. La extracción del radioligando después de 20 minutos de incubación mostró que más del 95% de la radiactividad emigró en una cromatografía en columna de sílica-gel con 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina pura. Después de alcanzarse el equilibrio, la unión de melatonina iodinada a células T fue reversible. Se estudió la disociación del complejo trazador-membrana por la adición de melatonina fría 100 μM, obteniéndose una vida media de disociación de aproximadamente 4 minutos. Por tanto, la presencia de melatonina en el medio de incubación no sólo revirtió la unión del radioligando, sino también la evitó. Cada experimento es la media ±SE de tres experimentos realizados por duplicado.

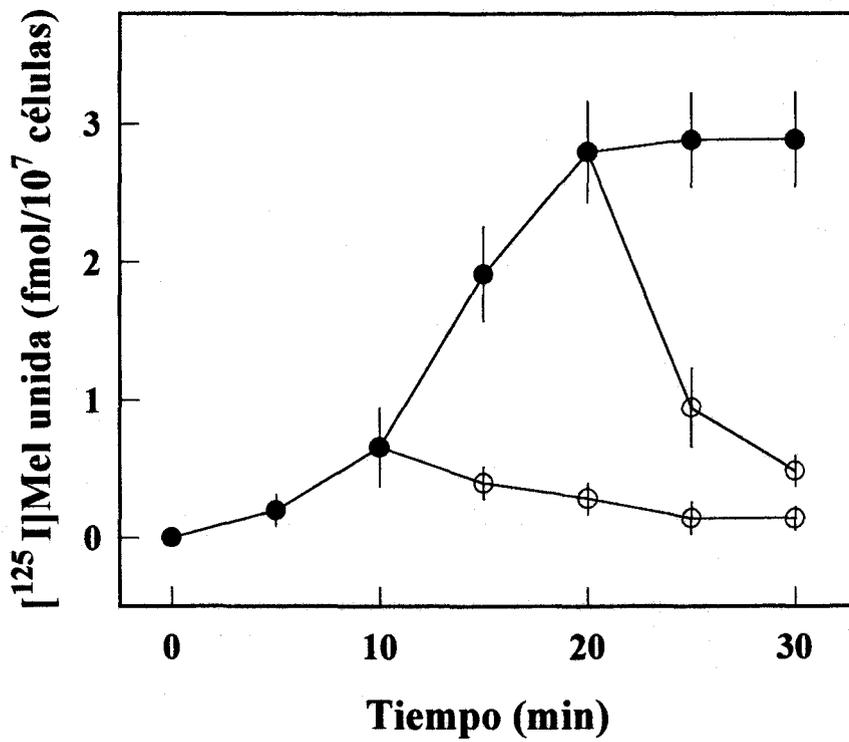


Fig. 10: Curva asociación-disociación de la unión de 2- $[^{125}\text{I}]$ -iodomelatonina a linfocitos T humanos.

IV.1.4.- Isoterma de saturación de la unión de la 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina a linfocitos T humanos: Los estudios estequiométricos mostraron que la unión específica de 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina a linfocitos T humanos aumentó con concentraciones crecientes del trazador, aproximándose a la saturación a una concentración de 800 pM. El análisis de Scatchard (1949) de los datos mostró una recta sugerente de un sólo tipo de lugares de unión. Se obtuvo un valor de $K_D=0.27\pm 0.05$ nM y una capacidad de unión de 2.10 ± 0.76 fmol/ 10^7 células. Cada experimento es la media \pm SE de cuatro experimentos realizados por duplicado. Estos resultados se muestran en la Fig. 11.

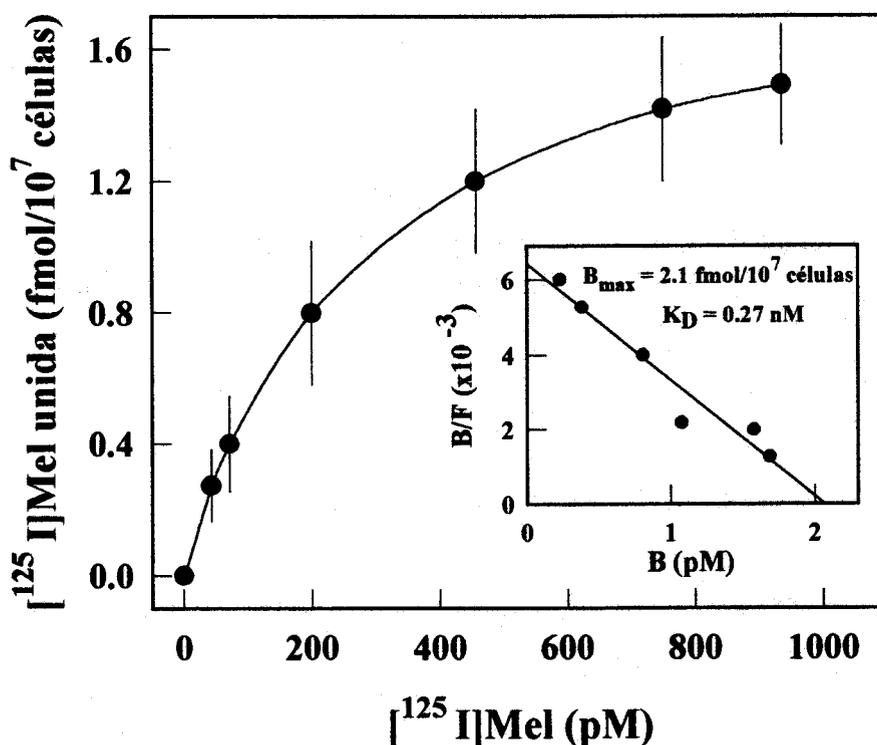


Fig. 11: Isoterma de saturación de la unión de 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina a linfocitos T humanos.

IV.1.5.- Unión de melatonina a linfocitos T CD4+ y CD8+: Se estudiaron dos subpoblaciones de linfocitos T, CD4+ y CD8+, para ver si podían unir melatonina. Se aislaron en primer lugar las células CD4+ y CD8+, según se detalla en el apartado de material y métodos. Utilizando una concentración de 1×10^6 células/mL, se incubaron las células con 2-[^{125}I]-iodomelatonina a una concentración de 100 pM, durante 20 minutos a 25°C. Paralelamente, se incubaron en las mismas condiciones células mononucleares de sangre periférica. En la Fig. 12 se muestra la unión de melatonina a células mononucleares (CMN), linfocitos T (LT), linfocitos B (LB), células CD4+ y CD8+. Cada punto es la media \pm SE de ocho experimentos realizados por duplicado. Como puede apreciarse, aunque existe unión a todos los tipos de células, es significativamente superior en el caso de la subpoblación de células CD4+.

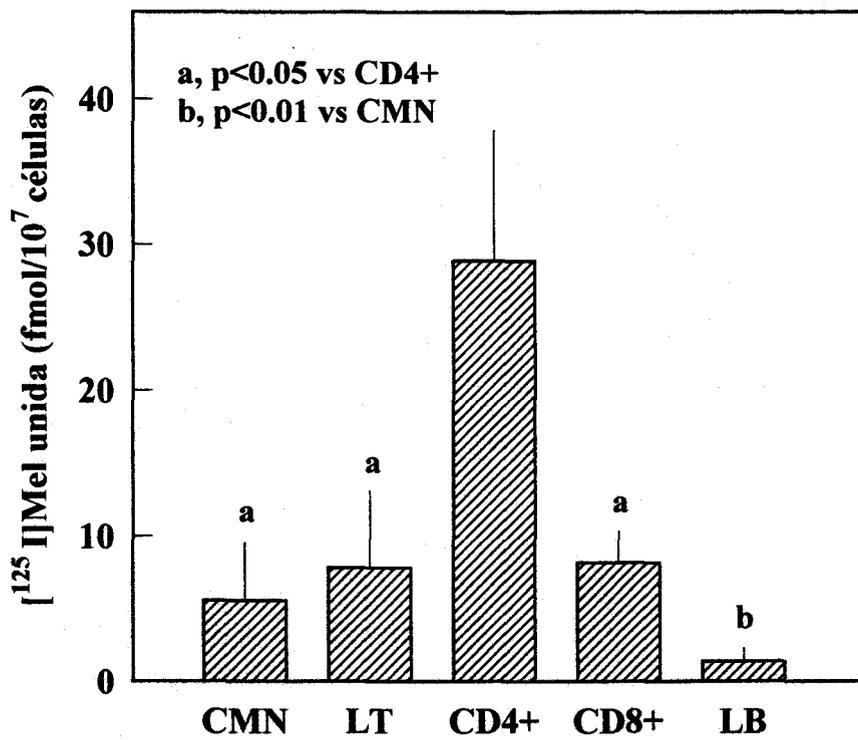


Fig. 12: Unión de la 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina a células mononucleares (CMN), células T (LT), células CD4+ y CD8+.

IV.1.6.- Perfil farmacológico de los lugares de unión de la 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina en linfocitos T humanos: La caracterización farmacológica de la unión de 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina se realizó con melatonina y diferentes metabolitos implicados en la ruta biosintética de la hormona. Se utilizó una concentración 100 pM de radioligando. Los resultados, expuestos en Tabla 4, muestran que el sitio de unión para melatonina en linfocitos T es altamente específico para la hormona. La unión fue inhibida por concentraciones crecientes de melatonina fría; La IC₅₀, esto es, la concentración de droga capaz de inhibir la unión del radioligando a las células en un 50%, se observó a una concentración 0.89 nM de melatonina. Sólo la 6-hidroximelatonina, al igual que la melatonina, desplazó al trazador, aunque fue cien veces menos efectiva que la hormona. Otros indoles, como los 5-hidroxiindoles o 5-metoxiindoles no fueron efectivos en desplazar la melatonina. Los resultados fueron la media de dos experimentos realizados por duplicado.

Tabla 4: Perfil farmacológico del sitio de unión de la 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina en linfocitos T humanos.

Fármacos	IC ₅₀ , nM	
5-metoxiindoles	Melatonina	0.89
	6-hidroximelatonina	74
	Ácido 5-metoxiindol-3-acético	16500
	5-metoxitriptofol	18700
	5-metoxil-DL-triptófano	>100000
	5-metoxitriptamina	>100000
5-hidroxiindoles	N-acetilserotonina	2100
	Ácido 5-hidroxiindol-3-acético	1100
	5-hidroxitriptofol	17000
Indoles	Triptamina	28000
	DL-triptófano	>1000

IV.1.7.- Discusión: Los resultados anteriormente expuestos muestran que la melatonina puede interactuar con las células T humanas a través de sitios de unión de alta afinidad. No ocurre lo mismo con los linfocitos B en donde la unión fue escasa. La unión de 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina a linfocitos T cumple todos los criterios de la unión a receptores, esto es, dependencia del tiempo, reversibilidad, saturabilidad, especificidad y alta afinidad. La isoterma de saturación se obtuvo utilizando exclusivamente concentraciones crecientes del radioligando iodinado de melatonina. La interpretación de los datos por el análisis de Scatchard (1949) reveló un único sitio de unión de alta afinidad para la melatonina en linfocitos T, con una constante de afinidad (K_d) cuyo valor fue de 0.27 nM. Por tanto, esta interacción radioligando-receptor implica un tipo simple de receptor a través de una reacción bimolecular reversible. La afinidad de este sitio de unión encontrado en células T humanas es del mismo orden que la que se ha descrito en células mononucleares totales de sangre periférica, también en humanos (López-González et al, 1992a). Este mismo grupo ha estudiado posibles receptores para la melatonina en neutrófilos y ha encontrado un tipo simple de receptor pero, a diferencia de los anteriores son de baja afinidad, con constantes de afinidad 10^4 veces menores que las obtenidas para linfocitos T (López-González et al, 1993a). Hasta ahora, en humanos no hay más bibliografía disponible que hable de posibles receptores para la hormona pineal en el sistema inmune. Sí se han descrito sitios de unión en timo de rata (López-González et al, 1993b) y esplenocitos de rata (Rafii-El-Idrissi et al, 1995). La K_d en ambos casos tuvo el mismo rango que el obtenido para linfocitos T humanos. Recientemente, Maestroni (1995) ha encontrado receptores de alta afinidad para la 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina en linfocitos T colaboradores tipo 2 (T_{H2}) de la médula ósea de ratones. Una vez más la afinidad fue del orden de nanomolar (0.346 nM).

Tejidos cerebrales como la eminencia media (Vanecek, 1988), la pars tuberalis (Weaver et al, 1989), el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (Laitinen y Saavedra, 1990b) o el área postrema (Laitinen et al, 1990) se han definido como dianas importantes para la melatonina en animales, encontrándose en todas ellas receptores con afinidades de 10 a 50 veces superiores a las descritas en los tejidos y células del sistema inmune. Otras hormonas también presentan distintos valores de constantes de afinidad según el tejido o especie estudiada (Guerrero et al, 1994). Concretamente, el valor de K_d obtenido en el caso que nos ocupa, el sitio de unión para la melatonina en los linfocitos T, es similar a las concentraciones séricas nocturnas de la melatonina en humanos (200 pM)(Reiter, 1986), lo cual permite el reconocimiento de los sitios de unión por parte de la melatonina circulante. Además, permite sugerir un papel fisiológico para la hormona en estas células del sistema inmune.

La caracterización farmacológica de este sitio de unión indicó que únicamente la 6-hidroximelatonina fue capaz de desplazar de forma efectiva el radioligando iodinado unido a los linfocitos. Indoles como los 5-hidroxi y 5-metoxiindoles no fueron efectivos en dicha acción. Estos resultados concuerdan con los de nuestro grupo (López-González et al., 1992a; López-González et al., 1993b; López-González et al., 1993a) y con los de otros autores (Yu y Pang, 1991; Pang y Pang, 1992; Poon y Pang, 1992b; Vanecek, 1988; Laitinen y Saavedra, 1990b), tanto en órganos no pertenecientes al sistema inmune como en el propio sistema inmune.

En este mismo estudio se encontró una relación inversa entre la unión de la melatonina a linfocitos T y la excreción urinaria de la 6-sulfatoxi-melatonina, uno de los principales metabolitos de la hormona en orina. Así, individuos que presentaron gran eliminación de este producto por orina mostraron una unión pequeña, y viceversa. El mismo experimento se realizó para linfocitos B y no ocurrió lo mismo. La unión en este caso fue siempre escasa o nula y no se relacionó en ningún momento con la excreción de la 6-sulfatoxi-melatonina. Estos resultados apoyan estudios anteriores sobre la regulación de los receptores. Algunos autores han visto, igualmente, que la unión de la melatonina a sus

receptores en los distintos tejidos diana fue tanto mayor cuanto menor era el nivel de melatonina, incluso tras mantener a los animales de experimentación bajo condiciones de luz constante durante varios días (Rafii-El-Idrissi et al, 1995).

Laitinen y colaboradores (1989) han mostrado cómo la capacidad de unión de la hormona en el núcleo supraquiasmático de rata presenta variaciones diurnas significativas, con valores máximos durante el período de luz. Resultados similares se obtuvieron en el estudio de cerebro de paloma, donde la unión máxima correspondió a la última fase del período de oscuridad, justamente cuando los niveles circulantes de la melatonina son mínimos (Yuan y Pang, 1991). Del mismo modo, este tipo de estudios se han hecho administrando la hormona de forma exógena. En este caso, la sensibilidad a la melatonina parece estar inversamente relacionada con los niveles endógenos de la hormona en la especie animal considerada. A este respecto, Reiter et al (1980) sostienen que este cambio de sensibilidad antes mencionado podría estar relacionado con alteraciones en las respuesta de los receptores de la melatonina.

Una vez visto que son los linfocitos T una de las principales dianas de la melatonina en el sistema inmune humano, surge la necesidad de investigar qué subpoblación de células T es capaz de unir dicha hormona. Dicha subpoblación son las células CD4+, lo cual sugiere que estas células CD4+ son las células dianas de la melatonina entre las células inmunocompetentes. Igualmente, podrían existir otras subpoblaciones linfocitarias como posibles dianas, aunque esto todavía no está claro. Ahora bien, la demostración de estos sitios de unión para la 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina en las células CD4+, proporciona un gran apoyo a la hipótesis que considera que el efecto regulador de la melatonina sobre el sistema inmune está mediado por unión de la misma a las células CD4+. Como es bien sabido, esta estirpe celular desempeña un papel central en la respuesta inmune, tanto humoral como celular. Ante la llegada de antígenos recibe estímulos procedentes de otras células y envía respuesta a otras, mediante la liberación de mediadores inmunológicos que posibilitan una respuesta eficaz para el huésped (Bierer et al, 1989; Miceli y Parnes, 1993). A este respecto, ya en 1986, Maestroni et al probaron que el efecto de la melatonina sobre la función inmune

afectaba a la inmunidad mediada por células, pero la hormona solamente ejercía dicho efecto en presencia de antígenos. Posteriormente, este mismo grupo de investigadores (Maestroni et al, 1987) sugirieron que los linfocitos T activados por antígenos podían ser las posibles células dianas de la acción de la melatonina, una acción que estaría mediada por péptidos opioides. Estos resultados fueron completados cuando observaron que la melatonina era capaz de estimular células murinas CD4+ activadas (Thy-1⁺) a liberar agonistas opioides con propiedades inmunoestimuladoras (Maestroni y Conti, 1990a).

IV.2.- INFLUENCIA DE LA MELATONINA SOBRE EL COCIENTE CD4/CD8

IV.2.1.- Efecto de la melatonina sobre el cociente CD4/CD8 en cultivos de células mononucleares humanas de sangre periférica: En este caso se utilizó como mitógeno el PHA, a una concentración de 4 $\mu\text{g/mL}$. Las células se dividieron en dos grupos, a uno de los cuales se añadió melatonina a una concentración de 1 μM . Después de 96 horas de incubación y tras una centrifugación, se añadió medio de cultivo nuevo y se continuó la incubación otras 96 horas. Finalmente, se determinaron las subpoblaciones de células T CD4+ y CD8+ por técnicas de citometría de flujo, con el fin de calcular el cociente CD4/CD8. En la Fig. 13 se muestran los resultados de este experimento, en donde se aprecia que dicho cociente fue superior de forma significativa en las células cultivadas con melatonina.

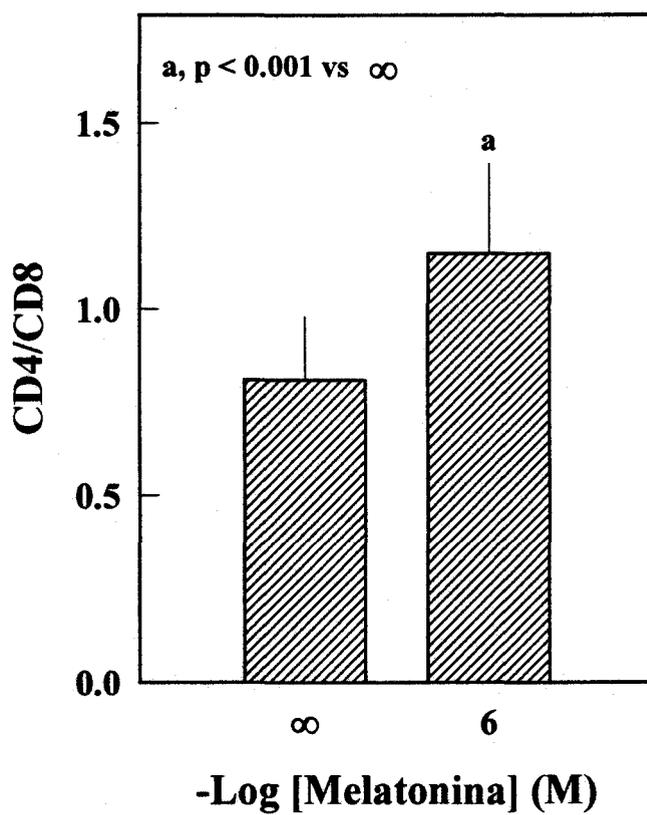


Fig. 13: Efecto de la melatonina sobre el cociente CD4/CD8 en cultivos de células mononucleares de sangre periférica.

IV.2.2.- Discusión: Como puede apreciarse en la figura anterior las células cultivadas en presencia de melatonina presentaron un cociente CD4/CD8 superior. En este caso se utilizaron sujetos sanos y los ensayos se realizaron *in vitro*, utilizando cultivos celulares de sangre periférica humana. Hallazgos similares se han encontrado en estudios hechos con enfermos de cáncer. Lissoni et al. (1989) realizaron un ensayo administrando melatonina a enfermos de cáncer con metástasis y que no respondían a terapias clásicas. En el seguimiento de dichos pacientes encontraron que en aquellos en los que la enfermedad no progresó, el cociente CD4/CD8 fue significativamente mayor que antes del inicio del tratamiento con la hormona. Sin embargo, en aquellos enfermos en los que la enfermedad progresó, dicho cociente disminuyó.

Este aumento del cociente CD4/CD8 en presencia de melatonina, tanto en enfermos como en sujetos sanos, hacen que esta hormona pueda ser útil desde el punto de vista terapéutico. Asimismo, dicho cociente puede utilizarse como un marcador pronóstico en el seguimiento de la enfermedad.

En conclusión, estos resultados confirman una vez más la acción moduladora de la melatonina exógena en las respuestas inmunes.

IV.3.- EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS EN CULTIVOS DE CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS DE SANGRE PERIFÉRICA

IV.3.1.- Producción de citoquinas a distintas concentraciones de PHA:

En primer lugar se estudió el efecto del PHA sobre la producción de citoquinas en cultivos de células mononucleares. Se emplearon concentraciones crecientes de PHA, comprendidas entre 0 y 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En la Fig. 14 se muestra la producción de interleuquina-2, interleuquina-4, interleuquina-6 e interferón- γ a distintas concentraciones de PHA. En todos los casos se observó un aumento significativo de la citoquina en cuestión al incrementarse la concentración de mitógeno.

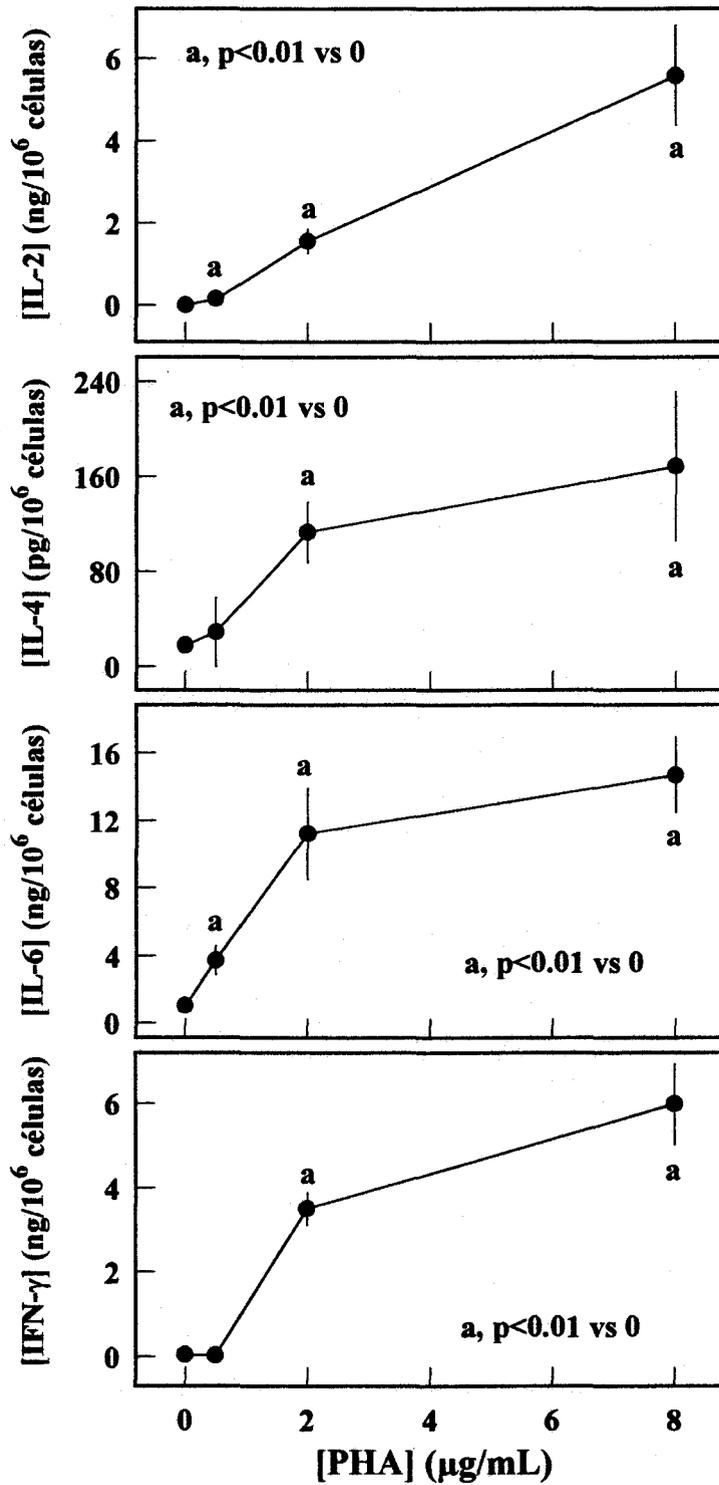


Fig. 14: Efecto del PHA sobre la producción de citoquinas en cultivos de células mononucleares humanas de sangre periférica.

IV.3.2.- Efecto de la melatonina sobre la producción de interleuquina-2 en cultivos de células mononucleares humanas de sangre periférica:

Para ver el efecto de la melatonina sobre la producción de interleuquina-2 se cultivaron las células en presencia de distintas concentraciones de PHA. Las concentraciones de hormona empleadas fueron 1nM y 1µM, concentraciones fisiológica y farmacológica de la hormona, respectivamente. Como puede observarse en la Fig.15, cuando se emplearon concentraciones relativamente altas de mitógeno (2 y 8 µg/mL) no se apreció efecto estimulador de la melatonina sobre la producción de interleuquina-2. Incluso se observa cierto efecto inhibitorio. Sin embargo, cuando se utilizaron concentraciones bajas de mitógeno (0.5 µg/mL) o en ausencia de éste, la melatonina fue capaz de aumentar significativamente la producción de interleuquina-2.

[INTERLEUQUINA-2]

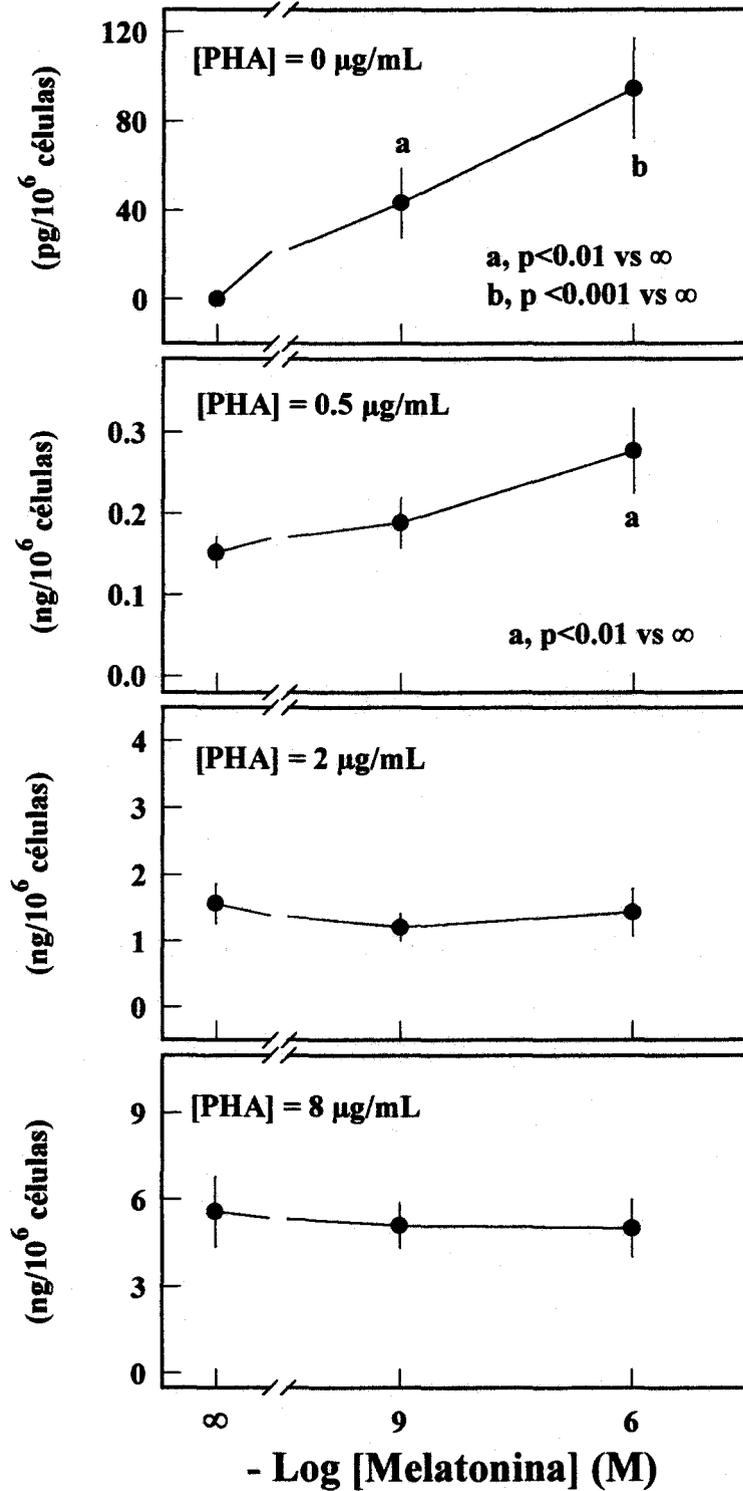


Fig. 15: Efecto de la melatonina sobre la producción de interleuquina-2 en cultivos de células mononucleares humanas de sangre periférica.

IV.3.3.- Efecto de la melatonina sobre la producción de interleuquina-4 en cultivos de células mononucleares humanas de sangre periférica:

Este ensayo se realizó de manera similar al caso de la interleuquina-2, mostrado anteriormente en la Fig. 15. En este caso, independientemente de la concentración de PHA empleada, la melatonina no fue capaz de estimular la producción de interleuquina-4. Estos resultados se muestran en la Fig. 16.

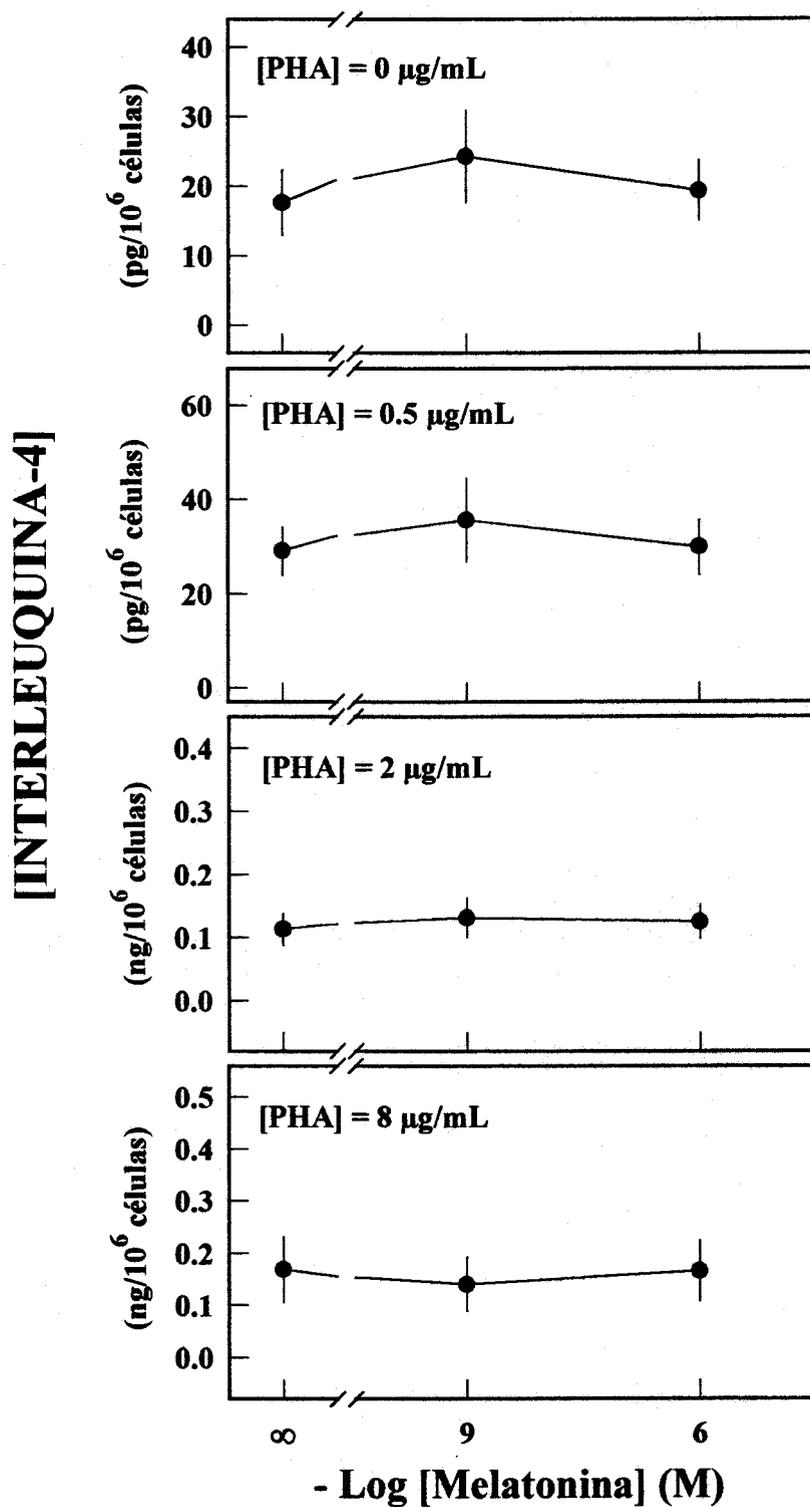


Fig. 16: Efecto de la melatonina sobre la producción de interleuquina-4 en cultivos de células mononucleares humanas de sangre periférica.

IV.3.4.- Efecto de la melatonina sobre la producción de interleuquina-6 en cultivos de células mononucleares humanas de sangre periférica:

Como se muestra en la Fig. 17 la melatonina produjo una estimulación de la producción de interleuquina-6 a las concentraciones empleadas, 1nM y 1µM, respectivamente. En presencia de cualquier concentración de PHA, no se produjo ninguna estimulación de la producción de dicha citoquina por parte de la melatonina, lo cual si se aprecia y, de forma significativa, cuando el mitógeno estuvo ausente. En todas las condiciones estudiadas pueden verse, incluso, niveles basales importante de interleuquina-6, que se van incrementando al aumentar la concentración de PHA, y que son mínimos cuando dicho mitógeno está ausente.

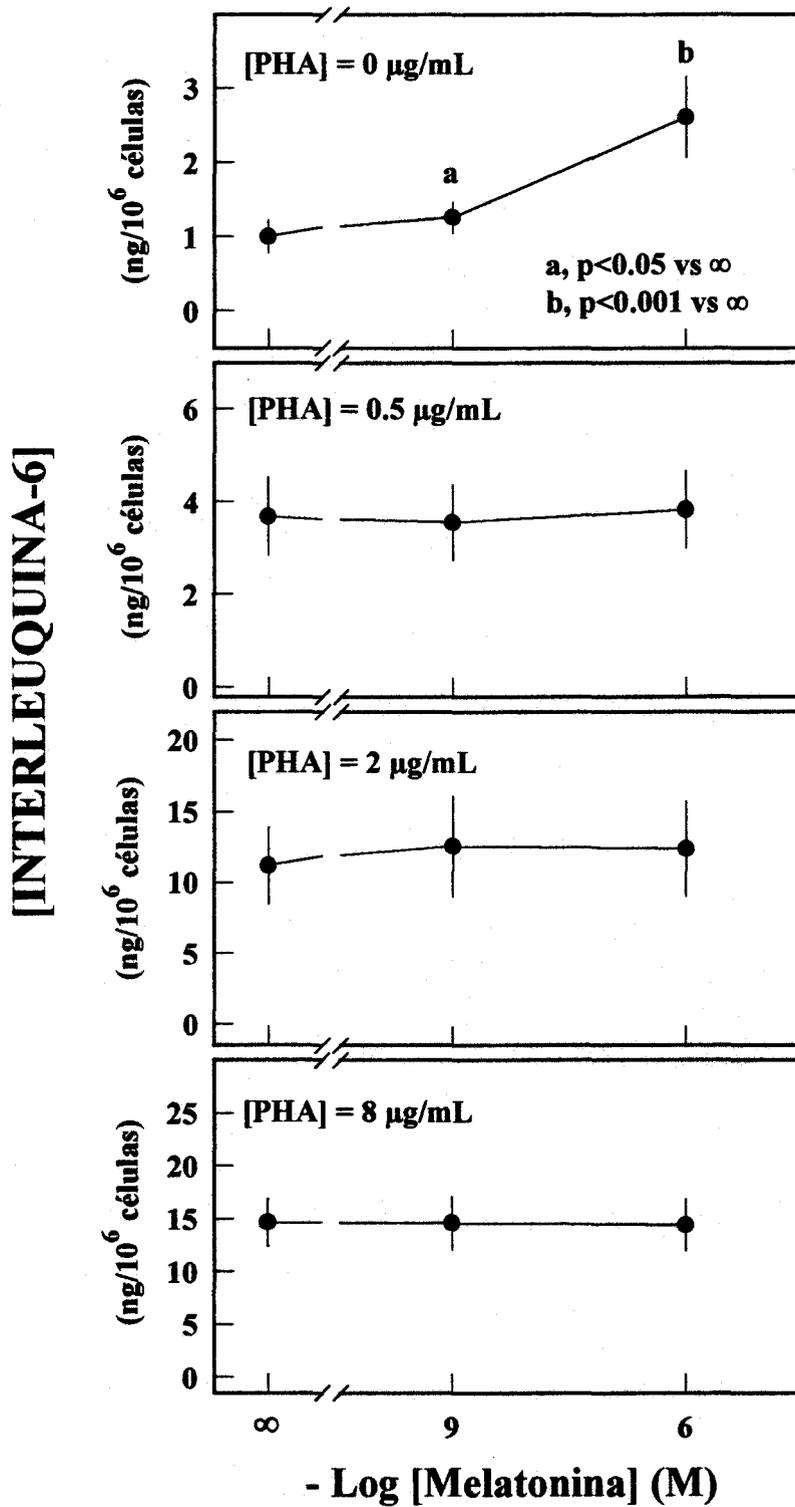


Fig. 17: Efecto de la melatonina sobre la producción de interleuquina-6 en cultivos de células mononucleares humanas de sangre periférica.

IV.3.5.- Efecto de la melatonina sobre la producción de interferón- γ en cultivos de células mononucleares humanas de sangre periférica:

Una vez más no puede advertirse efecto estimulador de la melatonina cuando se adiciona el agente mitógeno a distintas concentraciones. Así, la producción de interferón- γ tan sólo se incrementó de forma significativa a la concentración 1 μ M de melatonina y cuando no se añadió PHA al medio de cultivo. Estos resultados se representan en la Fig. 18 en donde puede observarse que la producción de esta citoquina concuerda con el caso de interleuquina-2 e interleuquina-6, y no con la producción de interleuquina-4.

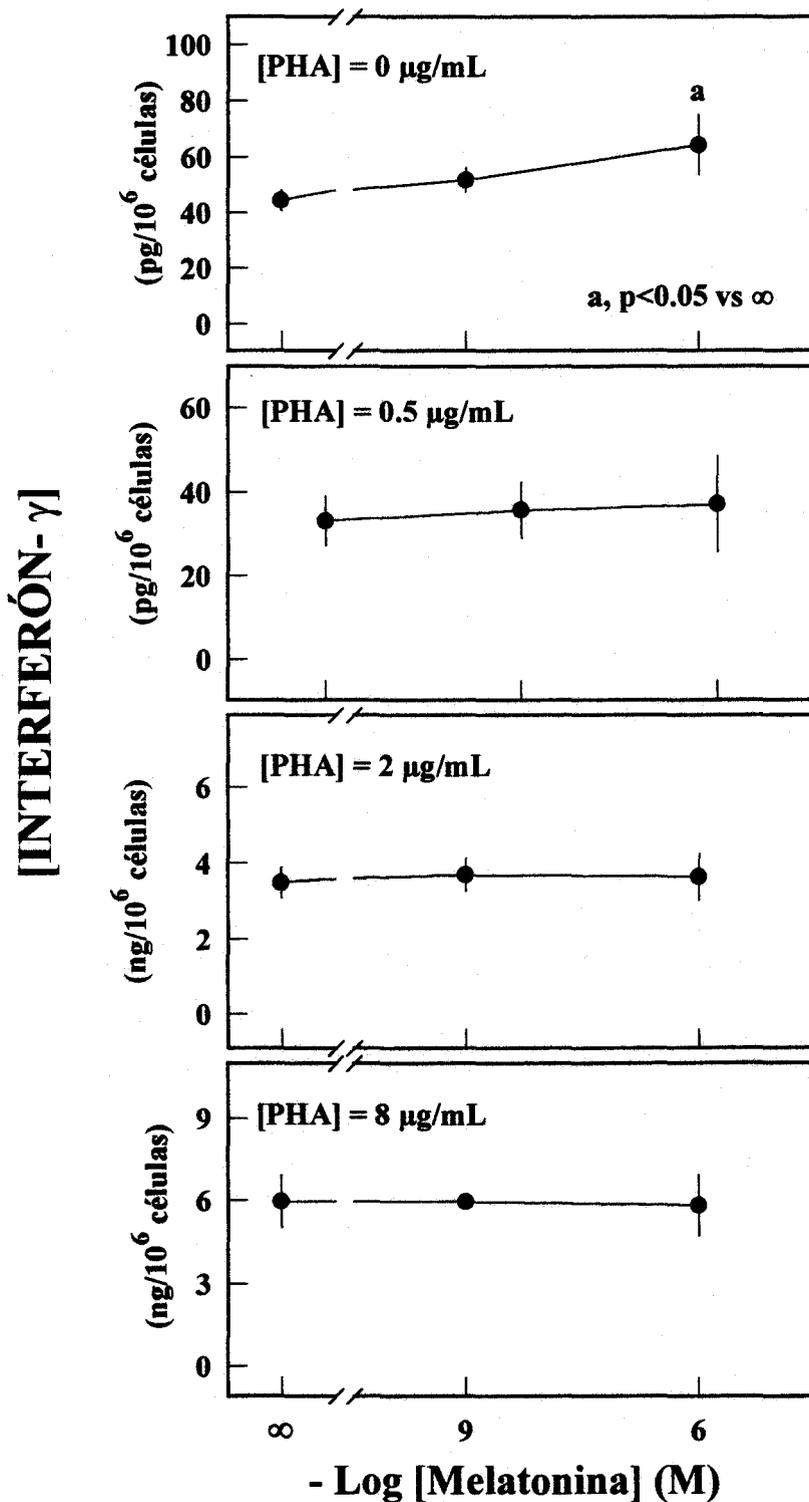


Fig. 18: Efecto de la melatonina sobre la producción de interferón-γ en cultivos de células mononucleares humanas de sangre periférica.

IV.3.6.- Efecto de la melatonina sobre la producción de interleuquina-2, interleuquina-4, interleuquina-6 e interferón- γ en cultivos mixtos de células mononucleares humanas de sangre periférica:

Para valorar si la melatonina podía actuar sobre linfocitos humanos en presencia de un estímulo fisiológico, se estudió el efecto de la hormona sobre la producción de citoquinas en cultivos mixtos linfocitarios. En el apartado III.9.2 del material y métodos se explica cómo se llevaron a cabo estos cultivos. Al igual que con los cultivos puros se midieron las citoquinas interleuquina-2, interleuquina-4, interleuquina-6 e interferón- γ . En la Fig. 19 se presentan los resultados de este experimento. Una vez más se confirma que la melatonina puede aumentar de forma significativa la producción de interleuquina-2, interleuquina-6 e interferón- γ en presencia de estímulos adecuados, tanto si se utiliza melatonina a una concentración de 1 nM como 1 μ M. En cuanto a la producción de interleuquina-4, se advierte en la gráfica que no se produce ningún incremento en su producción, coincidiendo los resultados con los obtenidos en los cultivos puros.

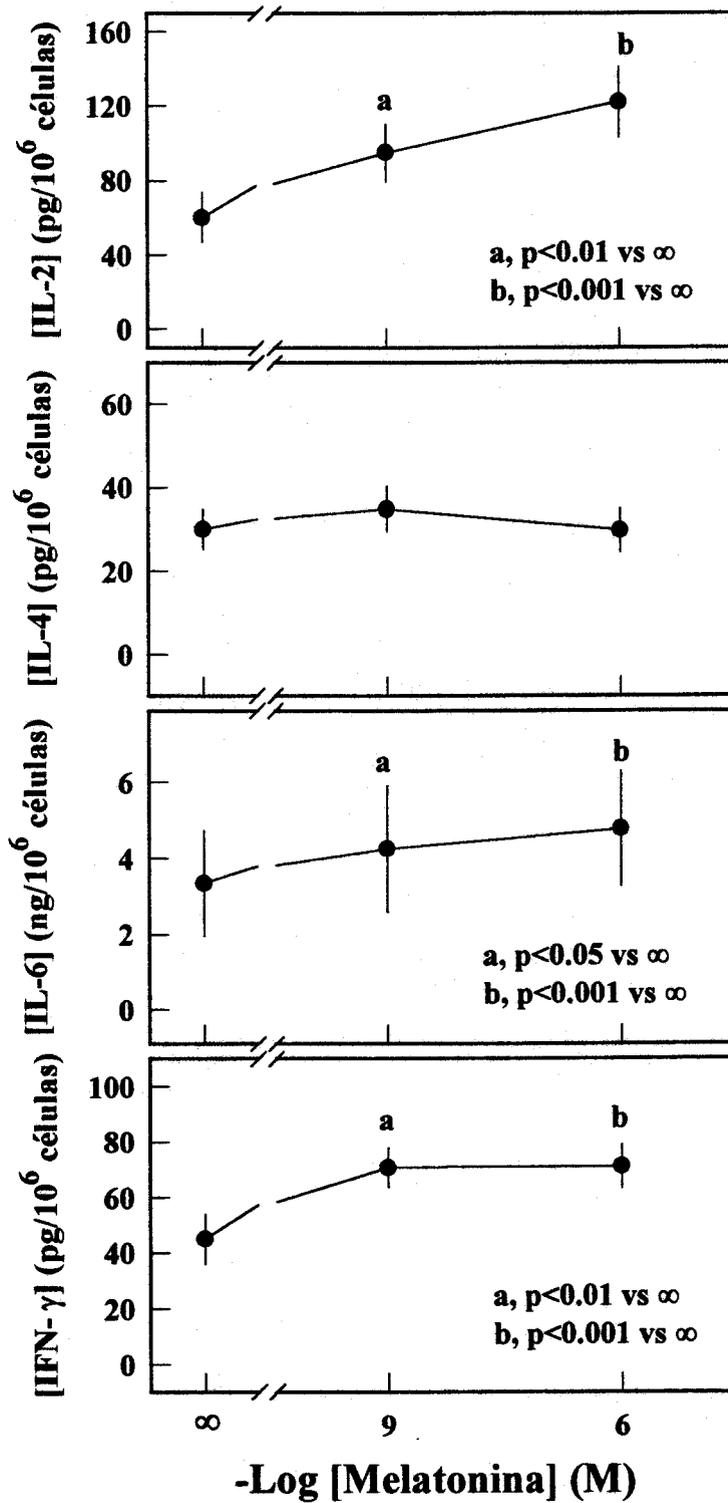


Fig. 19: Efecto de la melatonina sobre la producción de citoquinas en cultivos mixtos de células mononucleares humanas de sangre periférica.

IV.3.7.- Efecto de la melatonina sobre células CD4+/CD14+ (monocitos/macrófagos): Para tratar de discernir a través de qué tipo de células CD4+ la melatonina regula la producción de citoquinas, se realizaron cultivos de células humanas de sangre periférica, en presencia y ausencia de células de la serie monocito/ macrófago, cuyo marcador de linaje es el CD14, y que en el caso de monocitos humanos también marcan para la molécula CD4. Al igual que en experimentos anteriores, se midió la producción de citoquinas (IL-2 e IL-6) en los mencionados cultivos. Como puede apreciarse en la Fig. 20, en ausencia de células CD14+, la melatonina no fue capaz de incrementar la producción de IL-6. Es más, la producción de IL-6, tanto en ausencia como en presencia de melatonina, disminuye de forma muy significativa en ausencia de las células CD14, lo cual hace pensar que son las células monocíticas las responsables de la producción de dicha citoquina en los cultivos celulares realizados. No ocurrió lo mismo con la IL-2, que aún en ausencia de células CD14+, la melatonina aumentó la producción de ésta última citoquina, lo que hace sospechar que dicha producción es independiente de las células CD14+.

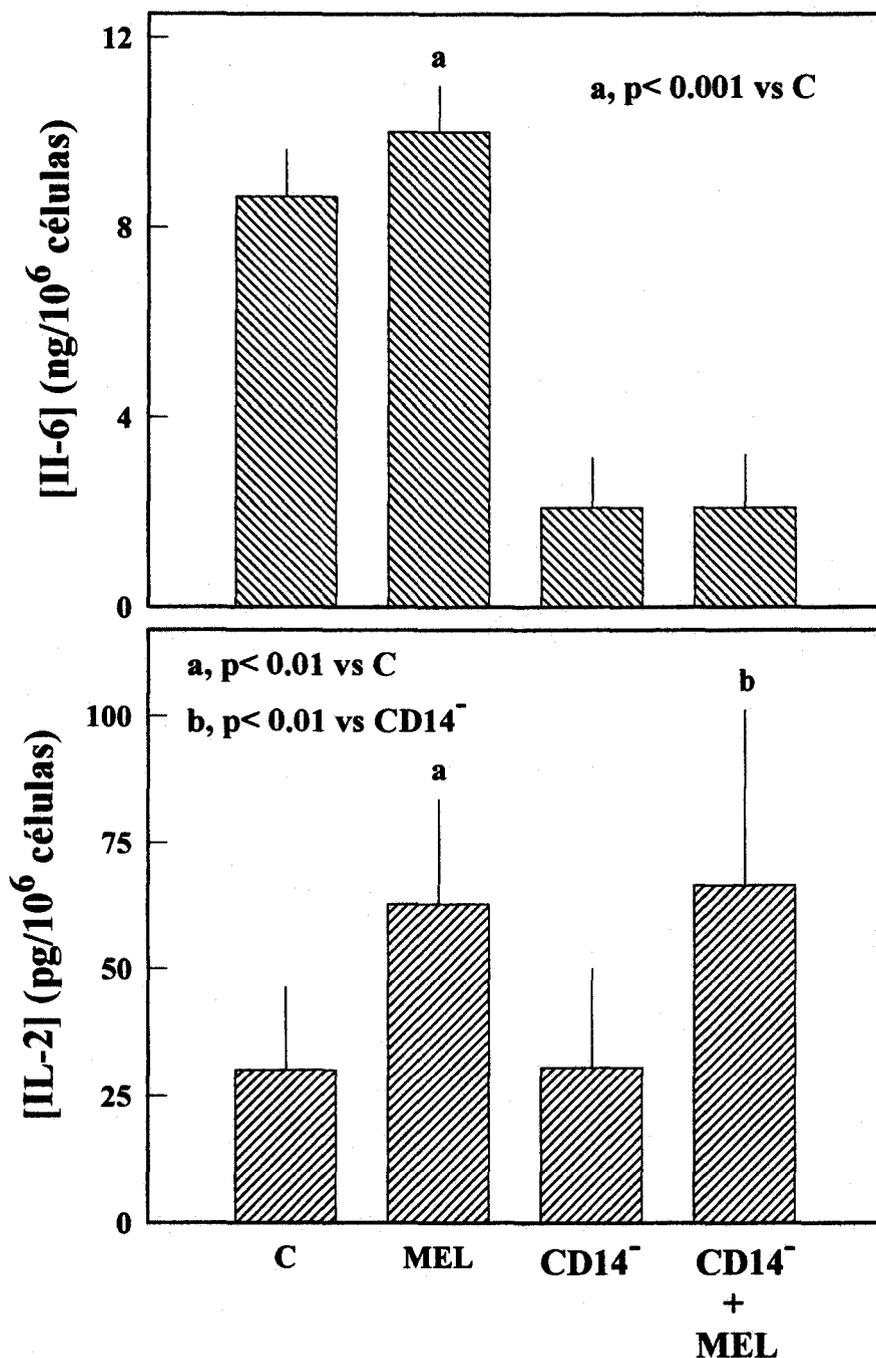


Fig. 20: Efecto de la melatonina sobre las células CD4⁺/CD14⁺ (monocitos/macrófagos)

IV.3.8.- DISCUSIÓN:

Las citoquinas son polipéptidos solubles liberados por células del sistema inmune. Su producción en algunas glándulas endocrinas y sus acciones sobre células sensibles a hormonas son actualmente temas de gran interés en investigación. Ejercen sus efectos en una gran variedad de tejidos. Existe una amplia evidencia acerca de su implicación en la patogenia de algunas enfermedades autoinmunes. (Kennedy y Jones, 1991; Arai et al, 1990). Igualmente, el sistema neuroendocrino ejerce una acción moduladora sobre el sistema inmune, que puede manifestarse mediante la liberación de citoquinas (MacLean y Reichlin, 1981). Desde hace poco tiempo se habla incluso de una estructura reguladora completa entre los sistemas inmune y neuroendocrino (Blalock y Smith, 1985).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores (apartado IV.1), en donde se muestra la existencia de posibles lugares de unión para la melatonina en células CD4+, el siguiente paso lógico es ver si la inducción y/o estimulación de la secreción de citoquinas es una posible vía de interacción entre la hormona pineal y la respuesta linfocítica. Estas células CD4+ son vitales en la liberación de factores inmunológicos tipo citoquinas (Kupfer y Singer, 1989), las cuales podrían ser los verdaderos mediadores fisiológicos de la melatonina. Esta idea ha sido apoyada por Maestroni et al (1988a), que consideran que las células T murinas activadas por antígenos son las posibles células diana de la acción de la melatonina. Esta acción estaría mediada por péptidos opioides y las moléculas efectoras finales podrían ser productos de estas células T activadas. Este mismo grupo ha demostrado posteriormente (Maestroni y Conti, 1990a) que la melatonina es capaz de estimular la liberación de agonistas opioides, con propiedades anti-stress e inmunoestimuladoras, por las

células CD4⁺ murinas (Thy-1⁺). Estos péptidos opioides podrían ser algunos de los mediadores fisiológicos de la hormona pineal, capaces de modular el sistema inmunológico tras una lesión debida a stress agudo y regular la reactividad inmune en situaciones normales. En el modelo humano, estos investigadores han encontrado resultados menos consistentes y con grandes variaciones interpersonales.

En 1986, Mosmann et al publicaron que algunas líneas de células T CD4⁺ murinas podían ser clasificadas en dos grupos, T_{H1} y T_{H2}, basándose en las citoquinas producidas por cada grupo y en sus actividades funcionales. Desde entonces, este modelo de subpoblaciones ha evolucionado para incluir nuevas citoquinas descubiertas posteriormente. Actualmente, las células T_{H1} se definen por su producción de interleuquina-2, interferón- γ y TNF- β , y las células T_{H2} por la producción de interleuquina-4, interleuquina-5, interleuquina-6, interleuquina-10 e interleuquina-13; ambos tipos de células producen interleuquina-3, TNF- α y GM-CSF en un grupo que se ha dado en llamar T_{H0} (Del Prete et al, 1994; Kelso, 1995).

Una de las citoquinas que se ha medido en los experimentos que se muestran en este trabajo es la interleuquina-2. Es una linfoquina producida principalmente por células T colaboradoras (T_{H1}) y en una pequeña proporción por células T CD8⁺ (T_c). Juega un papel central en la proliferación de linfocitos T antígeno dependientes (Watson y Mochizuki, 1980), así como en la inducción de las funciones efectoras de linfocitos T y B y células NK (Swain, 1991). La cantidad de interleuquina-2 sintetizada por células T CD4⁺ determina, de forma importante, la magnitud de las respuestas inmunes dependiente de células T. Como se muestra en el apartado IV.3.2, la melatonina fue capaz de aumentar la producción de esta citoquina cuando se utilizaron tanto condiciones fisiológicas como farmacológicas de la hormona. Ahora bien, esta estimulación tan sólo se aprecia cuando las concentraciones de mitógeno fueron bajas o estuvo ausente. En el caso del cultivo mixto linfocitario, que se realizó con el fin de aproximarse aún más a las concentraciones fisiológicas (apartado IV.3.6), la estimulación fue aproximadamente del mismo orden que cuando se utilizó el PHA a la concentración de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ o cuando éste estuvo ausente. Esta relación de la

melatonina con la interleuquina-2 se ha recogido en trabajos anteriores. Así, Del Gobbo et al (1989) vieron que la pinealectomía inhibía la producción de esta linfoquina en esplenocitos de ratón y que la melatonina era capaz de revertir este efecto tras una única administración de la hormona. A este efecto sobre la producción de interleuquina-2 se unía una inhibición de la actividad citotóxica de las células NK en los animales pinealectomizados. Esta alteración parece estar relacionada con la reducción de la producción de interleuquina-2. De hecho, las células NK están bajo control directo de los linfocitos T colaboradores (T_H) a través de la producción de interleuquina-2, que interviene en su proliferación y actividad (Hanney et al, 1981). También se ha publicado que la melatonina puede incrementar la expresión de receptores de interleuquina-2 en linfocitos humanos (Scaglione et al, 1990).

A la vista de los resultados obtenidos en este trabajo, acerca de la producción de interleuquina-2 en humanos, y apoyados de alguna manera por otros autores en modelos animales, cabe relacionar de algún modo la acción de la melatonina sobre la función inmune en humanos con su acción antitumoral. Ya anteriormente, Maestroni et al (1988b) sugerían que tal actividad dependía básicamente de mecanismos inmunológicos. Este mismo grupo (Maestroni y Conti, 1991) investigó, posteriormente, la posible acción anticancerosa de la melatonina teniendo en consideración la posible acción de la interleuquina-2. Así pues, vieron que esta linfoquina podía estimular la producción, a partir de precursores de células NK, de células que podían ejercer frente a células tumorales una acción citolítica específica. Estas células se han denominado células LAK (*lymphokine-activated-killer* o células "asesinas" activadas por linfoquinas). Otras células implicadas en la destrucción de células tumorales, como son las células NK y los linfocitos T citotóxicos (T_C), se encuentran fisiológicamente bajo el control de la interleuquina-2, siendo la respuesta inmunológica antitumoral un fenómeno dependiente de la citada citoquina (Grimm et al, 1982; 1983). Por todo esto, puede sugerirse que la producción de interleuquina-2 por parte de la melatonina puede explicar parte de su acción antitumoral. De hecho, se han hecho estudios en los que se ha utilizado una terapia combinada de interleuquina-2 con melatonina (Lissoni et al, 1991;

1994).

Los interferones son proteínas o glucoproteínas que se agrupan, de acuerdo con la secuencia aminoacídica de sus estructuras proteicas, en tres clases: alfa, beta y gamma. Los interferones alfa y beta integran los interferones de tipo I y el gamma permanece en solitario dentro del tipo II. Los del tipo I están, por regla general, mejor capacitados para inducir resistencia vírica en las células; el gamma desempeña un papel más prominente en la dirección de las maniobras defensivas del sistema inmunitario. El interferón- γ se produce fundamentalmente por células T_{HI} . La transcripción se inicia como consecuencia de la activación de un antígeno y es aumentada por interleuquina-2 e interleuquina-12. También las células NK pueden sintetizarlo, funcionando en este caso como un mediador de la inmunidad natural (Farrar y Schreiber, 1993).

Por ser una de las principales citoquinas liberadas por las células $CD4^+$ se midió en los experimentos que se presentan, al igual que la interleuquina-2. En el apartado IV.3.5 se exponen los resultados correspondientes a la producción de interferón- γ en ausencia y en presencia de melatonina a concentraciones $1 \mu M$ y $1 nM$. En este caso, sólo aumentó la producción de la citada citoquina cuando no había mitógeno en el medio de cultivo y sólo fue significativo cuando se emplearon concentraciones farmacológicas de la hormona. Una vez más, la presencia de concentraciones relativamente altas de PHA hizo que no se observase el efecto estimulador de la melatonina. En el caso del cultivo mixto linfocitario (apartado IV.3.6), la producción de interferón- γ fue del mismo orden que en el cultivo puro. La diferencia es que la producción fue también significativa a concentraciones fisiológicas de la hormona. Estos resultados obtenidos con el interferón- γ concuerdan bastante bien con los obtenidos con la interleuquina-2. Por una parte, ambas citoquinas son liberadas por el mismo tipo de subpoblación de células, esto es células T_{HI} . Por otra parte, resulta lógico si se tiene en cuenta la secuencia normal de la respuesta inmune en humanos. Así, como se ha comentado anteriormente, la interleuquina-2 aumenta la producción de interferón- γ . Éste último estimula la actividad citolítica de células NK (Reiter, 1993), mostrando así una acción

sinérgica con la interleuquina-2. Estos resultados pueden ser apoyados por trabajos anteriores de otros grupos. Así, Giordano y Palermo publicaron en 1991 que la melatonina aumentaba la ADCC mediada por esplenocitos de ratón. Debido a que el interferón- γ juega un papel importante en la activación de células portadoras del receptor Fc γ , principales efectoras de la ADCC (Nathan et al, 1983), es posible que la melatonina incremente la ADCC por estimulación de la producción de este mediador soluble. Otros autores sugieren que la melatonina induce un incremento en la producción de interferón- γ por esplenocitos murinos, pero por una vía independiente de interleuquina-2 (Colombo et al, 1992).

Otras publicaciones más recientes hablan también en favor de una estimulación de la producción de interleuquina-2 e interferón- γ por parte de la melatonina (Caroleo et al, 1992; Pioli et al, 1993)

La interleuquina-4 fue identificada inicialmente como una citoquina derivada de las células T colaboradoras (T_H) que estimulaba la proliferación de células B murinas en presencia de anticuerpos anti-inmunoglobulinas y causaba una activación de las células B en reposo, así como el incremento de la expresión de moléculas MHC de clase II (Howard et al, 1982). También puede actuar sobre otras células como monocitos y células endoteliales (Bancherau, 1991). Hoy se sabe que una de sus principales funciones fisiológicas es la regulación de las reacciones alérgicas (Pene et al, 1988). Actualmente se conoce que son las células T_{H2} la principal fuente de esta linfoquina, aunque poblaciones celulares como mastocitos y basófilos y algunas células T CD8+ también son capaces de producirla.

En el apartado IV.3.3 se presentan los resultados correspondientes a la producción de interleuquina-4 a diferentes concentraciones de melatonina y utilizando concentraciones crecientes de PHA. Claramente se observa que la melatonina no fue capaz de estimular la producción de la citada linfoquina en ninguna de las condiciones utilizadas. Ni siquiera se observa efecto alguno cuando se utilizó cultivo mixto linfocitario (apartado IV.3.6). Si se tiene en cuenta que son las células T_{H2} las principales productoras de interleuquina-4 y que los resultados anteriores hablan en favor de citoquinas liberadas por células T_{H1}

(interleuquina-2 e interferón- γ), es posible que la melatonina estimule la producción de citoquinas únicamente a través de células T_{H1} . Por otra parte, hay que decir que entre las múltiples funciones atribuidas al interferón- γ una de las más importantes es una función inhibidora de la estirpe T_{H2} y de los efectos mediados por la interleuquina-4 (Pène et al, 1988b). Igualmente, ésta última inhibe la activación de macrófagos y bloquea muchos de los efectos activadores del interferón- γ sobre los macrófagos, como la producción de interleuquina-1, óxido nítrico y prostaglandinas. Estos efectos son compartidos por la interleuquina-10, también producida por las células T_{H2} (Fiorentino et al, 1989). Este antagonismo entre el interferón- γ y la interleuquina-4 representa la base para el balance entre los dos tipos de subpoblaciones de células T $CD4^+$, T_{H1} y T_{H2} (Mosmann y Coffman, 1989). Los resultados expuestos en este trabajo correspondientes a la producción de interleuquina-4 no concuerdan en un principio con los obtenidos por Maestroni en un artículo publicado en 1995. En él publicó que los linfocitos T_{H2} podían ser posibles células dianas para la melatonina en médula ósea de humanos. De hecho, caracterizó un receptor de alta afinidad, cuya activación con concentraciones fisiológicas y farmacológicas de melatonina, resultaba en un aumento significativo de interleuquina-4, aumento que ya había visto anteriormente (Maestroni et al, 1994b). Esta citoquina tiene la capacidad de actuar sobre las células estromales de la médula ósea, las cuales pueden sintetizar dicha citoquina (Garland, 1991), e inducir la liberación de factores de crecimiento hematopoyéticos, tipo GM-CSF y G-CSF (Peschel et al, 1987). Éstos, a su vez, pueden disminuir los efectos tóxicos sobre la función hematopoyética provocados por los agentes citotóxicos utilizados en la terapia anticancerosa, abriendo una posible vía de aplicación terapéutica para la melatonina en patología tumoral. Ahora bien, este mismo grupo (Maestroni et al, 1996) ha presentado recientemente, en el congreso sobre neuroendocrinoinmunología celebrado en Locarno (Suiza), una comunicación en donde consideran que no han podido confirmar ningún efecto de la melatonina sobre la expresión del m-RNA de la interleuquina-4 ni sobre su liberación en la médula ósea. Piensan que el efecto hematopoyético de la melatonina podría depender

de lo que ellos llaman péptidos opioides inducidos por melatonina (MIO), efecto neutralizado por el antagonista específico de opiáceos, naltrexona. Con estos resultados se confirma que la melatonina probablemente sólo actúe a través de las células T_{H1} y no sobre las T_{H2} .

Entre las citoquinas que median la inmunidad natural se encuentra la interleuquina-6. Es sintetizada fundamentalmente por células T_{H2} y en menor extensión por células de la serie monocito/macrófago humana, células endoteliales vasculares, fibroblastos, etc. Se produce en respuesta a la interleuquina-1, y en menor extensión al TNF. Entre sus funciones más importantes destacar que incrementa la proliferación de células T, estimula la diferenciación de células B, aumenta la respuesta de fase aguda, actúa como factor de crecimiento de células hematopoyéticas, etc. (van Snick, 1990). En el trabajo que aquí se expone, también se ha medido producción de interleuquina-6 en cultivos de células humanas de sangre periférica. Como se presenta en el apartado IV.3.4, la melatonina estimuló la producción de interleuquina-6 a concentraciones fisiológica y farmacológica, y en ausencia de mitógeno alguno. También lo hizo en el caso de cultivo mixto linfocitario (apartado IV.3.6) a las dos concentraciones de melatonina empleadas. Al igual que con el interferón- γ y la interleuquina-2, existe bibliografía anterior que apoya este hecho de estimulación por parte de la melatonina. Así, por ejemplo, Maestroni et al (1986; 1987) postularon que la melatonina aumentaba la respuesta a anticuerpos a través de un mecanismo opiatérgico. Dado el papel que la interleuquina-6 juega sobre los linfocitos B, es posible que el efecto de la melatonina sobre la producción de anticuerpos pueda estar mediado también por la liberación de dicha citoquina. Por otra parte, la interleuquina 6, al igual que el interferón- γ es capaz de estimular a las células efectoras de la ADCC (Miyaura et al, 1988). Podría ser por tanto otro mediador inmunológico implicado en el aumento de esta citotoxicidad dependiente de anticuerpos por parte de la melatonina (Giordano y Palermo, 1991).

Otro aspecto a considerar en la estimulación de la producción de interleuquina-6 por melatonina, en cultivos de células humanas de sangre periférica, es el hecho de que dicha

citoquina puede ser también liberada por células que marquen para la molécula CD4+, pero que no sean células T. Tal es el caso de las células de la serie monocito/macrófago humana (van Snick, 1990). Por esto, se realizaron cultivos celulares en los que estaban ausentes dichos monocitos y volvió a medirse la producción de interleuquina-6 a distintas concentraciones de melatonina. El resultado obtenido (apartado IV.3.7) hizo confirmar que dicha estimulación por melatonina se producía a través de células monocíticas CD4+ y no a través de linfocitos T CD4+. Ya Morrey y colaboradores (1994), habían publicado que la melatonina podía activar la función monocítica humana induciendo la secreción de interleuquina-1, radicales libres de oxígeno y estimulando la citotoxicidad frente a células tumorales. A esto puede unírsele la producción de interleuquina-6 aquí expuesta. El mismo experimento se realizó midiendo la producción de interleuquina-2, que no varió aunque los monocitos no estuvieran presentes. Así pues, puede concluirse diciendo que la estimulación de interleuquina-2 e interferón- γ por melatonina se produce a través de linfocitos T_{H1}, que la melatonina no parece influir sobre las células T_{H2} productoras de interleuquina-4 e interleuquina-6 y que la producción de ésta última se produce a través de la activación de los monocitos.

En la Fig. 21 se expone de forma esquemática la interrelación existente entre la glándula pineal y el sistema inmune, con todos los posibles mediadores inmunológicos descritos hasta la fecha.

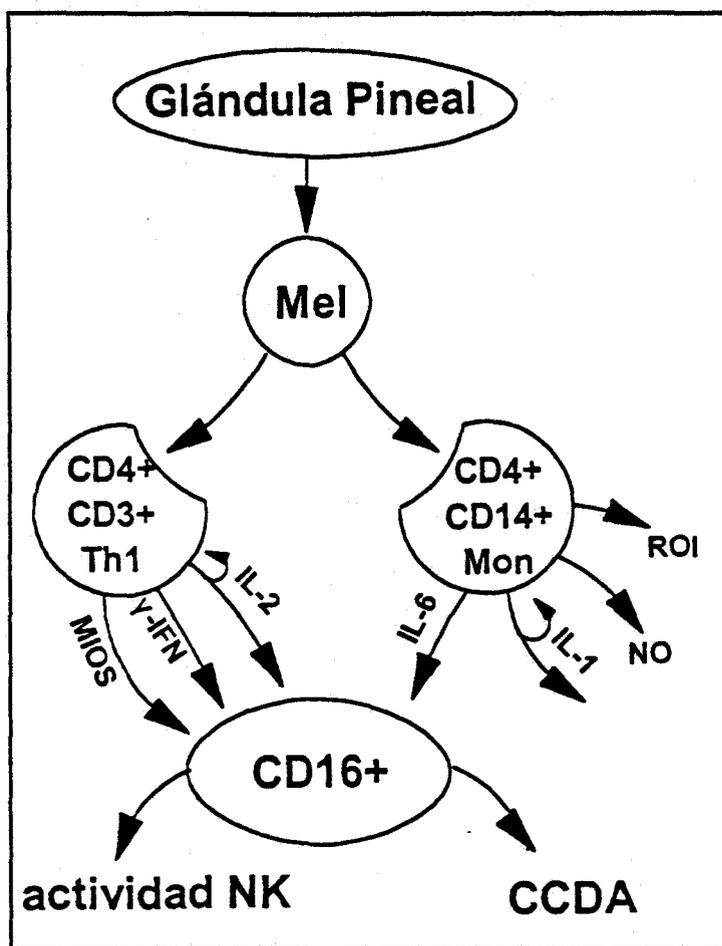


Fig. 21: Esquema de las posibles interrelaciones existentes entre la glándula pineal y el sistema inmune.

IV.4.- EFECTO DEL CGP-52608 SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS EN CULTIVOS PUROS Y MIXTOS DE CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS DE SANGRE PERIFÉRICA

Para tratar de discernir sobre una posible acción de la melatonina a nivel nuclear se utilizó un agonista del receptor nuclear de la hormona, el CGP-52608, un ligando que no se une al receptor de membrana. Se realizaron cultivos de células mononucleares humanas de sangre periférica, tanto puros como mixtos, en presencia de concentraciones de análogo similares a las empleadas con melatonina, esto es 1 μ M. Posteriormente se realizaron determinaciones de citoquinas, interleuquina-2, interleuquina-6 e interferón- γ , para ver si el CGP-52608 tenía alguna acción estimuladora sobre la producción de dichos mediadores inmunológicos.

IV.4.1.- Efecto del CGP-52608 sobre la producción de interleuquina-2 en cultivos puros y mixtos de células mononucleares humanas de sangre periférica: En la Fig. 22 se muestran los resultados correspondientes a la producción de interleuquina-2 en presencia de CGP-52608 y melatonina, ambos a una concentración de 1 μ M. Como puede apreciarse, el CGP-52608 fue capaz de estimular la producción de interleuquina-2 de manera similar a la melatonina, consiguiéndose concentraciones de dicha citoquina del mismo orden que las obtenidas cuando los cultivos se realizan en presencia de la hormona.

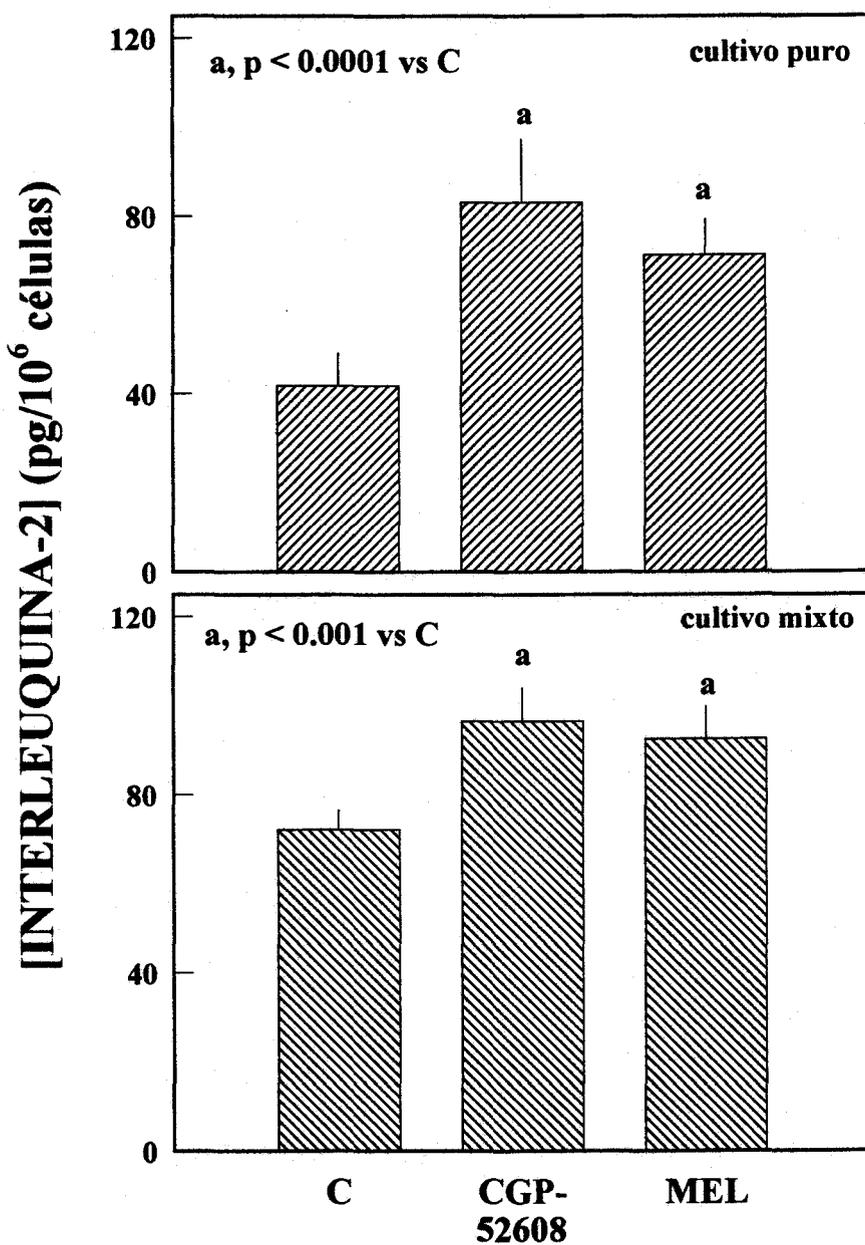


Fig. 22: Efecto del CGP-52608 sobre la producción de interleuquina-2 en cultivos puros y mixtos de células mononucleares humanas de sangre periférica.

IV.4.2.- Efecto del CGP-52608 sobre la producción de interleuquina-6 en cultivos puros y mixtos de células mononucleares humanas de sangre periférica: En este caso, al igual que en el apartado IV.4.1, se midió la producción de interleuquina-6 en cultivos de células mononucleares en presencia del análogo CGP-52608. La estimulación de la producción de interleuquina-6 por el CGP-52608 fue significativa tanto en cultivos puros como en cultivos mixtos, y en éste último el efecto del CGP fue superior al de la melatonina. Cabe destacar la producción basal de interleuquina-6 que se produce en ambos tipos de cultivos. Estos resultados se muestran en la Fig. 23.

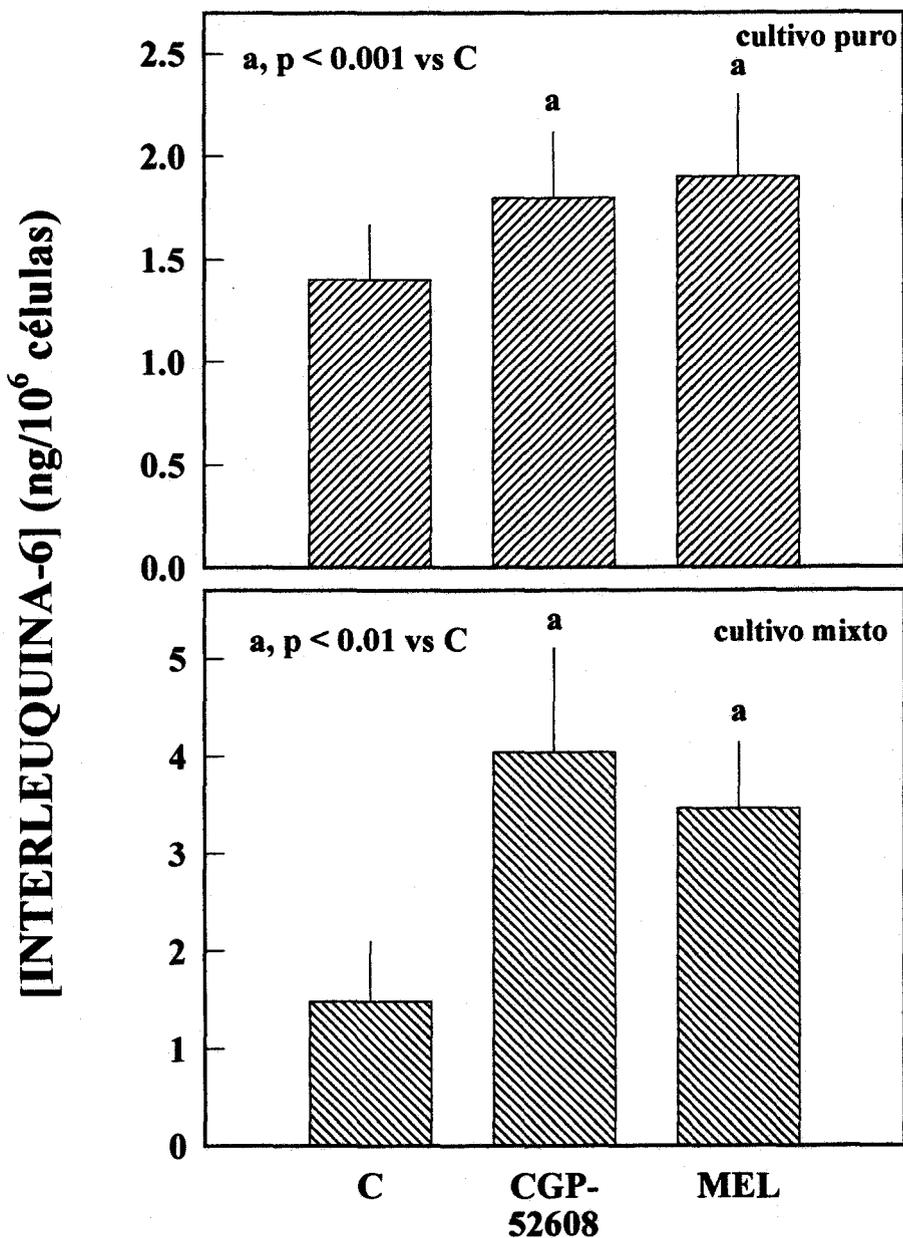


Fig. 23: Efecto del CGP-52608 sobre la producción de interleuquina-6 en cultivos puros y mixtos de células mononucleares humanas de sangre periférica.

IV.4.3.- Efecto del CGP-52608 sobre la producción de interferón- γ en cultivos puros y mixtos de células mononucleares humanas de sangre periférica: El CGP-52608 también fue capaz de estimular la producción de interferón- γ en cultivos puros y mixtos de células mononucleares humanas. Este efecto fue más pronunciado en el caso del cultivo mixto, en donde la estimulación fue similar a la producida por melatonina. En el cultivo puro fue ligeramente inferior que la estimulación de la citoquina por melatonina. En ambos casos, la estimulación de la producción de interferón- γ fue estadísticamente significativa. Una vez más, al igual como ocurre con otras citoquinas, existe una producción basal de dicho mediador inmunológico. Estos resultados pueden observarse en la Fig. 24.

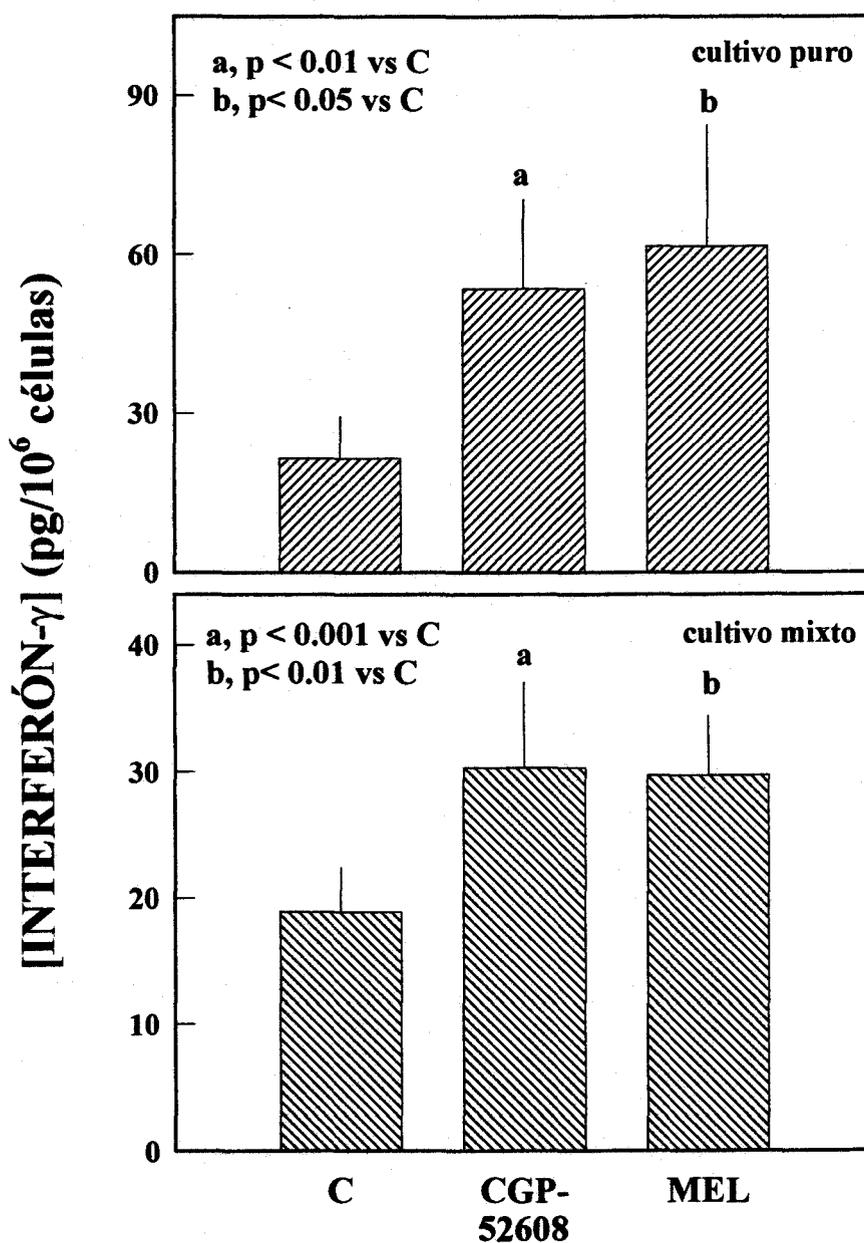


Fig. 24: Efecto del CGP-52608 sobre la producción de interferón- γ en cultivos puros y mixtos de células mononucleares humanas de sangre periférica.

IV.4.4.-Discusión: El CGP-52608 es una tiazolidin diona identificada por Wiesenberg et al en 1995. Se trata de un ligando sintético del receptor nuclear de la hormona melatonina, pero no se une al receptor de membrana de alta afinidad.

Los resultados presentados en el apartado IV.4 muestran que este compuesto fue capaz de reproducir los efectos de la melatonina sobre células inmunocompetentes, exhibiendo la misma potencia que ésta, ya que en todo momento se utilizaron las mismas concentraciones para ambos, esto es 1 μ M. Estos resultados hablan en favor de un posible mecanismo mediado por receptores nucleares, frente a receptores de membrana, para la acción de la melatonina sobre células inmunocompetentes. Por esto, este compuesto puede ser una herramienta importante para discernir entre efectos mediados a nivel nuclear y a nivel de membrana.

Actualmente no hay nada publicado al respecto de los posibles efectos del CGP-52608. Únicamente, existen datos obtenidos en timocitos y esplenocitos de rata, los cuales fueron presentados en el pasado congreso celebrado en Locarno (Suiza) sobre neuro-endocrino-inmunología por Rafii-El-Idrissi et al (1996). En estos experimentos se muestra cómo el CGP-52608 fue capaz de desplazar la unión por 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina en núcleos de timocitos y esplenocitos de rata. Todo lo contrario en el caso de las membranas de estas mismas células a las que el CGP-52608 no pudo unirse.

Se abre, por tanto, un amplio campo de investigación con la aparición de éste análogos del receptor nuclear de melatonina, sin duda de gran valor para tratar de discernir los posibles mecanismos a través de los cuales la hormona puede actuar en los distintos órganos y tejidos.

V.- CONCLUSIONES

1.- La melatonina tiene un efecto directo sobre la función inmune humana actuando fundamentalmente sobre células CD4+. No se descarta que pueda actuar sobre otros tipos de células inmunocompetentes.

2.- La unión de melatonina a células CD4+ se realiza a través de un receptor de alta afinidad, cuya constante de afinidad (0.27 nM) presenta un valor del orden de las concentraciones fisiológicas de la melatonina. Esto confiere un posible papel funcional a dicho receptor en el sistema inmune humano.

3.- La melatonina parece influir en el incremento del cociente CD4/CD8 que se produce al cultivar células mononucleares de sangre periférica en presencia de concentraciones farmacológicas (1 micromolar) de la hormona, frente a cultivos realizados en ausencia de la hormona.

4.- La melatonina incrementa la producción de IL-2, IL-6 e interferón- γ en cultivos de células mononucleares humanas de sangre periférica.

5.- La regulación de la producción de IL-2 por melatonina está mediada por células CD3+/CD4+, esto es, células T colaboradoras del tipo 1 (T_{H1}).

6.- La regulación de la producción de IL-6 por melatonina está mediada por células CD14+/CD4+, es decir, células humanas de la serie monocito/macrófago.

7.- La melatonina no parece actuar sobre células T colaboradoras del tipo 2 (T_{H2}), hecho que se manifiesta al no ser capaz de incrementar la producción de IL-4, una de las principales citoquinas liberadas por este tipo de células.

8.- Los resultados obtenidos acerca del efecto de la melatonina sobre la producción de IL-2 e IL-6, junto otros posibles mecanismos, parecen indicar que dicho efecto puede estar mediado por receptores nucleares de la hormona. Este hecho es corroborado por los resultados obtenidos con la utilización de un análogo del receptor nuclear de la melatonina, el CGP-52608.

VI.- PUBLICACIONES

VI.1.- *FASEB Journal* 9, 1331-1335 (1995)

RESEARCH COMMUNICATIONS

High-affinity binding of melatonin by human circulating T lymphocytes (CD4⁺)

MARIA G. GONZALEZ-HABA, SOFIA GARCIA-MAURIÑO, JUAN R. CALVO, RAIMUNDO GOBERNA, AND JUAN M. GUERRERO¹

Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, The University of Seville School of Medicine and Virgen Macarena Hospital, 41009-Seville, Spain

ABSTRACT This paper shows the presence of high-affinity binding sites for melatonin in human circulating T lymphocytes, but not in B lymphocytes. The binding of melatonin to T cells was dependent on time, stable, reversible, saturable, specific, and inversely correlated to the production of melatonin, expressed as the nocturnal 12 h production of its urinary metabolite 6-sulfatoxymelatonin. The affinity of these binding sites ($K_d = 0.27$ nM) suggests that they may recognize the physiological concentrations of melatonin in serum. Moreover, among the lymphocyte subpopulations studied, binding of melatonin was mostly found in CD4⁺ cells rather than in CD8⁺ cells. Results suggest that CD4⁺ cells may be the target of melatonin among the human circulating lymphocytes.—Gonzalez-Haba, M. G., Garcia-Mauriño, S., Calvo, J. R., Goberna, R., Guerrero, J. M. High-affinity binding of melatonin by human circulating T lymphocytes (CD4⁺). *FASEB J.* 9, 1331–1335 (1995)

Key Words: pineal gland · CD4⁺ cells

THE NEUROENDOCRINE SYSTEM MODULATES the immune system through neuropeptides and neurohormones (1), which suggests the existence of a neuroendocrine-immune system regulatory axis (2). Among the different neurohormones and neuropeptides that influence the immune system, the pineal neurohormone melatonin plays an important role in the immune system (3). Maestroni and co-workers (4–8) have demonstrated that melatonin enhances antibody production against T-dependent antigens in normal mice. Melatonin also counteracts the immunodepression induced by acute stress or pharmacologically administered corticosteroids on antibody production, thymus weight, and antiviral resistance. Mechanisms involved in the immunostimulatory effect of pineal gland are not well understood, but some evidence suggests that the release of opioid peptides and interleukin-2 by T-helper cells may participate in this mechanism by activating, at least, natural killer cell activity (9) and antibody-dependent cellular cytotoxicity (10). Furthermore, melatonin also activates human monocytes, increasing the cytotoxicity, the secretion of IL-1, and the production of reactive oxygen intermediates (11).

The effect of melatonin on the immune system is also supported by the existence of specific binding sites for melatonin in lymphoid cells (12). We have described previously the presence of high-affinity binding sites ($K_d = 1$ nM) for melatonin in human blood lymphocytes (13, 14). We have also provided evidence for the presence of low-affinity melatonin binding sites ($K_d = 2,000$ nM) in human granulocytes (15). In other species, melatonin binding sites have been described in spleens of the mouse, guinea pig, duck, chicken, and pigeon with K_d values in the 0.1 nM range (16–18). Similar findings have been shown in spleen and thymus from the rat, where the K_d value of the melatonin binding site is in the nanomolar range (19–21).

In this paper, we show the presence of high-affinity binding sites for melatonin in human circulating T lymphocytes, but not in B lymphocytes. The binding of melatonin to T cells was dependent on time, stable, reversible, saturable, specific, and inversely correlated to the production of melatonin, expressed as the nocturnal 12 h production of its urinary metabolite 6-sulfatoxymelatonin (6S-MEL).² Furthermore, among the T cell subtypes studied, binding of melatonin was mostly found in CD4⁺ cells rather than in CD8⁺ cells. The affinity of these binding sites suggests that they may recognize the physiological concentrations of melatonin in serum.

MATERIAL AND METHODS

Materials

[¹²⁵I]Melatonin was purchased from the Radiochemical Centre (Amersham Int., Amersham, U.K.). The specific activity of the radioligand was 1900–2175 Ci/mmol and was used for 60 days. Purity of the radioligand was checked by silica gel column chromatography (SCCC) and was >95%. Melatonin, 6-hydroxymelatonin, N-acetylserotonin, 5-hydroxytryptophol, 5-methoxytryptophol, tryptamine, 5-hydroxytryptamine, 5-hydroxy-L-tryptophan, 5-methoxy-DL-tryptophan, 5-methoxytryptamine, 5-hydroxyindole-3-acetic acid, 5-methoxyindole-3-acetic acid, and DL-tryptophan were purchased from Sigma (St. Louis, Mo.). Other drugs were obtained from commercial sources.

¹To whom correspondence should be addressed, at: Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, The University of Seville School of Medicine, Avda Sanchez Pizjuan 4, 41009-Seville, Spain.

²Abbreviations: 6S-MEL, 6-sulfatoxymelatonin; SCCC, silica gel column chromatography.

RESEARCH COMMUNICATION

Cell preparations

Peripheral blood was obtained from healthy adult volunteers and used to obtain B lymphocytes, T lymphocytes, CD4⁺ T cells, or CD8⁺ T cells. T and B lymphocytes were obtained by the FluoroBeads isolation procedure (One Lambda, Los Angeles, Calif.) using whole blood. The method uses immunomagnetic beads coated with monoclonal antibodies against the CD19 and CD2 marker cells for B and T lymphocytes, respectively. During a 3 min incubation period, the CD19 or CD2 positive cells bind to the immunomagnetic beads, and subsequently the rosetted cells can be isolated and washed by a magnet. The isolated cells are pure (>98%) and show high viability (>95%) as determined by trypan-blue exclusion studies.

When required, CD4⁺ and CD8⁺ T cells were obtained by the Dynabeads M-450 CD4 and Dynabeads M-450 CD8 isolation procedures, respectively, from mononuclear cell preparations. The method uses immunomagnetic beads coated with monoclonal antibodies against CD4 and CD8. Mononuclear cells were obtained by Ficoll-Hypaque density gradient (22). With this technique the interface between Ficoll and plasma contains the lymphocytes and monocytes. The isolated cells (about 60% T lymphocytes, 20% B lymphocytes, 10% K-NK cells, and 10% monocytes) were incubated for 5 min with the respective immunomagnetic beads; CD4 and CD8 positive cells then bind to the immunomagnetic beads, and subsequently the rosetted cells can be isolated and washed by a magnet. The isolated cells were pure (>98%) and viability, as determined by trypan-blue exclusion, was always greater than 95%.

Binding studies

Binding assay conditions were essentially as previously described for lymphocyte studies (13, 15, 19, 21, 23). Briefly, rosetted cells (up to 1.2×10^6 cells/ml) were incubated with [¹²⁵I]melatonin (25–300 pM) in PBS buffer, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7.4, and, when necessary, native melatonin or other drugs, in a total reaction volume of 1 ml. Reaction was performed at the times indicated and at 20°C. Cell-bound [¹²⁵I]melatonin was separated by centrifugation, then washed with PBS buffer, and the radioactivity was determined. Data are reported as specific binding, i.e., total tracer bound minus the amount of the tracer that was not displaced by 10 μM melatonin. No detectable degradation of [¹²⁵I]melatonin during the incubation at 20°C for 20 min occurred as SGCC of aliquots of the incubation medium, taken before and after incubation, revealed similar amounts of radioactivity (95%) in the position of [¹²⁵I]melatonin. In saturation studies, data were evaluated by Scatchard (24) analysis. The equilibrium dissociation constant (*K_d*) and the maximal binding capacity were calculated.

6-Sulfatoxymelatonin determinations

When required, urinary 6S-MEL determinations were performed. Subjects collected the 12 h nocturnal urine (from 2000 to 0800 h) into plastic bottles containing 2 g boric acid as preservative. Five milliliter aliquots were frozen until assayed to quantify 6S-MEL. Urinary 6S-MEL was assayed in duplicate at a volume of 100 μl using a direct radioimmunoassay (Stockgrand Ltd., Guilford, Surrey, U.K.). The intra-assay coefficient of variation over repeated measurements at concentrations of 8 and 50 ng/ml was 3.6 (*n* = 10) and 8.1 (*n* = 10), respectively. The interassay coefficient of variation over the course of the assays at concentrations of 8 and 50 ng/ml was 9.8 (*n* = 8) and 11.1 (*n* = 8), respectively. The sensitivity of each assay was set at 2 ng/ml, the value of the lowest standard used to derive the standard curve.

RESULTS

The presence of melatonin binding sites in B and T lymphocytes was initially investigated. As shown in Fig. 1, binding of [¹²⁵I]melatonin was observed in T cells rather

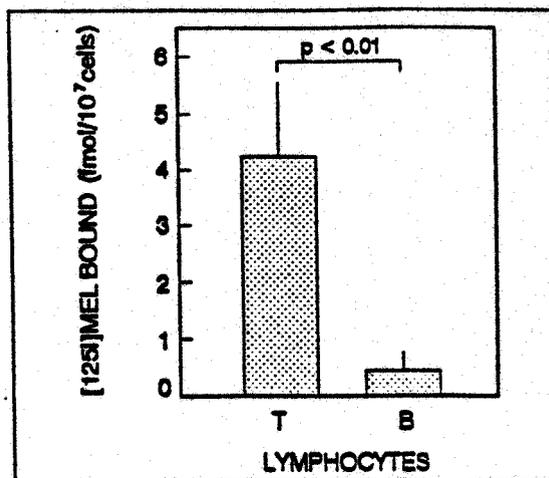


Figure 1. Binding of melatonin by human T and B lymphocytes. Rosetted cells ($1-5 \times 10^6$ cells/ml) were incubated with [¹²⁵I]melatonin (100 pM) for 20 min at 25°C. Each point is the mean \pm SE of eight experiments performed in duplicate.

than in B cells. Although binding of melatonin by B cells cannot be discarded, binding by T cells is 10-fold higher than that found in B lymphocytes. Further experiments were performed to investigate whether melatonin production could affect the expression of melatonin binding sites. In fact, we observed a reverse correlation between melatonin production, expressed as the nocturnal excretion of the urinary metabolite 6S-MEL, and binding of [¹²⁵I]melatonin by T lymphocytes. Thus, binding exhibited the highest values when the excretion of 6S-MEL was low and, conversely, binding of melatonin by T cells decreased when excretion of urinary 6S-MEL was high (Fig. 2, top). As in previous experiments, we again failed to find binding of melatonin by B cells, even when the excretion of melatonin was low (Fig. 2, bottom). Then, the following experiments were performed using T lymphocytes.

Figure 3 depicts the time course of specific binding of melatonin to human T lymphocytes at 20°C. Binding reached its maximal value at 20 min and remained stable for 30 min. Extraction of radioligand after 20 min incubation showed that more than 95% of radioactivity comigrated on SGCC with authentic [¹²⁵I]melatonin; no other radiolabeled peaks were observed. Thus, tracer was stable during the course of a standard binding assay at 20°C. After equilibrium, binding of [¹²⁵I]melatonin to T cells was reversible. Dissociation of the tracer-membrane complex was studied by the addition of 100 μM melatonin; this test indicated a half-time of dissociation of about 4 min. Furthermore, the presence of 100 μM melatonin not only reverted binding of [¹²⁵I]melatonin by T cells, but also prevented it.

Stoichiometric studies showed that specific binding of [¹²⁵I]melatonin to human T lymphocytes increased with increasing concentrations of the radioligand and ap-

RESEARCH COMMUNICATION

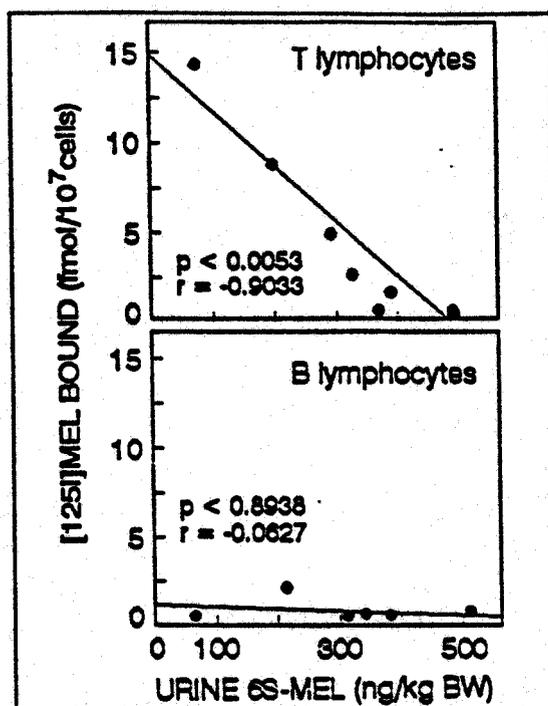


Figure 2. Correlation between binding of melatonin by B and T lymphocytes and urinary excretion of 6S-MEL. Binding of melatonin was determined incubating rosetted cells ($1-5 \times 10^6$ cells/ml) with [125 I]melatonin (100 pM) for 20 min at 25°C. 6S-MEL was determined by radioimmunoassay in urine collected from 2000 to 0800 h.

proached saturation at 800 pM (Fig. 4). Scatchard analysis of the data (Fig. 4, inset) yielded a linear plot suggesting binding to a single class of binding sites. The K_d for the single site was 0.27 ± 0.05 nM, with a binding capacity of 1.92 ± 0.76 fmol/ 10^7 cells.

The pharmacological characterization of [125 I]melatonin binding to human T lymphocytes was carried out with tracer concentrations of radioligand (100 pM) and with melatonin or different metabolites involved in the melatonin synthesis pathway. Results showed that the melatonin binding site on T lymphocytes is highly specific for the hormone. Binding was inhibited by increasing concentrations of native melatonin; 50% inhibition (IC_{50}) was observed at 0.89 nM melatonin. Only 6-hydroxymelatonin also displaced the radioligand, but was 100-fold less effective than melatonin. Other indoles, 5-hydroxyindoles, or 5-methoxyindoles were shown to be ineffective (Table 1).

Finally, experiments were performed to investigate the T lymphocyte subpopulation able to bind melatonin. Lymphocyte preparations enriched in CD4 $^+$ and CD8 $^+$ cells were used for that purpose. As shown in Fig. 5, we observed significant binding in mononuclear cells, T lympho-

cytes, and CD8 $^+$ cells. However, binding of melatonin by CD4 $^+$ cells was around four- to eightfold higher than that found in the other cell preparations.

DISCUSSION

In this paper we show that melatonin may interact with human circulating T lymphocytes, rather than with B lymphocytes, through high-affinity binding sites. Binding of [125 I]melatonin by T lymphocytes fulfills all criteria for binding to a receptor site. Binding exhibited properties such as dependence on time, reversibility, saturability, specificity, and high affinity. Saturation studies were performed using exclusively increasing concentrations of [125 I]melatonin. Interpretation of the data by the Scatchard analysis (24) disclosed one high-affinity binding site for melatonin ($K_d = 0.27$ nM) in T lymphocytes. Thus, the radioligand-receptor interaction involves a single species of receptor via a simple and reversible bimolecular reaction. The affinity of the melatonin binding site in human T lymphocytes is in the same range as that described for human circulating mononuclear cells (13), rat thymus (19), and rat spleen (21), and is 5- to 10-fold lower than that described in the spleens of guinea pig (18), chicken (17), or duck (16). Melatonin receptors described in other tissues such as median eminence-pars tuberalis (25, 26), suprachiasmatic nucleus (27), and area postrema (28) also exhibit 10- to 50-fold higher affinity than that in rat spleen. However, affinity of melatonin binding sites in human T lymphocytes is 10,000 times higher than that described in human neutrophils. Remarkably, receptors for other hor-

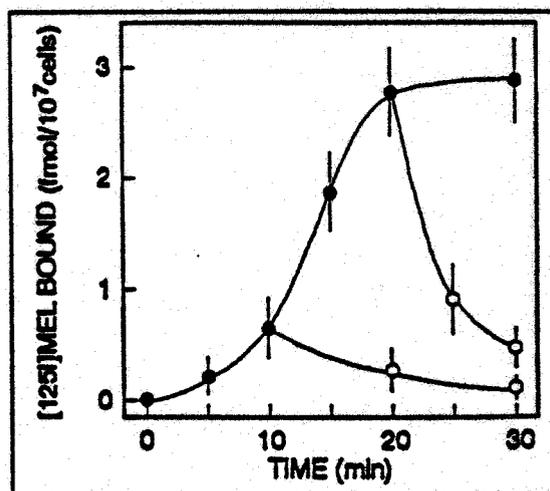


Figure 3. Association and dissociation of [125 I]MEL binding in human T lymphocytes. [125 I]MEL (100 pM) was incubated with rosetted cells (8×10^6 cells/ml) at 25°C at the times indicated (●). After 10 or 20 min incubation, 100 pM melatonin was added and the radioactivity specifically bound was determined at the appropriated times (○). Each experiment is the mean \pm SE of three experiments performed in duplicate.

RESEARCH COMMUNICATION

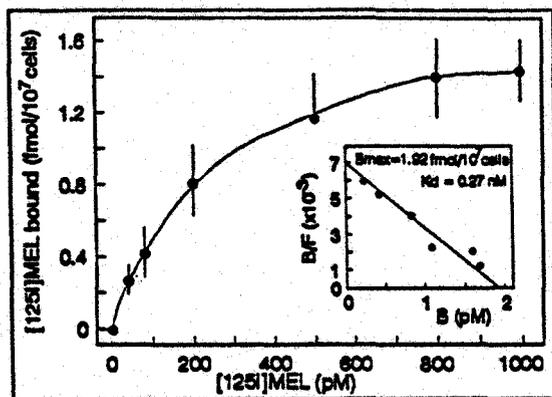


Figure 4. Saturation isotherm of [125 I]MEL binding in human T lymphocytes. Rossetted cells (8×10^6 cells/ml) were incubated with increasing concentrations of [125 I]MEL (up to 1000 pM) for 20 min at 25°C. Each point is the mean \pm SE of four experiments performed in duplicate. Inset: Scatchard analysis of the data. B_{max} is the binding capacity.

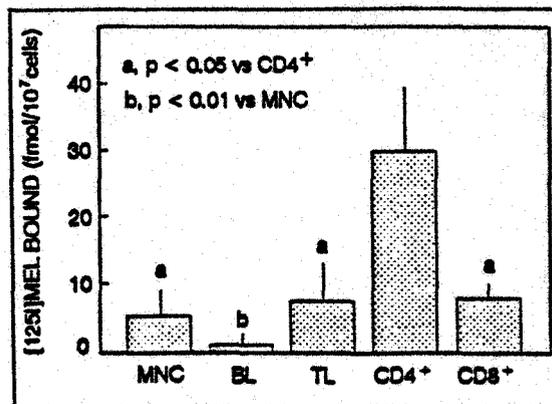


Figure 5. Binding of melatonin by human mononuclear cells (MNC), B lymphocytes (BL), T lymphocytes (TL), CD4⁺ cells, and CD8⁺ cells. Cells ($1-5 \times 10^6$ cells/ml) were incubated with [125 I]melatonin (100 pM) for 20 min at 25°C. Each point is the mean \pm SE of eight experiments performed in duplicate.

mones also exhibit a variety of K_d values depending on the tissue or the species studied (12). Moreover, the high-affinity binding site of melatonin in human T lymphocytes is likely related to a physiological role of the hormone in the organ. Thus, the K_d value obtained is similar to serum melatonin concentrations at night (200 pM) in humans

TABLE 1. Pharmacological profile of the [125 I]melatonin binding site in human T lymphocytes^a

Drug	IC ₅₀ , nM
5-methoxyindoles	
Melatonin	0.89
6-hydroxymelatonin	74
3-methoxyindole-3-acetic acid	16500
5-methoxytryptophol	18700
5-methoxy-L-tryptophan	>100,000
5-methoxytryptamine	>100,000
5-hydroxyindoles	
N-acetylaserotonin	2100
5-hydroxyindole-3-acetic acid	11000
5-hydroxytryptophol	17000
5-hydroxytryptamine	31000
5-hydroxy-L-tryptophan	34000
Indoles	
Tryptamine	28000
DL-tryptophan	>100,000

^aHuman T lymphocytes were incubated with 100 pM [125 I]melatonin in the absence or in the presence of increasing concentrations of each drug (up to 0.1 mM) at 25°C for 20 min. The IC₅₀ value is the concentration of the drug required to inhibit the [125 I]melatonin binding to the cells by 50%. Results are the mean of two experiments performed in duplicate.

(29), possibly allowing melatonin binding sites in T lymphocytes to recognize circulating melatonin.

The pharmacological characterization of the melatonin binding site labeled by [125 I]melatonin indicated that only 6-hydroxymelatonin approached the effectiveness of melatonin in displacing [125 I]melatonin bound to lymphocytes (Table 1). Other indoles including 5-hydroxy- and 5-methoxyindoles were ineffective. Results are in good agreement with those described by our group (13, 15, 19, 21) and by other authors (16-18, 25, 27) for immune and nonimmune organs.

In this study, binding of [125 I]melatonin to human T lymphocytes showed to be inversely correlated with the nocturnal melatonin production, measured as the urinary metabolite 6S-MEL. Thus, subjects with high excretion of 6S-MEL exhibited low binding of melatonin to T lymphocytes, whereas subjects with low production of melatonin exhibited high binding. Results agree with previous studies reporting that binding of melatonin to its receptor in different target tissues is higher when melatonin concentration is low, i.e., after maintaining the animals under constant light exposure for several days (21). Moreover, Laitinen et al. (30) showed that [125 I]melatonin binding capacity in the rat suprachiasmatic nucleus exhibited significant diurnal variation, with a peak in the light period. Similar results were obtained in the brain tissues of birds (31), where maximal binding was observed in the late photophase. Studies of binding sites and the diurnal responses of the animal to exogenous administration of melatonin also show that sensitivity to melatonin appears to be inversely related to the levels of endogenous hormone in the animal. Because of the inhibitory effect of melatonin in the late afternoon, but not in the morning, on the neuroendocrine-reproductive axis, Reiter et al. (32) suggested that the changed sensitivity of the animal might be related to alterations in the response of melatonin receptors.

RESEARCH COMMUNICATION

Finally, experiments performed to investigate the T lymphocyte subpopulation able to bind melatonin showed that binding of melatonin by CD4⁺ cells was around four- to eightfold higher than that found in the other cell preparations studied. These results suggest that CD4⁺ lymphocytes, in addition to other possible subpopulations, may be the target of melatonin among the immunocompetent cells. The physiological role of melatonin binding sites in human CD4⁺ cells remains unclear. However, the demonstration of [¹²⁵I]melatonin binding sites, the putative melatonin receptors, in these cells provides evidence to support the hypothesis that the regulatory effect of melatonin on the immune system is mediated by binding to CD4⁺ lymphocytes. This hypothesis is also supported by previous experiments showing that physiological concentrations of melatonin stimulate, in vitro, activated L3T4⁺ (CD4⁺) cells to release opioid agonists that can reproduce in vivo the immunoenhancing and anti-stress effects on thymus cellularity and antibody production of melatonin (5).

In conclusion, the present work describes the presence of high-affinity melatonin binding sites in human T lymphocytes (CD4⁺). The K_d value of the binding site is below the nanomolar range, suggesting that melatonin may play a physiological role in regulation of immune function via binding to CD4⁺ cells. [E]

Supported by grants from Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (PM91-0616) and Fondo de Investigaciones Sanitarias (93/0210).

REFERENCES

- Adler, R. (1981) *Psychoneuroimmunology*. Academic Press, New York
- Blalock, J. E., and Smith, E. M. (1985) A complex regulatory loop between the immune and neuroendocrine systems. *Federation Proc.* 44, 108-111
- Guerrero, J. M., and Reiter, R. J. (1992) A brief survey of pineal gland-immune system interrelationships. *Endocr. Res.* 18, 91-113
- Mancroni, G. J. M., and Conti, A. (1989) Beta-endorphin and dinorphin mimic the circadian immunoenhancing and anti-stress effects of melatonin. *Int. J. Immunopharmacol.* 11, 333-340
- Mancroni, G. J. M., and Conti, A. (1990) The pineal neurohormone melatonin stimulates activated CD4⁺, Thy-1⁺ cells to release opioid agonist(s) with immunoenhancing and anti-stress properties. *J. Neuroimmunol.* 28, 167-176
- Mancroni, G. J. M., Conti, A., and Pierpaoli, W. (1986) Role of the pineal gland in immunity. I. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. *J. Neuroimmunol.* 13, 19-30
- Mancroni, G. J. M., Conti, A., and Pierpaoli, W. (1987) Role of the pineal gland in immunity. II. Melatonin enhances the antibody response via an opiate mechanism. *Clin. Exp. Immunol.* 68, 384-391
- Mancroni, G. J. M., Conti, A., and Pierpaoli, W. (1988) Role of the pineal gland in immunity. III. Melatonin antagonizes the immunosuppressive effect of acute stress via an opiate mechanism. *Immunology* 63, 465-469
- Del Gobbo, V., Libri, V., Villani, N., Calia, R., and Nistico, G. (1986) Pineallectomy inhibits interleukin-2 production and natural killer activity in mice. *Int. J. Immunopharmacol.* 8, 567-571
- Giordano, M., and Palermo, M. S. (1991) Melatonin induced enhancement of antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Pineal Res.* 10, 117-121
- Morrey, K. M., Melachlan, J. A., Serkin, C. D., and Bakouche, O. (1994) Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. *J. Immunol.* 153, 2671-2680
- Guerrero, J. M., Calvo, J. R., Osuna, C., and Lopez-Gonzalez, M. A. (1994) Binding of melatonin by lymphoid cells in humans and rodents. *Adv. Pineal Res.* 7, 109-117
- Lopez-Gonzalez, M. A., Calvo, J. R., Osuna, C., and Guerrero, J. M. (1992) Interaction of melatonin with human lymphocytes: evidence for binding sites coupled to potentiation of cyclic AMP stimulation by vasoactive intestinal peptide and activation of cyclic GMP production. *J. Pineal Res.* 12, 97-104
- Lopez-Gonzalez, M. A., Calvo, J. R., Osuna, C., Rubio, A., and Guerrero, J. M. (1992) Synergistic action of melatonin and vasoactive intestinal peptide in stimulating cyclic AMP production in human lymphocytes. *J. Pineal Res.* 12, 174-181
- Lopez-Gonzalez, M. A., Calvo, J. R., Segura, J. J., and Guerrero, J. M. (1993) Characterization of melatonin binding sites in human peripheral blood neutrophils. *Biotech. Ther.* 4, 253-262
- Yu, Z. H., and Pang, S. F. (1991) [¹²⁵I]melatonin binding sites in spleens of birds and mammals. *Neurosci. Lett.* 125, 175-178
- Pang, C. S., and Pang, S. F. (1992) High affinity specific binding of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin by spleen membrane preparations of chicken. *J. Pineal Res.* 12, 167-173
- Poon, A. M. S., and Pang, S. F. (1992) 2-[¹²⁵I]iodomelatonin binding sites in spleens of guinea pigs. *Life Sci.* 50, 1719-1726
- Lopez-Gonzalez, M. A., Martin-Cano, A., Calvo, J. R., Reiter, R. J., Osuna, C., and Guerrero, J. M. (1993) Specific binding of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin by partially purified membranes of rat thymus. *J. Neuroimmunol.* 45:45, 121-126
- Martin-Cano, A., Lopez-Gonzalez, M. A., Reiter, R. J., Calvo, J. R., and Guerrero, J. M. (1993) Binding of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin by rat thymus membranes during postnatal development. *Immunol. Lett.* 36, 59-64
- Rafii-El-Idrissi, M., Calvo, J. R., Poon, D., Harmouch, A., and Guerrero, J. M. (1995) Specific binding of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin by rat splenocytes: characterization and its role on regulation of cyclic AMP production. *J. Neuroimmunol.* 57, 171-178
- Bayam, A. (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21, 51-76
- Guerrero, J. M., Prieto, J. C., Elorza, F. L., Ramirez, R., and Goberna, R. (1981) Interaction of vasoactive intestinal peptide with human blood mononuclear cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 21, 151-160
- Scatchard, G. (1949) The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51, 660-672
- Vanocok, J. (1988) Melatonin binding sites. *J. Neurochem.* 51, 1436-1440
- Weaver, D. R., Rivkova, S. C., and Reppert, S. M. (1989) Localization and characterization of melatonin receptors in rodent brain by in vitro autoradiography. *J. Neurosci.* 9, 2581-2590
- Laitinen, J. T., and Saavedra, J. M. (1990) Characterization of melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nuclei: modulation of affinity with octanoic and guanine nucleotides. *Endocrinology* 126, 2110-2115
- Laitinen, J. T., Filipp, G., and Saavedra, J. M. (1990) Characterization of melatonin receptors in the rat area postrema: modulation of affinity with octanoic and guanine nucleotides. *Neuroendocrinology* 51, 619-624
- Reiter, R. J. (1986) Normal patterns of melatonin in the pineal gland and body fluids of human and experimental animals. *J. Neural Transm. (Suppl.)* 21, 35-54
- Laitinen, J. T., Castron, E., Vakkuri, O., and Saavedra, J. M. (1989) Diurnal rhythm of melatonin binding in the rat suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology* 124, 1585-1587
- Yuan, H., and Pang, S. F. (1991) [¹²⁵I]iodomelatonin-binding sites in the pigeon brain: binding characteristics, regional distribution and diurnal variation. *J. Endocrinol.* 128, 475-482
- Reiter, R. J., Pottarborg, I. J., Trakulrungsri, C., and Trakulrungsri, W. K. (1980) Surgical removal of the olfactory bulbs increases sensitivity of the reproductive system of female rats to the inhibitory effects of late afternoon melatonin injection. *J. Exp. Zool.* 212, 47-52

Received for publication April 20, 1995.

Accepted for publication July 19, 1995.

VII.- BIBLIOGRAFÍA

- Abo, T., Kawate, T., Itoh, K. y Kumagai, K. (1981)**
Studies on the bioperiodicity of the immune response. I. Circadian rhythms of human T, B and K cell traffic in the peripheral blood.
J. Immunol., 126, 1360-1364.
- Acuña-Castroviejo, D., García del Río, C., García-Torres, L., Luna, J. y Osorio, C. (1984)**
Role of pineal gland in kidney-adrenal homeostasis.
Horm. Metab. Res., 16, 589-592.
- Acuña-Castroviejo, D., Reiter, R. J., Menéndez-Peláez, A., Pablos, M. I. y Burgos, A. (1994)**
Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver.
J. Pineal Res., 16, 100-112.
- Ahlborn, F. (1883)**
Untersuchungen über das Gehirn der Petromyzonten.
Z. Wiss. Zool., 39, 191-294.
- Aldhous, M.E. y Arendt, J. (1988)**
Radioimmunoassay for 6-sulphatoximelatonin in urine using an iodinated tracer.
Ann. Clin. Biochem., 25, 798-303.
- Anis, Y. y Zisapel, N. (1991)**
Castration affects brain iodomelatonin binding in hamsters maintained in long but not short days.
Mol. Cell. Endocrinol., 76, 23-24.
- Arai, K., Lee, F., Miyajima, A., Miyatake, S., Arai, N. y Yokota, T. (1990)**
Cytokines: Coordinators of immune and inflammatory responses.
Annu. Rev. Biochem., 59, 783-836.
- Arendt, J. (1986)**
Role of the pineal gland and melatonin in seasonal reproductive function in mammals.
Oxford Rev. Reprod. Biol., 8, 266-320.
- Arendt, J., Aldhous, M., English, J., Marks, V. y Arendt J. H. (1987)**
Some effects of *jet-lag* and their alleviation by melatonin.
Ergonomics, 30, 1379-1393.

Arendt, J., Wetterberg, L., Heydon, T., Sizonenko, F. C. y Paunier, L. (1977)
Radioimmunoassay of melatonin in human serum and cerebrospinal fluid.

Horm. Res., 8, 65-75.

Arendt, J., Wirz-Justice, A. y Bradtke, J. (1977)

Annual rhythm of serum melatonin in man.

Neurosci. Lett., 7, 327-330.

Armstrong, S. M. (1989)

Melatonin and circadian control in mammals.

Experientia, 45, 932-938.

Armstrong, S. M. y Redman, J. R. (1991)

Melatonin: A chronobiotic with anti-aging properties?.

Med. Hypotheses, 34, 300-309.

Artz, E. S., Fernandez-Castelo, S., Finocchiaro, L. M. E., Criscuolo, M. E., Diaz, A., Finkielman, S. y Nahmod, V. E. (1988)

Immunomodulation by indoleamines: serotonin and melatonin action on DNA and interferon- γ synthesis by human peripheral blood mononuclear cells.

J. Clin. Immunol., 8, 513-520.

Axelrod, J. (1974)

The pineal gland: a neurochemical transducer.

Science, 184, 1341-1348.

Ayre, E. A., Yuan, H. y Pang, S. F. (1992)

The identification of ^{125}I -labelled iodomelatonin-binding sites in the testis and ovaries of the chicken (*Gallus domesticus*).

J. Endocrinol., 133, 5-11.

Balzer, I. y Hardeland, R. (1991)

Photoperiodism and effects of indoleamines in a unicellular alga, *Gonyaulax polyedra*.

Science, 253, 795-797.

Banchereau, J. (1991)

Interleukin-4.

The Cytokine Handbook, A. Thomson, eds., Academic Press, Londres, 119-149.

Barlow-Walden, L. R., Reiter, R. J., Abe, M., Pablos, M. I., Menéndez-Peláez, A., Chen, L.- D. y Poeggeler, B. (1995)

Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity.
Neurochem. Int., 26, 497-502.

Bartness, T. J. y Goldman, B. D. (1988)

Peak duration of serum melatonin and short day responses in adult Siberian hamsters.
Am. J. Physiol., 255, 812.

Becker, J., Veit, G., Handgretinger, A., Attanasio, A., Bruchett, G., Treuner, I., Niethammer, D. y Gupta, D. (1988)

Circadian variations in the immunomodulatory role of the pineal gland.
Neuroendocrinol. Lett., 10, 65-78.

Ben-Nathan, D., Maestroni, G. J. M., Lusting, S. y Conti, A. (1995)

Protective effects of melatonin in mice infected with encephalitis viruses.
Arch. Virol., 140, 223-230.

Benítez-King, G., Huerto-Delgadillo, L. y Antón-Tay, F. (1990)

Melatonin effects on the cytoskeletal organization of MDCK and neuroblastoma N1E-115 cells.
J.Pineal Res., 9, 209-220.

Benítez-King, G., Huerto-Delgadillo, L. y Antón-Tay, F. (1991)

Melatonin modifies calmodulin cell levels in MDCK and N1E-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity in vitro.
Brain Res., 557, 289-292.

Benítez-King, G., Huerto-Delgadillo, L. y Antón-Tay, F. (1993)

Binding of [³H]-melatonin to calmodulin.
Life Sci., 53, 201-207.

Benítez-King, G. y Antón-Tay, F. (1993)

Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects.
Experientia, 49, 635-641.

Berga, S. L., Mortola, J. F. y Yen, S. S. C. (1988)

Amplification of nocturnal melatonin secretion in women with functional hypothalamic amenorrhea.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 66, 242-244.

Berman, L. (1921)

The Glands Regulating Personality, McGrath, College Park.

Bierer, B. E., Sleckman, B. P., Ratnofsky S. E. y Burakoff, S. J. (1989)

The biologic roles of CD2, CD4 and CD8 in T-cell activation.

Annu. Rev. Immunol., 7, 579-600.

Binkley, S., Hryshchyshyn, M. y Reilly, K. (1979)

N-acetyltransferase activity responds to environmental lighting in the eye as well as in the pineal gland.

Nature, 281, 479-481.

Blalock, J. E. (1987)

Virus induced increase in plasma corticosterone.

Science, 238, 1424-1425.

Blalock, J. E. y Smith, E. M. (1985)

A complete regulatory loop between the immune and the neuroendocrine systems.

Fedn. Proc. Fedn. Am. Soc. exp. Biol., 44, 108-111.

Blum, M., McEwen, B. S. y Roberts, J. L. (1987)

Transcriptional analysis of tyrosine hydroxylase gene expression in the tuberoinfundibular dopaminergic neurons of the rat arcuate nucleus after estrogen treatment.

J. Biol. Chem., 262, 817-821.

Blum, M. y Roberts, J. L. (1989)

Quantitation of nuclear low-level gene expression in central nervous system using solution hybridization and in situ hybridization.

Gene Probes, P. M. Conn ed., Academic Press, San Diego, 293-303.

Boya, J. y Calvo, J. (1978)

Post-hatching evolution of the pineal gland of the chicken.

Acta Anat., 101, 1-9.

Boyum, A. (1968)

Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood.

Scand. J. Clin. Lab. Invest., 21, 51-76.

Brambilla, F., Frascini, F., Esposti, G., Bossolo, P. A., Marelli, G. y Ferrari, E. (1988)
Melatonin circadian rhythm in anorexia nervosa and obesity.

Psychiat. Res., 23, 267-276.

Brinchmann, JE., Vartdal, F., Gaudernack, G., Merkussen, G., Funderud, S., Ugelstad, J. y Thorsby E. (1988)

Direct immunomagnetic quantification of lymphocyte subsets in blood.

Clin. Exp. Immunol., 71, 182-186.

Bubenik, G. A., Brown, G. M. y Grota, L. J. (1976a)

Immunohistochemical localization of melatonin in the rat Harderian gland.

J. Histochem. Cytochem., 24, 1173-1177.

Bubenik, G. A., Brown, G. M. y Grota, L. J. (1976b)

Differential localization of N-acetylated indolealkylamines in CNS and harderian gland using immunohistology.

Brain Res., 118, 417-427.

Bubenik, G. A., Brown, G. M., Uhler, T. y Grota, L. J. (1974)

Immunohistochemical localization of N-acetylindealkylamines in pineal gland, retina and cerebellum.

Brain Res., 81, 233-242.

Bubenik, G. A., Purtil, R. A., Brown, G. M. y Grota, L. J. (1978)

Melatonin in the retina and the harderian gland. Ontogeny, diurnal variations and melatonin treatment.

Exp. Eye Res., 27, 323-333.

Cagnacci, A., Soldani, R. y Yen, S. S. C. (1993)

The effect of light on core body temperature is mediated by melatonin in women.

J. Clin. Endocrinol. Metab., 76, 1036-1038.

Calvo, J. R., Rafii-El-Idrissi, M., Pozo, D. y Guerrero, J. M. (1995)

Immunomodulatory role of melatonin: specific binding sites in human and rodent lymphoid cells.

J. Pineal Res., 18, 119-126.

Capsoni, S., Viswanathan, M., De Oliveira, A. M. y Saavedra, J. M. (1994)
Characterization of melatonin receptors and signal transduction system in rat arteries forming the circle of Willis.
Endocrinology, 135, 373-378.

Cardinali, D. P. (1974)
Melatonin and the endocrine role of the pineal organ.
Current topics in experimental endocrinology. V. H. T. James y L. Martini eds., Academic press, Nueva York, 107.

Cardinali, D. P. (1981)
Melatonin. A mammalian pineal hormone.
Endocrine Rev., 2, 237-258.

Cardinali, D. P., Hyypää, M. T. y Wurtman R. J. (1973)
Fate of intracisternally injected melatonin by the rat brain.
Neuroendocrinology, 12, 30.

Cardinali, D. P., Vacas, M. I. y Estévez Boyer, E. (1979)
Specific binding of melatonin in bovine brain.
Endocrinology, 105, 437-441.

Cardinali, D. P., Vacas, M. I. y Lowenstein, P. R. (1985)
Melatonin action on brain: presumptive receptors and second messengers.
The Pineal Gland, Current State of Pineal Research, B. Mess, C. Ruzsas, L. Tima, P. Pevet eds., Elsevier, Amsterdam, 273-290.

Caroleo, M. C., Frasca, D., Nistico, G. y Doria, G. (1992)
Melatonin as immunomodulator in immunodeficient mice.
Immunopharmacology, 23, 81-89.

Carter, D. S., Hall, V. D., Tamarkin, L. y Goldman, B. D. (1982)
Pineal is required for testicular maintenance in the turkish hamster (*Mesocricetus brandti*).
Endocrinology, 111, 863-871.

Claustrat, B., Loisy, C., Brun, J., Beorchia, S., Arnaud, J. L., y Chazot, G. (1989)
Nocturnal plasma melatonin levels in migraine: a preliminary report.
Headache, 29, 242-245.

Cohen, M., Roselle, D., Chabner, B. Schmidt, T. J. y Lippman, M. (1978)

Evidence for a cytoplasmic melatonin receptor.

Nature, 274, 894-895.

Colombo, L. I., Chen, G-J., Lopez, M. C. y Watson R. R. (1992)

Melatonin induce increase in gamma-interferon production by murine splenocytes.

Immunol. Lett., 33, 123-126.

Craft, C. M., Morgan, W. W., Jones, D. J. y Reiter, R. J. (1985)

Hamster and rat pineal gland α -adrenoceptor characterization with iodocyanopindolol and the effect of decreased catecholamine synthesis on the receptor.

J. Pineal. Res., 2, 51.

Csaba, G., Fisher, J. y Acs, T. (1966)

The effect of pinealectomy and thymectomy on the immune capacity of the rat.

Experientia, 22, 168-169.

Chen, L. D., Tan, D. S., Reiter, R. J., Yaga, K., Poeggeler, B., Kumar, L., Manchester, L. C. y Chambers, J. P. (1993)

In vivo and in vitro effects of the pineal gland and melatonin on $[Ca^{2+} + Mg^{2+}]$ -dependent ATPase in cardiac sarcolemma.

J. Pineal Res., 14, 178-183.

Del Gobbo, V., Libri, V., Villani, N., Calio, R. y Nistico, G. (1989)

Pinealectomy inhibits interleukin-2 production and natural killer activity in mice.

Int. J. Immunopharmacol., 5, 567-571.

Del Prete, G., Maggi, E. y Romagnani, S. (1994)

Human T_{H1} and T_{H2} cells: Functional properties, mechanisms of regulation and role in disease.

Lab. Invest., 70, 299-307.

Desmichi, L., Demish, K. y Nickelsen, T. (1988)

Influence of dexamethasone on nocturnal melatonin production in healthy adult subjects.

J. Pineal Res., 5, 317-322.

Devecerski, V. (1963)

Contributions à l'étude de l'effect de l'epiphysectomie sur l'histophysiologie du thymus.

Acta Anat., 54, 352-353.

Di Stefano, A. y Paulesu, L. (1994)

Inhibitory effect of melatonin on production of γ -IFN or TNF- α in peripheral blood mononuclear cells of some blood donors.

J. Pineal Res., 17, 164-169.

Dubocovich, M. L. (1983)

Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina.

Nature, 306, 782-784.

Dubocovich, M. L. (1988a)

Luzindole (N-0774): a novel melatonin receptor antagonist.

J. Pharmacol. Exp. Ther., 246, 902-910.

Dubocovich, M. L. (1995)

Melatonin receptors: are there multiple subtypes?.

TIPS, 16, 50-55.

Dubocovich, M. L. (1996)

Functional and molecular melatonin receptor subtypes (Abstr.).

II Meeting on Neuroendocrinology. Therapeutic potential of the pineal hormone melatonin, Locarno, Suiza.

Dubocovich, M. L. y Takahashi, J. S. (1987)

Use of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 3916-3920.

Duncan, M. J., Takahashi, J. S. y Dubocovich, M. L. (1988)

2-[¹²⁵I]iodomelatonin binding sites in hamster brain membranes: Pharmacological characteristics and regional distribution.

Endocrinology, 122, 1825-1833.

Duncan, M. J., Takahashi, J. S. y Dubocovich, M. L. (1989)

Characteristics and autoradiographic localization of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin binding sites in djungarian hamster brain.

Endocrinology, 125, 1011-1018.

Ebadi, M. (1984)

Regulation of the synthesis of melatonin and its significance to neuroendocrinology.

The pineal gland, R. J. Reiter ed., Raven Press, Nueva York, 1-38.

Ebisawa, T., Karne, S., Lerner, M. R. y Reppert, S. M. (1994)

Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores.

Proc. Natl. Acad. Sci., 91, 6133-6137.

Fairchild, D. L. y Pate, J. L. (1989)

Gamma-interferon induction of major histocompatibility complex antigens on cultured bovine luteal cells.

Biol. Reprod., 40, 453-457.

Farrar, M. A. y Schreiber, R. D. (1993)

The molecular cell biology of gamma-interferon and its receptor.

Annu. Rev. Immunol., 11, 571-611.

Fernandes, G., Carandente, F., Halberg, E., Halberg, F. y Good, R. A. (1979)

Circadian rhythm in activity of lymphocytic natural killer cells from spleens of Fischer rats.

J. Immunol., 123, 622-625.

Fèvre-Montagne, M., Van Cauter, E., Refetoff, S., Désir, D., Tourniaire, J. y Copinschi, G. (1981)

Effects of *jet-lag* on hormonal patterns. II. Adaptation of melatonin circadian periodicity.

J. Clin. Endocrinol. Metab., 52, 642-649.

Fiorentino D. F., Bond, M. W. y Mosmann, T. R. (1989)

Two types of mouse T helper cell. IV. T_{H2} clones secrete a factor that inhibits cytokine production by T_{H1} clones.

J. Exp. Med., 170, 2081-2096.

Finocchiaro, L. M. E., Arzt, E. S., Fernández-Castelo, S., Criscuolo, M., Finkielman, S. y Nahmod, V. (1988)

Serotonin and melatonin synthesis in peripheral mononuclear cells: Stimulation of gamma interferon as part of an immunostimulatory pathway.

J. Interf. Res., 8, 705-716.

Funderud, S., Nustad, K., Lea, T., Vartdal, F., Gaudernack, G., Stenstad, P. y Ugelstad, J. (1987)

Fractionation of lymphocytes by immunomagnetic beads.

Lymphocytes: A Practical Approach. Klaus GGB ed., IRL press, Oxford, 55-65.

Garland, J. M. (1991)

Colony stimulating factors.

The Cytokine Handbook, A. Thomson eds., Academic Press, Londres, 269-301.

Gaudernack, G., Leivestad, T., Ugelstad, J. y Thorsby, E. (1986)

Isolation of pure functionally active CD8+ T cells.

J. Imm. Meth., 90, 179-187.

Gearing, A.J.H. y Thorpe, R. (1988)

The international standard for human interleukin-2. Calibration by international collaborative study.

J. Imm. Meth., 114, 3-9.

Giordano, M. y Palermo, M. S. (1991)

Melatonin induced enhancement of antibody-dependent cellular cytotoxicity.

J. Pineal Res., 10, 117-121.

Giordano, M., Vermeulen, M. y Palermo, M. S. (1993)

Seasonal variations in antibody-dependent cellular cytotoxicity regulation by melatonin.

FASEB J., 7, 1052-1054.

Glass, J. D. y Lynch, G. R. (1981)

Melatonin: Identification of site of antigonadal action in mouse brain.

Science, 214, 821-823.

Glass, J. D. y Lynch, G. R. (1982)

Evidence for a brain site of action in the white-footed mouse *Peromyscus leucopus*.

Neuroendocrinology, 34, 1.

Goldman, B. D. y Darrow, J. M. (1983)

The pineal gland an mammalian photoperiodism.

Neuroendocrinology, 37, 386.

**Goldstein, D., Gockerman, J., Krishnan, R., Ritchie, J. Jr., Tso, C. Y., Hood, L. E.,
Ellinwood, E. y Laszlo, J. (1987)**

Effect of γ -interferon on the endocrine system: Results from a Phase 1 Study.

Cancer Res., 47, 6396-6401.

Grimm, E. A., Mazumder, A., Zhang, H. Z. y Rosenberg, S. A. (1982)

Lymphokine-activated killer cell phenomenon.

J. Exp. Med., 155, 1823-1841.

Grimm, E. A., Robb, R. J., Roth, J. A., Neckers, L. M., Lachman, L. B., Wilson, D. J. y Rosenberg, S. A. (1983)

Lymphokine-activated killer cell phenomenon. III. Evidence that IL-2 is sufficient for direct activation of peripheral blood lymphocytes into lymphokine-activated killer cells.

J. Exp. Med., 158, 1356-1361.

Grota, L. J., Holloway, W. R. y Brown, G. M. (1982)

24-hour rhythm of hypothalamic melatonin immunofluorescence correlates with serum and retinal melatonin rhythms.

Neuroendocrinology, 34, 363-368.

Guerrero, J. M., Calvo, J. R., Osuna, C. y López-González, M. A. (1994)

Binding of melatonin by lymphoid cells in humans and rodents.

Adv. Pineal Res., 7, 109-117.

Guerrero, J. M. y Reiter, R. J. (1992)

A brief survey of pineal gland-immune system interrelationships.

Endocr. Res., 18, 91-113.

Hamm, H. E. y Menaker, M. (1980)

Retinal rhythms in chicks: Circadian variation in melatonin and serotonin N-acetyl transferase activity.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, 4998-5002.

Hanney, C. S., Kuribayashi, K., Kern, D. E. y Gillis, S. (1981)

Interleukin-2 augments natural killer cell activity.

Nature, 291, 335-337.

Hardeland, R., Reiter, R. J., Poeggeler, B. y Tan, D. X. (1993)

The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of bioactive substances.

Neurosci Biobehav. Rev., 17, 347-357.

Haus, H., Lakouta, D. J., Swoyer, J. y Sackett-Lundeen, L. (1983)

Chronobiology in hematology and immunology.

Am. J. Anat., 168, 467-517.

Hoffman, R. A., Johnson, L. B. y Reiter, R. J. (1985)

Harderian glands of golden hamsters: temporal and sexual differences in immunoreactive melatonin.

J. Pineal Res., 2, 161-168.

Honda, M., Kitamura, K., Mizutani, Y., Oishi, M., Arai, M., Okura, T., Igarahi, K., Yasukawa, K., Hirano, T., Kishimoto, T., Mitsuyasu, R., Chermann, J.C. y Tokunaga, T. (1990)

Quantitative analysis of serum IL-6 and its correlation with increased levels of serum IL-2R in HIV-induced diseases.

J. Immunol., 145, 4059-4064.

Howard, M., Farrar, J., Hilfiker, M., Johnson, B., Takatsu, K., Hamaoka, T. y Paul, W. (1982)

Identification of a T cell-derived B cell growth factor distinct from IL-2.

J. Exp. Med., 155, 914-923.

Huether, G., Poeggeler, B., Reimer, A. y 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 Sci., 51, 945.

Iguchi, H., Kato, K. e Ibayashi, H. (1982)

Age-dependent reduction in serum melatonin concentrations in healthy human subjects.

J. Clin. Endocrinol. Metab., 55, 27-29.

Jackson, F. L., Heindel, J. J., Preslock, J. P. y Berkowitz, A. S. (1982)

Alterations in hypothalamic content of luteinizing hormone-releasing hormone associated with pineal mediated testicular regression in the golden hamster.

Biol. Reprod., 31, 436-445.

Jankovic, J. D., Isakovic, K. y Petrovic, S. (1970)

Effect of pinealectomy on immune reactions in the rat.

Immunology, 18, 1-6.

Kaneko, M., Elimban, V. y Dhalla, N. S. (1989)

Mechanism of depression of heart sarcolemmal Ca²⁺ pump by oxygen free radicals.

Am. J. Physiol., 257, H804-H811.

Kappers, J. A. (1980)

Descartes (1596-1650) and the pineal gland.

European Pineal Study Group Newsletter 3, P. Pévet y E. Tapp eds., Elsevier, Amsterdam.

Kappers, J. A. (1981)

The Pineal Gland. I. Anatomy and Biochemistry, Boca Raton, CRC press, Florida.

Karasaki, Y., Jaken, S., Komoriya, A. y Zoon, K. C. (1989)

Phorbol ester and γ -interferon modulation of epidermal growth factor receptors on human amniotic (WISH) cells.

J. Biol. Chem., 264, 6158-6163.

Kelso, A. (1995)

T_{H1} and T_{H2} subsets: paradigms lost ?

Immunol. Today, 16, 374-379.

Kennedi, R. L. y Jones, T. H. (1991)

Cytokines in endocrinology: their roles in health and in disease.

J. Endocrinol., 129, 167-178.

Kilduff, T. S. (1987)

Hibernation.

Encyclopedia of Neuroscience 2, G. Adelman ed., Birkhauser, Boston/Basel/Stuttgart, 486-492.

King, T. S., Steinlechner, S., Steger, R. W., Richardson, B. A. y Reiter, R. J. (1982)

Tryptophan loading inhibits serotonin N-acetyltransferase activity in the rat pineal gland.

Trans. Soc. Neurosci., 10, 763.

Kitay, J.I. y Altschule, M.D. (1954)

The pineal gland. A review of the physiologic literature. Cambridge Mass ed., Harvard University press, Cambridge, 280.

Klein, D. C., Sugden, D. y Weller, J. L. (1983)

Postsynaptic α -adrenergic receptors potentiate the β -adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 599.

Kopin, I.J., Pare, M.B., Axelrod, J. y Weissbach, H. (1961)

The fate of melatonin in animals.

J. Biol. Chem., 236, 3072.

Kuci, S., Becker, J., Veit, G., Handgretinger, R., Attanasio, A., Bruchelt, G., Treuner, J., Niethamer, D. y Gupta, D. (1988)

Circadian variations in the immunomodulatory role of the pineal gland.

Neuroendocrinol. Lett., 10, 65-78.

Kupfer, A. y Singer, S. J. (1989)

Cell Biology of cytotoxic and helper T-cell functions.

Annu. Rev. Immunol. 7, 309-337.

Laitinen, J. T., Castren, E., Vakkuri, O. y Saavedra, J. M. (1989)

Diurnal rhythm of melatonin binding in the rat suprachiasmatic nucleus.

Endocrinology, 124, 1585-1587.

Laitinen, J. T., Flugge, G. y Saavedra, J. M. (1990)

Characterization of melatonin receptors in the rat area postrema: modulation of affinity with cations and guanine nucleotides.

Neuroendocrinology, 51, 619-624.

Laitinen, J. T. y Saavedra, J. M. (1990a)

The chick retinal melatonin receptor revisited: Localization and modulation of agonist binding with guanine nucleotides.

Brain Res., 528, 349-352.

Laitinen, J. T. y Saavedra, J. M. (1990b)

Characterization of melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nuclei: modulation of affinity with cations and guanine nucleotides.

Endocrinology, 126, 2110-2115.

Lakin, M. L., Miller, C. H., Stott, M. L. y Winters, W. D. (1981)

Involvement of the pineal gland and melatonin in murine analgesia.

Life Sci., 29, 2543-2551.

Landay, A. y Muirhead, K. (1989)

Procedural guidelines for performing immunophenotyping by flow cytometry.

Clin. Immunol. Immunopathol., 52, 48-60.

Laudon, M. y Zisapel, N. (1986)

Characterization of a retinal melatonin receptor using 2-[¹²⁵I]-iodomelatonin.
FEBS Lett., 197, 9.

Lea, T., Smeland, E.B., Funderud, S., Vartdal, F., Davies, C., Beiske, K., y Ugelstad, J. (1986) Characterization of human mononuclear cells after positive selection with immunomagnetic particles.

Scand.J. Immunol., 23, 509-519.

Lee, P. P. N. y Pang, S. F. (1992)

Identification and characterization of melatonin binding sites in the gastrointestinal tract of ducks.

Life Sci., 50, 117-125.

Leino, M. y Airaksinen, M. M. (1985)

Methoxyindoles of the retina.

Medical Biology, 63, 160-169.

Leivestad, T., Gaudernack, G., Ugelstad, J., Vartdal, F. y Thorsby, E. (1987)

Isolation of pure and functionally active T₄ and T₈ cells by positive selection with antibody-coated monosized magnetic microspheres.

Transplantation Proceedings, XIX, 265-267.

Lerner, A. B., Case, J. D., Takahashi, Y., Lee, Y. y Mori, W. (1958)

Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes.

J. Am. Chem. Soc., 80, 2587.

Lesniewska, B., Nowak, M., Nussdorfer, G. G. y Malendowicz, L. K. (1990)

Sex-dependent effect of melatonin on the secretory activity of rat and hamster adrenal gland in vitro.

Life Sci., 47, 241-245.

Lewy, A. J., Kern, H. E., Rosenthal N. E. y Wehr T. A. (1982)

Bright artificial light treatment of a manic depressive patient with seasonal mood cycle.

Am. J. Psychiatry, 139, 1496-1498.

Lewy A. J. y Newsome, D. A. (1983)

Different types of melatonin circadian rhythms in some blind subjects.

J. Clin. Endocrinol. Metab., 56, 1103.

Lieberman, H. R., Waldhauser, F., Garfield, G., Lynch, H. y Wurtman, R. J. (1984)
Effects of melatonin on human mood and performance.

Brain Res., 323, 201-207.

Lissoni, P., Barni, S., Crispino, S., Tancini, G. y Frascini, F. (1989)

Endocrine and immune effects of melatonin therapy in metastatic cancer patients.

Eur. J. Cancer. Clin. Oncol., 25, 789-795.

Lissoni P., Barni, S., Tancini, G., Ardizzoia, A., Ricci, G., Aldeghi, R., Brivio, F., Tisi, E., Rovelli, F., Rescaldani, R., Quadro, G. y Maestroni, G. J. M. (1994)

A randomised study with subcutaneous low-dose interleukin-2 alone vs interleukin-2 plus the pineal neurohormone melatonin in advanced solid neoplasms other than renal cancer and melanoma.

Br. J. Cancer, 69, 196-199.

Lissoni, P., Barni, S., Tancini, G., Rovelli, F., Ardizzoia A., Conti, A. y Maestroni, G. J. M. (1993)

A study of the mechanisms involved in the immunostimulatory action of the pineal hormone in cancer patients.

Oncology, 50, 399-402.

Lissoni, P., Esposti, D., Esposti, G., Mauri, R., Resentini, M., Morabio, F., Fumagalli, P., Santagostino, A., Delitala, G. y Frascini, F. (1986)

Clinical study of the relationship between the pineal gland and the opioid system.

J. Neural Transm., 65, 63-73.

Lissoni, P., Tisi, E., Brivio, F., Ardizzola, A., Crispino, S., Barni, S., Tancini, G., Conti, A. y Maestroni, G. J. M. (1991)

Modulation of interleukin-2 induced macrophage activation in cancer patients by the pineal hormone melatonin.

J. Biol. Regul. Homeost. Agents, 5, 154-156.

Liu, Z. M. y Pang, S. F. (1992a)

[¹²⁵I]iodomelatonin binding sites in the duct bursa of fabricius: Binding characteristics and diurnal variation.

Neurosci. Lett., 146, 163-166.

Liu, Z. M. y Pang, S. F. (1992b)

Binding of [¹²⁵I]labelled iodomelatonin in the duck thymus.

Biol. Signals, 1, 271-278.

Liu, Z. M. y Pang, S. F. (1993)

[¹²⁵I]iodomelatonin binding sites in the bursa of Fabricius of birds: binding characteristics, subcellular distribution, diurnal variations and age studies.

J. Endocrinol., 138, 51-57.

López-González, M. A., Calvo, J. R., Osuna, C. y Guerrero, J. M. (1992a)

Interaction of melatonin with human lymphocytes: Evidence for binding sites coupled to potentiation of cyclic AMP stimulated by vasoactive intestinal peptide and activation of cyclic GMP.

J. Pineal Res., 12, 97-104.

López-González, M. A., Calvo, J. R., Osuna, C. Rubio, A. y Guerrero, J. M. (1992b)

Melatonin potentiates cyclic AMP production stimulated by vasoactive intestinal peptide in human lymphocytes.

Neurosci. Lett., 136, 150-152.

López-González, M. A., Calvo, J. R., Rubio, A., Goberna, R. y Guerrero, J. M. (1991)

Characterization of melatonin binding sites in the Harderian gland and median eminence of the rat.

Life Sci., 48, 1165-1171.

López-González, M. A., Calvo, J. R., Segura, J. J. y Guerrero, J. M. (1993a)

Characterization of melatonin binding sites in human peripheral blood neutrophils.

Biotechnol. Ther., 4, 253-262.

López-González, M. A., Martín-Cacao, A., Calvo, J. R., Reiter, R. J., Osuna, C. y Guerrero, J. M. (1993b)

Specific binding of 2-[¹²⁵I]melatonin by partially purified membranes of rat thymus.

J. Neuroimmunol., 45, 121-126.

MacLean, D. y Reichlin, S. (1981)

Neuroendocrinology and the immune process.

Psychoneuroimmunology, R. Ader ed., Academic Press, Nueva York, 475-520.

MacMurray, J. P., Barker, J. P., Armstrong, J. K., Bozzetti, L. P. y Kuhn, I. N. (1983)

Circannual changes in immune function.

Life Sci., 32, 2363-2370.

Maestroni, G. J. M. (1995)

T-helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin.
J. Pineal Res., 18, 84-89.

Maestroni, G. J. M. y Conti, A. (1989)

Beta-endorphin and dinorphin mimic the circadian immunoenhancing and anti-stress effects of melatonin.
Int. J. Immunopharmacol., 11, 333-340.

Maestroni, G. J. M. y Conti, A. (1990a)

The pineal neurohormone melatonin stimulates activated CD4⁺, Thy-1⁺ cells to release opioid agonist(s) with immunoenhancing and anti-stress properties.
J. Neuroimmunol., 28, 167-176.

Maestroni, G. J. M. y Conti, A. (1990b)

The melatonin-immune system-opioid network.
Advances in Pineal Research, 4, R. J. Reiter y A. Lukaszyk eds., J. Libbey y Co. Ltd., Londres, 295-302.

Maestroni, G. J. M. y Conti, A. (1991)

Action of melatonin on immune system.
Role of Melatonin and Pineal Peptides in Neuroimmunomodulation, F. Fraschini y R. Reiter eds., Plenum Press, Nueva York, 201-210.

Maestroni, G. J. M., Conti, A. y Lissoni, P. (1994)

Colony-stimulating activity and hematopoietic rescue from cancer chemotherapy compounds are induced by melatonin via endogenous interleukin-4.
Cancer Res., 54, 4740-4743.

Maestroni, G. J. M., Conti, A. y Pierpaoli, W. (1986)

Role of the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone.
J. Neuroimmunol., 13, 19-30.

Maestroni, G. J. M., Conti, A. y Pierpaoli, W. (1987)

Role of the pineal gland in immunity. II. Melatonin enhances the antibody response via an opiate mechanism.
Clin. Exp. Immunol., 68, 384-391.

- Maestroni, G. J. M., Conti, A. y Pierpaoli, W. (1988a)**
Role of the pineal gland in immunity. III. Melatonin antagonizes the immunosuppressive effect of acute stress via an opiate mechanism.
Immunology, 63, 465-469.
- Maestroni, G. J. M., Conti, A. y Pierpaoli, W. (1988b)**
Pineal melatonin, its fundamental immunoregulatory role in aging and cancer.
Ann. N. Y. Acad. Sci., 251, 140-148.
- Maestroni, G. J. M., Conti, A. y Pierpaoli, W. (1989)**
Melatonin, stress and the immune system.
Pineal Research Review 7, R. J. Reiter ed., Alan R. Liss, Nueva York, 203-226.
- Maestroni, G. J. M., Covacci, V. y Conti, A. (1994)**
Hematopoietic rescue via T-cell-dependent, endogenous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induced by the pineal neurohormone melatonin in tumor-bearing mice.
Cancer Res., 54, 2429-2432.
- Maestroni, G. J. M., Hertens, E., Galli, P. y Conti, A. (1996)**
New T-Helper cell opioid cytokines as mediators of the immunological and hematopoietic action of melatonin (Abstr.)
II Meeting on Neuroendocrinology. Therapeutic potential of the pineal hormone melatonin, Locarno, Suiza.
- Maestroni, G. J. M. y Pierpaoli, W. (1981)**
Pharmacologic control of the hormonally mediated immune response.
Psychoneuroimmunology, R. Ader ed., Academic Press, Nueva York, 405-413.
- MacLean, D. y Reichlin, S. (1981)**
Neuroendocrinology and the immune process.
Psychoneuroimmunology, R. Ader ed, Academic Press, Nueva York, 475-520.
- Marczynski, T. J., Yamaguchi, N., Ling, G. M. y Grodzinska, L. (1964)**
Sleep induced by the administration of melatonin (5-methoxy-N-acetyl tryptamine) to the hypothalamus in unrestrained cats.
Experientia, 20, 435-437.

Martín-Cacao, A., López-González, M. A., Reiter, R. J., Calvo, J. R. y Guerrero, J. M. (1993)

Binding of 2-[¹²⁵I]melatonin by rat thymus membranes during postnatal development.
Immunol. Lett., 36, 59-64.

McCord, C. P. y Allen, F. B. (1917)

Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation.

J. Exp. Zool., 23, 207-224.

McNulty, J. A., Relfson, M., Fox, L. M., Kus, L., Handa, R. J. y Schneider, G. B. (1990)

Circadian analysis of mononuclear cells in the rat following pinealectomy and superior cervical ganglionectomy.

Brain Behav. Immun., 4, 292-307.

Menéndez-Peláez, A., Howes, K. A., González-Brito, A. y Reiter, R. J. (1987)

N-acetyltransferase activity, hydroxyindole-O-methyltransferase activity, and melatonin levels in the harderian glands of the female Syrian hamster. Changes during the light:dark cycle and the effects of 6-chlorophenyl-alanine administration.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 145, 1231-1238.

Menéndez-Peláez, A. y Reiter, R. J. (1993)

Distribution of melatonin in mammalian tissues: Relative importance of nuclear versus cytosolic localization.

J. Pineal Res., 15, 59-69.

Menéndez-Peláez, A., Reiter, R. J., Guerrero, J. M., Puig-Domingo, J. y Howes, K. A. (1988)

Sexual dimorphism in N-acetyltransferase activity, hydroxyindole-O-methyltransferase activity and melatonin content in the harderian glands of Syrian hamsters: Changes following gonadectomy.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 187, 287-291.

Menéndez-Peláez, A., Rodríguez, C. y Domínguez, P. (1991)

5-Aminolevulenate synthase mRNA levels in the harderian gland of syrian hamsters: Correlation with porphyrin concentrations and regulation by androgens and melatonin.

Molec. Cell Endocrinol., 80, 177-182.

Mennenga, K., Ueck, M. y Reiter, R. J. (1990)

Immunocytochemical results with melatonin antiserum in the pineal gland and retina of the pigeon.

Advances in Pineal Research 4, R. J. Reiter, A. Lukaszyc eds. John Libbey, Londres, 69-74.

Mennenga, K., Ueck, M. y Reiter, R. J. (1991)

Immunohistological localization of melatonin in the pineal gland and retina of the rat.

J. Pineal Res., 10, 159-164.

Meusy-Desolle, N. y Tillet, Y. (1992)

Immunohistochemical demonstration of melatonin in the female mink harderian gland.

Anat. Rec., 234, 549-554.

Mhatre, M. C., van Jarrsveld, A. y Reiter, R. J. (1988)

Melatonin in the lacrimal gland: First demonstration and experimental manipulation.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 153, 1186-1192.

Miceli, M. C. y Parnes, J. R. (1993)

The role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation.

Adv. Immunol., 53, 59-122.

Milcu, S. M. y Pitis, M. (1943)

Contributions à l'étude de la corrélation thymo-épiphyserie.

Acta Anat., 9, 13-15.

Miyaura, C., Onozaki, K., Akiyama, Y., Taniyama, T., Hirano, T., Kishimoto, T. y Suda (1988)

Recombinant human interleukin-6 (B-cell stimulatory factor 2) is a potent inducer of differentiation of mouse myeloid leukemia cells (M1).

FEBS Lett., 234, 17-21.

Monteleone, P., Fuschino, A., Nolfo, F. y Maj, M. (1992)

Temporal relationship between melatonin and cortisol responses to night-time physical stress in humans.

Psychoneuroendocrinology, 17, 81-86.

Moore, R.Y. y Klein, D.C. (1974)

Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity.

Brain Res., 71, 17.

- Morgan, P. J., Barrett, P., Howell, H. E. y Helliwell, R. (1993)**
Melatonin receptors: Localization, molecular pharmacology and physiological significance.
Neurochem. Int., 24, 101-146.
- Morgan, P. J., Lawson, W., Davidson, G. y Howell, H. E. (1989b)**
Guanine nucleotides regulate the affinity of melatonin receptors on the ovine pars tuberalis.
Neuroendocrinology, 50, 359-362.
- Morgan, P. J., Lawson, W., Davidson, G. y Howell, H. E. (1989c)**
Melatonin inhibits cyclic AMP production in cultured ovine pars tuberalis cells.
J. Mol. Endocrinol., 3, R5-R8.
- Morgan, P. J. y Williams, L. M. (1989)**
Central melatonin receptors: Implications for a mode of action.
Experientia, 45, 955-965.
- Morgan, P. J., Williams, L. M., Davidson, G., Lawson, W. y Howell, H. E. (1989a)**
Melatonin receptors on ovine pars tuberalis: characterization and autoradiographical localization.
J. Neuroendocrinol., 1, 1-4.
- Morrey, K. M., McLachlan, J. A., Serkin, C. D. y Bakouche, O. (1994)**
Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin.
J. Immunol., 153, 2671-2680.
- Mosmann, T. R. y Coffman, R. L. (1989)**
T_{H1} and T_{H2} cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties.
Ann. Rev. Immunol., 7, 146-147.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. y Coffman, R. L. (1986)**
Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.
J. Immunol., 136, 2348-2357.
- Nathan, C. F., Murray, H. W., Wiebe, M. E. y Rubin, B. Y. (1983)**
Identification of interferon as the lymphokine that activates human macrophages oxidative metabolism and antimicrobial activity.
J. Exp. Med., 158, 670-689.

- Niles, L. P. (1989)**
High-affinity binding sites for melatonin in hamster spleen.
Med. Sci. Res., 17, 179-180.
- Niles, L. P. y Hashemi, S. S. (1990)**
Pharmacological inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in rat brain by melatonin, its analogs and diazepam.
Biochem. Pharmacol., 40, 2701-2705.
- Niles, L. P., Wong, Y-W., Mishra, R. K. y Brown, G. M. (1979)**
Melatonin receptors in brain.
Eur. J. Pharmacol., 55, 219-220.
- Pang, S.F. y Allen, A. E. (1986)**
Extra-pineal melatonin in the retina: Its regulation and physiological function.
Pineal. Res. Rev., 4, 55-95.
- Pang, C. S., Brown, G. M., Tang, P. L., Cheng, K. M. y Pang, S. F. (1993)**
2-[¹²⁵I]iodomelatonin binding sites in the lung and heart: A link between the photoperiodic signal, melatonin, and the cardiopulmonary system.
Biol. Signals, 2, 228-236.
- Pang, C. S. y Pang, S. F. (1992)**
High affinity specific binding of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin by spleen membrane preparations of chicken.
J. Pineal Res., 12, 167-173.
- Pang, C. S., Tsang, K. F. L., Brown, G. M. y Pang, S. F. (1994)**
Specific 2-[¹²⁵I]iodomelatonin binding sites in the duck adrenal gland.
Neurosci. Lett., 165, 55-58.
- Pardridge, W. M. y Mietus, L. J. (1980)**
Transport of albumin-bound melatonin through the blood-brain barrier.
J. Neurochem., 34, 1761.
- Pène, J., Rousset, F., Brière, F., Chrétien, I., Bonnefoy, J. Y., Spits, H., Yokota, T., Arai, N., Arai, K., Banchemreau, J. y de Vries, J. I. (1988a)**
Ig E production by normal human lymphocytes is induced by interleukin-4 and suppressed by interferons gamma y alpha and prostaglandin E₂.
Proc. Natl. Acad. Sci., 85, 6880-6884.

Pène, J., Rousset, F., Brière, F., Chrétien, I., Paliard, X., Banchereau, J., Spits, H. y De Vries J. E. (1988b)

Ig E production by normal human B cells induced by alloreactive T cell Clones is mediated by interleukin-4 and suppressed by gamma-interferon.

J. Immunol., 141, 1218-falta última página.

Persengiev, S. P., Kanchev, L. M. y Stankov, B. M. (1989)

Effect of melatonin on steroid production by rat adrenals under in vitro superfusion conditions.

Life Sci., 66, 1955-1962.

Persengiev, S., Marinova, CH. y Patchev, V. (1991)

Steroid hormone receptors in the thymus: A site of immunomodulatory action of melatonin.

Int. J. Biochem., 23, 1483-1485.

Persengiev, S., Patchev, V. y Velev, B. (1991)

Melatonin effects on thymus steroid receptors in the course of primary antibody responses: significance of circulating glucocorticoid levels.

Int. J. Biochem., 23, 1487-1489.

Peschel, C., Paul, W. E., Ohara, J. y Green, I. (1987)

Effect of B cell stimulatory factor/interleukin-4 on hematopoietic progenitor cells.

Blood, 70, 254-263.

Petterborg, L. J., Thalén, B. E., Kjellman, B. F. y Wetterberg, L. (1991)

Effect of melatonin replacement on serum hormone rhythms in a patient lacking endogenous melatonin.

Brain. Res. Bull., 27, 181-185.

Pieri, C., Marra, M., Moroni, F., Recchioni, R. y Marcheselli, F. (1994)

Melatonin: A peroxy radical scavenger more effective than vitamin E.

Life Sci., 15, PL271-PL276.

Pierpaoli, W., Kopp, H. G., Müller, J. y Keller, M. (1977)

Interdependence between neuroendocrine programming and the generation of immune recognition in ontogeny.

Cell. Immunol., 29, 16-27.

Pierpaoli, W. y Regelson, W. (1994)

Pineal control of aging: Effect of melatonin and pineal grafting on aging mice.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 787-791.

Pioli, C., Caroleo, M. C., Nistico, G. y Doria, G. (1993)

Melatonin increases antigen presentation and amplifies specific and non specific signals for T-cell proliferation.

Int. J. Immunopharmacol., 15, 463-469.

Poeggeler, B., Reiter, R. J., Tan, D. X., Chen, L. D. y Manchester, L. C. (1993)

Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: A hypothesis.

J. Pineal Res., 14, 151-168.

Pontoire, C., Bernard, M., Silvain, C., Collin, J-P y Voisin, P. (1993)

Characterization of melatonin binding sites in chicken and human intestines.

Eur. J. Pharmacol., 247, 111-118.

Poon, A. M. S., Liu, Z. M. y Pang, S. F. (1994)

Cortisol decreases 2-[¹²⁵I]iodomelatonin binding sites in the duck thymus.

Eur. J. Endocrinol., 130, 320-324.

Poon, A. M. S. y Pang, S. F. (1992a)

Constant light exposure increases 2-[¹²⁵I]iodomelatonin binding sites in the guinea pig spleen.

Neurosci. Lett., 146, 41-44.

Poon, A. M. S. y Pang, S. F. (1992b)

2-[¹²⁵I]-iodomelatonin binding sites in spleens of guinea pigs.

Life Sci., 50, 1719-1726.

Poon, A. M. S. y Pang, S. F. (1994)

Modulation of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin binding sites in the guinea pig spleen by melatonin injection is dependent on the dose and period but not the time.

Life Sci., 54, 1441-1448.

Poon, A. M. S., Wang, X. L. y Pang, S. F. (1993)

Characteristics of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin binding sites in the pigeon spleen and modulation of binding by guanine nucleotides.

J. Pineal Res., 14, 169-177.

Pozo, D., Reiter, R. J., Calvo, J. R. y Guerrero, J. M. (1994)

Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum.
Life Sci., 55, PL455-PL460.

Puig-Domingo, M., Webb, S. M., Serrano, J., Peinado, M. A., Corcoy, R., Rusalleda, J., Reiter, R. J. y De Leiva, A. (1992)

Melatonin related hipogonadotropic hypogonadism.
New Engl. J. Med., 327, 1356-1359.

Quan, C.P., Watanabe, S., Vuillier, F., Pires, R., Matsuo, T., Stanislawski, M., Pillot, J. y Bouvet, J.P. (1993)

Purification and partial amino acid sequence of suppressive lymphokine from a CD8+ CD57+ human T hybridoma.
Immunology, 78, 205-209.

Quay, W. B. y Ma, Y. H. (1976)

Demonstration of gastrointestinal-O-methyltransferase.
International Reports on Clinical Sciences, Medical Science, 4, 563.

Rafii-El-Idrissi, M., Calvo, J. R., Pozo, D., Harmouch, A. y Guerrero, J. M. (1995)

Specific binding of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin by rat splenocytes: characterization and its role on regulation of cyclic AMP production.
J. Neuroimmunol., 57, 171-178.

Rafii-El-Idrissi, M., Harmouch, A., Calvo, J. R. y Guerrero, J. M. (1996)

Characterization of specific binding sites of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin by rat spleen crude membranes and purified spleen cell nuclei. (Abstr.)
II Meeting on Neuroendocrinoimmunology. Therapeutic potential of the pineal hormone melatonin, Locarno, Suiza.

Raikhlin, N. T., Kvetnoy, I. M. y Tolkachev, V. N. (1975)

Melatonin may be synthesised in enterochromaffin cells.
Nature, 255, 344.

Reiter, R. J. (1973)

Pineal control of a seasonal reproductive rhythm in male golden hamsters exposed to natural daylength and temperature.
Endocrinology, 92, 423-430.

Reiter, R. J. (1981)

The mammalian pineal gland: structure and function.
Am. J. Anat., 162, 287-313.

Reiter, R. J. (1985)

Action spectra, dose-response relationships, and temporal aspects of light's effects on the pineal gland.
Ann. N. Y. Acad. Sci., 453, 215-230.

Reiter, R. J. (1986)

Normal patterns of melatonin levels in the pineal gland and body fluids of humans and experimental animals.
J. Neural Transm. [Suppl.], 21, 35-54.

Reiter, R. J. (1989)

The pineal and its indole products: Basic aspects and clinical applications.
The Brain as an Endocrine Organ, M. P. Cohen y P. P. Foa eds., Springer, Vienna, 96-159.

Reiter, R. J. (1992)

The ageing pineal gland and its physiological consequences.
Bioassays, 14, 169-175.

Reiter, Z. (1993)

Interferon: A major regulator of natural killer cell-mediated cytotoxicity.
J. Interf. Res., 13, 247-257.

Reiter, R. J., Craft, C. M., Johnson, J. E. Jr, King, T. S., Richardson, B. A., Vaughan, G. M. y Vaughan, M. K. (1981)

Age associated reduction in nocturnal pineal melatonin levels in female rats.
Endocrinology, 109, 1295-1297.

Reiter, R. J., Esquifino, A. I., Champney, T. H., Craft, C. M. y Vaughan, M. K. (1985)

Pineal melatonin production in relation to sexual development in the male rat.
Paediatric Endocrinology, D. Gupta, D. Borrelly y A. Attanasio eds., Londres, 190-202.

Reiter, R. J., Petterborg, L. J., Trakulrunsi, C. y Trakulrunsi, W. K. (1980)

Surgical removal of the olfactory bulbs increases sensitivity of the reproductive system of female rats to the inhibitory effects of late afternoon melatonin injection.
J. Exp. Zool., 212, 47-52.

Reiter, R. J. y Vaughan M. K. (1977)

Pineal antigonadotropic substances: Polypeptides and indoles.

Life Sci., 21, 159-172.

Reppert, S. M., Weaver, D. R., Rivkees, S. A. y Stopa, E. G. (1988)

Putative melatonin receptors in a human biological clock.

Science, 242, 78-81.

Richardson, B. A., Studier, E. H., Stallone, J. N. y Kennedy, C. M. (1992)

Effects of melatonin on water metabolism and renal function in male Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*).

J. Pineal Res., 13, 49-59.

Ritchie, A. W., Oswald, L., Micklem, H. S., Boyd, J. E. Elton, R. A., Jazwinska, E. y James, K. (1983)

Circadian variation of lymphocyte subpopulations: A study with monoclonal antibodies.

Br. J. Med., 286, 1773-1776.

Rivkees, S. A., Carlson, L. L. y Reppert, S. M. (1989)

Guanine nucleotide-binding protein and regulation of melatonin receptors in lizard brain.

Proc. Natl. Acad. Sci., 86, 3882-3886.

Rivkees, S. A., Conron, R. W. y Reppert, S. M. (1990)

Solubilization and purification of melatonin receptors from lizard brain.

Endocrinology, 127, 1206-1214.

Rivkees, S. A. y Reppert, S. M. (1991)

Appearance of melatonin receptors during embryonic life in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*).

Brain Res., 568, 345-349.

Rosengarten, H., Meller, E. y Friedhoff, A. J. (1972)

In vitro enzymatic formation of melatonin by human erythrocytes.

Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology, 4, 457-465.

Rosenthal, N. E., Jacobsen, F., Sack, D. A., Arendt, J., James, S. P., Parry, B. L. y Wehr, T. A. (1988)

Atenolol in seasonal affective disorder: A test of the melatonin hypothesis.

Am. J. Psychiatry, 145, 52-56.

Rosolowska-Huszcz, D., Thaela, M-J., Jagura, M., Stępień, D. y Skwarlo-Sołta, K. (1991)

Pineal influence on the diurnal rhythm of nonspecific immunity indices in chickens.
J. Pineal Res., 10, 190-195.

Rubio, A., Guerrero, J. M., Reiter, R. J. y Osuna, C. (1993)

Involvement of α - and β -adrenergic receptors in the regulation of rat pineal N-acetyltransferase activity during development.
Endocrinology, 132, 393-398.

Rubio, A., Osuna, C. y Guerrero, J. M. (1991)

β - and α -adrenergic mechanisms are involved in regulation of rat pineal type II thyroxine 5' - deiodinase activity during development.
Endocrinology, 128, 1661-1667.

Satake, N., Oe, H. y Shibata, S. (1991)

Vasorelaxing action of melatonin in rat isolated aorta; possible endothelium dependent relaxation.
Gen. Pharmacol., 22, 1

Scaglione, F., De Martini, G., Bernasconi, P., Maccarinelli, G., Dugnani, S. y Fraschini, F. (1990)

Effetto della melatonina sulla espressione dei recettori dell'interleuchina-2 o T-citotossi in linfociti umani (Abstr.).
II Meeting Nazionale GNI, Roma, Italia.

Scatchard, G. (1949)

The attractions of proteins for small molecules and ions
Ann. N. Y. Acad. Sci., 51, 660-672.

Schoedon, G., Troppmair, J., Adolf, G., Huber, C. y Niederwieser, A. (1986)

γ -interferon enhances biosynthesis of pterins in peripheral blood mononuclear cells by induction of GTP-cyclohydrolase I activity.
J. Interf. Res., 6, 697-703.

Shibata, S., Satake, N., Takagi, T. y Usui, H. (1989)

Vasorelaxing action of melatonin in rabbit basilar artery.
Gen. Pharmacol., 22, 677-680.

Silman, R. E., Leone, R. M. y Hooper, R. J. L. (1979)

Melatonin, the pineal gland and human puberty.

Nature, 282, 301-303.

Singer, C. (1956)

Galen on anatomical procedure.

Publications of the Wellcome Historical Medical Museum, NS 7, Londres, Nueva York.

Song, Y., Ayre, E. A. y Pang, S. (1992)

The identification and characterization of ¹²⁵I-labelled iodomelatonin-binding sites in the duck kidney.

J. Endocrinol., 135, 353-359.

Song, Y. y Pang, S. F. (1992)

[¹²⁵I]Iodomelatonin binding sites in the chicken kidney: characterization and comparison to other avian species.

Biol. Signals, 1, 313-321.

Song, Y., Poon, A. M. S., Lee, P. P. N. y Pang, S. F. (1993)

Putative melatonin receptors in the male guinea pig kidney.

J. Pineal. Res., 15, 153-160.

Stankov, B., Biella, G. Panara, C., Lucini, V., Capsoni, S., Fauteck, J. Cozzi, B. y Frascini, F. (1992)

Melatonin signal transduction and mechanism of action in the central nervous system: using the rabbit cortex as a model.

Endocrinology, 130, 2152-2159.

Stankov, B., Cozzi, B., Lucini, V., Fumagalli, P., Scaglione, F. y Frascini, F. (1991)

Characterization and mapping of melatonin receptors in the brain of three mammalian species: rabbit, horse and sheep.

Neuroendocrinology, 53, 214-221.

Stankov, B., Gervasoni, M., Scaglione, F., Perego, R., Cova, D., Marabini, L. y Frascini, F. (1993)

Primary pharmacotoxicological evaluation of 2-iodomelatonin, a potent melatonin agonist.

Life Sci., 53, 1357-1365.

Stankov, B. y Reiter, R. J. (1990)

Melatonin receptors: Current status, facts and hypothesis.

Life Sci., 46, 971-982.

Susemihl, F. (1892)

Geschichte der griechischen literatur in der Alexandrinerzeit. I-II. Leipzig (Reprinted Hildesheim, Olms 1965).

Swain, S. L. (1991)

Lymphokines and the immune response: the central role of interleukin-2.

Curr. Opinion Immunol., 3, 304-310.

Tamarkin, L., Westrom, W. K., Hamill, A. I. y Goldman, B. D. (1976)

Effect of melatonin on the reproductive systems of male and female Syrian hamsters: Diurnal rhythm in sensitivity to melatonin.

Endocrinology, 99, 1534-1541.

Tan, D. X., Poeggeler, B., Reiter, R. J., Chen, L. D., Chen, S., Manchester, L. C. y Barlow-Walden, L. R. (1993)

The pineal hormone melatonin inhibits DNA adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo.

Cancer Lett., 70, 65-71.

Tan, D. X., Reiter, R. J., Chen, L. D., Poeggeler, B., Manchester, L. C. y Barlow-Walden, L. R. (1994)

Both physiological and pharmacological levels of melatonin reduce DNA adduct formation induced by the carcinogen safrole.

Carcinogenesis, 15, 215-218.

Tillet, Y., Meusy-Desolle, N. y Martinet, L. (1989)

Immunohistochemical demonstration and radioimmunoassay of melatonin in the mink pineal gland.

Cell Tissue Res., 257, 23-28.

Vakkuri, O., Lamsa, E., Rahkamaa, E., Ruotsalainen, H. y Leppaluoto, J. (1984a)

Iodinated melatonin: preparation and characterization of the molecular structure by mass and ¹H-NMR spectroscopy.

Anal. Biochem., 142, 284-289.

Vakkuri, O., Leppaluoto, J. y Vuolteenaho, O. (1984b)

Development and validation of a melatonin radioimmunoassay using radioiodinated melatonin as tracer.

Acta Endocrinol., 106, 152-157.

Vanecek, J. (1988)

Melatonin binding sites.

J. Neurochem., 51, 1436-1440.

Vanecek, J., Pavlik, A. e Illnerova, H. (1988)

Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography.

Brain Res., 435, 359-362.

Vanecek, J. y Jansky, L. (1989)

Short days induce changes in specific melatonin binding in hamster median eminence and anterior pituitary.

Brain Res., 477, 387-390.

Van Snick, J. (1990)

Interleukin-6: an overview.

Annu. Rev. Immunol., 8, 253-278.

Vaughan, G. M. (1984)

Melatonin in humans.

Pin. Res. Rev., 2, 141-201.

Vaughan, G. M., Meyer, C. G. y Reiter, R. J. (1978)

Evidence for a pineal-gonad relationship in the human.

The Pineal and Reproduction, R. J. Reiter ed., Karger, Basel, 191-223.

Villanúa, M.A., Agrasal, C., Esquifino, A. y Fernandez-Tresguerres, J.A. (1989)

Fisiología de la glándula pineal.

Fisiología endocrina, Eudema S.A. ed., Madrid, 127-129.

Viswanathan, M., Laitinen, J. T. y Saavedra, J. M. (1990)

Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 6200-6203.

Waldhauser, F. y Dietzel, M. (1985)

Daily and annual rhythms in human melatonin secretion: Role in puberty control.
Ann. N. Y. Acad. Sci., 453, 205-214.

Waldhauser, F., Lieberman, H. R., Lynch, H. J., Waldhauser, M., Kerkner, K., Frish, H., Vierhapper, H., Waldhausl, W., Schemper, M., Wurtman, R. J., y Crowley, W. F. (1987)

A pharmacological dose of melatonin increases PRL levels in males without altering those of GH, LH, FSH, TSH, testosterone or cortisol.
Neuroendocrinology, 46, 125-130.

Waldhauser, F., Weißenbacher, G., Tatzer, E., Gisinger, B., Waldhauser, M. Schemper, M. y Frisch, H. (1988)

Alterations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 66, 648-652.

Wang, X-L., Yuan, H. y Pang, S-F. (1993)

Specific binding of [¹²⁵I]iodomelatonin in pigeon and quail spleen membrane preparations and effect with hydrocortisone-treatment.
Acta Pharmacol. Sinica, 14, 292-295.

Watson, J. y Mochizuki, D. (1980)

Interleukin-2: a class of T cell growth factor.
Immun. Rev., 51, 257-260.

Weaver, D. R., Carlson, L. L. y Reppert, S. M. (1990)

Melatonin receptors and signal transduction in melatonin-sensitive and melatonin-insensitive populations of white-footed mice (*Peromyscus leucopus*).
Brain Res., 506, 353-357.

Weaver, D. R., Rivkees, S. C. y Reppert, S.M. (1989)

Localization and characterization of melatonin receptors in rodent brain by in vitro autoradiography.
J. Neurosci., 9, 2581-2590.

Wiechmann, A. F. (1986)

Melatonin: Parallels in pineal gland and retina.
Exp. Eye Res., 42, 507-527.

Wiechmann, A. F., Bok, D. y Horwitz, J. (1986)

Melatonin binding in the frog retina: Autoradiographic and biochemical analysis.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 27, 153-163.

Wiesenberg, I., Missbach, M., Kahlen, J-P., Schröder, M. y Carlberg, C. (1995)

Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR α by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand.
Nucleic Acids Res., 23, 327-333.

Williams, L. M. y Morgan, P. J. (1988)

Demonstration of melatonin-binding sites on the pars tuberalis of the rat.
J. Endocrinol., 119, R1-R3.

Withyachumnarnkul, B., Nonaka, K. O., Santana, C., Attia, M. A. y Reiter, R. J. (1990a)

γ -interferon modulates melatonin production in rat pineal glands in organ culture.
J. Interf. Res., 10, 403-411.

Withyachumnarnkul, B., Nonaka, K. O., Attia, M. A. y Reiter, R. J. (1990b)

Changes in indole metabolism in organ cultured rat pineal gland induced by γ -interferon.
J. Pineal Res., 8, 313-322.

Withyachumnarnkul, B., Reiter, R. J., Lerchl, A., Nonaka, K. O. y Stokkan, K. A. (1991)

Evidence that γ -interferon alters pineal metabolism both indirectly via sympathetic nerves and directly on pinealocytes.
Int. J. Biochem., 12, 1397-1401.

Wittkowski, W., Hewing, M., Hoffmann, K., Bergmann, M. y Fechner, J. (1984)

Influence of photoperiod on the ultrastructure of the hypophysial pars tuberalis of the djungarian hamster, *Phodopus sungorus*.
Cell Tissue Res., 238, 213.

Wright, J., Aldhous, M., Franey, C., English, J. y Arendt, J. (1986)

The effects of exogenous melatonin on endocrine function in man.
Clin. Endocrinol., 24, 375-382.

Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S. Ulevitch, R. J. y Mathison, J. C. (1990)

CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein.
Science, 249, 1431-1433.

- Wurtman, R. J., Axelrod, J., y Chu, E. W. (1963)**
Melatonin, a pineal substance: Effect on the rat ovary.
Science, 141, 277-278.
- Wurtman, R. J., Axelrod, J. y Potter, L. T. (1964)**
The uptake of [³H]melatonin in endocrine and nervous tissues and the effects of constant light exposure.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 143, 314-318.
- Wurtman, R. J. y Lieberman, H. R. (1985)**
Melatonin secretion as a mediator of circadian variations in sleep and sleepiness.
J. Pineal Res., 2, 301-303.
- Yu, Z. H. y Pang, S. F. (1991)**
[¹²⁵I]-iodomelatonin binding sites in spleens of birds and mammals.
Neurosci. Lett., 125, 175-178.
- Yuan, H. y Pang, S. F. (1991)**
[¹²⁵I]melatonin binding sites in the pigeon brain: binding characteristics, regional distribution and diurnal variation.
J. Endocrinol. 128, 475-482.
- Yuan, H. y Pang, S. F. (1992)**
[¹²⁵I]Iodomelatonin binding sites in the chicken brain: Diurnal variations and effects of melatonin injection or pinealectomy.
Biol. Signals., 1, 208-218.
- Yuan, H., Tang, F. y Pang, S. F. (1990)**
Binding characteristics, regional distribution and diurnal variation of [¹²⁵I]melatonin binding sites in the chicken brain.
J. Pineal Res., 9, 179-191.
- Żylińska, K., Komorowski, J., Robak, T., Mucha, S. y Stpie, H. (1995)**
Effect of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and granulocyte colony stimulating factor on melatonin secretion in rats *in vivo* and *in vitro* studies.
J. Neuroimmunol., 56, 187-190.

Maná Gil González - Haba

Relato y función inmune en humanos.
Mecanismos de regulación

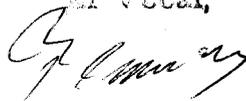
apto Cum Laude

30

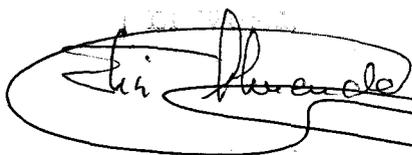
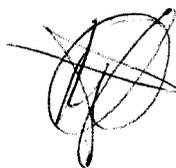
Septiembre

1996

El Vocal,



El Doctorado,



Maná Gil

