

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**



**ACCIÓN DE LA MELATONINA  
EN LAS ENFERMEDADES  
AUTOINMUNES:  
ARTRITIS REUMATOIDE Y  
LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO**

*Tesis doctoral presentada por*  
**ANTONIO JAVIER JIMÉNEZ CALIANI**  
*para optar al grado de Doctor*

**D<sup>a</sup>. CARMEN OSUNA FERNÁNDEZ Y D<sup>a</sup>. MARÍA DEL PATROCINIO MOLINERO HUESO**, Profesores del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla

CERTIFICAN QUE: **D. ANTONIO JAVIER JIMÉNEZ CALIANI**, Licenciado en Bioquímica, ha realizado bajo su conjunta dirección y en el Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla el trabajo titulado «**Acción de la melatonina en las enfermedades autoinmunes: Artritis Reumatoide y Lupus Eritematoso Sistémico**», reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Sevilla, 10 de diciembre de 2001

Vº Bº de las Directoras

El interesado

**D<sup>a</sup>. Carmen Osuna Fernández**

**D. Antonio Javier Jiménez Caliani**

**D<sup>a</sup>. María del Patrocinio Molinero Hueso**

**D. JUAN MIGUEL GUERRERO MONTÁVEZ**, Director del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA QUE: el trabajo titulado «**Acción de la melatonina en las enfermedades autoinmunes: Artritis Reumatoide y Lupus Eritematoso Sistémico**», presentado por **D. ANTONIO JAVIER JIMÉNEZ CALIANI** para optar al grado de Doctor, ha sido realizado en este Departamento bajo la dirección de las Profesoras **D<sup>a</sup>. CARMEN OSUNA FERNÁNDEZ Y D<sup>a</sup>. MARÍA DEL PATROCINIO MOLINERO HUESO.**

Sevilla, 10 de diciembre de 2004

Director del Departamento,

Fdo.: **D. Juan Miguel Guerrero Montávez**

## AGRADECIMIENTOS

Paradójicamente, el comienzo de este trabajo supone el fin de un lustro culminado con esta tesis doctoral. En todo este tiempo, como era de esperar, ha habido momentos buenos y momentos no tan buenos, pero como se suele decir es mejor quedarse con lo bueno y desdeñar lo malo. Por eso quiero con estas líneas agradecer a todas las personas que han colaborado en la realización de este lustroso trabajo.

En primer lugar quisiera agradecer a mis directoras de tesis, D<sup>a</sup> Carmen Osuna Fernández y D<sup>a</sup>. María del Patrocinio Molinero Hueso, por haberme dado la oportunidad de desarrollar mis conocimientos en el mundo científico y dedicar su tiempo para ayudarme en la elaboración de este trabajo.

A los Catedráticos Juan Miguel Guerrero y Juan Ramón Calvo por todo el apoyo prestado en la realización de este trabajo.

Al Dr Víctor Sánchez-Margalet, por ser tan buen jefe como buena persona. También a todo su grupo. A Loli por hacerme reír, a Sandrita por los buenos momentos vividos, a mi Doctora Souad por darme tanto cariño y risas, y a mi Doctora Carmela que fue la primera persona que conocí en el laboratorio y que casi me mata con esos cafés tan malos que hacía. Es de las personas más encantadora y buena de verdad que he conocido tanto ella como su marido Jose. Gracias por todo. A todos los que formaron parte de los partiditos de futbito gracias por los ratos que echamos. A Fran Morón y a los Doctores Pepe Utrilla y sobretudo a José María Fernández er Maquina, no sólo por su trabajo histopatológico sino por tener ese punto de vista tan particular sobre la ciencia y todo lo que le rodea. Cómo no acordarme de todos los desayunos y cervecitas en Ca´Paco, gracias Paquillo, Concha y Toñi. También quiero recordar a Manolo y Pepillo por todas las facilidades que me dieron en el animalario del Hospital, ya sí podéis decirme *Doctor Galiani*. Y a todos los integrantes de la secretaría por su trabajo.

A todos los integrantes del Departamento de Bioquímica Médica de la Facultad de Medicina por hacer más ameno el trabajo en el laboratorio. A los que me precedieron y se fueron a hacer las Américas: Dr Antoñito por su competencia, y a los Dres. Ilham, Soutto, Mohamed Rafii y Karim por mostrarme el maravilloso mundo musulmán. Al Dr Pozo, y a Antonio Carrillo por sus consejos. A la Dra. Mercedes León por ser tal como es. Al Dr Frank Martínez, por ser mejor persona que investigador. A Latifa Naji por ser tan buena, de ella me llevo todo el cariño que me ha dado. A Mari Carmen Naranjo por ser una persona que se preocupa más por los demás que por ella misma. Y por fin quiero dar las gracias a mi número 2, a Silvia Jiménez Jorge por hacer que todo esto fuera más llevadero y porque primara las risas antes que los llantos. Ya sabes que siempre que nos den diez me seguirás las sobrevolando.

Y por último, quiero dar las gracias a toda mi *GENTE*, a mis padres, hermanos, sobrinas, resto de familiares y amigos por estar siempre ahí y por intentar comprender lo que el niño estaba haciendo en el laboratorio, “Entonces lo que tú está estudiando es la melatonina y la artrosis”. “Quillo, no te dan pena los ratones”. “¿No te da asco trabajar con esos bichos?”. “¿Y la melatonina esa la tenemos todo?”. “Entonces, ¿la melatonina es buena o es mala?”. Por acompañarme a horas intempestivas al laboratorio a al animalario, ayudándome en la fotografía de los ratones, llevándome a Espartinas, escuchando mis alegrías y mis quejas, por estar en mis mejores y en los peores momentos. Por estar siempre ahí, por animarme, por aguantarme, en definitiva por todo y por siempre **MUCHAS GRACIAS.**

**Cuando en el mundo aparece un verdadero  
genio, puede identificársele por este signo:  
todos los necios se conjuran contra él.**

*Jonathan Swift*

**«THOUGHTS ON VARIOUS SUBJECTS,  
MORAL AND DIVERTING»**

**El saber no ocupa lugar,  
el único problema es acordarse  
de dónde se colocó.**

*A.J. Jiménez-Caliani*

*Para mis sobrinas Andrea y Elena,  
esto eran «los deberes» del Tito.*

---

# ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS .....	7
INTRODUCCIÓN .....	11
1. La melatonina .....	13
1.1. La glándula pineal .....	13
1.2. Síntesis de melatonina .....	15
1.3. Liberación, transporte y metabolismo .....	17
1.4. Regulación adrenérgica y transducción de señal para la síntesis de melatonina .....	18
1.5. Ritmos circadianos de producción de melatonina .....	21
1.6. Efecto de la luz y la pinealectomía sobre la producción de melatonina .....	23
1.7. Mecanismos de acción de la melatonina .....	24
2. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LA MELATONINA .....	27
2.1. Acciones sobre la función reproductora .....	27
2.2. La melatonina como sincronizador de los ritmos circadianos y el sueño .....	30
2.3. Efectos sobre el sistema nervioso central: la sedación .....	31
2.4. Efecto de la melatonina sobre el envejecimiento y la duración de la vida .....	32
2.5. Melatonina y su papel citoprotector .....	34
2.5.1. La melatonina como agente antioxidante .....	34
2.5.1. Melatonina y cáncer .....	38
2.6. Melatonina y sistema inmune .....	41
2.6.1. La melatonina como inmunomoduladora de la respuesta inmune .....	41
2.6.2. Influencia del sistema inmune sobre la función de la pineal .....	46
2.6.3. Sistema inmune y ritmos biológicos .....	47
3. MECANISMOS DE AUTOINMUNIDAD .....	49
3.1. Principios generales .....	49
3.2. Alteraciones linfocíticas que producen autoinmunidad .....	50
3.2.1. Fracaso de la tolerancia central .....	50
3.2.2. Mecanismos que superan la tolerancia periférica (anergia clonal) .....	51
3.2.3. Activación linfocitaria policlonal .....	51
3.2.4. Reactividad cruzada inmunitaria entre los antígenos propios y extraños .....	52



3.2.5. Regulación linfocítica anormal .....	52
3.3. Factores genéticos en la autoinmunidad .....	52
3.3.1. Papel de los genes del MHC en la autoinmunidad .....	53
3.3.2. Asociación de otros genes con la autoinmunidad .....	54
3.4. Infecciones, alteraciones anatómicas y otros factores en la autoinmunidad .....	54
3.5. ARTRITIS REUMATOIDE .....	55
3.5.1. Patogénesis .....	55
3.5.2. Modelos animales .....	59
3.5.2.1. Modelos de artritis en ratones .....	59
3.5.2.2. Modelos de artritis en ratones .....	61
3.5.3. Artritis inducida por colágeno .....	64
3.6. LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO .....	67
3.6.1. Papel de las células B .....	69
3.6.2. Papel de las células T .....	73
3.6.3. Factores medioambientales .....	74
3.6.4. Contribuciones genéticas .....	75
3.6.5. Modelos animales .....	76
3.6.6. Ratones MRL-lpr/-lpr .....	77
3.7. REGULACIÓN NEUROINMUNOENDOCRINA DE LAS ENFERMEDADES	
AUTOINMUNES .....	80
3.7.1. Interacciones inmuno-neuroendocrinas .....	80
3.7.2. Regulación neuroendocrina de la inflamación por la acción de los glucocorticoides .....	81
3.7.2.1. Eje hipotálamo-pituitaria-adrenal .....	81
3.7.2.2. Glucocorticoides .....	82
3.7.2.3. Hormonas sexuales .....	84
3.7.3. El eje HPA y hipotálamo-pituitaria-gonadal (HPG) en la Artritis Reumatoide .....	85
3.7.4. El eje HPA y HPG en el Lupus Eritematoso Sistémico .....	86
4. OBJETIVOS .....	87
4.1. Acción de la melatonina sobre la Artritis Reumatoide .....	89
4.2. Acción y efecto de la melatonina sobre el Lupus Eritematoso Sistémico .....	90

---

5. MATERIAL Y MÉTODOS .....	91
5.1. Animales de experimentación .....	93
5.2. Modelo experimental .....	93
5.2.1. Inducción de la artritis por colágeno .....	93
5.2.2. Lupus Eritematoso Sistémico .....	94
5.3. Estudio histopatológico .....	95
5.4. Obtención de las preparaciones celulares .....	96
5.4.1 Células del exudado peritoneal .....	96
5.4.2. Células mononucleares de sangre periférica .....	97
5.4.3. Aislamiento de esplenocitos purificados .....	99
5.4.4. Aislamiento de células de nódulos linfáticos purificados en ratones .....	101
5.5. Preparación de homogenados de articulación de ratas .....	102
5.6. Determinación de niveles de anticuerpos en suero .....	103
5.6.1. Niveles de anticuerpos anticolágeno tipo II en ratas .....	103
5.6.2. Niveles de anticuerpos en ratones MRI-lpr .....	104
5.6.2.1. Cuantificación de niveles de inmunoglobulinas totales .....	104
5.6.2.2. Cuantificación de niveles de anticuerpos antiDNA de doble cadena .....	106
5.6.2.3. Cuantificación de los niveles de anticuerpos anticolágeno tipo II .....	107
5.7. Determinación de citoquinas .....	108
5.8. Determinación de los niveles de Nitrito/Nitrato .....	109
5.9. Determinación del grado de peroxidación lipídica .....	110
5.10. Cuantificación de niveles hormonales en suero .....	112
5.11. Análisis estadístico .....	112
6.RESULTADOS .....	113
6.1. Estudio de la acción de la melatonina en la Artritis Reumatoide en ratas machos .....	115
6.1.1. Inducción de la enfermedad en ratas Wistar .....	115
6.1.2. Estudio histopatológico de la articulación afectada por la enfermedad .....	117
6.1.3. Determinación de los niveles de anticuerpos anti-colágeno tipo II en suero .....	119
6.1.4. Determinación de la producción de citoquinas inflamatorias en distintos tejidos .....	120
6.1.4.1. IL-1 $\beta$ e IL-6 en suero .....	120
6.1.4.2. IL-1 $\beta$ e IL-6 en células del exudado peritoneal .....	121

---

6.1.4.3. IL-1 $\beta$ e IL-6 en esplenocitos .....	121
6.1.4.4. IL-1 $\beta$ e IL-6 en PBMCs .....	122
6.1.4.5. Niveles de IL-1 $\beta$ y de IL-6 en homogenado de articulación .....	123
6.1.5. Determinación de los niveles de NO en distintos tejidos .....	124
6.1.5.1. Niveles de NO en suero .....	124
6.1.5.2. Niveles de NO en la articulación .....	125
6.1.5.3. Niveles de NO en células del exudado peritoneal .....	125
6.1.5.4. Niveles de NO en el sobrenadante de esplenocitos .....	126
6.1.6. Determinación del grado de peroxidación lipídica .....	127
6.1.7. Determinación de los niveles de cortisol, testosterona y estradiol en suero .....	128
6.2. Estudio de la acción de la pinealectomía en ratas con artritis inducida por colágeno .....	130
6.2.1. Establecimiento del modelo animal .....	130
6.2.2. Estudio histopatológico de la articulación afectada por la enfermedad .....	131
6.2.3. Determinación de los niveles de anticuerpos anti-colágeno tipo II en suero .....	132
6.2.4. Determinación de la producción de citoquinas inflamatorias en distintos tejidos .....	133
6.2.4.1. Niveles de IL-1 $\beta$ y de IL-6 en suero .....	133
6.2.4.2. Niveles de IL-1 $\beta$ y IL-6 en esplenocitos y en células del exudado peritoneal .....	134
6.2.4.3. Niveles de IL-1 $\beta$ y de IL-6 en PBMC .....	135
6.2.4.4. Niveles de IL-1 $\beta$ y de IL-6 en sobrenadante de homogenado de articulación .....	135
6.2.5. Determinación de los niveles de NO en distintos tejidos .....	136
6.2.5.1. Niveles de NO en suero .....	136
6.2.5.2. Niveles de NO en sobrenadante de homogenado de articulación .....	136
6.2.5.3. Niveles de NO en cultivos celulares .....	137
6.2.6. Determinación del grado de peroxidación lipídica .....	137
6.2.7. Determinación de los niveles de cortisol, testosterona y estradiol en suero .....	138
6.3. Estudio de la acción de la melatonina en la artritis inducida por colágeno en ratas hembras .....	139
6.3.1. Inducción de la enfermedad .....	139
6.3.2. Estudio histopatológico de la articulación afectada por la enfermedad .....	140
6.3.3. Determinación de los niveles de anticuerpos anti-colágeno tipo II en suero .....	142
6.3.4. Determinación de la producción de citoquinas inflamatorias en distintos tejidos .....	142

---

6.3.4.1. Niveles de IL-1 $\beta$ e IL-6 en suero.....	142
6.3.4.2. Niveles de IL-1 $\beta$ y de IL-6 en sobrenadante de cultivos celulares .....	143
6.3.4.3. Niveles de IL-1 $\beta$ e IL-6 en sobrenadante de homogenado de articulación .....	144
6.3.5. Determinación de los niveles de NO en distintos tejidos .....	144
6.3.5.1. Determinación de niveles de NO en suero .....	144
6.3.5.2. Determinación de niveles de NO en sobrenadante de homogenado de articulación .....	145
6.3.5.3. Determinación de niveles de NO en sobrenadante de cultivos celulares .....	145
6.3.6. Determinación del grado de peroxidación lipídica .....	146
6.3.7. Determinación de los niveles de cortisol, testosterona y estradiol en suero .....	147
6.4. Estudio de la acción de la melatonina en el Lupus Eritematoso Sistémico .....	148
6.4.1. Establecimiento y mantenimiento de un modelo animal para el estudio del LES .....	148
6.4.2. Estudio histopatológico de los riñones .....	151
6.4.3. Medición de la respuesta humoral en suero .....	154
6.4.3.1. Niveles de IgM e IgG totales .....	154
6.4.3.2. Niveles de anticuerpos IgM e IgG anti-DNADs en suero .....	155
6.4.3.3. Niveles de anticuerpos IgM e IgG anti-colágeno tipo II .....	155
6.4.4. Determinación de citoquinas que median en la inmunidad innata (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) ....	156
6.4.4.1. Niveles de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-6 en suero .....	157
6.4.4.2. Niveles de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-6 en sobrenadantes de cultivos celulares .....	158
6.4.5. Determinación de citoquina que regula la activación, proliferación y diferenciación linfocitaria (IL-2) .....	160
6.4.5.1. Niveles de IL-2 en suero .....	160
6.4.5.2. Niveles de IL-2 en sobrenadante de cultivos celulares .....	160
6.4.6. Determinación de citocinas que regulan la inflamación de origen inmunitario (IFN- $\gamma$ IL-10) .....	161
6.4.6.1. Niveles de IFN- $\gamma$ e IL-10 en suero .....	161
6.4.6.2. Niveles de IFN- $\gamma$ e IL-10 en cultivos celulares estimulados con LPS .....	162
6.4.6.3. Niveles de IFN- $\gamma$ e IL-10 en cultivos celulares estimulados con PHA .....	164
6.4.7. Medición del grado de estrés oxidativo .....	166
6.4.7.1. Niveles de NO en suero .....	166
6.4.7.2. Niveles de peroxidación lipídica en cerebro .....	166

---

6.5. Estudio de la acción de la melatonina en el Lupus Eritematoso Sistémico con tratamiento hormonal	
168	
6.5.1. Establecimiento y mantenimiento del modelo animal para el estudio del LES con tratamiento hormonal .....	168
6.5.2. Medición de la respuesta humoral en suero .....	170
6.5.2.1. Niveles de IgM e IgG totales .....	170
6.5.2.2. Niveles de anticuerpos IgM e IgG anti-DNAbs en suero .....	170
6.5.2.3. Niveles de anticuerpos IgM e IgG anti-colágeno tipo II .....	171
6.5.3. Determinación de citoquinas que median en la inmunidad innata (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) ....	172
6.5.3.1. Niveles de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-6 en suero .....	172
6.5.3.2. Niveles de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-6 en sobrenadantes de cultivos celulares .....	173
6.5.4. Determinación de citoquinas que regulan la activación, proliferación y diferenciación linfocitaria (IL-2) .....	174
6.5.4.1. Niveles de IL-2 en suero .....	174
6.5.4.2. Niveles de IL-2 en sobrenadante de cultivos celulares .....	174
6.5.5. Determinación de citocinas que regulan la inflamación de origen inmunitario (IFN- $\gamma$ ,IL-10)175	
6.5.5.1. Niveles de IFN- $\gamma$ e IL-10 en suero .....	175
6.5.5.2. Niveles de IFN- $\gamma$ e IL-10 en cultivos celulares estimulados con LPS .....	176
6.5.5.3. Niveles de IFN- $\gamma$ e IL-10 en cultivos celulares estimulados con PHA .....	177
6.5.6. Medición del grado de estrés oxidativo .....	178
6.5.6.1. Niveles de NO en suero .....	178
6.5.6.2. Niveles de peroxidación lipídica en cerebro .....	179
7. DISCUSIÓN .....	181
7.1. Acción de la melatonina en la Artritis Reumatoide .....	183
7.2. Acción de la melatonina en el Lupus Eritematoso Sistémico .....	192
8. CONCLUSIÓN .....	207
9. BIBLIOGRAFÍA .....	211
10. PUBLICACIONES .....	253

---

**ABREVIATURAS**

- <sup>125</sup>**I-Mel:** Melatonina marcada con yodo 125
- <sup>3</sup>**H-Mel:** Melatonina marcada con tritio
- 5-HT: 5-hidroxitriptamina
- ACTH: Hormona adrenocorticotropica
- ADCC: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- AMPc: Adenosil 3',5'-monofosfato cíclico
- ANA: Anticuerpos antinucleares.
- AR: Artritis Reumatoide
- ARN: Ácido ribonucleico
- ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
- ATP: Adenosín trifosfato
- BSA: Albúmina sérica bovina
- Ca<sup>2+</sup>: Calcio
- CaM: Calmodulina
- C-II: Colágeno tipo II
- CFA: Adyuvante completo de Freund
- CIA: Artritis inducida por colágeno
- CRE: Elemento de respuesta al AMPc
- CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc
- DHEA: Dihidroepiandrosterona
- DHT: Dihidrotosterona
- DO: Densidad óptica
- EBV: Virus de Epstein-Barr
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
- FIA: Adyuvante incompleto de Freund
- FSH: Hormona estimuladora del folículo
- G6PDH: Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
- GABA: Ácido gamma-aminobutírico
- Gi: Proteína G inhibidora
- Gs: Proteína G estimuladora
- G-CSF: Factores estimuladores de colonias de granulocitos
- GH: Hormona del crecimiento
- GHRH.: Hormona liberadora de la GH

## *Abreviaturas*

---

gld: enfermedad linfoproliferativa generalizada  
GM-CSF: Factores estimuladores de colonias de macrófagos y granulocitos  
GM-CFU: Unidad formadora de colonias de macrófagos y granulocitos  
GMN: Glomerulonefritis  
GMPc: Guanosil monofosfato cíclico  
GnRH: Hormona liberadora de gonadotrofinas  
GTP: Guanosín trifosfato  
HAE/HNE: Hidroxialquenos  
HEPES: N-[2-hidroxietil]piperazina-N-[ácido hidroxipropano sulfónico]  
HIOMT: Hidroxiindol-O-metiltransferasa  
HLA: Antígeno leucocitario humano  
HPA: Eje hipotálamo-pituitaria-adrenal  
HPG: Eje hipotálamo-pituitaria-gonadal  
HRE: Elemento de respuesta hormonal  
HSP: Proteínas de choque térmico  
ICER: Inhibidor de la proteína de la respuesta temprana inducida por AMPc  
IFN: Interferón  
Ig: Inmunoglobulina  
IL: Interleuquina  
LES: Lupus eritematoso sistémico  
LH: Hormona luteinizante  
LHRH: Hormona liberadora de LH  
LPO: Peroxidación lipídica  
lpr: linfoproliferación  
LPS: Lipopolisacárido bacteriano  
M-CSF: Factores estimuladores de macrófagos  
MDA: Malondialdehído  
MEL: Melatonina  
MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad  
MIOs: Péptidos opioides inducidos por melatonina  
MMP: Metaloproteinasas  
MSH: Hormona estimuladora del melanocito  
NADP: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina  
NADPH: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina  
NAT: N-acetiltransferasa  
NF- $\kappa$ B: Factor nuclear  $\kappa$ B

NK: Linfocitos con actividad citotóxica innata o natural killer  
NMDA: N-metil-D-aspartato  
NO: Óxido nítrico  
NOS: Óxido nítrico sintasa  
O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Anión superóxido  
OH: Radical hidroxilo  
OIA: Artritis inducida por aceite  
PBMC: Células mononucleares de sangre periférica  
PCPA: p-Clorofenilalanina  
PCREB: Proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc fosforilada  
PBS: Tampón fosfato  
PIA: Artritis inducida por Pristane  
PHA: Fitohemaglutinina  
PKA: Proteín-kinasa dependiente de AMPc  
PKC: Proteín-kinasa C  
PMSF: Fenilmetilsulfonilfluoruro  
PRL: Prolactina  
PX: Pinealectomía  
RAR y RXR: Receptor de ácido retinoico  
ROR: Receptor nuclear huérfano  
ROS: Especies reactivas de oxígeno  
RZR: Receptor Z retinoico  
SCN: Núcleo supraquiasmático  
SNC: Sistema nervioso central  
SOD: Superóxido dismutasa  
TH: Triptófano hidroxilasa  
Tc: Linfocitos T citotóxicos  
Th: Linfocitos T colaboradores  
TGF: Factor de crecimiento tumoral  
TIMP: Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas  
TMB: Tetrametilbenzidina  
TMOP: 1,1,3,3,-tetrametoxipropano  
TNF: Factor de necrosis tumoral  
TRH: Hormona liberadora de tirotrópina  
TSH: Hormona estimuladora de tirotrópina  
VIP: Péptido intestinal vasoactivo





# **INTRODUCCIÓN**



## 1. LA MELATONINA

### 1.1. La glándula pineal

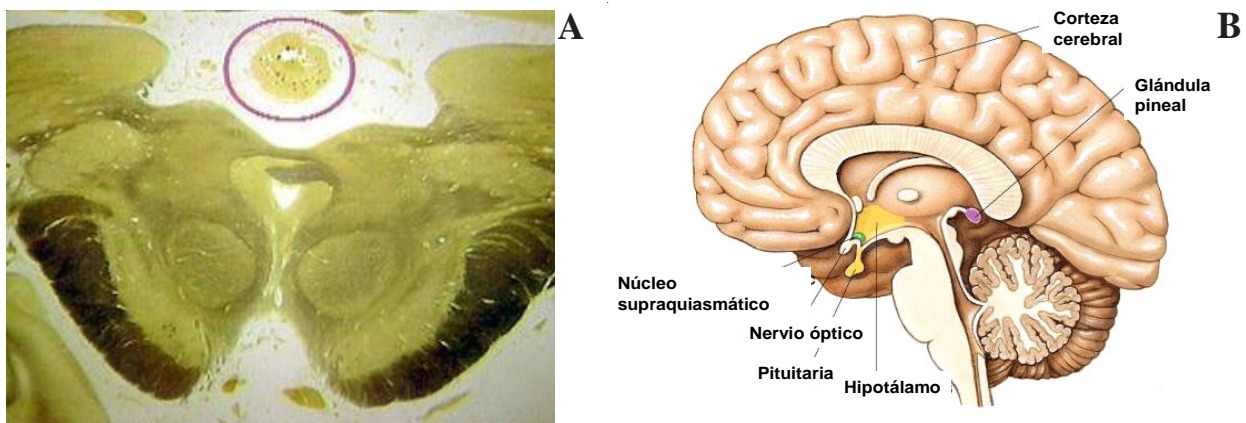
La glándula pineal o epífisis en mamíferos es un órgano pequeño y de estructura sencilla. En humanos tiene forma de cono de aproximadamente, 10 mm de longitud y 100 mg de peso, y se puede apreciar desde el segundo mes de vida intrauterina. Se origina por invaginación del diéncéfalo formando parte de él y se proyecta desde la parte trasera del hipotálamo, revistiendo la placa tectal del mesencéfalo. Se sitúa en la porción inferio-posterior del cuerpo calloso, entre los tubérculos cuadrigémicos superiores y detrás del tercer ventrículo. Está recubierta por una membrana conjuntiva proporcionada por la piamadre, que forma tabiques ramificados y anastomosados entre sí, los cuales dividen la epífisis en celdas.

El principal componente celular de la glándula pineal es el pinealocito. En ratas, la cantidad de pinealocitos constituye el 82% de las células presentes, siendo el resto principalmente células gliales del tipo astrocitos (12%) y fibroblastos (Wallace y cols., 1969). Los pinealocitos son células grandes, similares a las neuronas que constan de un cuerpo celular con prolongaciones celulares de diversas longitudes que suelen formar sacos. La ultraestructura del citoplasma no es muy relevante. Los pinealocitos se clasifican por su diferente densidad al microscopio electrónico en claros y oscuros. Los pinealocitos oscuros contienen gránulos de pigmentos de naturaleza aún poco establecida y depósitos de glucógeno. Dado que la diferenciación en claros y oscuros está basada preferentemente en criterios morfológicos, es posible que se trate del mismo tipo celular en diferentes estados funcionales que manifieste comportamientos diferentes hacia el fijador (Karasek y Reiter, 1992).

Los pinealocitos oscuros tienden a formar pequeños agrupaciones de células contiguas. Dejando a un lado el distinto grado de densidad electrónica, la única diferencia a reseñar entre ambos tipos viene dada por sus compartimentos de microvesículas de tipo sináptico. Ambos tipos contienen abundantes microvesículas claras de tamaño variable que se acumulan en terminales dilatadas. No obstante, las vesículas en los extremos de los pinealocitos oscuros mostraron un ordenamiento denso por todo el citoplasma. Estas contienen sinaptofisina, la principal proteína sináptica asociada a vesículas. Esta proteína está presente en pequeñas vesículas claras con supuestas funciones secretoras en una amplia variedad de células neuroendocrinas. La heterogeneidad ultraestructural puede ser la expresión de distintos estados de actividad secretora de un tipo celular de pinealocito (Redecker, 1993).

La glándula pineal recibe innervación desde diversas fuentes, pero exceptuando la innervación simpática responsable de la síntesis circadiana de melatonina, el significado funcional de las conexiones nerviosas permanece sin determinar con claridad. A nivel simpático está densamente innervada por fibras postganglionares noradrenérgicas que tienen su origen en el ganglio cervical superior, pudiéndose considerar como un órgano efector del sistema nervioso autónomo. Las fibras simpáticas dirigidas hacia la pineal siguen el nervio carotídeo interno, emitiendo el nervio pineal. Las fibras nerviosas terminan principalmente en los espacios perivasculares de la glándula y normalmente no forman sinapsis directa con los pinealocitos.

Todos los sistemas circadianos incluyen un “oscilador”, un fotodetector y una señal de salida. En nuestro caso, el oscilador estará constituido por el núcleo supraquiasmático (SCN) (revisado por Gillette y Mitchell, 2002), que está unido a la retina a través del eje retina-hipotálamo (Reuss, 1996).



**Figura 1.** Esquema (A) y aspecto de la glándula pineal (B) en humanos a nivel macroscópico.

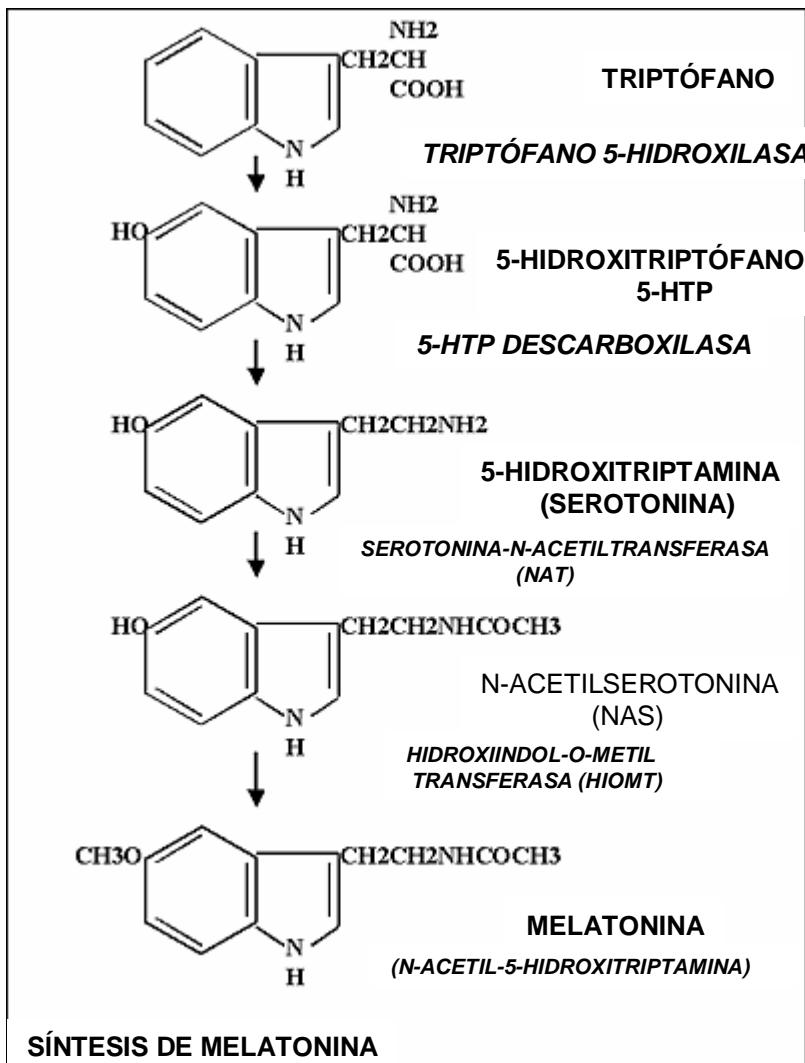
La innervación simpática de la glándula pineal toma la forma de una extensa red de fibras que contienen noradrenalina y que atraviesan el espacio perivascular (revisado por Moller y Baeres, 2002). La estimulación circadiana de estas fibras por el SCN hace que el circuito pineal libere noradrenalina en este espacio, donde ésta difunde a la superficie del pinealocito (Brownstein y Axelrod, 1974; Drijfhout y cols., 1996a; Drijfhout y cols., 1996b). Durante el día, las fibras nerviosas simpáticas liberan una cantidad de noradrenalina considerablemente inferior (3 fmol) a la liberada durante la noche (12,5 fmol en rata) (Drijfhout y cols., 1996a).

La glándula pineal de mamíferos es un transductor neuroendocrino (Wurtman y Axelrod, 1965; Wurtman y Antón-Tay, 1969) en el cual las señales neuronales originadas en el eje retina-SCN (fotodetector y oscilador, respectivamente) son transformadas en un mensaje hormonal (señal de salida), siendo éste el que conduce al ritmo circadiano de síntesis y liberación de la indolalquilamina melatonina. Aunque la melatonina es, sin duda, el principal producto activo de la glándula pineal, de ella se han extraído una variedad de péptidos con propiedades antigonadotrópicas (Benson y Ebels, 1978) y tumorales (Bartsch y cols., 1987).

## 1.2. Síntesis de melatonina

La melatonina fue descubierta y recibió su nombre gracias al dermatólogo Aarón Lerner y sus cols. (1958), que estaban investigando la sustancia que causaba la formación de manchas blancas en la piel de humanos. Partían de la ya conocida existencia de un factor aclarador de la piel de los anfibios, descrita en 1917 (McCord y Allen, 1917), que estaba contenido en la piel de los mamíferos. Consiguieron aislar y determinar la estructura de dicho factor aclarador pineal a partir de 250.000 glándulas pineales bovinas. Esta sustancia fue identificada como N-acetil-5-metoxitriptamina, una indolamina, y debido a su efecto blanqueador de los melanóforos la denominaron melatonina. Posteriormente, Axelrod y sus colaboradores demostraron la presencia en la glándula pineal de las enzimas necesarias para la síntesis de melatonina (Axelrod, 1974).

La biosíntesis de la melatonina a cargo de la glándula pineal está bien establecida (Sugden, 1989). Dicha biosíntesis se inicia con la captación de triptófano de la circulación de forma activa por los pinealocitos, la mayor parte de dicho triptófano se utiliza para la síntesis de indolaminas. El paso inicial es la oxidación de triptófano a 5-hidroxitriptófano por la acción de la triptófano hidroxilasa (TH), reacción que precisa  $O_2$  y  $Fe^{2+}$ . El 5-hidroxitriptófano es descarboxilado a serotonina (5-hidroxitriptamina) por la 5-hidroxitriptófano descarboxilasa. Una parte de la serotonina producida se deriva hacia la síntesis de melatonina, proceso que se lleva a cabo en dos pasos. La serotonina es acetilada a N-acetilserotonina por acción de la enzima arilalkilamina-N-acetiltransferasa (NAT). Finalmente, la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT), transfiere un grupo metilo donado por la S-adenosinmetionina, dando lugar a la melatonina.



**Figura 2.** Ruta de biosíntesis de la melatonina. El triptófano es el sustrato inicial de la reacción. La enzima HIOMT ocupa una posición preferente como reguladora de la síntesis.

Las enzimas TH y NAT presentan un ritmo luz-oscuridad de actividad, con un pico de máxima actividad (Klein y Weller, 1970; Sitaram y Lees, 1978; Binkley, 1993), que hace que la serotonina y la melatonina sigan un marcado ritmo circadiano de síntesis en la glándula pineal. La biosíntesis de melatonina está principalmente controlada por la actividad NAT, cuya reacción se considera paso limitante en la producción de la hormona. La actividad de la HIOMT es dos veces mayor en situaciones de fotoperíodo corto que en situaciones de fotoperíodo largo, y hay estudios que sugieren que las variaciones fotoperiódicas en la amplitud del pico nocturno de melatonina están reguladas por la HIOMT (Ribelayga y cols., 2000). Las variaciones fotoperiódicas de la actividad HIOMT no obstante no parecen modificar la síntesis de melatonina en las especies no fotoperiódicas (Illnerova y cols., 1984; Klein, 1985; Ribelayga y cols., 1999).

La síntesis de melatonina no es exclusiva de la pineal, ya que tanto la melatonina como las enzimas implicadas en su síntesis se han encontrado en estructuras extrapineales (Binkley y cols., 1981; Klein y cols., 1996), como retina (Tosini y Menaker, 1996; 1998), oído interno (Biesalski y cols., 1988), cuerpo ciliado (Martín y cols., 1992), intestino (Lee y Pang, 1993), así como en diversas células del sistema inmune (Kvetnoy y Yuzhakov, 1994). Las células del retinoblastoma humano Y79 también sintetizan melatonina (Janavs y cols., 1991). La síntesis extrapineal se puso de manifiesto cuando se detectó la presencia de melatonina en la sangre y orina de animales pinealectomizados.

### **1.3. Liberación, transporte y metabolismo**

La melatonina, tras su síntesis, en pineal, es secretada al sistema vascular (Rollang y cols., 1978) y se encuentra relativamente en pequeñas concentraciones en la glándula pineal (Vaughan y cols., 1981). No se ha descrito ningún mecanismo de transporte activo para la liberación de melatonina de los pinealocitos y, debido a que esta molécula es altamente lipofílica e hidrosoluble y a su pequeño tamaño, podría secretarse de los pinealocitos atravesando la membrana celular por difusión simple. Una vez en la sangre, la mayoría de la melatonina circulante (60-70%) está unida a la albúmina (Pardridge y Mietus, 1980) y el resto circula libremente. La vida media está entre 10 y 40 minutos (Kopin y cols., 1961; Kveder y McIsaac, 1961). Parte de la melatonina sintetizada pasa directamente a otros fluidos corporales como el líquido cefalorraquídeo, sin conocer la función que puede desempeñar éste (Reiter, 1988; Smith y cols., 1976). Los niveles de melatonina en el líquido cefalorraquídeo muestran el mismo ciclo luz-oscuridad que los niveles sanguíneos (Reppert y cols., 1980), pero con concentraciones mayores en sangre (Brown 1979; Tan y Khoo, 1981). Estos niveles de la hormona en el líquido cefalorraquídeo, se incrementan en relación con algunas patologías, por ejemplo, en el caso de pacientes esquizofrénicos y niños leucémicos (Smith y cols., 1976; 1979).

Alrededor del 90% de melatonina es metabolizada y se degrada en el primer paso en el hígado, vía 6-hidroxilación del anillo indólico y, en el segundo paso en los riñones. De esta hormona, el 75% es convertida en el mayor producto de catabólico que es la N-acetil-5-metoxi-6-hidroxitriptamina o 6-hidroximelatonina por las enzimas microsomales hepáticas, de la cual, el 70% es conjugado con sulfato para formar 6-sulfatoxi-melatonina) y el 6% con glucurónidos (glucocurónidoxi-melatonian) (Kveder y McIsaac, 1961).



En el cerebro y el plexo coroideo, la melatonina se encuentra en menor cantidad (alrededor de 6-12%) y es convertida en N-acetil-5-metoxikinuramina (Kopin y cols., 1961; Hirata y cols., 1974). Todos los metabolitos son excretados por orina y su excreción es paralela a las variaciones circadianas de la hormona en humanos y roedores. Sólo el 1% de la hormona se elimina por la orina sin sufrir ninguna transformación.

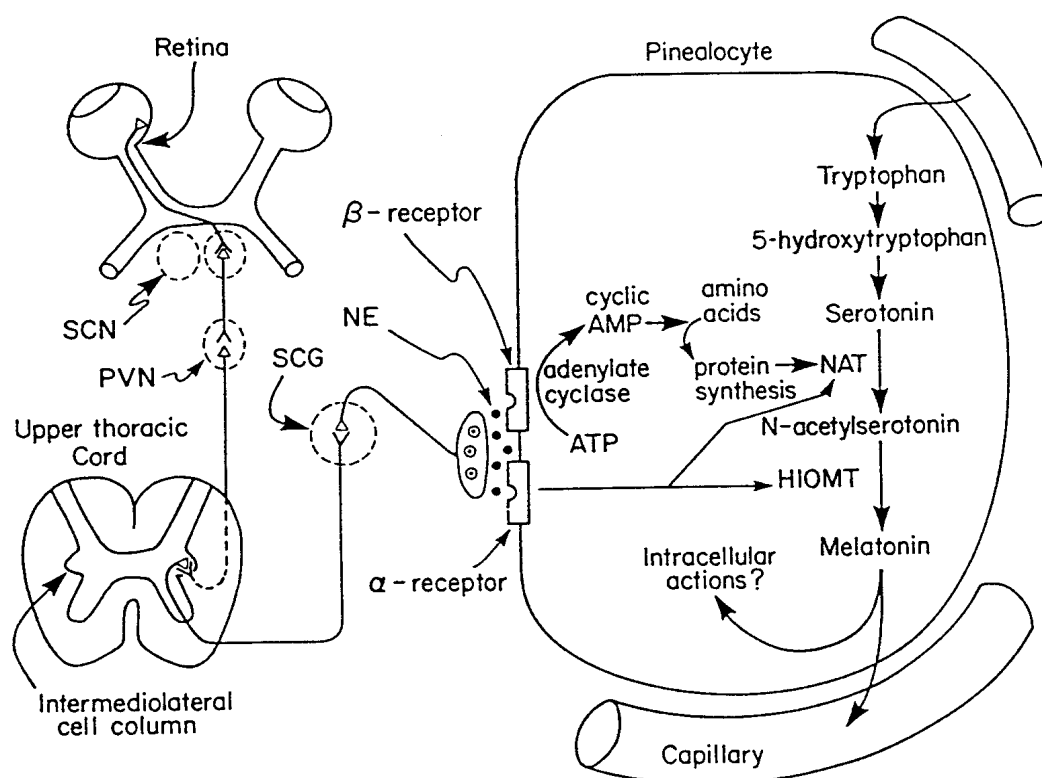
La melatonina producida en órganos extrapineales parece desempeñar un papel de tipo paracrino, al menos en mamíferos, no contribuyendo de forma significativa a los niveles existentes en sangre periférica, los cuales son fiel reflejo de la actividad pineal. Se han encontrado concentraciones significativas de melatonina en fluidos estrechamente relacionados con la reproducción como el fluido seminal (Bornman y cols., 1989), el fluido folicular ovárico donde las concentraciones son superiores en la sangre (Brzezinski y cols., 1987), en líquido amniótico, procediendo de la orina fetal, con un ritmo y concentraciones semejantes a las sanguíneas (Kivelä y cols., 1989) y en leche materna (Illnerova y cols., 1993). En la saliva, se ha encontrado concentraciones elevadas de melatonina con un ritmo similar al observado en la sangre aunque no alcanza las concentraciones sanguíneas de melatonina (Laasko 1990).

### 1.4. Regulación adrenérgica y transducción de señal para la síntesis de melatonina

La transducción de señal para la síntesis y secreción de melatonina, así como la actividad de NAT están reguladas por un mecanismo adrenérgico. Así, en pinealocitos, esta estimulación se inicia con la liberación nocturna de noradrenalina, por las terminaciones simpáticas post-ganglionares, y su unión a receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos en la membrana (Axelrod, 1974). La unión de noradrenalina a estos receptores produce la activación de la adenilil ciclasa a través de una proteína  $G_s$ , induciendo un aumento de los niveles citosólicos de AMPc, que actúa como segundo mensajero (Axelrod, 1974; Klein y cols., 1978). Esta estimulación  $\beta$ -adrenérgica también induce un aumento de la concentración intracelular de GMPc por estimulación de la guanilato ciclasa (Klein y cols., 1981). Además, se ha demostrado que una población de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos está implicada en la regulación de la actividad de NAT y parece que la unión de noradrenalina a estos receptores no aumenta *per se* la producción de AMPc pero potencia la respuesta de los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos ya activados y así la activación de AMPc y GMPc (Klein y cols., 1981). Esta potenciación se debería a un aumento de la eficiencia de la actividad adenilil ciclasa por medio de fosforilación, por acción de PKC, de la propia adenilil ciclasa o de la proteína  $G_s$ .

La activación de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos en pinealocitos, estimula la hidrólisis de un fosfolípido constituyente de membrana, el fosfatidilinositol, a través de la activación de la fosfolipasa C, fosfolipasa A y la proteína quinasa dependiente de fosfolípidos. El fosfatidilinositol produce la liberación y el incremento de dos mensajeros, el 1, 4, 5 inositol trifosfato y el diacilglicerol (Ho y Klein, 1987; Ho y cols., 1988). Por otra parte, esta activación de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos aumenta los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , por apertura de un canal dependiente del ligando, lo cual colabora en la inducción de la activación de la PKC a través del diacilglicerol (Ho y cols., 1988). El aumento de estos segundos mensajeros permite la translocación a la membrana y la activación de la PKC (Sudgen, 1989).

El aumento de los niveles intracelulares de AMPc conlleva el aumento de la actividad NAT y así incrementa la síntesis de melatonina. La velocidad a la que el AMPc incrementa la actividad de NAT y la magnitud de este aumento varía según las diferentes especies (Reiter, 1991a). Sin embargo, existen excepciones en las cuales el incremento de la síntesis de melatonina no conlleva un aumento significativo de la actividad NAT (Menéndez-Peláez y cols., 1990).



**Figura 3.** Regulación de la síntesis de la melatonina en pinealocitos a través de receptores adrenérgicos. SCN: Núcleo supraquiasmático; PVN: Núcleo paraventricular; NE: norepinefrina

El aumento de AMPc produce también un incremento de los niveles de ARNm de la NAT. El mecanismo por el cual se produce el aumento de la actividad y de los niveles de ARNm de la NAT y la regulación de estos cambios día-noche de la actividad NAT, son poco conocidos.

Estudios recientes, han demostrado que el AMPc aumentaría los niveles de ARNm de NAT a través de un mecanismo a nivel molecular en la glándula pineal. La expresión génica de NAT es rítmica y está sometida a una doble regulación adrenérgica positiva y negativa, inducida por AMPc. Este aumento de los niveles de ARNm para la NAT producido por AMPc citosólicos se hace a través de la fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB) para formar la proteína activa, fosforilada, de este factor de transcripción (PCREB). La fosforilación la llevan a cabo proteín-kinasa A (PKA) dependientes de AMPc, que una vez activadas se translocan al núcleo fosforilando a CREB (Roseboom y cols., 1996), y una vez activada, PCREB se une a su diana específica de unión CRE en el promotor de la NAT activando la transcripción (Roseboom y Klein, 1995). Por otra parte, la sola activación de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos eleva parcialmente los niveles de ARNm de NAT (Roseboom y cols., 1996) sin alterar el estado de fosforilación de CREB (Roseboom y Klein, 1995), sugiriendo la existencia de un elemento de respuesta en el promotor de NAT que mediaría los aumentos de los niveles de  $Ca^{2+}$  y activación de las proteínas kinasas dependientes de fosfolípidos (Ho y Klein, 1987; Ho y cols., 1988).

La expresión génica de NAT es rítmica y se establece con un mecanismo regulador de la transcripción de la NAT. Así los niveles de ARNm de la NAT decaen gradualmente después de alcanzar la máxima expresión. Sin embargo, este efecto no tiene lugar cuando se bloquea la síntesis de proteínas, lo que indica que el AMPc induce, con un retraso de 6 a 9 horas, la síntesis de uno o más factores inhibidores o inducibles que inhiben el incremento de ARNm de la NAT (Roseboom y cols., 1996). La identidad de estos factores de transcripción puede ser el antígeno 2 relacionado con Fos (Fra-2) (Baler y Klein, 1995) y la proteína de respuesta temprana inducida por AMPc (ICER) (Stehle y cols., 1993). La expresión de ARNm de ambos factores presenta fluctuaciones circadianas equivalentes a las del ARNm de la NAT, y además estos dos factores están bajo el control de señales adrenérgicas. El factor ICER, potente inhibidor de la transcripción, regula negativamente la expresión de su propio gen cuando los niveles de expresión son elevados en la célula, de tal forma que, el balance entre las proporciones de PCREB e ICER es el que determina la actividad de la transcripción del gen de NAT (Foulkes y cols., 1996).

La síntesis de ARNm de la NAT pineal de ratas es rítmico, se encuentra en un nivel bajo durante el día y se incrementa más de 150 veces durante la noche, lo cual es similar a la actividad enzimática (Roseboom y cols., 1996). Esta hipótesis, se ve apoyada por el hecho de que el tratamiento con actinomicina D, que inhibe la transcripción, bloquea tanto el aumento de ARNm como la actividad de la NAT (Roseboom y cols., 1996). Por otra parte, la presencia de luz durante la noche, disminuye la actividad NAT sin afectar los niveles de ARNm, sugiriendo la existencia de mecanismos post-traduccionales que modificarían dicha actividad (Roseboom y cols., 1996). En este sentido, se ha demostrado como la disminución de AMPc y la presencia de agentes reductores de agentes tioles, que rompen puentes disulfuro, inhiben la actividad NAT (Klein y cols., 1978; Namboodiri y cols., 1980).

Además de los receptores  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  adrenérgicos, se ha identificado la existencia de otros tipos de receptores como los dopaminérgicos  $D_1$  y  $D_2$ , que tienen efectos opuestos sobre la actividad NAT, inhibiéndola a  $0,1 \mu\text{M}$  y estimulándola a concentraciones mayores de  $10 \mu\text{M}$  (Govitrapong y cols., 1989). La activación de los receptores gabanérgicos en la glándula pineal no altera la actividad basal de NAT pero inhibe la estimulación de la NAT inducida por noradrenalina (Chan y Ebadi, 1980) y de los receptores opiáceos existentes en la glándula pineal incrementa esta actividad (Govitrapong y cols., 1992).

### 1.5. Ritmos circadianos de producción de melatonina

La presencia de melatonina en circulación de todos los animales estudiados es más elevada durante los períodos de oscuridad que durante el día, debido a que la síntesis y la secreción de la hormona en la pineal varía a lo largo del ciclo luz-oscuridad, con niveles altos durante las horas de oscuridad y bajos durante las horas de luz, como, resultado de la activación nocturna de la enzima NAT, paso limitante de síntesis de melatonina. De esta forma, la NAT y el enzima TH, presentan un ritmo circadiano de actividad, con un pico durante el período de oscuridad de máxima actividad y valores basales durante el período de luz (Klein y Weller, 1970; Sitaram y Lees, 1978; Binkley, 1993). Así, la producción y secreción de melatonina están principalmente controladas por el ritmo y la actividad de la NAT, de tal forma que el contenido de melatonina en la pineal y en la circulación sanguínea aumenta por la noche y se mantiene basal durante el día. Por el contrario, las concentraciones de serotonina se mantienen, en glándula pineal de rata, a un ritmo circadiano opuesto bien definido, con valores elevados durante el día y bajos durante la noche, al ser utilizado como sustrato por la NAT activa.

La actividad de la HIOMT no parece tener una variación con el ritmo circadiano, aunque es más

alta durante la noche (Sudgen, 1989; Binkley, 1993), por lo que se piensa que, la actividad de HIOMT podría intervenir en la regulación de la síntesis de la hormona.

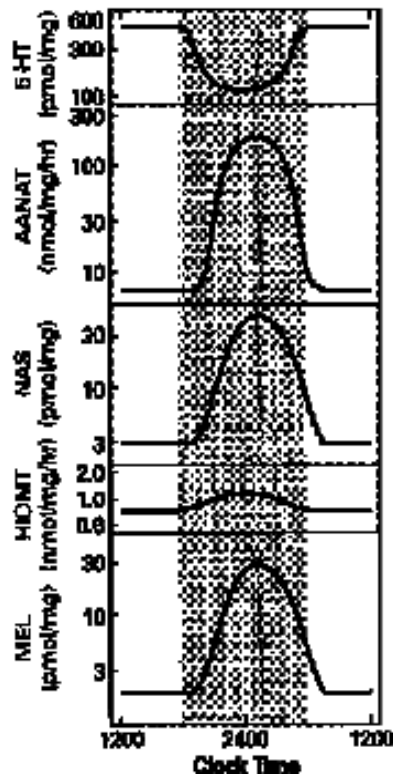
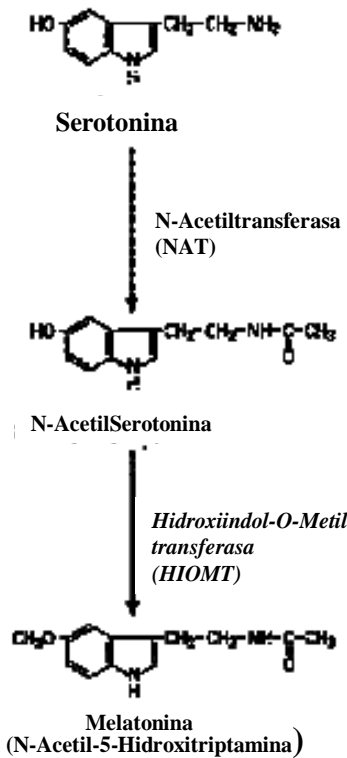


Figura 4. Ritmos diarios representativos de la biosíntesis de melatonina

En general, la pineal produce melatonina principalmente por la noche sin tener correlación con la actividad locomotora de las especies estudiadas. Sin embargo, en relación con la magnitud de la producción nocturna de melatonina, existen diferencias dependiendo de cada especie y además de las diferencias de la magnitud existen diferencias en el perfil de esa elevación. Estas diferencias han permitido clasificar los ritmos de producción de melatonina en tres clases (Reiter, 1988b; 1989).

En la primera clase (A), la producción de la hormona se limita en la segunda parte de la fase de oscuridad. Este tipo es el menos frecuente. La segunda clase (B), es la más frecuente y estable en el hombre (Arendt, 1988; Vaughan y cols., 1976) y rata (Arendt, 1988). Al entrar en fase de oscuridad, empieza a elevarse lentamente la producción de melatonina hasta alcanzar un pico máximo cerca de la mitad de la fase de oscuridad, seguido de un descenso de la misma hasta alcanzar los niveles basales durante la segunda mitad de la noche poco antes del comienzo de la fase luminosa. Finalmente en la clase C, el nivel de melatonina aumenta rápidamente tras entrar en la fase de oscuridad; después se mantienen elevados y estables durante todo el tipo el período nocturno y desciende bruscamente antes de comenzar la fase luminosa. En mamíferos, el papel esencial de la pineal parece ser la transmisión de información fotoperiódica relacionada con los ciclos anuales.

## 1.6. Efecto de la luz y la pinealectomía sobre la producción de melatonina

El ritmo circadiano de la síntesis de melatonina es de naturaleza endógena y se origina en el SCN del hipotálamo. Durante el período luminoso hay una inhibición de la vía simpática a través del haz retino-hipotalámico, y por tanto de la liberación de noradrenalina y disminuye la actividad de la NAT, y por consecuencia no se sintetiza la melatonina (Reiter, 1985). Pero durante el período de oscuridad ocurre lo contrario, por lo que se ha denominado a la melatonina como “hormona nocturna”. Casi sin excepción, en general en mamíferos, los valores de esta hormona durante el día son inferiores que los niveles nocturnos, la actividad NAT se ve incrementada de 10 a 100 veces durante la noche, y la actividad de la HIOMT se ve lentamente incrementada (Binkley, 1993).

En animales mantenidos bajo condiciones de oscuridad continua, tanto en los mamíferos (Underwood y Goldman, 1987; Reiter, 1991c; Binkley, 1993) como en las aves (Binkley, 1993), se mantiene el ritmo de la síntesis de melatonina y permanece sin alteraciones, aunque disminuido, y diferente del ritmo día-noche. Así, en individuos ciegos o sin percepción de luz, presentan un ritmo de melatonina sanguínea de fase libre (Lynch y cols., 1978). Esto se debe a un control en el SCN y a un ritmo impuesto por él mismo (Lewy y Newsome, 1983).

La exposición de los animales a iluminación continua durante la noche, produce una pérdida de las fluctuaciones diarias en las actividades de las enzimas pineales, y por tanto, de la síntesis de melatonina. Axelrod, en 1974, demostró que esta exposición reduce la expresión de noradrenalina de las terminaciones simpáticas, produciendo un descenso en la actividad NAT. Es importante destacar, que los niveles de melatonina por exposición a la luz continua se ven afectados; disminuyen en tejidos y sangre y no se observa ningún ritmo de producción de melatonina, siendo dependiente de la intensidad lumínica, la longitud de ondas y la duración de la exposición de la misma, variando éstas según la especie (Reiter y cols., 1983).

Así numerosos autores han investigado las propiedades espectrales de la luz con relación a su efecto sobre la producción de melatonina, y han demostrado que en ratas y humanos, la región verde del espectro correspondiente a la absorción de rodopsina es más efectiva en inhibir la producción de melatonina (Cardinali y cols., 1972). Sin embargo, en hámster, la luz azul es la más efectiva (Brainard y cols., 1984).

En humanos, en sujetos normales, se necesita 2500 luxes para inhibir totalmente la síntesis de melatonina, mientras que 100 luxes durante una hora, la reducen un 33% (Lewy y cols., 1980; McIntyre y cols., 1989).

De esta manera, después de mantener los animales bajo condiciones de luz u oscuridad continua, el período de ritmo endógeno de secreción de la hormona es diferente en los animales de hábitos nocturnos que en los diurnos. En los primeros, como se ha visto, es siempre superior a 24 horas, mientras que en los segundos es inferior a 24 horas. La excepción a esta regulación, la constituye las ratas, que pese a ser animales nocturnos, presentan ritmos de secreción con períodos menores de 24 horas.

La prolongación o acortamiento del período de oscuridad, en cualquier caso independientemente de la clase de ritmo (A, B, C) provoca proporcionalmente un aumento o descenso de la producción de melatonina.

### 1.7. Mecanismos de acción de la melatonina

Los estudios iniciales que pretendían establecer los mecanismos por los cuales la melatonina llevaba a cabo sus funciones biológicas, como por ejemplo, su efecto regulador de los ritmos circadianos actuando sobre el SCN, estudios en los que se utilizaban análogos radioactivos de la melatonina, como [<sup>125</sup>I]-melatonina, para realizar experimentos de unión de ligando o autorradiográficos, mostraron la existencia de sitios de unión de alta afinidad para la melatonina localizados, en su mayor parte, en tejidos cerebrales de una amplia variedad de especies de vertebrados. Muchos de estos sitios de unión fueron encontrados en preparaciones de membranas, o en su defecto fueron asociados a éstas.

Si nos basamos en sus características farmacológicas, hoy en día se acepta la existencia de dos clases de receptores para melatonina, los denominados ML<sub>1</sub> y ML<sub>2</sub> de alta y baja afinidad por la hormona respectivamente (Dubocovich, 1995). Ebisawa y sus cols. clonaron en 1994 por primera vez un receptor para melatonina a partir de melanóforos de piel de *Xenopus*, demostraron así la existencia de un receptor de membrana para melatonina, cuya estructura molecular presenta siete dominios transmembrana (Ebisawa y cols., 1994). En función de la estructura molecular se han establecido tres clases de receptores de membrana: Mel<sub>1a</sub>, Mel<sub>1b</sub> y Mel<sub>1c</sub>, los cuales son de alta afinidad y presentan características farmacológicas semejantes (Ebisawa y cols., 1994; Reppert y cols., 1994; 1995a; 1995b). Se ha demostrado también que estos receptores de melatonina con siete dominios transmembrana están acoplados a diferentes efectores a través de proteínas de unión a nucleótidos de guanina.

Sin embargo, atendiendo a la estructura lipofílica de la melatonina, que le permite atravesar por difusión simple la membrana plasmática, y en base a estudios inmunocitoquímicos que demostraban una distribución intracelular de la melatonina (tanto citoplasmática como nuclear) así como estudios que mostraron nuevas acciones de la melatonina, no relacionadas con la actividad circadiana, sobre células en las que no se habían descrito receptores de membrana para la hormona, se iniciaron estudios para establecer una relación entre la melatonina y la fisiología intracelular que fuera mediada por mecanismos independientes de los receptores de membrana.

Como resultado de estos estudios, se ha demostrado que la melatonina puede actuar como un potente neutralizador de radicales libres interaccionando directamente con éstos (Tan y cols., 1993), así como la existencia de receptores nucleares específicos para la hormona (Acuña-Castroviejo y cols., 1994; Becker-Andre y cols., 1994; Carlberg y cols., 1994) y su interacción con proteínas reguladoras citoplasmáticas como la calmodulina (CaM) o la PKC (Huerto-Delgadillo y cols., 1994; Pozo y cols., 1994; Benítez-King y cols., 1996; Romero y cols., 1998).

La melatonina también ejerce su actividad al evitar cambios estructurales en las membranas celulares, cambios producidos porque el estrés oxidativo reduce la fluidez de la membrana e influye en procesos patológicos (Ghosh y cols., 1993; Niranjan y Krishnakantha, 2000). La melatonina estabiliza la membrana inhibiendo la rigidez causada por la peroxidación lipídica.

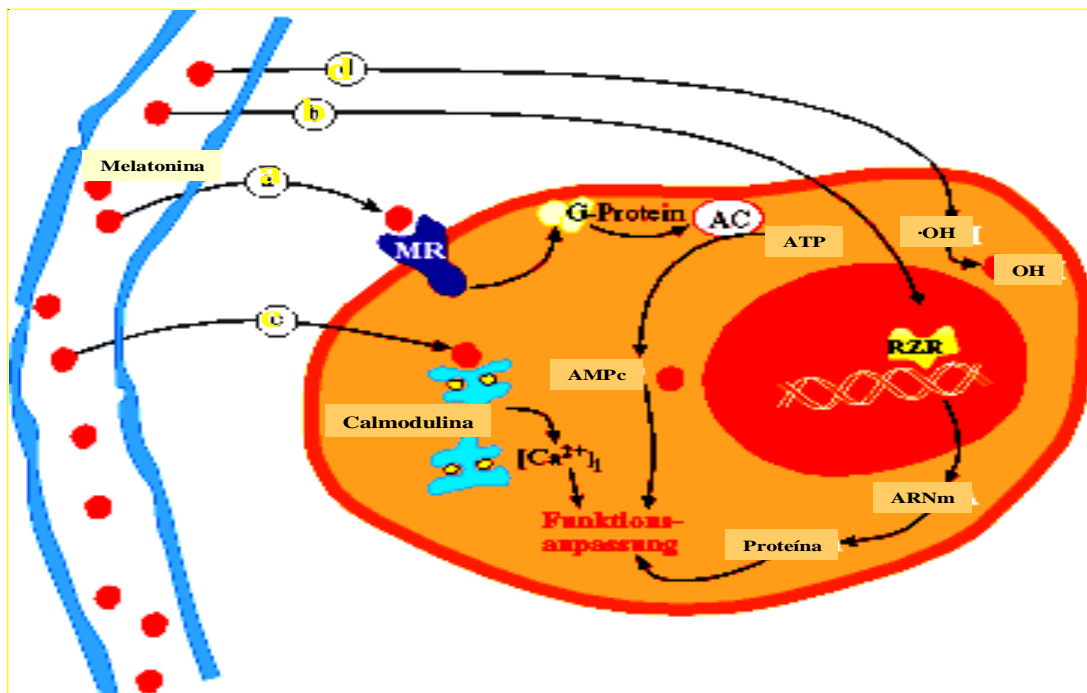
Por tanto, hasta la fecha son cuatro los mecanismos de acción por los cuales la melatonina puede llevar a cabo sus funciones biológicas:

1. Unión a receptores de membrana plasmática.
2. Unión a receptores nucleares.
3. Interacción con proteínas citosólicas.
4. Acción directa como neutralizador de radicales libres.

Sin embargo, se desconoce la posible interacción funcional entre los diferentes mecanismos de acción de la melatonina.



Se ha especulado con la posible existencia de una competencia entre los diferentes mecanismos por la hormona, o bien, si se excluyen unos a otros. Los receptores de membrana parecen tener una mayor afinidad por la melatonina que los receptores nucleares, por lo que en competición directa por el ligando tendrían preferencia los receptores de membrana. También se ha sugerido que una parte de los sitios de unión para la melatonina en la membrana celular podrían actuar como un sistema regulador de la concentración intracelular de melatonina, en particular en el núcleo donde parece ser que la melatonina se puede acumular, alcanzando concentraciones superiores a las sanguíneas (1nM) (Acuña-Castroviejo y cols., 1994). Posiblemente, este mismo efecto regulador podría ser llevado a cabo por la CaM u otras proteínas citosólicas. Por otra parte, no se puede descartar que la activación de los receptores de membrana y la consiguiente cascada de transducción de señal pueda regular la actividad de los receptores nucleares mediante modificaciones covalentes. A esto hay que añadir el posible efecto que podría tener sobre la concentración intracelular de melatonina la formación de radicales libres dentro de la célula.



**Figura 5.** Mecanismos de acción descritos para la melatonina. a) Unión a receptores de membrana plasmática; b) Unión a receptores nucleares; c) Interacción con proteínas citosólicas; d) Acción directa como neutralizador de radicales libres.

---

## 2. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LA MELATONINA

McCord y Allen (1917), fueron los primeros autores que demostraron el primer papel funcional de melatonina en anfibios; su capacidad de producir la condensación de los gránulos de melanina en la piel de anfibios.

A partir de la década de los setenta, se han descrito muchas acciones biológicas de la hormona tanto *in vivo* como *in vitro*. La glándula pineal y su principal hormona, la melatonina actuando como un importante mensajero químico, pueden regular muchos procesos metabólicos en todos los sistemas del organismo, dependiendo de las especies estudiadas, en los que destacan el propio sistema endocrino, el sistema nervioso central, el sistema inmune y el sistema cardiovascular. Las posibles funciones fisiológicas de melatonina, tales como 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, han sido plenamente estudiadas en mamíferos. Otras observaciones de la melatonina en suero y las manipulaciones experimentales de la concentración de la melatonina, han implicado a la glándula pineal su hormona en la activación del sistema inmune, del proceso intracelular antioxidante, del desorden de las funciones psicológicas, de la acción antitumoral y la termorregulación.

### 2.1. Acciones sobre la función reproductora

La glándula pineal de los mamíferos se consideró durante mucho tiempo como un órgano vestigial de poca significación fisiológica, y la melatonina como señal interna que traduce información fotoperiódica y va a ser el factor determinante de la actividad del sistema reproductor. Las investigaciones experimentales en los últimos años han establecido que la eficacia de la pineal para modificar las funciones reproductivas varía dependiendo de la especie, la edad de los animales de estudio, y del momento en el que se suministra la melatonina con relación al ciclo luz-oscuridad y de la pinealectomía.

Las modificaciones en la que la producción nocturna de melatonina son las señales mediante las cuales la hormona influye en la reproducción de los animales. Hay tres posibilidades diferentes que pueden definir la señal de la melatonina: la fase, la duración y la amplitud. Particularmente, parece ser que la modificación en la duración de la producción nocturna de melatonina es la que transmite la información acerca del fotoperíodo al sistema reproductor de los animales con cambios estacionales (Reiter, 1991b; Cagnacci y Volpe, 1996). En algunas especies, como el hámster, la prolongación de producción nocturna

de melatonina induce un reposo en la actividad reproductora, pero en otras especies, como en la ovina, la misma señal produce una recrudescencia gonadal. Sin embargo, los seres humanos no son estrictamente considerados como reproductores estacionales (Ronneberg y Aschoff, 1990a, b; Cagnacci y Volpe, 1996) pero existe un comportamiento estacional en cuanto a la concepción y la natalidad con respecto a las diferentes áreas geográficas. Así, estudios epidemiológicos en poblaciones del ártico, demuestran que el número de concepciones y la tasa de natalidad descienden en los meses de invierno respecto a los del verano (Rojansky y cols., 1992; Kauppila y cols., 1987).

El mecanismo más aceptado como responsable de esta función de la melatonina como mediador de la fisiología reproductiva, es su efecto en diversos niveles sobre el eje hipotálamo-adenohipofisario-gonadal (HPG) (Brzezinski y cols., 1987a, b). La administración de melatonina afecta a: la liberación hipotalámica de la hormona liberadora de gonadotropina (GnHR); la respuesta hipofisaria a la GnHR; la secreción de prolactina; la síntesis de esteroides gonadales; y la respuesta de los órganos diana periféricos a los esteroides gonadales. A su vez, una prolongación de la producción nocturna de melatonina inhibe la secreción de GnHR en ratas recién nacidas. Además, la integridad del hipotálamo ventromedial es vital para el efecto inhibitorio de la melatonina sobre la secreción gonadotrófica (Hastings y cols., 1997), y se han localizado receptores de melatonina en la glándula pituitaria, concretamente en la pars tuberalis en los animales con reproducción estacional (Dubocovich, 1995).

En los animales reproductores de días largos, como es el caso de roedores, una mayor duración en la secreción nocturna de melatonina durante el otoño e invierno induce la regresión gonadal inhibiendo la liberación de GnHR y con la llegada de la primavera el sistema reproductor se activa. Por el contrario, en aquellos reproductores de días cortos, como las ovejas, la melatonina durante el invierno induce una estimulación del desarrollo gonadal, lo contrario ocurre durante la primavera y el verano.

En el hámster sirio, los cambios en la longitud del fotoperíodo son importante para controlar la actividad gonadal (Reiter, 1978). Los órganos reproductivos del animal son muy sensibles a la iluminación ambiental y la actividad de la glándula pineal. Un fotoperíodo corto o la ceguera llevan a la atrofia de estos órganos. En los machos, se observa una atrofia gonadal con una pérdida completa de la actividad espermatogénica testicular, las gónadas se reducen en un 80% y se ven afectados también los órganos gonadales secundarios (vesículas seminales). Este efecto se produce por una disminución en la secreción de LH y FSH por la hipófisis. En las hembras, se observa una disminución en las concentraciones plasmáticas de GnHR y una pérdida de peso del útero, debido posiblemente a una disminución en la producción de

estrógenos. La pinealectomía evita la regresión gonadal que se produce al mantener estos animales en condiciones de fotoperíodo corto (Reiter, 1991b; Elliot y Goldman, 1981). A la vista de estos resultados se puede establecer un claro efecto antigonadotrófico de la melatonina en el hámster sirio y en ovejas. Durante los días cortos, la actividad pineal aumenta favoreciendo el efecto negativo de las hormonas esteroideas que retraen las gónadas, mientras que en días largos, la actividad pineal descende y el efecto inhibidor desaparece, recuperándose la actividad gonadal y reproductora.

Por otra parte, la melatonina y la pineal, tienen efectos progonadotróficos en otras especies: como el hámster turco (Carter y cols., 1982) y el carnero (Arendt, 1986), siendo esenciales para mantener la actividad reproductora.

En humanos, el primer indicio de la glándula pineal sobre la reproducción fue descrita por Heubner en 1898 al relatar un caso de pubertad precoz en un niño de cuatro años que presentaba un tumor noparenquimal que destruía la glándula pineal. Por otro lado, se conoce que los tumores hiperactivos, que secretan melatonina en exceso, producen un retraso en la aparición de la pubertad sin poder establecer una relación entre los niveles de melatonina y la aparición de la pubertad. Hoy en día se acepta que en humanos, la glándula pineal afecta de algún modo el desarrollo de la pubertad y que la entrada en la pubertad está relacionada con la disminución en los niveles séricos de la melatonina en los adolescentes.

En humanos, la disminución en la secreción de melatonina que tienen lugar antes de iniciarse la pubertad, parece uno de los factores que desencadenan la aparición de la misma (Silman y cols., 1979). De hecho, existen varias patologías que relacionadas con la glándula pineal y su hormona. En mujeres con amenorreas de origen hipotalámico, cuyos niveles de estrógenos son muy bajos, los niveles nocturnos de melatonina suelen estar elevados (Berga y cols., 1988).

La administración exógena de estrógenos en estas mujeres, inhibe la secreción nocturna de melatonina, y la supresión de la síntesis de estrógenos en mujeres sanas eleva los niveles nocturnos de melatonina circulante. Estos datos sugieren la existencia de un control negativo de los estrógenos sobre la función de la pineal. Por otra parte, los hombres con oligospermia o aspermia y mujeres con ciclos menstruales alterados o sin ovulación presentan niveles nocturnos elevados de melatonina circulante. Todos estos datos sugieren que la elevación de la concentración sérica de melatonina puede desencadenar anomalías reproductivas (Reiter, 1998). En pacientes con hipogonadismo hipogonadotrófico que presentan una pubertad retrasada y altos niveles de melatonina, tras una disminución de la secreción de melatonina se

observó un aumento en la secreción gonadotrófica y la aparición del desarrollo sexual (Puig-Domingo y cols., 1992). Además, la administración de melatonina durante el día en la fase folicular del ciclo menstrual, aumenta la amplitud de los pulsos de LH y su respuesta a la estimulación por GnHR, y en base a esto, se ha sugerido que la secreción circadiana de melatonina ayudaría a sincronizar la secreción de LH preovulatoria que ocurre en el período nocturno (Cagnacci y Volpe, 1996).

### **2.2. La melatonina como sincronizador de los ritmos circadianos y el sueño**

La melatonina tiene una función sincronizadora interna de los diferentes ritmos circadianos que se generan en el organismo con los ciclos diarios de luz-oscuridad, adaptando el organismo a las modificaciones del medio ambiente (Reiter, 1981). Así actúa como un cronobiótico, es decir, es capaz de reajustar los ritmos circadianos desincronizadores o bien prevenir que estos se desajusten por alteraciones medioambientales.

Los mecanismos por los cuales la melatonina lleva a cabo esta función cronobiótica no están bien establecidos. Se sabe que el ritmo endógeno está controlado por el denominado reloj biológico central, que en mamíferos se localiza en el SCN de la parte anterior del hipotálamo, y en vertebrados inferiores y en algunas aves se localiza en la pineal (Ibata y cols., 1999), y que está ajustado a un período de 24 horas por diversos factores ambientales, de los que el ciclo luz-oscuridad es el más importante. Así, lesiones en el SCN en ratas y hámster, produce pérdidas del ritmo de actividad locomotora y de ritmicidad circadiana de diferentes funciones biológicas como: absorción de alimentos, temperatura corporal, ciclos de vigilia-sueño, ingestión de agua, niveles plasmáticos de melatonina y secreción de diversas hormonas (Steinlechner, 1996; Ralph y cols., 1990). La única manera de restablecer la ritmicidad en los hámsters es la implantación del SCN, pero en las ratas es la estimulación eléctrica o farmacológica del SCN.

Los estudios sobre las funciones cronobióticas de la melatonina se han centrado principalmente en las alteraciones en el ritmo circadiano de los ciclos vigilia-sueño. En humanos, la melatonina puede avanzar o retrasar la fase de sueño dependiendo del momento en que sea administrada. De este modo, la administración de melatonina en las primeras horas de la mañana, produce un retraso de fase, mientras que a últimas horas del día produce un adelanto de fase (Sack y cols., 1998). Se ha descrito que la melatonina ha resultado ser eficiente en el tratamiento de diferentes alteraciones del sueño como: las pérdidas de sincronización entre el ritmo circadiano de producción de la melatonina y las horas habituales de sueño

que conducen a situaciones de insomnio (Sack y cols., 1998); el fenómeno del jet lag, donde los ritmos de melatonina se van resincronizando con la nueva situación hasta que el fenómeno desaparece (Arendt y cols., 1987; Sack y cols., 1998); y las alteraciones como consecuencia del cambio en la pauta vigilia-sueño en trabajadores con turno de noche (Sack y cols., 1998).

La ingestión exógena de melatonina afecta tanto a la aparición del sueño como a la calidad y la duración del mismo, y tiene un efecto hinóptico. Los primeros estudios que mostraron el efecto de la melatonina sobre el sueño en humanos se llevaron a cabo con concentraciones farmacológicas (entre 1 mg y 1,2 g). Recientemente, se ha demostrado que a bajas concentraciones de melatonina (1-3 mg) permite que las concentraciones séricas de la hormona pineal se aproximen a los niveles de melatonina en adultos (50-120 pg/ml) y facilita la inducción de sueño en individuos sanos. Independientemente del momento en que se administra, la respuesta ocurre en menos de una hora tras la administración y así parece excluir la posibilidad de que el efecto sea debido a un cambio de fase en la aparición del sueño (Dollins y cols., 1994). La melatonina mejora además las condiciones del sueño en pacientes con insomnio que presentan déficit en sus niveles de dicha hormona, generalmente ancianos, así como en pacientes con Alzheimer (Haimov y cols., 1995). Por otra parte, los mecanismos que median la inducción del sueño y el efecto hinóptico de la melatonina podrían estar relacionados con los efectos hipotérmicos de la misma (Cagnacci y cols., 1992).

### **2.3. Efectos sobre el sistema nervioso central: la sedación**

La melatonina realiza diversos efectos sobre el sistema nervioso central (SNC), el más estudiado 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. Diversos estudios demostraron la capacidad de la melatonina para facilitar o inducir el sueño en animales agresivos (Marczynski y cols., 1964) y también la disminución de la sensibilidad al dolor que producía esta hormona (Lakin y cols., 1981). En humanos, tiene un efecto inductor del sueño que se acompaña de sedación, así la melatonina actúa como un mediador de las variaciones circadianas en el sueño y la somnolencia (Wurtman y Lieberman, 1985) y reduce la capacidad de atención y manipulación de objetos disminuyendo las puntuaciones obtenidas en tests de control y coordinación psicomotora (Lieberman y cols., 1984). El mecanismo de estos efectos hinópticos de la melatonina sobre el SNC se desconoce, pero existen otros aspectos importantes a nivel del SNC como la conducta y el comportamiento.

Así se ha visto que, las alteraciones del ritmo de melatonina parecen acompañarse de alteraciones conductuales y se han descrito afecciones psiquiátricas con un marcado componente cíclico:

- El síndrome de depresión invernal o desorden afectivo estacional que consiste en un síndrome depresivo de aparición invernal en latitudes extremas del planeta, y que afecta principalmente a mujeres con una tríada de síntomas típicos: aumento de peso, hipersomnia y gran apetencia por carbohidratos (Rosenthal y cols., 1984), y donde se sospecha de una secreción inapropiada de melatonina. El tratamiento de estos pacientes con una fototerapia a primera hora de la mañana está dando resultados positivos (Lewy y cols., 1982; Rosenthal y cols., 1988).
- Pacientes con anorexia nerviosa presentan niveles anormalmente elevados de melatonina (Brambilla y cols., 1988). La causa podrá ser un fallo a nivel del eje neuroendocrino-reproductivo.
- Pacientes con migrañas repetidas presentan niveles anormalmente bajos de melatonina (Claustrat y cols., 1989).

### **2.4. Efecto de la melatonina sobre el envejecimiento y la duración de la vida**

La relación entre la melatonina y el envejecimiento no es un hallazgo reciente, y las propiedades anti-envejecimiento de la melatonina han despertado un gran interés y atención en medios científicos. Aunque su mecanismo de acción, avalado por muchos autores, ha sido su capacidad inmunopotenciadora, hay que tener en cuenta que hoy en día, dentro del contexto general de la teoría del envejecimiento por radicales libres y sus efectos acumulativos, se admite su relación con otras funciones, como el papel antioxidante y como molécula citoprotectora.

Desde hace tiempo, se conoce que la producción de melatonina disminuye con la edad. Así esta degeneración se hace especialmente evidente en la reducción gradual del pico nocturno en todas las especies estudiadas (revisado por Reiter y cols., 1990; Trentini y cols., 1991), incluido en hombre (Iguchi y cols., 1982).

En relación con el crecimiento y desarrollo de los individuos, los estudios realizados en diversos mamíferos, incluido el hombre, muestran que durante el período fetal y en recién nacidos, la melatonina no es sintetizada por el organismo pero se suministra por vía placentaria o en la leche materna, y que la secreción rítmica de la hormona se empieza a los 3 o 4 meses de edad (Iguchi y cols., 1982).

A partir de ahí la producción de la melatonina se incrementa de forma espectacular durante el primer año de vida y alcanza los niveles nocturnos más elevados entre el primer y el quinto año. Posteriormente, los niveles de melatonina empiezan a disminuir con relativa brusquedad coincidiendo con los cambios pubertales momento a partir del cual, la producción de la hormona decae lentamente con el envejecimiento fisiológico de forma que, por encima de los 60 años, los niveles de melatonina pueden estar alrededor del 10% de los máximos prepubertales (Sack y cols., 1986; Reiter, 1994; Benot y cols., 1998; Waldhauser y cols., 1988).

Todos estos datos, han permitido considerar que la melatonina está involucrada, como causa o como efecto, en el proceso de envejecimiento. Diversos grupos de investigadores, han coincidido en describir que, la administración de extractos de pineal a roedores adultos, puede prolongar la vida media de los mismos entre un 10 y un 15% (Maestroni y cols., 1989). Del mismo modo, injertos de pineal de ratones jóvenes en ratones adultos (Pierpaoli y Regelson, 1994), e implantes de pineal de ratones jóvenes en timo de ratones adultos, prolongan también la vida de estos últimos. Recientemente, en animales pinealectomizados, se observa un gran descenso de la longevidad, que tras la administración de extractos de pineal se recupera (Bubenik, 1998).

Pero el resultado más interesante es, gracias a la administración de melatonina, que los animales alcanzan edades avanzadas sin padecer las enfermedades relacionadas con la edad, entre las que cabe destacar una notable disminución de la incidencia de tumores, infecciones y enfermedades degenerativas del sistema cardiovascular y del SNC.

Armstrong y Redmen (1991), propusieron que los efectos beneficiosos de la melatonina dependían de su asociación a los ritmos circadianos, cuya estabilidad se pierde con la edad y que esta desincronización conduce a distintas patologías y a un deterioro generalizado de la salud.

La disminución de los niveles de melatonina con la edad puede deberse a diversos factores: reducción del número de receptores  $\beta$ -adrenérgicos en la membrana del pinealocito (Henden y cols., 1992); al daño que sufre el SCN hipotalámico causado por la formación de radicales oxigenados, que destruyen las neuronas postsinápticas (Poeggeler y cols., 1993); a cambios en la estructura de la pineal y declive de los pinealocitos o por cambios en la actividad de las enzimas que regulan el proceso de síntesis de la melatonina (Bubenik, 1998).



En un gran número de patologías neurodegenerativas asociadas a la vejez, por ejemplo Alzheimer y Parkinson, epilepsia, procesos de isquemia-reperfusión, se ha observado cantidades excesivas de glutamato o aspartato, que son capaces de estimular las neuronas del SNC hasta el punto de producir la muerte neuronal (fenómeno de excitotoxicidad). Este fenómeno produce radicales libres, por lo que puede ser contrarrestado con el uso de antioxidantes. Recientemente, se ha demostrado que la melatonina es capaz de inhibir el daño oxidativo causado por neurotransmisores como el ácido kaínico o el glutamato en gránulos cerebelosos (Giusti y cols., 1995; 1996; Melchiori y cols., 1995; Lipartiti y cols., 1996), en neuronas del hipocampo (Uz y cols., 1996; Skaper y cols., 1998) o en cerebro (Floreaan 1997), y el daño excitotóxico del N-metil-D-aspartato (NMDA) en estriado (Kim y Kwou, 1999) y del NMDA y de la hipoxia/reoxigenación en cultivos primarios de neuronas corticales de rata (Cazevieille y cols., 1997).

### **2.5. Melatonina y su papel citoprotector**

Durante los últimos años, numerosos trabajos sobre la glándula pineal y su hormona principal, se han centrado en nuevos aspectos, entre los que destacan dos: su papel como antioxidante, y su papel como antiproliferativo y oncostático.

#### **2.5.1. La melatonina como agente antioxidante**

La función antioxidante se basa en la capacidad neutralizadora de radicales libres (scavenger) de la melatonina. La naturaleza liposoluble de ésta le permite atravesar con facilidad las membranas celulares, incluso la barrera hematoencefálica, y acceder a aquellos compartimentos celulares en los que se originan los radicales libres producidos como consecuencia del metabolismo aeróbico. Por todo ello se considera a la melatonina como uno de los componentes esenciales del sistema de defensa antioxidante de los organismos, y quizás el mejor de todos los agentes antioxidantes conocidos (Poeggeler y cols., 1993; Reiter y cols., 1993).

Cuando los sistemas fisiológicos de defensa contra los efectos oxidantes de los radicales libres (enzimas específicas y neutralizadores biológicos) se saturan por una excesiva producción de radicales libres (exposición a ciertas drogas, radiación ionizante o ultravioleta, reacciones agudas de inflamación) o por una baja actividad enzimática (recién nacidos con sistemas de defensa no desarrollados, dietas deficientes, fallos metabólicos o problemas asociados con el envejecimiento), los radicales libres atacan a los

diferentes constituyentes celulares como membranas, ácidos nucleicos y proteínas lo que puede desembocar en la muerte celular. Al conjunto de los daños que pueden producir los radicales libres a las diferentes biomoléculas se le denomina “estrés oxidativo”. Este estrés oxidativo puede provocar el deterioro de las membranas celulares, un metabolismo deficitario y modificaciones del ADN, que pueden conducir a situaciones más o menos graves como pueden ser carcinogénesis (Farber, 1982), neurodegeneración (Poeggeler y cols., 1993) o envejecimiento (Rice, 1993; Poeggeler y cols., 1993).

La función protectora de la melatonina ante el estrés oxidativo causado por agentes oxidantes ha sido demostrada a nivel celular y molecular, tanto *in vitro* como *in vivo*.

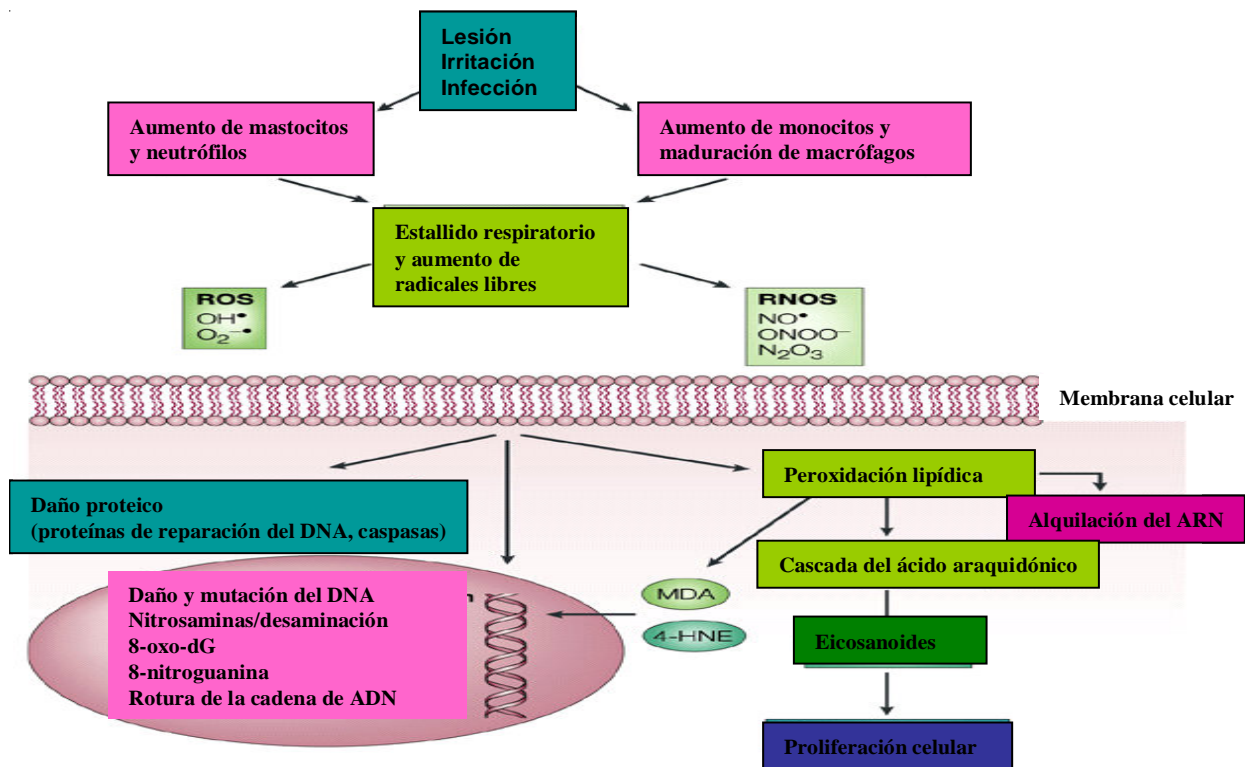
La melatonina disminuye el daño causado por diferentes agentes pro-oxidantes sobre el ADN nuclear. El safrol, un agente cancerígeno, induce la producción de radicales libres que dañan el ADN nuclear y mitocondrial (Reiter y cols., 1993). Tanto la administración de concentraciones farmacológicas (Tan y cols., 1993) como a concentraciones similares a la endógena (Tan y cols., 1993; 1994) de melatonina disminuyeron el daño producido por el safrol. Además, la hormona mostró una mayor eficacia radioprotectora ante el daño causado por radiaciones ionizantes que otros compuestos radioprotectores conocidos, como el dimetilsulfóxido (Tan y cols., 1993; Vijayalaxmi y cols., 1995).

Se ha demostrado asimismo que la melatonina atenúa el efecto dañino de los radicales libres en las reacciones de peroxidación lipídica de ácidos grasos poliinsaturados causada por diferentes agentes tóxicos como el paraquat, un herbicida que causa choque endotóxico (pulmón, hígado, y cerebro), o ácido kaínico en cultivos de neuronas de cerebelo (Giusti y cols., 1995a; 1995b).

La melatonina parece proteger también a las proteínas citosólicas del ataque de los radicales libres. La inducción de cataratas en ratas recién inducidas, hecho que se asocia a la degradación de proteínas citosólicas por radicales libres, es bloqueada por la administración de melatonina (Abe y cols., 1994).

Por otra parte, diversas enzimas con actividad antioxidante pueden ser reguladas por la melatonina. La actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa hepática y cerebral de ratones se ve estimulada por la hormona (Pierrefiche y Laborit, 1995). La actividad de la glutatión peroxidasa es estimulada por concentraciones farmacológicas de melatonina en cerebro de rata (Barlow-Walden y cols., 1995). Se ha observado también que su actividad aumenta por la noche en cerebro de pollo, aumento que desaparece al inhibirse la producción de melatonina por condiciones de iluminación nocturna (Pablos y cols., 1995). Los niveles de ARNm de la superóxido dismutasa en glándula harderiana de hámsters (Antolín y cols., 1996)

y de la glutatión peroxidasa en córtex cerebral de ratas (Kotler y cols., 1998) se incrementan tras la administración de melatonina.



**Figura 6.** Esquema de los mecanismos y los daños causados por el estrés oxidativo. ROS: Especies reactivas del oxígeno, RNOS: Especies reactivas del NO; MDA: Malondialdehído; HNE: Hidroxialquenes.

A su vez, enzimas con actividad pro-oxidante son inhibidas por la melatonina. La actividad de la enzima óxido nítrico sintasa controla la producción de óxido nítrico (NO), un neurotransmisor gaseoso, que favorece la formación de los radicales peroxinitrito e hidroxilo; esta enzima es inhibida por concentraciones fisiológicas de melatonina en cerebelo (Pozo y cols., 1994) e hipotálamo (Bettahi y cols., 1996) de rata. La melatonina también inhibe la actividad de la 5-lipooxigenasa (Steinhilber y cols., 1995), enzima presente sólo en células del sistema inmune (granulocitos, monocitos/macrófagos, células cebadas y linfocitos B) y que interviene en procesos inflamatorios e inmunes.

En el caso de la fenilcetonuria, un trastorno metabólico autosómico recesivo, se produce un estado de estrés oxidativo que causa a los pacientes retraso en el desarrollo corporal e intelectual. Estos daños provocados por la fenilcetonuria pueden ser prevenidos con un tratamiento que incluya la adición de melatonina, además del tratamiento clásico (Martínez-Cruz y cols., 2002).

La considerable importancia de la función antioxidante de la melatonina se pone de relieve cuando analizamos su posible implicación en diferentes enfermedades neurodegenerativas. En los procesos de envejecimiento y enfermedades relacionadas con los mismos, la melatonina podría desempeñar un papel determinante. El envejecimiento y las enfermedades de Parkinson y Alzheimer están relacionadas con el estrés oxidativo y la formación de radicales libres (Owen y cols., 1997). Por otra parte, la producción de melatonina por la glándula pineal disminuye con la edad, de forma que en personas con edad avanzada la cantidad de melatonina en sangre se ve muy disminuída (Benot y cols., 1999). El hecho de que ningún otro antioxidante endógeno se deteriore drásticamente como la melatonina permite pensar que la pérdida de melatonina durante el envejecimiento hace que las células y macromoléculas sean más vulnerables al ataque oxidativo, especialmente en el cerebro, donde no hay un sistema antioxidante de defensa muy desarrollado, lo que contribuiría al desarrollo de dichas enfermedades. (Reiter, 1995; 1999).

Existen estudios que sugieren que la administración de melatonina puede paliar en algún grado las consecuencias de los procesos degenerativos que producen Parkinson (Acuña-Castroviejo y cols., 1997; Mayo y cols., 1998) y Alzheimer (Pappolla y cols., 1997). En este sentido, no está claramente establecido si la melatonina puede ejercer su función antioxidante a concentraciones fisiológicas de ésta, que protejan contra el daño producido por los radicales libres (Tan y cols., 1994; Pablos y cols., 1995; Benot y cols., 1999) y cómo las concentraciones de melatonina pueden alcanzar niveles mayores en el interior de la célula que los medidos normalmente en el suero (Menéndez-Pélaez y Reiter, 1993).

Aun considerando que el efecto antioxidante de la melatonina sólo se observara a concentraciones farmacológicas, no se podría descartar la posibilidad de utilizar la administración de la melatonina como un tratamiento válido para prevenir o paliar las consecuencias de determinadas enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el envejecimiento, puesto que a las propiedades de molécula antioxidante, capacidad para atravesar cualquier barrera fisiológica y rápida absorción por el organismo, hay que añadir la de no tener, hasta la fecha, efectos tóxicos ni secundarios descritos, y las no despreciables propiedades de ser fácilmente producible y no ser un tratamiento costoso.

### 2.5.2. Melatonina y cáncer

Hace unos 70 años que se sugirió una posible relación entre malignidad y pineal (Georgiou 1929). Pero fue en 1981, cuando Bartsch y cols, observaron que la amplitud del pico nocturno de la melatonina circulante disminuye en el caso de las mujeres que padecían cáncer de mama. En la actualidad, la función antitumoral de la glándula pineal y la melatonina ha sido demostrada en numerosas pruebas experimentales y trabajos de una gran variedad de tumores, entre los que se encuentran el cáncer de mama (Hill y Blask, 1988; Cos y Blask 1994; Blask, 1993), melanomas (El-Domeiri y Das Grupta, 1973), adenocarcinoma prostático (Toma y cols., 1987; Buzzel y cols., 1988), tumores hipofisarios (Leadem y Burns, 1987) o carcinoma pulmonar y fibrosarcomas (Blask, 1984). También tiene efecto antiproliferativo en distintas líneas celulares tumorales de melanoma, sarcoma, macrófagos, fibroblastos y coriocarcinoma (Sze y cols., 1993). Particularmente la línea de células de cáncer de mama MCF-7 ha sido la más estudiada en relación con el efecto antiproliferativo (Hill y Blask, 1988).

La influencia de la melatonina sobre el crecimiento neoplásico, tanto con concentraciones fisiológicas como farmacológicas, es eficaz. Así en animales pinealectomizados o expuestos a luz continua, y con inducción de neoplasias, se produce un incremento tumoral que es revertido tras la administración de melatonina (El Domieri y Das Grupta, 1973; Buswell, 1975).

Por otra parte, las inyecciones de melatonina administradas a última hora de la tarde a dosis farmacológicas también inhiben la tumorigénesis, pero si se administran a otras horas del día, o no tienen efecto o incluso pueden llegar a estimular la formación de tumores en algunos casos (Bartsch y Bartsch, 1981; Blask, 1994).

El efecto antiproliferativo de la melatonina es más evidente en cánceres de mama humanos *in vitro*, pero sólo contra aquellos que son sensibles a los efectos mitogénicos de los estrógenos, o bien positivos para el receptor de estrógeno (Bartsch y cols., 1992) y una gran variedad de líneas celulares neoplásicas entre las que se incluyen los carcinomas ováricos, melanomas, cáncer de vejiga y neuroblastos (Blask, 1993).

Los mecanismos de acción directos e indirectos involucrados en el efecto antitumoral de la melatonina son varios y la relación ente estos mecanismos y la actividad antiproliferativa no está bien establecida. Entre los mecanismos directos que median en la acción antiproliferativa de la melatonina se encuentran:

- La modulación de la expresión del receptor de estrógenos a concentraciones fisiológicas, inhiben la inducción de la proliferación celular y así suprimen la transcripción disminuyendo los niveles de síntesis de ARNm del receptor del estrógeno y el efecto es independiente de la síntesis de proteínas (Molis y cols., 1994).
- Su acción más directa sobre el ciclo celular a concentraciones fisiológicas, antagonizan el efecto antimitótico sobre el crecimiento tumoral mostrándose que producen un retraso del ciclo celular a nivel de la transición entre las fases  $G_0G_{1,s}$ , efecto mediado en parte por estrógenos (Tamarkin y cols., 1981; Cos y cols., 1991).
- La interferencia en la acción de factores de crecimiento: la melatonina bloquea la liberación y la acción de factores de crecimiento inducidos por estradiol y estimula la liberación de factores de crecimiento inhibitorios, autocrinos o paracrinos (Cos y Blask, 1994).
- La interacción con calmodulina a concentraciones fisiológicas incrementa el tamaño de los microtúbulos al bloquear la formación del complejo calmodulina-tubulina en células cancerígenas (Benítez-King y Antón-Tay, 1993) lo que podría provocar la muerte de las mismas.
- El favorecer la comunicación intracelular de células sanas y cancerígenas, concentraciones fisiológicas incrementan la unión gap, lo que permitiría el paso de moléculas inhibitorias del desarrollo neoplásico de unas células a otras.

Sin embargo, los mecanismos de acción indirectos hacen referencia a los efectos antioxidante e inmunomodulador de la melatonina. la existencia de interacción entre la melatonina y el metabolismo del glutatión a la hora de llevar a cabo la inhibición de la proliferación celular, permitiría sugerir que en aquellas células cancerígenas que no responden a la melatonina (por ejemplo las que no presentan receptores de estrógenos) el aumento de la concentración intracelular de glutatión favorece la capacidad antitumoral de la melatonina. Por tanto, el efecto antiproliferativo de células se produce por otros mecanismos independientes de los receptores de estrógenos (Blask y cols., 1997).

También se ha demostrado como relación indirecta, el papel fisiológico de la glándula pineal en la regulación de la proliferación de las unidades formadoras de granulocitos y macrófagos (GM-CFU) en cultivos de médula ósea de rata (Haldar y cols., 1992). Se ha comprobado que en el tracto gastrointestinal de rata, la pinealectomía induce la hiperplasia en células de la cripta (Callaghan, 1995), y las concentraciones plasmáticas y salivares durante se ven incrementadas en los individuos con cáncer de colon cuando se estudió *in vitro* el papel antimitótico de la melatonina en células cancerosas colónicas (Bubenik, 1998).

Han sido numerosos los trabajos sobre la relación entre melatonina y el metabolismo lipídico, de hecho, la neurohormona provoca un descenso en el peso corporal del animal y la lipólisis basal *in vitro*. Las dosis tanto farmacológicas como fisiológicas inhiben la lipogénesis en los adipositos de rata, permitiendo así que la melatonina inhiba el desarrollo tumoral limitando o inhibiendo la asimilación del ácido linoléico por el tumor y provocando una disminución de los niveles del metabolito mitogénico 13-hidroxioctadecadeinoico, fruto de la oxidación via lipooxigenasa del ácido linoleico (Welsch, 1995). Todos estos datos permiten sugerir una posible acción indirecta sobre la actividad lipooxigenasa y la actuación de la melatonina sobre el transporte del ácido linoleico en las membranas celulares.

Por otra parte, el efecto oncostático de la melatonina a través de la función inmunomoduladora, se basa en su capacidad para estimular la respuesta inmune celular y humoral. Células inmunocompetentes pueden sintetizar melatonina y presentar receptores para la hormona. Las células tumorocidas son activadas por la melatonina aumentando la respuesta humoral primaria y la producción de determinadas citoquinas y ello contribuiría a su acción anticancerígena (Conti y Maestroni, 1995). Los estudios clínicos en pacientes neoplásicos parecen indicar que tanto la melatonina (Lissoni y cols., 1992c) como la conexión melatonina e IL-2 (Bubenik 1998) permiten un incremento en la actividad citostática de la citoquina, aumentando así la calidad de vida y mejorando la tolerancia al tratamiento de muchos de estos pacientes.

Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que la melatonina afecta al enzima telomerasa tanto *in vivo* como *in vitro* en células tumorales MCF-7 (León-Blanco y cols., 2003). La melatonina disminuye la actividad telomerasa en tumores implantados en ratones atómicos. *In vitro*, las concentraciones crecientes de melatonina desde 1 pM hasta 10  $\mu$ M provocaron una disminución muy significativa de la expresión del ARNm de la subunidad catalítica de la telomerasa TERT. Asimismo, se produjo un descenso más moderado de la expresión del ARNm de la subunidad ribonucleica de la telomerasa TR (León-Blanco y cols., 2003).

## 2.6. Melatonina y sistema inmune

Desde principios del siglo XX se sospechaba la relación de la glándula pineal con el sistema inmune y en los últimos años se ha puesto de manifiesto, tanto *in vivo* como *in vitro*, la función inmunomoduladora de la melatonina y la conexión bilateral entre la glándula pineal y el sistema inmune. Los mecanismos por los que la melatonina actúa sobre el sistema inmune abarcan interacciones directas e indirectas con células inmunocompetentes. Por otra parte, el sistema inmune puede, a través de la síntesis y secreción determinados factores solubles, afectar a la función de la glándula pineal. Esta interacción mutua sugiere la existencia de una regulación recíproca entre la glándula pineal, un órgano neuroendocrino, y el sistema inmune y así nace una nueva disciplina denominada neuroendocrinoinmunología (Guerrero y Reiter, 1992).

### 2.6.1. La melatonina como inmunomoduladora de la respuesta inmune

La evidencia de una relación entre la glándula pineal y el sistema inmune, fue la observación de un incremento del peso del timo tras la administración de extractos pineales, presentando una hiperplasia en las zonas medular y cortical de la glándula tímica (Milca y Pitis, 1943).

Veinte años después se observó una desorganización en las estructuras tímicas tras la pinealectomía en ratas recién nacidas (Csaba y Barath, 1975; Jankovic y cols., 1970; Devecerski, 1963) y una alteración inmune expresada como disminución de la producción de anticuerpos (Csaba y cols., 1966; Jankovic y cols., 1970).

Los primeros resultados positivos, que demostraron un claro efecto de la melatonina sobre la función del sistema inmune, fueron proporcionados por Maestroni y Pierpaoli en 1981. Realizaron una pinealectomía funcional al mantener ratones durante varias generaciones bajo luz continua, suprimiendo así la producción de la hormona. Observaron, como en la tercera o cuarta generación, los ratones crecían con dificultad y presentaban una disminución en la producción de anticuerpos en respuesta a antígenos T-dependientes, así como una atrofia de los tejidos linfoides de bazo y timo.

Estudios adicionales en ratones, mostraron que la inhibición farmacológica de la función pineal tras la inyección por la tarde de un antagonista  $\beta$ -adrenérgico, propanol, que disminuye el pico nocturno de melatonina, o la inyección diaria de p-clorofenilalanina (PCPA), un inhibidor de la síntesis de serotonina, disminuyó la producción de anticuerpos de la respuesta primaria a la exposición frente a eritrocitos



carnero y reacciones mixtas de linfocitos autólogas disminuidas (Maestroni y cols., 1986). La administración de melatonina a última hora del día, restablece los efectos producidos por los  $\beta$ -bloqueantes (Maestroni y cols., 1996). En los animales controles, se observó también un efecto inmunoestimulador de la melatonina suministrada a últimas horas de la tarde ( $10 \cdot 10^{-4}$   $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso), al aumentar la producción de anticuerpos en la respuesta inmune primaria y secundaria frente a eritrocitos de carnero, y el número de células formadoras de placas hemolíticas o de bazo (Maestroni y cols., 1987).

La mayoría de los datos múltiples que relacionaban a la melatonina con el sistema inmune procedían de estudios *in vivo* e *in vitro*. El hecho de que los experimentos de unión a células inmunocompetentes por [ $^3\text{H}$ ]-melatonina o [ $^{125}\text{I}$ ]-Mel no se encontraran sitios de unión a células, hizo pensar a Maestroni que el efecto de la melatonina debía estar mediado por algunos factores identificados.

Algunos trabajos apuntaban hacia un efecto más bien indirecto, a una posible relación entre la glándula pineal y el sistema de opioides endógenos (Lakin y cols., 1981; Lissoni y cols., 1986). Para confirmar esta relación, demostraron que los efectos inmunológicos de la melatonina (estimulación de la producción de anticuerpos en la respuesta primaria y el efecto antiestrés sobre la respuesta inmune de ratones inmunizados) eran contrarrestados por el antagonista opioide naloxona (Maestroni y cols., 1987; 1988). También observaron que otros péptidos opioides como la  $\beta$ -endorfina y la olinorfinal-13 reproducían, al menos en parte, el efecto inmunoestimulador y antiestrés de la melatonina (Maestroni y cols., 1989).

Estos mismos autores, demostraron que concentraciones fisiológicas de melatonina en el rango de nM, estimulan a las células T CD4+ (Th1) *in vitro* para liberar ciertos mediadores que compiten con la unión específica de [ $^3\text{H}$ ] naloxona a las membranas de timo y cerebro de ratón (Maestroni y Conti, 1990a; 1991).

Finalmente, la unión específica de los factores liberados por las células Th tras ser estimuladas por la melatonina a receptores opioides del timo, y la supresión del efecto recuperador del timo (peso, celularidad y producción de anticuerpos) ante el estrés inducido por corticosteroides o ciclofosfamida, al ser incubados con anticuerpos anti  $\beta$ -endorfina y antimetaencefalina, demostró el carácter opioide de estos factores (Maestroni y Conti, 1991).

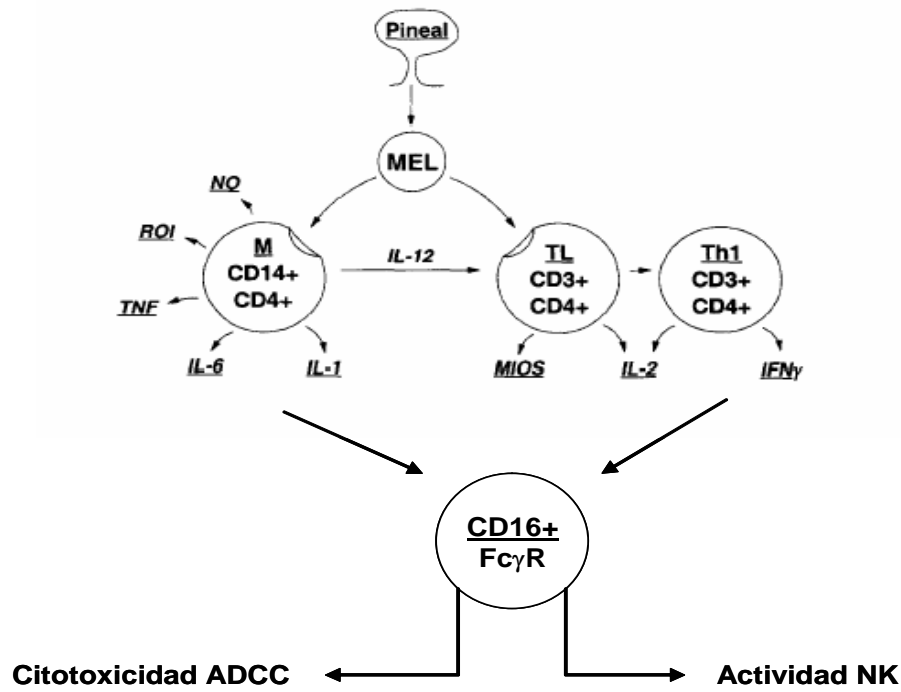
Por otra parte, el sistema opioide-melatonina puede actuar sobre las células del sistema inmune específico. De este modo, se ha demostrado que la melatonina fue capaz de modular el número de células progenitoras de granulocitos y macrófagos en la médula ósea (Maestroni y Conti 1990b) y de rescatar a estas células de la apoptosis inducida por fármacos usados en quimioterapia, como el etopóxido o la ciclofosfamida, tanto *in vivo* como *in vitro* (Maestroni y cols., 1994a; 1994 b). Este efecto protector viene determinado por el aumento en la producción endógena de factores estimulados de colonias de macrófagos y granulocitos (G-CSF, M-CSF y GM-CSF) en las células hematopoyéticas de médula ósea de rata (Maestroni y cols., 1994a).

Existen numerosos datos de distintos grupos, que defienden una acción directa de la melatonina sobre determinadas células inmunes que liberan diversas citoquinas que constituyen los principales mediadores del efecto inmunológico de la melatonina.

Los primeros datos que demostraban que la melatonina podía estimular la liberación de citoquinas por las células del sistema inmune fueron descritos por Del Gobbo y cols. en 1989. Estos autores, demostraron que la pinealectomía reducía la producción de IL-2, linfoquina liberada por las células Th1 que activa las células NK o células T citotóxicas, y la consiguiente actividad de las mismas en ratones, mientras que el tratamiento con concentraciones farmacológicas de melatonina revertía los efectos de la pinealectomía. Por otra parte, Giordano y Palermo (1991), demostraron cómo la inyección de melatonina por la noche, aumentaba la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de los esplenocitos de ratones, hecho no antagonizado por naloxona. La ADCC es un proceso lítico en el que la célula es recubierta por anticuerpos específicos cuya función constante es reconocida por receptores específicos de leucocitos (Fc $\gamma$ R), entre ellos las células NK, activando su capacidad citolítica y destruyendo a la célula. Este proceso es estimulado por diversas citoquinas como IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-6.

En esta misma línea de modulación positiva por parte de la melatonina, otros autores han demostrado que esta hormona induce un incremento en la producción de IFN- $\gamma$  en esplenocitos de ratones por una vía independiente de IL-2, y que esta producción en esplenocitos murinos aumenta por la noche en comparación a la mañana (Colombo y cols., 1992). En ratones viejos o inmunodeprimidos por el tratamiento con ciclofosfamida, la administración crónica de melatonina estimuló la respuesta inmune humoral a antígenos tras la inducción de la actividad de las células T colaboradoras, aumentó la respuesta a mitógeno de las células B y T e indujo la liberación de IL-2 (Caroleo y cols., 1992; 1994). Aumentó la presencia en

esplenocitos de antígenos por los macrófagos a los linfocitos T en bazo, al incrementar las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC clase II) y la producción de IL-1 y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Pioli y cols., 1993).



**Figura 7.** Esquema de la regulación de la melatonina en la producción de citoquinas. MEL: melatonina; M: monocitos; TL: linfocitos T; Th1: células T helper tipo 1; NO: óxido nítrico; ROI: intermediarios de oxígeno reactivos; MIOS: sistema opioide inducido por melatonina.

Por el contrario, algunos autores apoyan los efectos inhibidores de la melatonina sobre la función inmune. Así, en humanos, se ha demostrado que la melatonina inhibe la producción de IFN- $\gamma$  en linfocitos y la proliferación de estas células estimuladas por fitohemaglutinina (PHA) (Finocchiaro y cols., 1988), y la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en cultivos de células mononucleares de sangre periférica, procedentes de individuos sanos, estimuladas con PHA (Di Stefano y Paulesu, 1994) y la actividad de linfocitos T citotóxicos y la proliferación de líneas celulares de linfoblastos.

En esplenocitos humanos, la melatonina es capaz de inducir la actividad citotóxica y la síntesis de ARNm de IL-1, así como la producción de intermediarios del metabolismo de oxígeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> y óxido nítrico. Además, la melatonina es capaz de sensibilizar a los monocitos para un posterior estimulación con LPS (Morrey y cols., 1994).

García-Mauriño y cols (1997) han demostrado que concentraciones fisiológicas de melatonina, estimulan la producción de IL-2 e IFN- $\gamma$  en linfocitos humanos Th1 *in vitro*, mientras que los linfocitos Th2 no parecen verse afectados por la melatonina como lo demuestra el hecho de que no se observa estimulación de la producción de IL-4 por melatonina en ninguna de las actuaciones experimentales.

La producción de IL-6 se ve también estimulada en células mononucleares de sangre periférica, posiblemente por la activación de monocitos más que de linfocitos Th2. En linfocitos B humanos, la melatonina inhibe la expresión de ARNm del gen 5-lipooxigenasa, enzima implicada en la formación de leucotrienos (compuestos relacionados con mecanismos inmunes inflamatorios), mediante su unión a receptores nucleares RZR $\alpha$ , lo que hace suponer que la melatonina ejerce una función moduladora de los procesos inflamatorios e inmunes y regula negativamente (down-regulation) la expresión de esta enzima (Steinhilber y cols., 1995).

Por otra parte, se ha descrito que la melatonina aumenta la expresión del marcador de activación CD69 en células CD4+ y no así en células CD8+ y el mecanismo de acción pudiera estar mediado por la transactivación de los receptores nucleares RZR/ROR y así se ha propuesto un esquema de las principales funciones de la melatonina sobre las células del sistema inmune en mamíferos (García-Mauriño y cols., 1997).

Por último, se propone un posible papel de la melatonina en la inmunoterapia. De esta manera, la melatonina potencia la actividad de la IL-2 en la respuesta antitumoral en humanos (Lissoni y cols., 1992a; 1992b). La administración conjunta de melatonina e IL-2 durante la inmunoterapia del cáncer mejora los resultados del tratamiento, permitiendo además una disminución en la cantidad de IL-2 administrada y los efectos secundarios (Conti y Maestroni, 1995). También el tratamiento de melatonina durante 30 días en pacientes con cáncer incrementa los niveles séricos de TNF- $\alpha$ , IL-2 e IFN- $\gamma$  comparado con los niveles anteriores del tratamiento (Neri y cols., 1995).

Además, se ha descubierto que la melatonina tiene eficiencia en la protección frente a infecciones virales y bacterias letales, así la melatonina reduce la letalidad que se produce en situaciones de estrés experimentales en aquellos ratones que han sido infectados con dosis subletales de virus de la encefalomiocarditis (Maestroni y cols., 1988) y antagoniza la reducción del peso del timo inducida por corticosterona en ratones inmunizados con el virus de la viruela (Maestroni y cols., 1988). Por otra parte, la melatonina estimula la producción de IFN- $\gamma$ , el cual se sabe que tiene una importante acción antiviral (Withyachumnarkul y cols., 1990).

Recientemente, Ben-Nathan y cols (1995), han confirmado estos resultados mostrando que la melatonina reduce la viremia y retrasa la aparición de la enfermedad y la muerte tras la infección con los virus Semliki y West Nile (WN-25), causante de una encefalitis, y además, han demostrado que la melatonina reduce la mortalidad y protege a los animales de diferentes edades infectados por la bacteria gram negativo, *Pseudomonas aeruginosa*, el virus West Nile y la bacteria producida de endotoxina lipopolisacárido (LPS) (1997).

Además, Guerrero y cols, en el año 2000 han demostrado que la expresión de receptores nucleares  $ROR\alpha_1$  y  $ROR\alpha_2$  es suficiente para que la melatonina active la producción de citoquinas en los linfocitos humanos y algunas líneas celulares de monocitos (células U 937).

### **2.6.2. Influencia del sistema inmune sobre la función de la pineal**

Aparte de las ya establecidas propiedades inmunoregulatoras de la melatonina sobre el sistema inmune, son varios los estudios que demuestran la sensibilidad de la pineal, así como de su hormona, a diferentes productos inmunes tales como las citoquinas o las hormonas del timo, poniendo de manifiesto la posible existencia de un flujo bidireccional de información entre la glándula pineal y el sistema inmune.

Se ha demostrado que los linfocitos T y los macrófagos humanos tienen capacidad de producir la secreción de serotonina, N-acetilserotonina y melatonina, así como que la incubación de pinealocitos con un subtipo de interferón, IFN- $\gamma$ , aumenta la captación de triptófano por las células, así como la síntesis de serotonina y melatonina (Finocchiaro y cols., 1988).

Basándose en esta idea, se ha demostrado que el IFN- $\gamma$  estimula la producción de melatonina en cultivos de glándulas pineales que han sido estimuladas con isoproterenol, un agonista de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos que activa a la NAT, mientras que por otra parte, inhibe la actividad NAT (Withyachumnarkul y cols., 1990a; 1990b).

La estimulación de la producción de melatonina podría ocurrir por una vía distinta de la activación de la NAT y consistiría en la inhibición por IFN- $\gamma$  de la degradación de la 5-hidroxitriptamina (5-HT), potenciando por tanto, el precursor de la síntesis hacia la producción de melatonina (Withyachumnarkul y cols., 1991). Los mecanismos por los que el IFN- $\gamma$  inhibe la actividad de la enzima NAT parece deberse por una parte, a que el aumento de la 5-HT causado por el IFN- $\gamma$  hace que ésta difunda al exterior y se una a sus receptores en la membrana de los pinealocitos, lo que inhibe la actividad de la NAT; por otra parte, se debería a que los terminales simpáticos de la pineal están íntegros, lo que sugiere que el aumento y difusión de la 5-HT podría tener lugar también en los terminales simpáticos (Withyachumnarkul y cols., 1991).

Otro tipo de experimentos apoyan la existencia de una comunicación bidireccional entre la pineal y el sistema inmune. Son los descritos por Mucha y cols en 1994, que demuestran que la liberación de melatonina está inhibida de una forma dependiente de la dosis por la administración a ratas de IL-1 $\beta$  recombinante humana, efecto que se inhibe por la administración de anticuerpos anti-receptores de IL-1 humanos. Por otro lado, el tratamiento con IL-2, elimina el pico nocturno de la liberación de la melatonina en humanos (Lissoni y cols., 1990).

Recientemente, se ha demostrado que la administración en ratas de los factores G-CSF, M-CSF y GM-CSF, glicoproteínas secretadas principalmente por macrófagos, estimula la producción y la liberación de melatonina en cultivos de glándulas pineales de forma dependiente de la dosis (Zylinska y cols., 1995).

### **2.6.3. Sistema inmune y ritmos biológicos**

Tanto la glándula pineal como las concentraciones séricas de melatonina, muestran una periodicidad circadiana y estacional en muchas especies (Arendt y cols., 1977). Así, la glándula pineal es uno de los posibles candidatos para regular el ritmo diario y estacional de la función inmune. La pineal transforma la información fotoperiódica en una señal endógena que es la melatonina, cuyo patrón de secreción circadiana dependiente de la luz, ha sido descrito en la mayoría de las especies. Esto permite a los animales adaptarse a los diferentes momentos del año y anticiparse así a los previsible cambios ambientales (Reiter, 1991a). De esta forma, la melatonina parece estar implicada en la regulación de la actividad circadiana y estacional del sistema inmune y aumenta la ADCC en verano pero no en invierno. Este efecto parece debido a diferencias en la sensibilidad de los animales a la melatonina a lo largo del año; así es necesario administrar dosis de melatonina mayores en invierno que en verano para inducir el aumento de la actividad ADCC (Giordano y cols., 1993). Además, se ha observado que la liberación rítmica de melatonina es la que determina el proceso de proliferación circadiana de las células hematopoyéticas, progenitoras de granulocitos y macrófagos (Kuci y cols., 1988). La actividad circadiana observada en células NK desaparece cuando los animales son pinealectomizados (McNulty y cols., 1990).

Otros trabajos relacionados con la producción de citoquinas inducidas por melatonina, defienden esta idea. Así, se ha descrito que la producción de IFN- $\gamma$  inducida por melatonina fue mayor en esplenocitos de ratones aislados de noche (Colombo y cols., 1992) y que la melatonina inhibe la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en cultivos de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PHA, lo que ocurría sólo el 22% de los casos (Di Stefano y Paulesu, 1994).

Hay evidencias que sugieren que los animales podrían utilizar el fotoperíodo para combatir la disminución de la función inmune provocada por el estrés estacional (Nelson y cols., 1995). Así por ejemplo, ratones sometidos a bajas temperaturas presentan concentraciones elevadas de corticoesteroides, una pérdida de peso en el bazo y una disminución de IgG, independientemente del período de luz al que sean sometidos. Sin embargo, esta inmunosupresión es mayor en aquellos sometidos a períodos de luz más largos, lo que apoya el concepto de que el sistema inmune es estimulado en los días cortos para contrarrestar la supresión del sistema inmune causada por el estrés invernal (Demas y Nelson, 1996).

---

### 3. MECANISMOS DE AUTOINMUNIDAD

#### 3.1. Principios generales

A principios del siglo XX, Paul Erlich acuñó la frase “horror autotoxicus” para definir la inmunidad contra lo propio. Cincuenta años después, Macfarlane Burnet propuso la hipótesis de la selección clonal, donde los clones de linfocitos autorreactivos se eliminaban durante el desarrollo para evitar las reacciones inmunitarias.

La autoinmunidad es una causa importante de enfermedad en los seres humanos y afecta al 1-2% de la población mundial. La autoinmunidad se puede definir como la enfermedad resultante de un fallo o ruptura de los mecanismos que normalmente son responsables del mantenimiento de la autotolerancia. La pérdida de la autotolerancia puede ser resultado de una selección anormal de clones autorreactivos, de una estimulación anormal de linfocitos que son normalmente anérgicos frente a antígenos propios, o de la liberación de antígenos propios que normalmente son inaccesibles para el sistema inmunitario.

Varios son los conceptos generales para el estudio de la autoinmunidad:

- 1) Hay múltiples factores que interaccionan entre sí contribuyen al desarrollo de las enfermedades autoinmunitarias. Entre estos factores se encuentran: alteraciones inmunitarias, predisposición genética, alteraciones tisulares locales, e infecciones microbianas.
- 2) Las enfermedades autoinmunitarias pueden ser sistémicas o específicas de órgano, y pueden estar causadas por diferentes tipos de antígenos y diferentes alteraciones inmunitarias. Las respuestas inmunitarias frente a antígenos ampliamente diseminados y la formación de complejos inmunitarios circulantes, suelen producir enfermedades sistémicas, que se caracterizan por múltiples fenómenos autoinmunitarios debidos a una regulación aberrante o a una activación policlonal de múltiples clones de linfocitos. Por el contrario, las enfermedades autoinmunitarias específicas de órgano, presentan una respuesta autoinmunitaria frente a antígenos con una distribución tisular restringida, y se ocasionan por autotolerancia en los linfocitos específicos para uno o unos pocos antígenostisulares, o a una activación anormal de clones de linfocitos reactivos con un número limitado de antígenos, quizás secundarios a alteraciones tisulares locales.



- 3) Varios son los mecanismos efectores son responsables de la lesión tisular en diferentes enfermedades autoinmunitarias, como son: autoanticuerpos circulantes, complejos inmunitarios y linfocitos T autorreactivos.
- 4) Durante las respuestas inmunitarias frente a antígenos extraños, los individuos normales producen concentraciones bajas de autoanticuerpos. Los autoanticuerpos naturales suelen ser anticuerpos de baja afinidad de la clase IgM que pueden generarse sin la cooperación de la célula T, y que no lesionan los tejidos. Si se producen grandes cantidades de autoanticuerpos de alta afinidad puede aparecer una autoinmunidad patológica.

### **3.2. Alteraciones linfocíticas que producen autoinmunidad**

La autoinmunidad puede ser el resultado de alteraciones primarias de las células B, T, o de ambas. Pero recientemente se está centrando el interés sobre las células T, porque una alteración en la autotolerancia de los linfocitos T puede dar lugar a enfermedades autoinmunitarias que son producidas por reacciones inmunitarias mediadas por células. Las alteraciones de la célula T cooperadora también puede conducir a la producción de autoanticuerpos porque las células T cooperadoras son necesarias para la producción de anticuerpos de alta afinidad contra antígenos proteicos. Hay distintas alteraciones que producen autoinmunidad.

#### **3.2.1. Fracaso de la tolerancia central**

Se puede considerar que la autoinmunidad es el resultado de un fracaso de los procesos de selección que normalmente eliminan o inactivan clones linfocitos específicos para antígenos propios durante su maduración.. Se desconocen los mecanismos por los que los linfocitos autorreactivos pueden escapar de este proceso.

### **3.2.2. Fracaso de la tolerancia periférica (anergia clonal)**

La tolerancia periférica puede fracasar por mecanismos dependientes de la coestimulación de células presentadoras de antígeno (infecciones e inflamación local) que pueden superar la anergia de la célula T y provocar reacciones autoinmunitarias, es decir, que la inflamación local puede conducir a la autoinmunidad.

La tolerancia periférica también puede fallar por mecanismos no relacionados con la coestimulación. Un ejemplo es el caso del gen Fas en ratones MRL/lpr, donde la expresión defectuosa del Fas da lugar a un fallo en la inducción de apoptosis. Esto puede llevar a la persistencia de linfocitos autorreactivos de muchas especificidades, a la estimulación de numerosos clones de células autorreactivas, a la producción de múltiples autoanticuerpos, y a enfermedades autoinmunitarias sistémicas.

En los linfocitos B, el reconocimiento del antígeno sin la cooperación de la célula T, induce anergia clonal. Por lo tanto, la estimulación de las células T cooperadoras que puedan interactuar con células B potencialmente autorreactivas pero anérgicas, puede superar la tolerancia de la célula B. En las situaciones en las que las células B autorreactivas no son eliminadas, al entrar en contacto con células T cooperadoras pueden llevar a la producción de autoanticuerpos. La estimulación de las células B autorreactivas por las células T cooperadoras se debe a la exposición de antígenos con múltiples determinantes en los que un epítipo se une a las células B autorreactivas pero el otro epítipo ligado es extraño.

### **3.2.3. Activación linfocitaria policlonal**

La autoinmunidad puede ser el resultado de la estimulación de linfocitos autorreactivos que no se eliminan durante su desarrollo. Los activadores policlonales estimulan muchos clones de linfocitos T o B, sin importar su especificidad antigénica y, en algunos casos, interactuando con moléculas de superficie diferentes a los receptores para el antígeno.. Productos microbianos como el LPS pueden inducir la activación policlonal de la célula B, y esto puede ser un nexo entre las infecciones y la autoinmunidad. La activación policlonal de la célula T por superantígenos bacterianos es otro de los mecanismos propuestos de autoinmunidad, pero los superantígenos estimulan a las células T al unirse a las regiones V del receptor para el antígeno.

Se observan fenómenos autoinmunitarios en la enfermedad injerto contra huésped. En los receptores de tales transplantes, las células T cooperadoras transplantadas pueden reconocer linfocitos B del huésped como extraños (una forma de alorreactividad), llevando a la activación policlonal de la célula B y a la producción de autoanticuerpos sin una estimulación antigénica específica.

En las enfermedades autoinmunitarias atribuidas a una activación policlonal, se producen múltiples autoanticuerpos, lo que da lugar a lesiones sistémicas en lugar de específicas de órganos.

### **3.2.4. Reactividad cruzada inmunitaria entre los antígenos propios y extraños**

Algunas enfermedades autoinmunitarias son iniciadas por respuestas inmunitarias normales frente a antígenos extraños, pero los anticuerpos o células T que se estimulan pueden reconocer casualmente una proteína propia similar (reactividad cruzada). En algunos aspectos, el ejemplo de antígeno extraño que comparte epítomos con antígenos propios es también una forma de reactividad cruzada entre proteínas propias y extrañas que conduce a la autoinmunidad. A la homología encontrada en secuencias entre varios antígenos microbianos y propios se le llama imitación molecular y se cree que es una razón por la que las respuestas inmunitarias contra los antígenos extraños pueden inducir reactividad contra los propios.

### **3.2.5. Regulación linfocítica anormal**

Una producción excesiva o desequilibrada de citocinas puede ser un mecanismo de estimulación anormal de múltiples linfocitos, incluidas las células autorreactivas, bien rompiendo la tolerancia de las células T o siendo efectoras de la lesión tisular.

También se han comprobado que tanto el déficit en el número y funciones de las células T supresoras o reguladoras como el exceso de células Th1 pueden originar autoinmunidad.

## **3.3. Factores genéticos en la autoinmunidad**

Una gran parte del reciente interés en la base genética de la autoinmunidad se ha centrado en los genes del MHC, debido a su papel crítico en la maduración de las células T y en la inducción de respuestas inmunitarias frente a todos los antígenos proteicos.

### 3.3.1. Papel de los genes del MHC en la autoinmunidad

La tipificación del antígeno leucocitario humano (HLA) en grandes grupos de pacientes con diferentes enfermedades autoinmunitarias, ha demostrado que algunos alelos HLA aparecen con una frecuencia superior en estos pacientes que en la población general. A partir de estos estudios, se puede calcular el riesgo relativo de desarrollar una enfermedad en individuos que heredan alelos variables del HLA. De esta forma, se ha encontrado que la artritis reumatoide está asociada al alelo DR4, y que los individuos que presentan este alelo tienen un riesgo relativo de 6 de padecer la enfermedad en comparación con los individuos que carecen de ese alelo.

Se han propuesto diversos mecanismos para explicar la asociación de las enfermedades autoinmunitarias con la herencia de secuencias del MHC particulares:

- 1) Las estructuras de las moléculas del MHC pueden determinar qué clones de linfocitos T sufren selección negativa durante su maduración. Este mecanismo puede explicar el que la resistencia asociada al HLA-DQ $\beta$  puede provocar la falta de selección negativa de las células T autorreactivas.
- 2) Las moléculas de clase II del MHC pueden influir en la activación de células T reguladoras cuya función normal es evitar la autoinmunidad
- 3) El gen asociado a la enfermedad puede no ser alelo del HLA, sino otro gen localizado en el complejo HLA. Otra hipótesis es que, la autoinmunidad se asocia a los genes del proteosoma cuyos productos sirven para degradar antígenos proteicos y transportar los péptidos a lugares dentro de las células donde se unen a moléculas del MHC.
- 4) Las similitudes entre los antígenos microbianos y las moléculas del MHC propias pueden dar lugar a reacciones autoinmunitarias tras las infecciones.

De todos modos, la expresión de un gen HLA particular no es por sí misma la causa de ninguna enfermedad autoinmunitaria, pero puede ser uno de los diversos factores que contribuya a la autoinmunidad.

### **3.3.2. Asociación de otros genes con la autoinmunidad**

Los déficit genéticos de dos de las proteínas del complemento C2 y C4, o del receptor del complemento del tipo 1, afectan a la fagocitosis de complejos inmunitarios, aumentan su concentración en circulación y coinciden con la aparición de síndromes similares al lupus eritematoso sistémico.

### **3.4. Infecciones, alteraciones anatómicas y otros factores en la autoinmunidad**

El desarrollo de autoinmunidad se asocia también con muchos factores.

1) Infecciones virales y bacterianas, no por el propio agente infeccioso, sino que son el resultado de respuestas inmunitarias del huésped que el microorganismo puede provocar o en cuya regulación puede interferir ocasionando autoinmunidad. Los posibles efectos de las infecciones son: activación policlonal de linfocitos, inflamación tisular local, alteraciones de los antígenos propios creando neoantígenos que muestren reacción cruzada parcial, lesión tisular que libere antígenos aislados.

2) Alteraciones anatómicas en los tejidos, como la inflamación, lesión isquémica o traumatismo que pueden conducir a la exposición de antígenos propios aislados del sistema inmunitario. Estos antígenos secuestrados pueden no haber inducido autotolerancia, y si se liberan podrán interactuar con linfocitos inmunocompetentes e inducir respuestas inmunitarias específicas. La inflamación tisular puede también causar alteraciones estructurales en los antígenos propios y la formación de nuevos determinantes capaces de inducir reacciones autoinmunitarias.

3) Influencias hormonales, que desempeñan un papel importante en las enfermedades autoinmunitarias humanas y experimentales.

### 3.5. ARTRITIS REUMATOIDE

La Artritis Reumatoide (AR), término propuesto por Garrod en 1859, es una enfermedad inflamatoria de tipo sistémico que compromete las diferentes estructuras articulares, preferencialmente la membrana sinovial. Durante su evolución puede afectar diversos órganos y sistemas, razón por la cual se recomienda utilizar el término de “enfermedad reumatoide”.

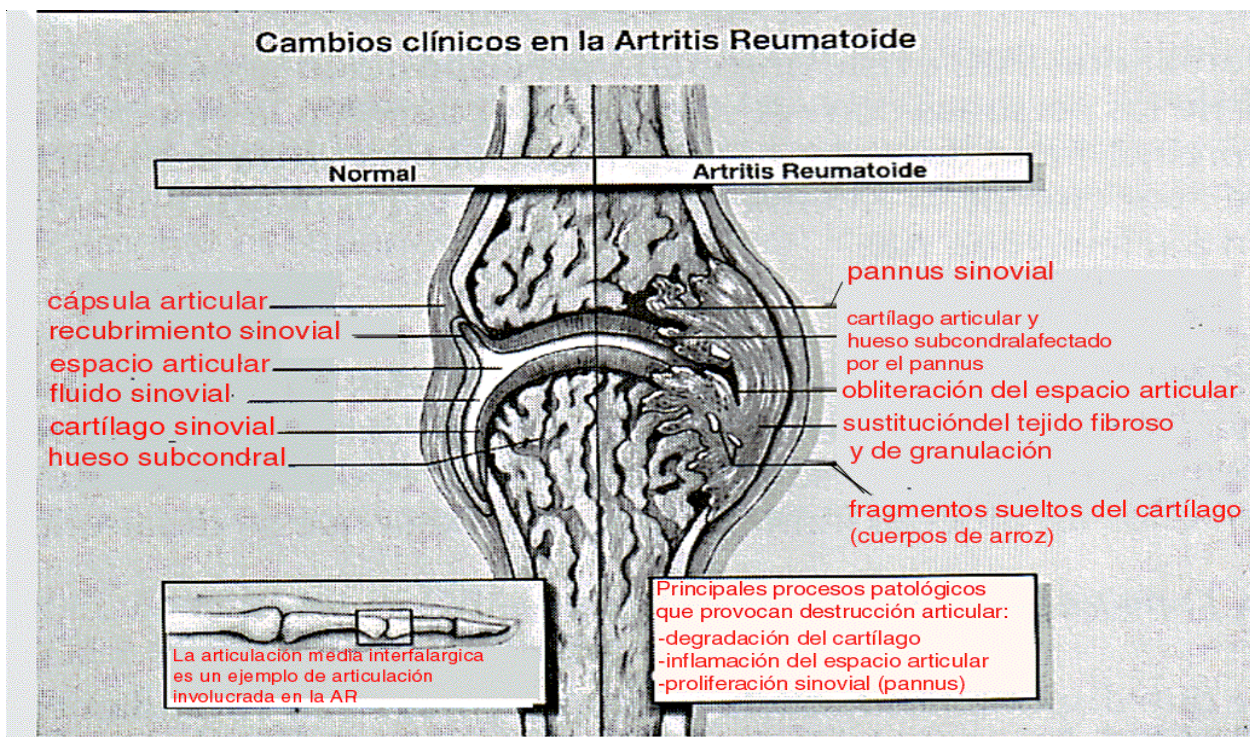
Como enfermedad sistémica es muy variable en su presentación y en su evolución. Inicialmente produce lesión de la sinovial, presentándose un complejo sintomático de tipo inflamatorio que es el responsable de los síntomas clínicos, sin embargo, ocasionalmente el reconocimiento de la AR en sus fases iniciales puede ser difícil debido sobre todo a sus diferentes formas de comienzo .

#### 3.5.1. Patogénesis

La AR se caracteriza por una inflamación crónica de las articulaciones sinoviales e infiltración de células sanguíneas activadas, principalmente células T, macrófagos y células plasmáticas (Janossy y cols., 1981; Cush y Lipsky, 1988), que producen una progresiva destrucción del hueso y del cartílago mediado por citoquinas y por enzimas destructivas (Feldmann y cols., 1996b), sobretodo metaloproteinasas (MMP), que son enzimas producidas por macrófagos y fibroblastos activados en respuesta a IL-1 y TNF- $\alpha$ . Las MMP se sintetizan como moléculas latentes, siendo la MMP-1 (colagenasa) y la MMP-3 (estromielisina 1) las más involucradas en la destrucción articular (Vicenti y cols., 1994). La actividad de las MMP está regulada por los inhibidores tisulares de MMP (TIMP). Estos TIMP están producidas por las mismas células que producen las MMP, lo que sugiere que la enfermedad artrítica puede deberse a un desequilibrio entre la producción de MMP y TIMP (Feldmann y cols., 1996a). Es de interés señalar que la IL-10 y TGF- $\beta$  no sólo inhiben la producción de citoquinas proinflamatorias, sino que también inducen la producción de TIMP (Wright y cols., 1991).

Las causas que originan la AR son desconocidas, las investigaciones actuales hablan de 3 mecanismos distintos: por agentes infecciosos, por un fallo de la autotolerancia y por una activación anómala de linfocitos T.

Entre los agentes infecciosos que se barajan se encuentran: el virus linfotrópico de células T humanas tipo I; virus de la rubeola; Citomegalovirus; Herpes virus; micoplasma y virus Epstein-Barr (Venables, 1989; Phillips, 1988). Se han detectado anticuerpos dirigidos contra antígenos específicos del EBV en un 8% de los pacientes, estos antígenos que se encuentran en la glicoproteína viral gp 110 se mimetizan con



**Figura 7.** Esquema de la situación de una articulación normal y una articulación afectada de Artritis Reumatoide.

la cadena  $\beta$  de las moléculas de MHC de clase II de HLA-Dw4 (en el 50% de los pacientes), -Dw14 y -DR1 (Roudier y cols., 1988). Es posible que en pacientes con estos haplotipos, la tolerancia a autoantígenos puede modificar la respuesta al EBV y producir una alteración en la infección que conllevaría a manifestar síntomas similares a la AR (Roudier y cols., 1988; 1989). Otro dato que apoyaría el papel del EBV, que se ha encontrado en pacientes de AR un número elevado de células B infectadas con el virus y una disminución de la respuesta citotóxica de células T en respuesta al virus (Yao y cols., 1986; Depper y Zvaifler, 1981). Al ser el EBV un activador policlonal de linfocitos B, también producirá una sobreproducción de inmunoglobulinas, incluyendo aumento del factor reumatoide (Slaughter y cols., 1978).

Otros virus implicados son los parvovirus. Los parvovirus son virus de DNA pequeños que causan enfermedad en muchas especies. El parvovirus B19 ha sido implicado como la causa de una artropatía en adultos que normalmente es autolimitada y que no desemboca en AR (White y cols., 1985). Otros parvovirus han sido implicados en la patogénesis, porque se han encontrado en la membrana sinovial de los pacientes (Simpson y cols., 1984).

Por otro lado, las micobacterias expresan proteínas de choque térmico (HSP), las cuales se han comportado como factores artritogénicos en ratas con artritis inducida por adyuvante (van Eden y cols., 1988), su gran homología con las HSP humana hace que se piense que jueguen un papel en la inflamación (Polla, 1988). Pacientes con AR presentan niveles elevados de anticuerpos anti-HSP de micobacterias recombinantes (Tsoulfa y cols., 1989). Otro indicio es la presencia de células T CD3 $\gamma$  $\delta$  CD4- CD8- en el fluido sinovial, siendo este grupo el que prolifera ante una infección con antígenos micobacterianos (Holoshitz y cols., 1989).

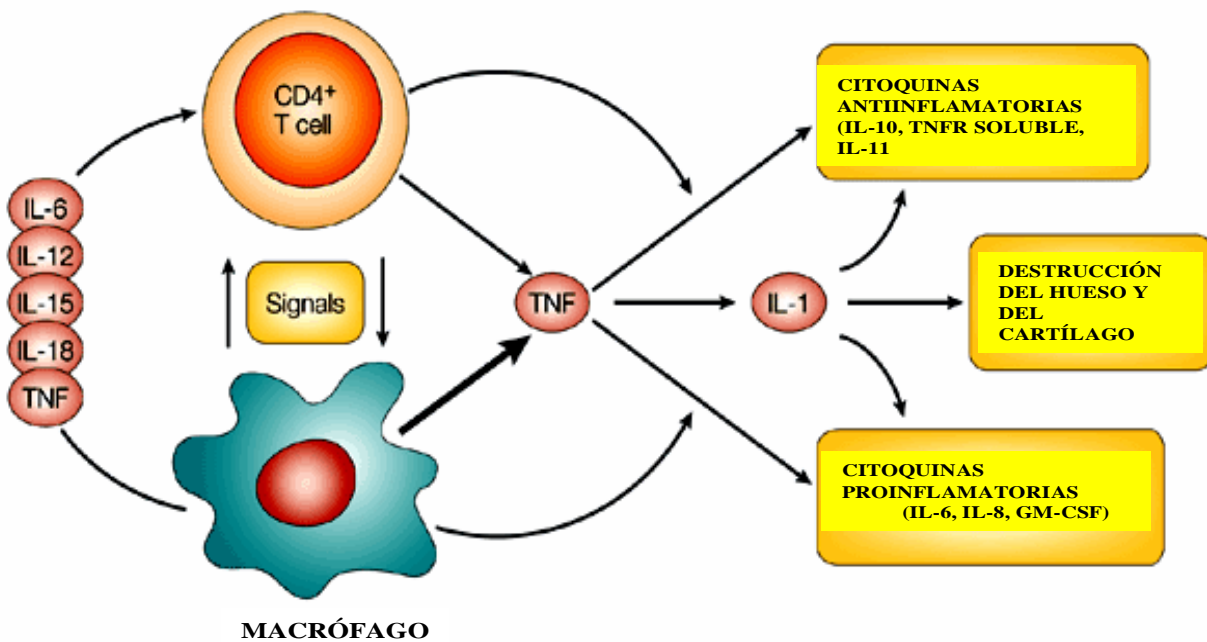
En cuanto a la autoinmunidad, las proteínas endógenas más comúnmente implicadas son el colágeno y las IgG. El colágeno es una causa directa de artritis en roedores y monos, en humanos se han detectado altos títulos de anticuerpos a las formas nativas y desnaturalizadas de colágeno tipo II en el suero de los pacientes con AR (Rowley y cols., 1986; Choi y cols., 1988), sin embargo hay datos que apoyan que estos anticuerpos no preceden el inicio de la AR. Es probable que cuando el cartílago es invadido y destruido por la sinovitis, porciones de ese colágeno creen una respuesta inmune formando los complejos anticuerpo-antígeno del colágeno (ej, factor reumatoide-IgG) que precipitan en la superficie del cartílago sirviendo como un quimioatracante para el tejido invasivo (Jasin, 1985)

Los factores reumatoides, son anticuerpos circulantes, normalmente IgG o IgM, reactivos con la porción Fc de sus propias moléculas IgG, debido probablemente a una anómala glicosilación de estas proteínas. Estos factores reumatoides se encuentran en el 80% de los pacientes de AR y se utiliza como prueba diagnóstica (Abbas 1990).

En referencia a la activación de linfocito, estudios genéticos y en gemelos han demostrado que la predisposición a padecer la enfermedad reside en el locus HLA-DR (Stasny, 1978). De este modo, el 80% de pacientes con AR de raza caucásiana, expresan los subtipos DR1 o DR4 (Gregersen 1987). Como se sabe, la función de DR es presentar péptidos a las células T CD4+, por lo que está claro que las células T están implicadas en la patogénesis de la enfermedad, y este papel se centra en la presentación de autoantígenos (Todd y cols., 1988). Gracias a estudios de análisis de mutación se conoce que la posición del aminoácido 71 de la cadena DR $\beta$  se correlaciona con la susceptibilidad genética a padecer AR (Hammer y cols., 1995).



Las citoquinas juegan un papel muy importante en el curso de la AR. Las dos citoquinas claves en la patogénesis de AR son la IL-1 y el TNF- $\alpha$  (Buchan y cols., 1998; van der Berg, 1998). IL-1 y TNF actúan sinérgicamente para inducir otras citoquinas (IL-6 e IL-12) e incrementar la producción de PGE<sub>2</sub> y otros metabolitos del ácido araquidónico en los sinoviocitos que contribuye al dolor y a la hinchazón característica de la AR (Harris, 1990). Las citoquinas proinflamatorias: promueven la migración de neutrófilos, monocitos y linfocitos al sinovio, favorecen la degradación ósea por la inducción de la pérdida de proteoglicanos; estimulan a las proteasas neutras en los condrocitos (Cush y Lipsky, 1991; van Lent y cols., 1995); favorecen la reabsorción ósea (Dinarello y Moldawer, 1999). Varios investigadores han demostrado que el tratamiento con anticuerpos anti-TNF- $\alpha$  reduce la producción sinovial de IL-1, GM-CSF, IL-6 y IL-8 (Brennan y cols., 1989). Otros estudios usando antagonista del receptor de IL-1, bloquean la producción de IL-1 y reducen los niveles de IL-6 e IL-8 pero no los de TNF- $\alpha$ . Estos datos sugieren que el TNF- $\alpha$  es el iniciador de la cascada proinflamatoria (Feldmann y cols., 1996b) y una futura diana terapéutica en el tratamiento de la AR.



**Figura 9.** Cascada de citoquinas implicadas en la Artritis Reumatoide. Representación esquemática de algunas de las citoquinas y de las células que participan en la cascada de citocinas dependiente de factor de necrosis tumoral (TNF), que ilustran el papel crucial de dicha citocina en la Artritis Reumatoide. Entre las células implicadas se encuentran las células T CD4+ y los macrófagos, aunque la interacción entre ambas células no están bien definidas. GM-CSF: factores estimuladores de colonias de macrófagos y granulocitos; IL: interleukina; Ra: antagonista del receptor; TNF-R: receptor de TNF.

Este aumento de las citoquinas proinflamatorias contrasta con la deficiente producción de IL-10, una citoquina antiinflamatoria que antagoniza los efectos de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12, en pacientes de AR (Feldmann y cols., 1996a; Kotake y cols., 1997). Aunque otra citoquina antiinflamatoria (como el TGF- $\beta$ , tanto en su forma activa como en su forma latente) y los inhibidores de citoquinas (como el IL-1ra y el TNF-R soluble) se encuentran paradójicamente elevados, aunque este aumento no es suficiente para neutralizar toda la producción de IL-1 y TNF- $\alpha$  (Fava y cols., 1989; Wahl, 1994, Feldmann y cols., 1996a). El hecho de que una citoquina característica de las células Th2, como la IL-4, no se encuentre normalmente en el fluido sinovial, sugiere que el subtipo de células T involucradas en AR son las del subtipo Th1 (Feldmann y cols., 1996b).

### 3.5.2. Modelos animales

En ratas, los modelos de artritis erosiva pueden ser clasificadas dentro de 3 grupos. El primer grupo es el que se induce por hiperinmunización de ratas genéticamente susceptibles con antígenos como colágeno tipo II (CIA) y proteína oligomérica de la matriz del colágeno (COMP) disuelta en adyuvante incompleto de Freund (FIA). El segundo grupo es el que se induce la artritis por la administración intradérmica de varios adyuvantes oleicos, de los cuales el que contiene *Micobacterium tuberculosis* inactivada por calor y emulsificado con FIA el más estudiado. La artritis erosiva crónica también ha sido inducida con otros adyuvantes, como por ejemplo avridina en FIA, pristane y con FIA sólo. El tercer grupo de modelos de artritis con ratas incluye varias formas de peptidoglicanos-polisacáridos de la pared celular de bacterias. Aquí se incluye el modelo de artritis inducida por componentes de la pared celular de estreptococos.

En ratones, los tres principales modelos para el estudio de ratones son: la artritis inducida por pristane (PIA), inducida por colágeno (CIA) e inducida por proteoglicanos (Joe y Wilder, 1999).

#### 3.5.2.1. Modelos de artritis en ratones

**PIA en ratones:** Es una enfermedad crónica inducida por dos inyecciones intraperitoneales de pristane. El inicio de PIA se retrasa y el curso de la enfermedad se extiende hasta 100-200 días. Las células TCD4+ juegan un papel muy importante, aunque la activación de las células B también, como demuestra la presencia de hipergammaglobulinemia, producción de autoanticuerpos: anti-Hsp65, anti-IgG, anti-

colágeno tipo I y II, anti-histonas, anti-DNAse. Se inducen esta enfermedad en ratones DBA/1 y BALB/c (Wilder, 1999; Crofford y Wilder, 1997). Las similitudes con la AR humana son: artritis simétrica de las articulaciones, articulaciones periféricas afectadas, inflamación persistente en las articulaciones, hiperplasia sinovial, infiltración celular en la inflamación, erosiones marginales, regulado por genes del MHC y por genes no MHC, progresión crónica de la enfermedad, presencia de factor reumatoide. Las diferencias son poliartritis leve y retraso en el inicio de los síntomas clínicos (Joe y Wilder, 1999).

**Artritis inducida por colágeno en ratones:** La artritis inducida por colágeno (CIA) en ratones se produce por inmunización con colágeno tipo II emulsificado en adyuvante completo de Freund (CFA), los ratones, a diferencia de las ratas necesitan CFA en vez de FIA como adyuvante. En las etapas tempranas de CIA, hay deposición de fibrina y los anticuerpos anti-colágeno se unen al colágeno del cartílago y activan al complemento. La fase crónica es dependiente de células T autorreactivas. En ratones DBA/1 y B10.RIII, los machos tienen una mayor prevalencia y la enfermedad es más severa que en hembras. Como ocurre en la AR humana, la CIA murina remite durante el embarazo y se agrava después del parto (Wilder, 1999). Las similitudes con la AR humana son: artritis simétrica de las articulaciones, articulaciones periféricas afectadas, inflamación persistente en las articulaciones, hiperplasia sinovial, infiltración celular en la inflamación, erosiones marginales, mayor incidencia en hembras que en machos, regulado por genes del MHC y por genes no MHC, responden a las mayoría de las terapias efectivas en AR salvo a los fármacos anti-inflamatorio no esteroideos (Joe y Wilder, 1999).

**Artritis inducida por proteoglicanos:** Tres inyecciones intraperitoneales de proteoglicano (sin condroitin sulfato) de cartílago humano fetal en CFA o en FIA, induce una poliartritis crónica en ratones BALB/c después de 4 semanas. Las hembras son más susceptibles que los machos (Wilder, 1999; Crofford y Wilder, 1997). Las similitudes con la AR humana son: artritis simétrica de las articulaciones, articulaciones periféricas afectadas, inflamación persistente en las articulaciones, hiperplasia sinovial, infiltración celular en la inflamación, erosiones marginales, regulado por genes del MHC y por genes no MHC, presencia de factor reumatoide y anticuerpos anti-colágeno tipo II, deposición de inmunocomplejos. Se diferencia en que desarrollan espondilitis (Joe y Wilder, 1999).

### 3.5.2.2. Modelos de artritis en ratas

**Artritis inducida por COMP:** La inmunización tanto con COMP de rata nativa como COMP desnaturalizado en FIA induce artritis severa en cepas de ratas susceptibles (DA y Lewis). Aunque la artritis de las articulaciones periféricas se parece clínicamente al AR, no acaba en una destrucción permanente de las articulaciones. El desarrollo de la enfermedad parece ser dependiente de una respuesta inmune a COMP autólogo y no por la reactividad cruzada a otros colágenos del cartílago de rata (Crofford y Wilder, 1997). Las similitudes de este modelo con la AR humana son: artritis de las articulaciones simétricas, articulaciones periféricas afectadas, inflamación de la articulación persistente, respuesta inmune a proteínas del cartílago, regulado genéticamente por genes del MHC y genes que no pertenecen al MHC. Sin embargo, no presenta una destrucción permanente de las articulaciones y es una enfermedad transitoria (Joe y Wilder, 1999).

**Artritis inducida por adyuvante completo:** Una inyección intradérmica, en la base de la cola, con *Micobacterium tuberculosis* inactivada por calor en FIA, conlleva una artritis en 14 días en cepas de ratas DA o Lewis. AIA puede ser también inducida con componentes de la pared celular de otras bacterias aunque la artrogeneidad varía. El aumento de TNF- $\alpha$ , IL-1 y IL-6 se detecta a los 4 días después de la inmunización. El progreso de la enfermedad ocurre rápidamente en varias semanas semejante a un proceso monofásico. Los granulocitos y las células CD4<sup>+</sup> autorreactivas juegan un papel principal en la enfermedad. La respuesta inmune humoral no contribuye a la enfermedad (Wilder, 1999; Crofford y Wilder, 1997). Las similitudes que presentan con la AR humana son: artritis simétrica de las articulaciones, articulaciones periféricas afectadas, inflamación persistente de las articulaciones, hiperplasia sinovial, infiltración de células en la inflamación, erosiones marginales, regulado por genes del MHC y por genes no MHC, responde a la mayoría de las terapias efectivas en AR. Las diferencias con la AR humana son: que ocurre de una manera explosiva, es de curso monofásico, involucra al esqueleto axial, no presenta factores reumatoides, se ven afectados el sistema gastrointestinal, el tracto urinario y la piel. Presenta periostitis, anquilosis ósea y manifestaciones extraarticulares que no son propias de la AR (Joe y Wilder, 1999).

**Artritis inducida por Avidina:** La inyección de avidina [N,N-dioctadecil-N',N'-bis (2-hydroxyethyl) propanodiamina/CP-20961] emulsificado en FIA, en la base de la cola es potencialmente artritogénico en ratas DA y Lewis. Las ratas inyectadas con avidina desarrollan artritis semejante al AIA. Como la avidina es un adyuvante sintético carente de las propiedades para inducir respuesta inmunes de las células T y células B, ha sido utilizada para investigar el papel de los adyuvantes en la inmunidad innata en el desarrollo de la artritis erosiva. Sin embargo, las células T son importantes en el desarrollo de la enfermedad porque la inducción de la artritis por avidina en ratas nude atímicas no desarrollan artritis.

Como sucede en la AR humana, las hembras desarrollan una enfermedad más severa que los machos. Los datos experimentales sugieren que los cromosomas sexuales regulan la severidad de la enfermedad según el género, pero las hormonas gonadales también ejercen efectos reguladores (Wilder, 1999). Las similitudes con la AR humana son: artritis simétrica de las articulaciones, articulaciones periféricas afectadas, inflamación persistente en las articulaciones, hiperplasia sinovial, infiltración celular en la inflamación, erosiones marginales, mayor incidencia en hembras que en machos, regulado por genes del MHC y por genes no MHC. Sin embargo, se diferencia en que la severidad es moderada, monofásica y presenta poliartritis (Joe y Wilder, 1999).

**Artritis inducida por Pristane (PIA):** la inyección intradérmica de 2,6,10,14-tetrametilpentadecano (pristane), en la base de la cola, induce artritis en ratas Lewis y DA. PIA desarrolla artritis en 2-3 semanas después de la inyección y progresa durante un mes. Las células T son necesarias para el desarrollo de la enfermedad. Las erosiones óseas, comienza subcondralmente, son evidentes a los 2 días después del inicio de la artritis clínica. El suero de las ratas afectadas tienen niveles elevados de IL-6 durante la fase aguda de la enfermedad (Wilder, 1999). Las similitudes con la AR humana son: artritis simétrica de las articulaciones, articulaciones periféricas afectadas, inflamación persistente en las articulaciones, hiperplasia sinovial, infiltración celular en la inflamación, erosiones marginales, mayor incidencia en hembras que en machos, regulado por genes del MHC y por genes no MHC, presencia de factor reumatoide. Las diferencias con la AR humana son: que presenta una poliartritis leve o moderadamente severa.

**Artritis inducida por aceite (OIA):** Este modelo de artritis sólo se desarrolla en ratas DA después de una inyección subcutánea de FIA. El inicio de la enfermedad es a los 14 días de la inyección. La inflamación en la articulación es mucho menos grave que en otros modelos. Las células T autorreactivas expresan

altos niveles de IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . No producen anticuerpos anti-colágeno tipo II (Wilder, 1999). Las similitudes que presentan son: artritis simétrica en las articulaciones, articulaciones periféricas afectadas, inflamación leve en las articulaciones, hiperplasia sinovial, infiltración celular en la inflamación, erosiones marginales, regulado por genes del MHC y genes no MHC. Sin embargo, la poliartritis es leve y no presenta factor reumatoide (Joe y Wilder, 1999).

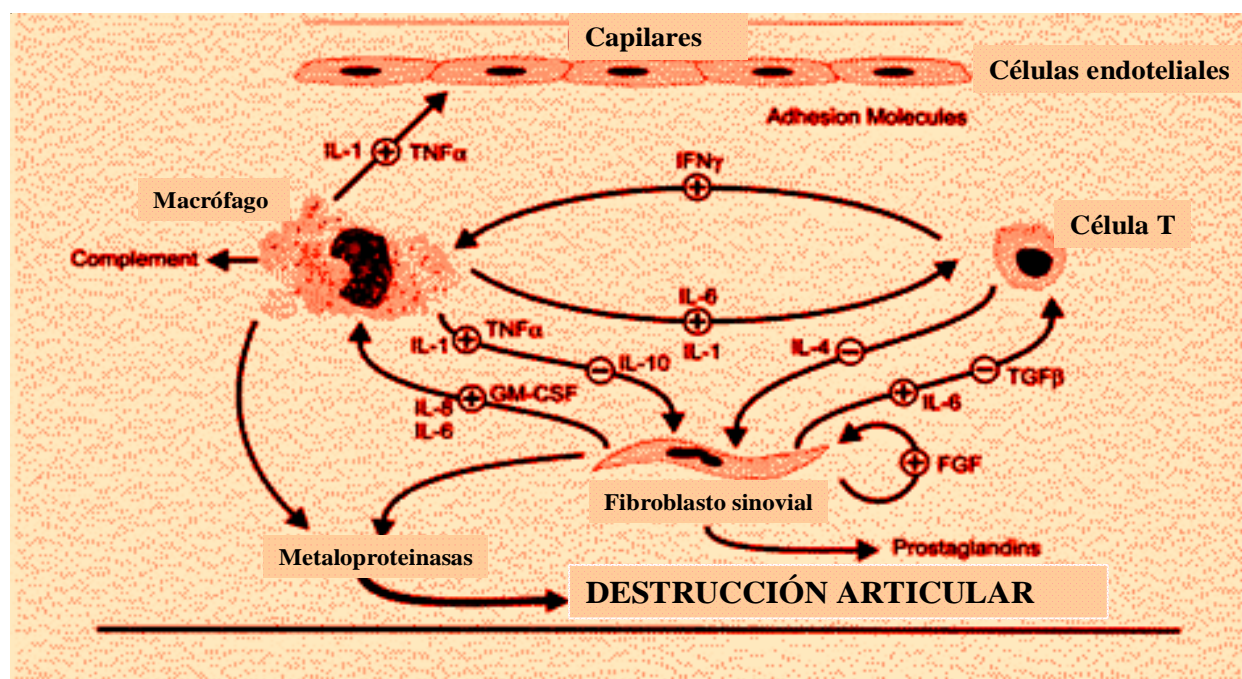
**Artritis inducida por componentes de la pared celular de estreptococos:** Una única inyección peritoneal de una suspensión acuosa de fragmentos de peptidoglicano-liposacárido de la pared celular de estreptococo del grupo A induce artritis en ratas Lewis. Una fase aguda, independiente de la respuesta del timo y dependiente del complemento, se origina a las 24 horas. Tras esa etapa, viene una etapa crónica, dependiente de la respuesta del timo, que comienza a los 14 días después de la inyección, y que se caracteriza por curso fluctuante similar al de los pacientes de AR. Esta fase crónica está asociada con la producción de altos niveles de citokinas pro-inflamatorias, factores de crecimiento, metaloproteinasas, ciclooxigenasa 2 y NO en las articulaciones afectadas (Wilder, 1999). Las similitudes con la AR humana son: artritis simétrica de las articulaciones, articulaciones periféricas afectadas, inflamación persistente en las articulaciones, hiperplasia sinovial, infiltración celular en la inflamación, erosiones marginales, mayor incidencia en hembras que en machos, regulado por genes del MHC y por genes no MHC. Sin embargo, no presenta factor reumatoide.

### **3.5.3. Artritis inducida por colágeno**

La artritis inducida por colágeno (CIA) en ratas es un modelo animal dependiente de células T descrito por primera vez por Trentham y cols. en 1977. Se induce por la inyección de colágeno tipo II, un componente de la matriz extracelular del cartílago articular localizado en la articulación diartrodial (Cuzzocrea y cols., 2000). La artritis inducida con cualquier tipo de colágeno es normalmente monofásica, siguiendo un patrón de sinovitis aguda (1-2 semanas), una resolución gradual (2-3 semanas) seguido por una anquilosis fibrosa u ósea que va paralela a las severidad de la artritis durante las dos primeras semanas (Cremer y cols., 1998). Después de 10-14 días tras la inmunización con colágeno tipo II en FIA, las ratas desarrollan poliartrosis con formación de pannus y erosión del hueso y cartílago a nivel histológico (Brahm y cols., 1994). Además, la inmunización con colágeno tipo II conlleva un desarrollo de la hipersensibilidad retardada y producción de autoanticuerpos (Oliver y cols., 1998). Tanto la respuesta inmune celular como la humoral son características de la enfermedad (Brahm, 1991).

La fase inicial de CIA se caracteriza por la unión del autoanticuerpo a la superficie del cartílago articular en asociación con la fijación del complemento, aumento de C5a dentro del espacio intrarticular, deposición de fibrina, invasión de neutrófilos y pérdida de proteoglicanos del cartílago de la articulación. La segunda fase de CIA se caracteriza por un flujo de células T activadas, células B y monocitos para producir inflamación en la articulación. Las células T tienen dos funciones: estimular a las células B para la producción de autoanticuerpos y producir citocinas pro-inflamatorias (Cannon y cols., 1996; Griffiths y cols., 1993). Las citoquinas proinflamatorias estimulan a los neutrófilos, monocitos y linfocitos para que migren al sinovio. Una vez en el sinovio, los neutrófilos se activan y producen mediadores que estimulan a los leucocitos mononucleares, sinoviocitos y condrocitos. Estas células producen IL-1 $\beta$  y IL-6 (Koch y cols., 1995; Harris, 1990). La IL-1 $\beta$  producida inhibe la síntesis de matriz extracelular, induce a las metaloproteinasas de la matriz (Arend y Dayer, 1990; Tamura y cols., 2001), y promueve la degradación del cartílago mediante la pérdida de proteoglicanos y por la producción de proteasas neutras en los condrocitos (Cush 1991; van Lent 1995).

La IL-6 se produce por la estimulación de IL-1 $\beta$  en condrocitos y actúa junto a ésta en la inhibición de la síntesis de proteoglicanos (Nietfled y cols., 1990). También actúa sobre el crecimiento en las últimas fases de la diferenciación de células B, estimula la mielopoyesis (Sarlis y cols., 1992; Luross y Williams, 2001), y coordina la actividad de diferentes células inmunes con un importante papel en la respuesta de la fase aguda (Zubelewicz y cols., 1999). La IL-6 es segregada por fagocitos mononucleares en respuesta a la estimulación de TNF- $\alpha$  y de IL-1 $\beta$  (McCartney-Francis y cols., 1993).



**Figura 10.** Fisiopatología de la destrucción articular en la Artritis Reumatoide.

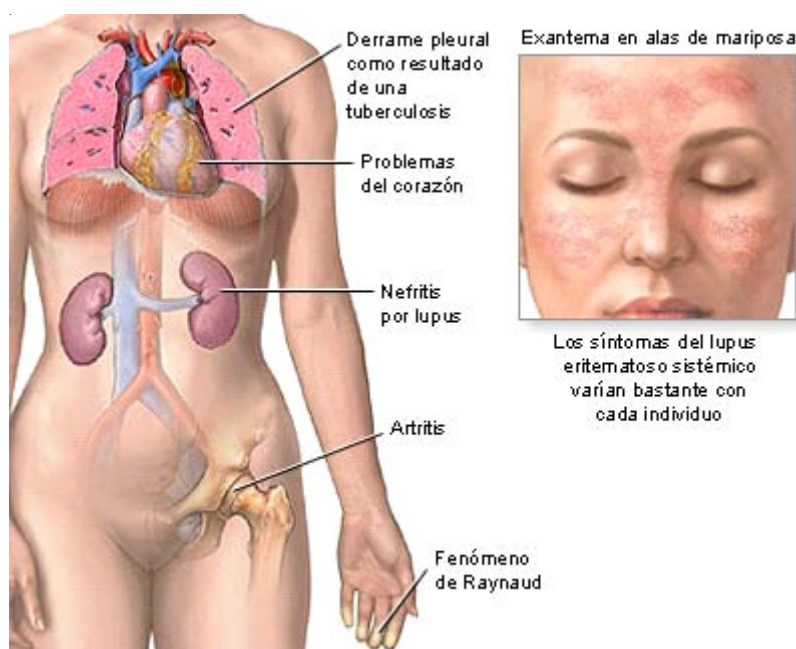


Uno de los mecanismos por los cuales la IL-1 $\beta$  ejerce su acción pro-inflamatoria es porque estimula la producción de NO (Koch y cols., 1995). NO, es un radical inestable producido por la acción de NO sintasa (NOS) sobre L-Arginina y es un importante mediador en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas. NO puede mediar en la inflamación local y en la destrucción tisular (Cannon y cols., 1996; McCartney-Francis y cols., 1993; Brahn y cols., 1998) por la producción de una isoforma de NOS (NOS inducible [iNOS]) que puede producir grandes cantidades de NO durante mucho tiempo (Nathan, 1992). El desarrollo de artritis se correlaciona con la inducción de iNOS y por la producción de NO. El NO producido, en respuesta a las citoquinas, promueve la degradación del cartílago articular, la inhibición de la síntesis de colágeno y de proteoglicanos, y la inducción de apoptosis (Taskiran y cols., 1994; Stefanovic-Racic y cols., 1996; Lotz y cols., 1999).

Cuando el NO se produce en grandes cantidades por la iNOS, se puede dar la formación de peroxinitrito, el cual se descompone en radicales hidroxilo altamente reactivos (Andersson y Ekström, 1997). El peroxinitrito es citotóxico por iniciar la peroxidación lipídica, inactivar las enzimas de respiración mitocondriana, reducir los niveles de glutatión, activar a la enzima nuclear poli(ADP-ribosa) sintetasa, y promover la muerte celular (Cuzzocrea y cols., 1998; 2000; Phelps y cols., 1995; Inoue y Kawanishi, 1995; Salgo y cols., 1995). La sobreproducción de ROS (aniones superóxido, peróxido de hidrógeno, peroxinitrito) en la inflamación conlleva a una considerable situación de stress oxidativo, indicado por los niveles de peroxidación lipídica. El empeoramiento de la artritis está estrechamente relacionada con el aumento de la peroxidación lipídica, como muestra los altos niveles en sangre de malondialdehído y conjugados dianos en pacientes con AR (Cuzzocrea y cols., 2000; Yoshikawa y Kondo, 1981).

### 3.6. Lupus Eritematoso Sistémico

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune, multisistémica, de gran heterogeneidad y variabilidad, caracterizada por la producción de autoanticuerpos, así como la formación y depósito de complejos inmunes. Aunque no todas las manifestaciones del LES pueden ser atribuidas a los complejos inmunes, ellos juegan un papel muy importante en su patología e inmunopatología, siendo el LES el prototipo de la enfermedad mediada por complejos antígeno-anticuerpo en el ser humano (Edberg y cols., 1998). La etiología de la enfermedad permanece desconocida, pero se cree que es multifactorial, resultando de la interacción compleja de factores genéticos y ambientales (Grossman y Tsao, 2000). Sin embargo, los estudios con pacientes así como en ratones propensos a desarrollar una enfermedad similar, han permitido la creación de un modelo para estudiar los eventos críticos para la inducción de los autoanticuerpos. De acuerdo a este modelo, los autoanticuerpos se producen en individuos genéticamente susceptibles en quienes las anomalías promueven la autorreactividad de las células B y T.



**Figura 11.** Manifestaciones más características en el Lupus Eritematoso Sistémico.

Durante el inicio de la enfermedad, los anticuerpos antinucleares (ANA) son estimulados por la presencia de autoantígenos que existen como complejos y que se vuelven inmunogénicos cuando son liberados por células apoptóticas. Esta estimulación es manejada por la producción de autoanticuerpos del tipo de la IgG, por mecanismos similares a los observados en las respuestas inmunes a antígenos extraños (Pistesky, 2000).

Otros tipos de autoanticuerpos que producen los pacientes de LES son: anti-histonas, anti-eritrocitos, anti-plaquetas, anti-leucocitos y frente a factores de coagulación. El autoanticuerpo específico para los glóbulos rojos y plaquetas llevan a una lisis mediada por complemento que da origen a una anemia hemolítica y una trombocitopenia respectivamente. Cuando los autoanticuerpos reaccionan con varios antígenos nucleares forman los complejos inmunes, que se depositan en las paredes de los capilares desarrollando una reacción de hipersensibilidad tipo III. Estos inmunocomplejos activan al sistema del complemento y generan complejos que atacan a las membranas y productos del complemento que dañan las paredes de los capilares originando los síntomas de vasculitis y glomerulonefritis.

Los pacientes con LES severa presentan niveles muy elevados en suero de factores activados del complemento (C3a y C5a), de 3 a 5 veces más altas que en sujetos normales. C5a induce un aumento de la expresión del receptor del complemento del tipo 3 (CR3) en neutrófilos, facilitando la agregación neutrofílica y el ataque al endotelio vascular. Al estar los neutrófilos atacando el endotelio de los capilares, el número de neutrófilos circulantes desciende (neutropenia) y se procede la oclusión de varios capilares (vasculitis). Esta oclusión puede originar una debilidad del tejido dañado.

Entre los innumerables autoanticuerpos producidos en el LES se encuentran anticuerpos contra cromatina, contra partículas de ribonucleoproteína nucleares pequeña (U1 y Sm) y frente a los complejos Ro/SSA y La/SSB (Tan, 1989; Kotzin y O`Dell, 1995). Autoanticuerpos anti-fosfolípidos también son frecuentes y están asociados a complicaciones trombóticas. Otro grupo de autoanticuerpos están dirigidos contra moléculas de superficie de las células que originan anemia hemolítica y trombocitopenia.

Los autoanticuerpos IgG anti-DNAs juegan un papel prominente en la glomerulonefritis (GMN) originada por inmunocomplejos (Kotzin y O`Dell, 1995). Hay dos mecanismos propuestos. En el primero, el antígeno que contiene DNA queda retenido en el glomérulo y es entonces cuando es reconocido por los anticuerpos anti-DNA, originando la formación de inmunocomplejos in situ (Bernstein y cols., 1995). En el segundo modelo, el subtipo patológico de anticuerpos anti-DNA es capaz de interactuar con las estructuras del glomérulo sin que haya antígenos-DNA en el origen. Otros autoanticuerpos implicados en la GMN son los anticuerpos anti-glicoproteína retroviral endógena (gp70) y el IC gp70-antigp70 (Izui y cols., 1981).

### 3.6.1. Papel de las células B

La primera vez que fue identificado fue en pacientes con LES hace 40 años y durante los últimos 20 años se ha considerado que los niveles de anticuerpos anti-DNAs refleja la actividad clínica de la enfermedad, en especial en riñón. De este modo, altos niveles de anticuerpos anti-DNAs (medidos por la técnica de Farr) se han encontrado en pacientes con nefritis ocasionada por lupus y que la inmunoglobulina que más afecta a la enfermedad renal es la IgG.

En ratones, los anticuerpos anti-DNA pueden ser inducidos por inyección de irritantes químicos (como el Pristane), por estimulación con antígenos como el DNA bacteriano, fosfolípidos de la pared de las bacterias y virus y por estimulación con complejos de DNA y proteínas (Schwartz y Ayollar, 1985; Satoh y cols., 1995). También en ratones, los anticuerpos anti-DNA patógenos son inducidos por inmunización de animales con complejos de proteínas y DNA (Desai y cols., 1993).

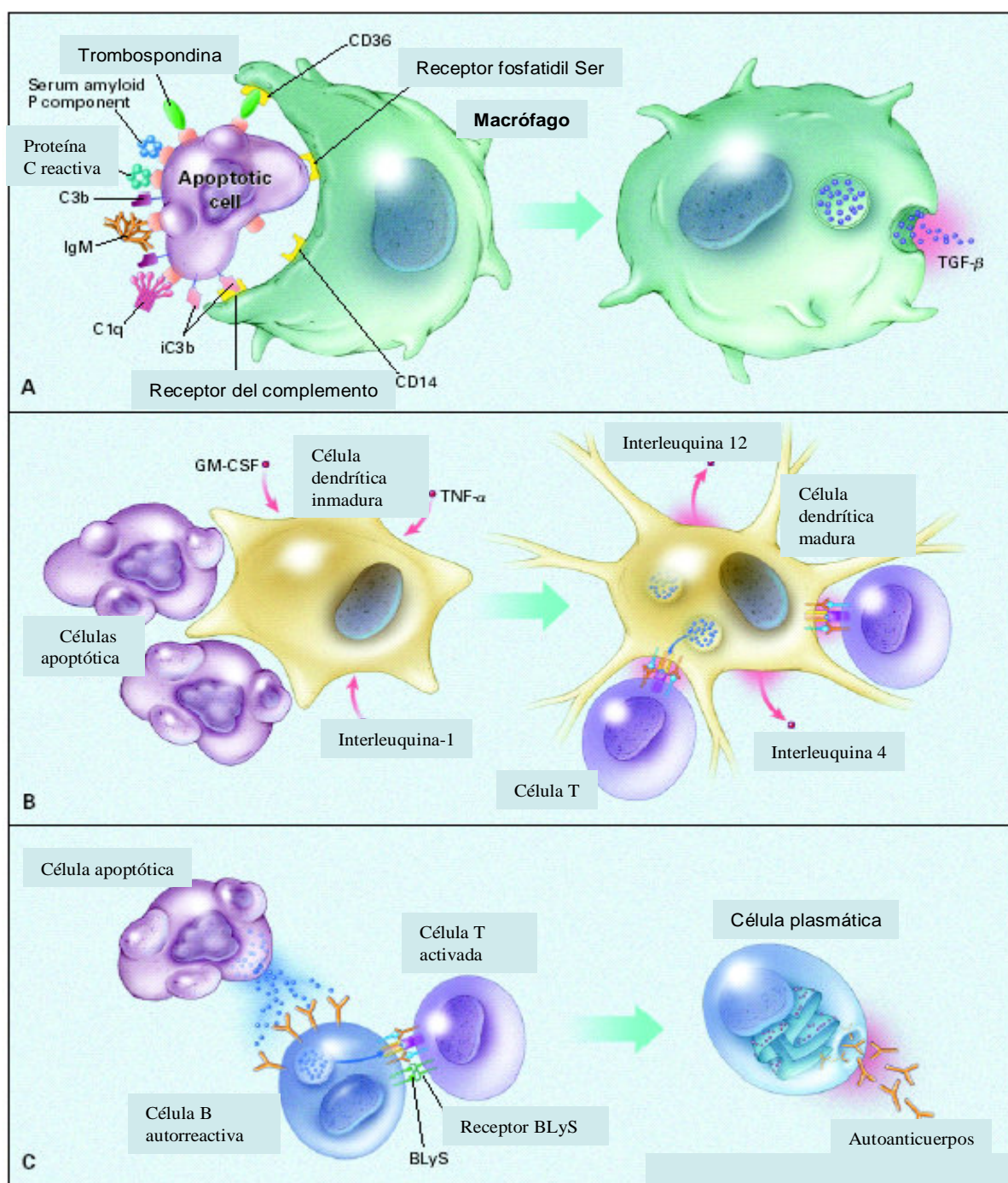
En humanos, los antígenos que inician la formación de anticuerpos anti-DNA potencialmente patogénicos pueden ser la cromatina y/o los nucleosomas. La evidencia del papel central de la inmunogenicidad de estos dos complejos incluyen la presencia de anticuerpos a estas sustancias en el suero de pacientes (Burlingame y cols., 1994) y su capacidad de bloquear la unión de las inmunoglobulinas séricas de pacientes con LES a extractos de glomérulos (Lefkowitz y cols., 1996). Además, los linfocitos T activados por nucleosomas de pacientes con LES pueden estimular a los linfocitos B para producir anti-DNA del tipo IgG (Mohan y cols., 1993). Los nucleosomas juegan un papel central en la fisiopatogénesis del LES siendo los anticuerpos IgG anti-nucleosomas los marcadores más sensibles para diagnosticar la presencia de LES, ya que estos anticuerpos se encuentran casi exclusivamente en pacientes con lupus, escleroderma y enfermedad mixta del tejido conectivo (Amoura y cols., 2000).

Por otra parte, complejos proteicos que contienen ARN, pueden inducir anticuerpos anti-DNA, de hecho, se observó que inmunizando conejos con péptidos con pequeñas partículas RNA nucleares pueden inducir anti-DNA y anticuerpos a pequeñas partículas RNA nucleares (James y cols., 1995).

Debido a que la apoptosis es la fuente de la producción de nucleosomas ha llevado a la sugerencia que la muerte celular programada está incrementada en el LES lo cual ha sido confirmado tanto en humanos como en ratones (Emlen y cols., 1994). Sin embargo, esto no es específico de los pacientes con Lupus, ya que también se ha observado en otras enfermedades inflamatorias (Lorenz y cols., 1997), lo cual obliga a pensar que existe una fagocitosis defectuosa que explique la presencia de nucleosomas circulantes en niveles elevados en el LES (Hermann y cols., 1998). Interesantemente, el nucleosoma mismo inhibe la remoción de células apoptóticas por macrófagos murinos (Lederach y cols., 1998). También se ha visto la aglomeración de nucleosomas con otros autoantígenos, como las ribonucleoproteínas llamados cuerpos apoptóticos, lo cual permite lanzar la hipótesis que en el LES la persistencia de células apoptóticas circulantes estimulan la producción de autoanticuerpos. Por otra parte, se ha encontrado que durante la apoptosis, hay una serie de cambios en las proteínas y una alta producción de ROS que tienen la capacidad de incrementar la inmunogenicidad de las células apoptóticas (Zahir y cols., 2000). Además, las infecciones con virus pueden contribuir a la inmunogenicidad de los nucleosomas e iniciar una respuesta autoinmune (Rekvig y cols., 1997), especialmente con el poliovirus T, los cuales pueden agruparse con los nucleosomas en cuerpos apoptóticos e inducir una respuesta autoinmune que puede extenderse del antígeno viral al nucleosoma (Andreassen y cols., 1999).

El mecanismo responsable para la ruptura de la tolerancia en el LES aún permanece desconocido, sin embargo, en los últimos años ha existido un avance en el conocimiento de las interacciones moleculares regulando la expansión de las células B y T autorreactivas.

Los anticuerpos IgM anti-DNA se encuentran normalmente en suero de sujetos sanos. Estos anticuerpos corresponden al repertorio de autoanticuerpos naturales, tienen baja afinidad por el DNA y por otros autoantígenos, como la tiroglobulina (Pisetsky y cols., 1990). Por otra parte, los anticuerpos anti-DNA son menos prevalentes en sujetos normales y contienen subgrupos de alta afinidad con reactividad cruzada estrecha (Diamond y cols., 1992). Otras características adicionales que contribuyen a la patogenicidad de los autoanticuerpos son: la capacidad de fijar complemento, afinidad por el DNA y otros antígenos que reaccionan cruzadamente, la carga de la molécula del anticuerpo o del complejo inmune que lo contiene y la secuencia de los aminoácidos de la proteína asociada (Rothfield y Satllar, 1967; Mohan y Datta, 1995; Winfield y cols., 1997).



**Figura 12.** Esquema de la producción de autoanticuerpos. A) Macrófago engullendo una célula apoptótica. La unión de C1q, proteína C reactiva e IgM a la célula apoptótica puede promover la activación del complemento que conduce a la disolución de la célula apoptótica. Una vez que el macrófago ha engullido a la célula apoptótica secreta la citoquina antiinflamatoria TGF- $\beta$ . B) Cuando hay un exceso de células apoptóticas y/o fracaso de uno o más del sistemas de reconocimiento receptor-ligando la células dendríticas inmaduras pueden convertirse en células apoptóticas. Si esto ocurre en presencia de citoquinas inflamatorias como GM-CSF, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  la célula dendrítica puede madurar a célula presentadora de autoantígeno que puede presentar autoantígeno a células T en presencia de moléculas coestimuladoras y citoquinas. C) Célula B autorreactiva reaccionando con autoantígenos de una célula apoptótica. La célula B recibe ayuda de una célula T activada que está expresando moléculas coestimuladoras y citoquinas involucradas en la maduración de células B, p.ej.: estimulador de linfocitos B (BLYS). La célula B autorreactiva se divide y madura a célula plasmática que segrega autoanticuerpos.

El proceso mediante el cual la respuesta de los linfocitos T y B a un antígeno se expande para incluir la reactividad a antígenos adicionales, depende de la degeneración del receptor de antígeno de la célula T, de manera tal que, un solo receptor se une a un complejo péptido-HLA. Por lo tanto, una célula T o B activada por un solo antígeno responde a múltiples autoantígenos y no autoantígenos (Hemmer y cols., 1997). A través de este mecanismo, múltiples exposiciones a antígenos bacterianos, virales o químicos o autoantígenos puede llevar a la formación de anticuerpos anti-DNA.

La tolerancia es el mecanismo por el cual se elimina o neutralizan las células autorreactivas, un fallo en este mecanismo en personas genéticamente susceptibles puede llevar a la autoinmunidad (Kamradt, 2001). Algunos mecanismos están dirigidos a bloquear células B autorreactivas y son: supresión clonal de células B inmaduras en médula ósea (Nemazee, 2000); supresión de células B en bazo o en ganglios linfáticos (Rathmell y cols., 1996); inactivación funcional (Goodnow y cols., 1988); y la edición del receptor (Nemazee 2000b), un mecanismo que cambia la especificidad del receptor de la célula B cuando se encuentra a un autoantígeno. El papel que juegan cada uno de estos mecanismos en la patogénesis del LES es desconocido.

### 3.6.2. Papel de las células T

La presencia de ciertos alelos de MHC-II y la producción de autoanticuerpos IgG características de la enfermedad del LES hicieron sospechar que las células T CD4 jugaban un papel principal en la patogénesis de la enfermedad. En todos los modelos animales se ha podido demostrar que el tratamiento con anticuerpos anti-CD4 disminuye la producción de autoanticuepros IgG y mejoraba los síntomas de la enfermedad. Mismos resultados se obtuvieron bloqueando la activación de las células T y/o la interacción entre células T-B (Finck 1994).

Estudios realizados en modelos murinos demostraron que antígenos nucleosomales no-DNA son capaces de estimular algunas células T autorreactivas que inducirían la producción de anticuerpos anti-DNA por parte de las células B. De este modo, estas células B podrían mediante el MHC-II presentar histonas u otros péptidos cromosomales a las células T (Mohan y cols., 1993).

Se ha podido comprobar que las células T causantes de la enfermedad se hayan presente en el repertorio normal de células T circulantes. Estas células T que no fueron eliminadas durante la selección tímica se hayan sin embargo inactivadas gracias a los mecanismos protectores de la tolerancia periférica (inactivación funcional, inmunoregulación e ignorancia inmunológica) (Kotzin, 1996). Sin embargo, cuando se produce una presentación anormal, o ocurre la presentación de un autoantígeno o se produce un fallo en la tolerancia periférica se puede producir la activación de estos clones de células T autorreactivas que pueden desencadenar el LES (Bockenstedt 1995).

Otro papel que desempeña las células T en el LES es la producción de citoquinas, aunque este punto es bastante controvertido, ya que hay autores que otorgan un papel preponderante a las citoquinas producidas por células Th2, mientras que otros autores sostienen la teoría que son las citoquinas producidas por las células Th1 las que juegan un papel preponderante en la patología del LES

Normalmente, los inmunocomplejos antígeno-anticuerpo, son eficientemente suprimidos o aclarados por el sistema fagocítico mononuclear que se encuentra en hígado y bazo. Este sistema, es dependiente de los receptores para el complemento, de los receptores para reconocer la porción Fc de la inmunoglobulina o receptores Fc y de los transportadores de inmunoglobulinas (Ravetch y Clynes, 1998). Un procesamiento anormal de los inmunocomplejos podría jugar un papel importante en el LES por diferentes vías, incluyendo anomalías en los mecanismos de transporte o de presentación, defectos



en la función del sistema fagocítico mononuclear (Haakenstad y Mannik, 1974), o anomalías intrínsecas a la función fagocítica nuclear, los cuales han sido descritos como factores importantes en la fisiopatogénesis del LES (Davies y cols., 1992).

No está claro, qué es lo que distingue un autoanticuerpo patogénico de uno que no lo es. La fijación del complemento es esencial para el daño tisular, lo cual coincide con la riqueza en anticuerpos patogénicos del tipo IgG1 e IgG3, las cuales fijan complemento eficientemente (Rothfield y Satllar, 1967; Mohan y Datta, 1995). Por otra parte, la carga catiónica también da al anticuerpo una ventaja patogénica, permitiendo que éste se una a moléculas cargadas negativamente en la membrana basal glomerular (Suzuky y cols., 1993).

Los inmunocomplejos que son capaces de ligar el complemento de manera eficiente, son fijados rápidamente por los eritrocitos a través del receptor eritrocitario para el complemento tipo 1 (CR1), y estos complejos eritrocito-inmunocomplejo son incapaces de depositarse en los tejidos (Kimberly, 1987), y son transportados hacia el sistema fagocítico mononuclear donde son eliminados de la circulación (Cornacoff y cols., 1983). En cualquier situación en la que se disminuya la reacción de adherencia inmune eritrocito-inmunocomplejo, estará asociada a una mayor probabilidad de depósito de inmunocomplejos en los tejidos (Wilson y Fearon, 1984; Schifferli y cols., 1986). El depósito en los tejidos de estos inmunocomplejos produce liberación de mediadores inflamatorios e infiltración con células inflamatorias, con el consiguiente daño tisular, que se hace especialmente evidente en el riñón (Salmon y cols., 1996). Allí, estos depósitos se encuentran principalmente en la membrana basal glomerular, pero también se pueden depositar en cualquier otro órgano (Wener y cols., 1985).

### 3.6.3. Factores medioambientales

Entre las mismas se encuentran el incremento del rash cutáneo tras la exposición al sol, empeoramiento de la enfermedad tras infección vírica o bacteriana, y cambios en la actividad de la enfermedad tras tratamiento hormonal. También se ha descrito que el tratamiento con ciertos fármacos (procainamida o hidralazina) induce la producción de anticuerpos anti-nucleares y a padecer una enfermedad parecida al lupus (Kotzin y O'Dell, 1995). Las inyecciones intraperitoneales de pristane induce una enfermedad parecida al lupus en ratones (Satoh y cols., 1995). A pesar de todos estos datos, no hay una evidencia clara de que los factores medioambientales estén implicados en el inicio del LES en humanos.

#### 3.6.4. Contribuciones genéticas

Múltiples son los genes que se han involucrado con el inicio, susceptibilidad y desarrollo del LES entre los que se encuentran los genes del MHC-II, genes del complemento y genes no-MHC-II. Sin embargo la combinación de ciertos genes puede ser menos importante que la acumulación de un número adecuado de genes que predisponen a la enfermedad (Morel 1994; Drake y cols., 1995), de este modo el riesgo relativo de padecer LES para los individuos con el haplotipo HLA-DR2 o HLA-DR3 es de 2 a 3 mientras que si presenta los dos haplotipos el riesgo relativo es de aproximadamente 5.

Entre los genes claramente implicados en el desarrollo de la enfermedad, se encuentran los genes del MHC-II, involucrados en la presentación de antígenos. En cuanto a una alteración en los genes del complemento se ha podido comprobar que el déficit de la proteína del complemento C4 se produce en aproximadamente el 10% de los pacientes con LES pero sólo en el 1% de la población normal, aunque los mecanismos de esta influencia son desconocidos.

Otras contribuciones genéticas pueden influir en el aumento de la deposición y/o formación de inmunocomplejos en el riñón o alterar la respuesta inflamatoria ante estos complejos. Otros genes involucrados son los genes *lpr* y *gld*, producidos por mutación en el gen *Fas* y *Fas-L*, respectivamente, que están involucrados en la apoptosis (Cohen y Eisenberg, 1991; van Houten y Budd, 1994). Los individuos homocigóticos para estas mutaciones presentan una población anormalmente elevada de células T CD4-CD8-, una alta tasa de autoanticuerpos y presentan alteraciones en los mecanismos de tolerancia periférica de las células T. Las mutaciones en el gen *Fas* es la base genética de los ratones MRL-*lpr* y aunque ha sido detectada en un grupo de niños con síndromes linfoproliferativos y evidencia de autoinmunidad no se ha encontrado un equivalente del fenotipo *lpr* o *gld* en el LES.

### 3.6.5. Modelos animales

Los modelos animales de lupus proporcionan sistemas experimentales muy valiosos para el análisis de la patogenia de esta enfermedad. Se han descubierto varias cepas endogámicas de ratones que desarrollan de forma espontánea enfermedades autoinmunitarias que se parecen al LES humano en diferentes grados.

**Ratones NZB y (NZB x NZW)F1:** Fue la primera que se describió, y la más parecida al LES. Los ratones negros de la cepa Nueva Zelanda (NZB) desarrollan una anemia hemolítica autoinmune a los 2-4 meses de vida. El haplotipo implicado es el MHX H-2<sup>d</sup> y el tiempo de supervivencia para el 50% de los animales es de 18 meses, dándose en ambos sexos por igual. Además de la anemia hemolítica, estos ratones desarrollan linfomas y glomerulonefritis. Las principales características inmunológicas son: producción de anticuerpos anti-eritrocito, anti-proteínas nucleares, anti-DNA y anti-linfocito T, hiperproducción de IgM y una disfunción linfocitaria generalizada (Kalsi, 2002).

Los ratones híbridos resultantes de la primera generación de los ratones de las cepas Nueva Zelanda negros y blancos (NZB x NZW)F1 desarrollan una glomerulonefritis severa mediada por depósitos de inmunocomplejos en el riñón que causan la muerte. Las hembras son las que más padecen esta enfermedad, teniendo una supervivencia media de 7-8 meses. El haplotipo característico de estos ratones es el MHC H-2<sup>d/z</sup>. Las principales características inmunológicas son producción de anticuerpos antinucleares y anti-DNA, y una disfunción linfocitaria generalizada (Kalsi, 2002).

Estudios extensos en estos ratones, han demostrado que también hay genes que no son del MHC en la F1 procedentes de ambos progenitores, contribuyen a la evolución de la enfermedad. Las células B de los ratones (NZB x NZW)F1 son hiper-respondedores a los antígenos extraños así como los activadores policlonales y las citocinas, y esta puede ser la anormalidad inmunitaria básica en estos ratones. Se desconoce la base bioquímica de este exceso de respuesta de la célula B.

**Líneas de ratones BXSB:** Es una cepa recombinante en la que la susceptibilidad a padecer la enfermedad está ligada al cromosoma Y, y sólo los machos la padecen. Estos ratones que tienen una vida media de 2-4 meses padecen anemia hemolítica, linfadenopatía y GMN. Estos ratones producen anticuerpos anti-DNA, anti-anticuerpos timocitotóxico naturales (anti-NTA), anticuerpos anti-eritrocitos, también padecen atrofia tímica que ocurre más temprano que en los normales (Abbas y cols., 1994; Kalsi, 2002).

**Líneas de ratones Moth-Eaten:** Estos ratones poseen el haplotipo H-2<sup>b</sup> y en ambos sexos están afectados por igual, con un tiempo medio de supervivencia de 1 mes. Estos ratones padecen pérdida de pelo, GMR y un aumento de la probabilidad de padecer infecciones. Producen anticuerpos anti-DNA, anti-NTA, anti-eritrocitos e inmunosupresión (Kalsi, 2002).

**Ratones de la línea Palmerston-North:** La prevalencia de la enfermedad es mayor en hembras, con un tiempo de vida medio de 11 meses. El haplotipo implicado es el H-2<sup>a</sup>. Estos ratones padecen poliarteritis nodosa y nefritis mediada por inmunocomplejos y producen anticuerpos anti-DNA con hiperactividad de linfocitos B (Kalsi, 2002).

**Ratones de la línea Swan:** Los ratones de ambos sexos padecen la enfermedad, que se caracteriza por padecer una GMN leve. Tienen un tiempo de vida media de 18 meses. El haplotipo implicado es el H-2<sup>k</sup>. Estos ratones producen anticuerpos anti-DNA y padecen una atrofia tímica antes de lo normal (Kalsi, 2002).

**Ratones de la línea SNF1:** Las hembras de esta línea padecen una GMN severa debido al haplotipo H-2<sup>q/d</sup>. Tienen una supervivencia media de 4-8 meses, y producen anticuerpos anti-DNA y anti-nucleosomas (Kalsi, 2002).

### 3.6.6. Ratones MRL-lpr/-lpr

Los ratones MRL/lpr desarrollan espontáneamente una enfermedad autoinmune muy parecida al LES humano. Las características clínicas de la enfermedad incluye producción de autoanticuerpos, hipergammaglobulinemia, nefritis, artritis, vasculitis y linfadenopatía (Cohen y Eisenberg, 1991; Theofilopoulos y Dixon, 1985; Andrews y cols., 1978).

Las cepas mutantes más conocidas son la de los ratones lpr (lpr: linfoproliferación) que tienen la mutación en el gen fas y la cepa de los ratones gld (gld: enfermedad linfoproliferativa generalizada) que tienen la mutación en el gene fasL. Los linfocitos de estos ratones tienen una tasa exagerada de proliferación porque, después de su activación, su tasa de multiplicaciones no está modulada por apoptosis, lo cual es un mecanismo que habitualmente controla la respuesta del sistema inmunitario. Fas es un receptor de membrana que pertenece a la superfamilia del receptor TNF y está involucrado en los mecanismos de apoptosis (Tada y cols., 1999). La apoptosis puede ser inducida cuando la proteína FasL del linfocito Tc interacciona con la proteína Fas de una célula blanco. La unión Fas-FasL provoca un aumento en la concentración intracelular del Ca<sup>2+</sup> y la fragmentación del DNA.

La mutación *lpr* se define como la inserción de un retrotransposón temprano en el segundo intrón del gen *fas* en el cromosoma 19, que interfiere con la normal transcripción del gen (Watanabe-Fukunaga y cols., 1992; Watson y cols., 1992). Esta mutación tiene como resultado la acumulación de una población atípica de células T que no expresan el antígeno CD4 y CD8 pero sí B220, una isoforma del CD45 que se encuentra normalmente en las células B (Abbas y cols., 1994).

La mutación *gld* ocurre por la sustitución de un único aminoácido en el dominio de muerte citoplasmática de la proteína Fas que elimina su capacidad para traducir la señal apoptótica dentro de la célula a pesar de su unión con el ligando Fas (Nagata y Suda, 1995).

En estos ratones, juega un papel muy importante la células T, en especial las células T CD4+ autorreactivas, en la patogénesis del lupus, como queda reflejado en los estudios de nefritis por timectomía neonatal (Steinberg 1980), la inmunodepleción con anticuerpos anti-CD3 (Santoro y cols., 1988; O'Sullivan y cols., 1991; Jabs y cols., 1993; Merino y cols., 1993), anti-CD4 (Henrickson y cols., 1994), anti-Thy 1.2 (Seaman y cols., 1983), o la administración de ciclosporina A (Mountz y cols., 1987), incluso la depleción genética de células T CD4+ por desorganización controlada del MHC II (Jevinkar y cols., 1994) o del gen CD4 (Koh y cols., 1995), reducen los síntomas de la enfermedad y la proliferación de células T doble negativas.

Sin embargo, las funciones que desempeñan los subtipos de células T, Th1 y Th2, permanecen muy poco definidas. Por ejemplo, algunos estudios hablan que, el repertorio de citoquinas predominante en el lupus son las producidas por las células Th1 (Shirai y cols., 1995; Takahashi y cols., 1996), mientras que para otros autores, son las citoquinas producidas por las células Th2 las que son importantes en el desarrollo de la enfermedad (Prud'homme y cols., 1995; Shorlemmer y cols., 1995; Tsai y cols., 1995).

Entre los indicios que podrían demostrar el papel preponderante de las células Th2 se encuentran el hecho de que activan a las células B autorreactivas en la producción de autoanticuerpos, que es la marca característica tanto en el lupus humano como en ratones (Peng y cols., 1997). Una citoquina producida por las células Th2 es la IL-10, es una citoquina reguladora que inhibe la producción de citoquinas en las células Th1 y la proliferación de las células T CD4+ por mecanismos indirectos sobre la función de las células presentadoras de antígenos o por efecto directo sobre las células T (Moore y cols., 2001). Se ha observado que esta citoquina se encuentra elevada en pacientes de LES (Llorente y cols., 1995), y los niveles séricos se correlacionan con la actividad de la enfermedad (Hagiwara y cols., 1996; Houssiau y cols., 1995; Park y cols., 1998). También se ha demostrado, que el tratamiento en ratones y en humanos

---

con anticuerpos anti-IL-10 retrasa el inicio de la enfermedad quizás, a través de un efecto sobre la producción de TNF- $\alpha$  (Ishida y cols., 1994; Llorente y cols., 2000). A su vez, el tratamiento con antagonistas de la IL-4 reducía los niveles de anticuerpos anti-DNA y el daño renal (Schorlemmer y cols., 1995).

Otros experimentos demuestran la prevalencia de las citoquinas producidas por las células Th1, como es el hecho de encontrar niveles elevados de IL-12 (Yasuda y cols., 2001; Schwarting y cols., 1999), de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en riñón, nodos linfáticos y bazo (Murray y cols., 1990; Boswell y cols., 1988). Pero la citoquina de las células Th1 que está más involucrada en la patogenia de la enfermedad es el IFN- $\gamma$ . Está demostrado que en el lupus hay una hiperproducción de IFN- $\gamma$  (Murray y cols., 1990, Prud'homme y cols., 1995; Takahashi y cols., 1996). A su vez, un déficit del gen de IFN- $\gamma$  (Balomenos y cols., 1998, Peng y cols., 1997) o una delección de su receptor reduce la GMN a través de la reducción de la producción de anticuerpos Ig2a anti-DNAs (Haas y cols., 1997). También reduce los signos de la enfermedad, el tratamiento con anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  o anti-IFN- $\gamma$ -receptor (Jacob y cols., 1987; Ozmen y cols., 1995).

Otros datos que demuestran la implicación de las células Th1, es que hay un aumento de la expresión de MHC II en macrófagos que hace que estén activados (Lu y Unanue, 1982). Una de las consecuencias de esta activación es la sobreproducción de NO por los macrófagos infiltrados y células mesenquiales residentes en el glomérulo inflamado (Reilly y cols., 2000), esta producción es crucial en el inicio y mantenimiento de la GMN y su inhibición reduce la progresión de la enfermedad (Hortelano y cols., 1997; Weinberg y cols., 1994).

Una posible explicación de esta dicotomía en el patrón de producción de citoquinas la da Dayan y cols (2000). Estos autores hablan de que la prevalencia de uno u otro subtipo de células T depende de la edad. De esta forma, en ratones jóvenes, hay un incremento inicial de las citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 y TNF- $\alpha$ ), seguido por un pico en la producción de citoquinas de Th1 (IFN- $\gamma$  e IL-2). Las citoquinas producidas por las células Th2 (IL-4 e IL-10) aparecerían en una etapa mucho más tarde, cuando las manifestaciones clínicas ya están instauradas, en esta etapa, los niveles de citoquinas de Th1 estarían más baja que en ratones controles (Segal 1997a). Este cambio en la producción de citoquinas de Th1 a Th2 ha sido observado tanto en pacientes y en ratones de edad avanzada (Kubo y Cinaderer, 1990; Weigle, 1993; Ernst y cols., 1995; Engwerda y cols., 1996; Segal y cols., 1997b).

### 3.7. Regulación neuroinmunoendocrina de las enfermedades autoinmunes

La primera relación del sistema endocrino con el inmunológico fue comunicada por Calzolari en 1898, quien observó en conejos castrados el aumento del timo, confirmado por Chillido en 1940.; posteriormente Salomon en 1964 escribe sobre la integración entre inmunidad, enfermedad y cómo podrían influir los estados emocionales. Ader en 1975 escribe sobre la conducta y estados emocionales que pueden llevar a la inmunosupresión y Farrar en 1987 publica un interesante artículo sobre la relación del sistema inmune y el nervioso. La interacción entre estos dos sistemas juega un papel importante en la modulación de la susceptibilidad y de la resistencia a padecer enfermedades inflamatorias e infecciosas (Sternberg, 2001).

#### 3.7.1. Interacciones inmuno-neuroendocrinas

Numerosos son los trabajos que han arrojado resultados que pueden aceptarse como evidencia de una integración funcional entre el sistema inmune y el neuroendocrino que comparten una serie de mediadores tanto a nivel endógeno como exógeno (Eiguchi y Soneira, 2002). La regulación neuroendocrina de la respuesta inmune e inflamatoria ocurre a distintos niveles: a nivel general, a través de la acción antiinflamatoria de los glucocorticoides, que aumentan por la estimulación del eje hipotalámico-pituitaria-adrenal (HPA); o a un nivel local, en el foco inflamatorio, por la producción en los nervios periféricos de neuropéptidos y neurohormonas proinflamatorias (Stenberg, 2001). La integración de estos sistemas se puede resumir de la siguiente forma:

- 1) Las hormonas clásicas y neurotransmisores se unen a receptores específicos de las células del sistema inmune, regulando su actividad.
- 2) Los productos clásicos del sistema inmune, como las citoquinas, pueden actuar sobre las células del sistema neuroendocrino alterando sus funcionalidad.
- 3) Las hormonas liberadas por el hipotálamo, así como los estímulos inmunes, pueden actuar sobre los linfocitos favoreciendo la liberación de neuropéptidos, los cuales podrían modificar la actividad del sistema neuroendocrino.
- 4) Algunas células del sistema nervioso producen citoquinas o péptidos semejantes, que son capaces de modular la función de las células del sistema inmunitario (Eiguchi y Soneira, 2002).

### 3.7.2. Regulación neuroendocrina de la inflamación por la acción de los glucocorticoides

#### 3.7.2.1. Eje hipotálamo-pituitaria-adrenal

El eje HPA interviene fundamentalmente en el stress y existen evidencias de acciones bidireccionales. Está demostrado que las citoquinas, como la IL-1, puede estimular al SNC a través de la estimulación del nervio vago y el núcleo del tracto solitario (Bluthe y cols., 1994, Watkins y cols., 1994). Esta estimulación produce liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en el hipotálamo y un aumento de los niveles plasmáticos de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) por la hipófisis. A su vez, la ACTH puede inhibir la producción de IFN- $\gamma$  por interferir con la unión de las células Th; también tendría un importante rol regulador en las funciones de los linfocitos B y sería estimulador de la migración de monocitos por quimiotaxis. Dosis fisiológicas de ACTH pueden interferir en la respuesta celular. Por otra parte, los linfocitos también producen ACTH (Eiguchi y Soneira, 2002).

La hormona estimulante del melanocito (MSH) inhibe la producción y acción de citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8), inhibe la síntesis de NO y neopterinina en macrófagos, inhibe la migración de neutrófilos, y la síntesis de prostaglandinas en fibroblastos e incrementa la producción de IL-10 en monocitos (Lipton y Catania, 1997).

La prolactina (PRL), otra hormona adenohipofisaria, puede ser producidas por linfocitos de sangre periférica, en el bazo y en timocitos. Las células NK y los linfocitos de los órganos linfoides primarios y secundarios expresan receptores para PRL. En pacientes hiperprolactinémicos se ha detectado una considerable reducción de la población de células NK. En ratones nude (carentes de timo), los niveles de PRL son significativamente bajos, con niveles de hormona luteinizante (LH) altos. El transplante de tejido tímico en estos animales provoca la disminución de LH y aumento de PRL a niveles normales, lo que indicaría una interacción recíproca entre timo e hipófisis (Eiguchi y Soneira, 2002).

La hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH) sintetizada en hipotálamo y otros sitios, es capaz de estimular la blastogénesis de linfocitos en sujetos sanos, pero tiene un efecto inhibitor sobre la actividad NK, la quimiotaxis y migración de los leucocitos en sujetos normales. La hormona del crecimiento (GH), puede ser sintetizada por células epiteliales del timo y puede regular distintos parámetros involucrados en la migración y diferenciación de los timocitos. Estos efectos serían mediados por la secreción autocrina del factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 (IGF-1) (Eiguchi y Soneira, 2002).



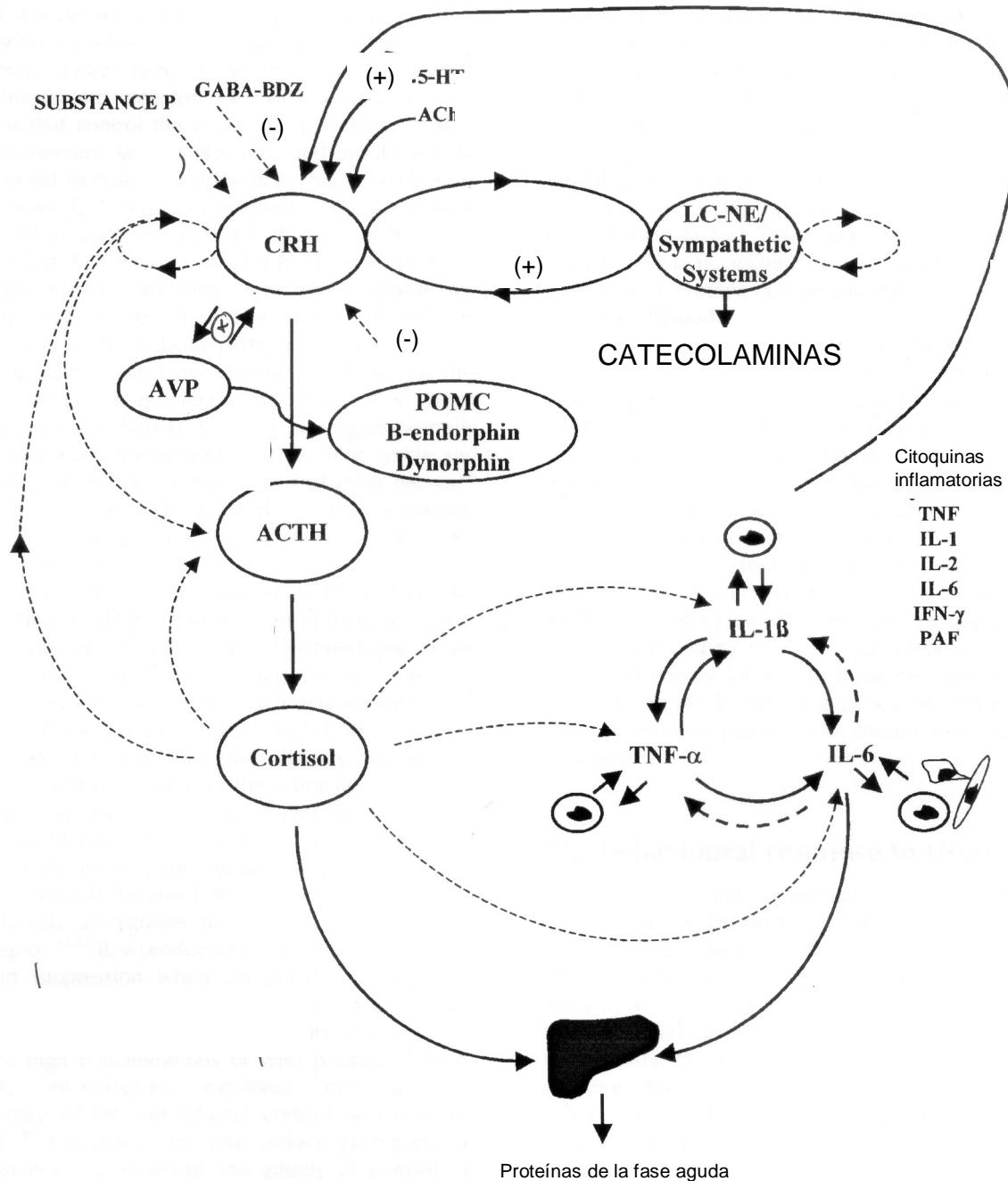
Por otra parte, la expresión de citoquinas y de sus receptores en células del tejido nervioso y endocrino han sido demostrada claramente, como por ejemplo, la expresión del receptor de IL-1 en los islotes pancreáticos de Langerhans. En la adenohipófisis, se ha observado que la IL-2 y la IL-6 podrían alterar la proliferación celular, así como la secreción de GH, PRL y ACTH (McEwen y cols., 1997). También la IL-2, induce la secreción de CRH en las neuronas hipotalámicas, con incremento de NO. Otros estudios han demostrado que la IL-5, IL-7, IL-9 y TGF- $\beta$  participan en la regulación de la diferenciación neuronal (Eiguchi y cols., 2000).

Tanto el exceso como el defecto de la respuesta hormonal contra el stress está asociado con la enfermedad: el exceso puede afectar a la susceptibilidad y a la severidad de las enfermedades infecciosas por los efectos inmunosupresores de los glucocorticoides (Brown y cols., 1993; Hermann 1993; Glaser y Kiecolt-Glaser, 1998); el defecto, de la respuesta del eje HPA, se asocia con el aumento de la probabilidad de padecer enfermedades autoinmune (Sternberg, 1997, Jafarian-Tehrani y Sternberg, 1999).

### 3.7.2.2. *Glucocorticoides*

Inicialmente se pensó que los glucocorticoides tenían sólo efectos inmunosupresivo (Hench y cols., 1950, Cupps y Fauci, 1982). De este modo, se vio que suprimían la adhesión celular, la migración, la activación de macrófagos, la presentación de antígenos, la expresión del receptor de células T, activación, proliferación y diferenciación de linfocitos T y linfocitos B, incluyendo la producción de anticuerpos (Sternberg, 2001). Sin embargo, estudios recientes han mostrado que, a dosis fisiológicas, los GC poseen efectos inmunomoduladores, causando un cambio de la producción de citoquinas pro-inflamatorias a un patrón de citoquinas anti-inflamatorias (Elenkov y Chrousos, 1999; Ashwell y cols., 2000).

Los glucocorticoides también regulan la función inmune a nivel de órgano, como en el timo, donde se ha descrito que posee toda la maquinaria para su producción (Vacchio y Ashwell, 1997), interviniendo en la selección tímica. Los glucocorticoides tímicos se producen por citoqueratina tímica de las células T que se diferencian en el estroma. La cantidad que se produce es más baja que la presente en el plasma y sólo se detecta en cultivos de tejido, lo cual indica, que el efecto de los esteroides es una acción paracrina más que endocrina (Stenberg, 2001).



**Figura 13.** La hormona estimuladora de corticotropina (CRH) y el sistema *locus coeruleus*-noradrenalina (LC-NE) del cerebro son los efectores principales de la respuesta ante el stress y participan en un feedback positivo, en donde la activación de uno de ellos activa a los demás. El sistema CRH se inhibe por cortisol, sustancia P, GABA-BDZ, pro-opiomelanocortina (POMC) y por la propia CRH; por otra parte su producción se estimula por serotonina (5-HT), acetilcolina (ACh), el sistema LN-CE, vasopresina (AVP) y por citoquinas inflamatorias. La producción de CRH estimula la secreción de AVP y actúa sinérgicamente con ella para estimular la producción de ACTH en la pituitaria, la cual estimula la producción de cortisol por la médula adrenal. El TNF- $\alpha$ , la IL-1 $\beta$  y la IL-6 se producen en el foco inflamatorio y son los mayores activadores del sistema CRH. Estas tres inflamatorias estimulan su propia producción, de esta forma el TNF- $\alpha$  y el IL-1 $\beta$  estimulan la producción de IL-6, pero la IL-6 inhibe la de TNF- $\alpha$  y el IL-1 $\beta$  y actúa junto a los glucocorticoides para estimular la secreción hepática de las proteínas de la fase aguda. Los glucocorticoides inhiben la producción de estas tres citoquinas. Las líneas discontinuas representan inhibición; las líneas continuas representan estimulación.

También se ha demostrado que los glucocorticoides inhiben la producción de andrógenos adrenales (Vilarinho y Costellat, 1998) y de hormonas sexuales (Vilarinho y Costellat, 1998; Navarro y cols., 1998). A su vez, hay una interacción de las hormonas sexuales sobre el eje HPA, los andrógenos inhiben y los estrógenos estimulan al eje HPA (Chrousos y Gold, 1992). La gonadectomía en machos incrementa el CRH hipotalámico, sin embargo, si se le administra después testosterona se recuperan los niveles de glucocorticoides y ACTH (Bingaman y cols., 1994).

### 3.7.2.3. Hormonas sexuales

Existe una interrelación entre las hormonas sexuales y el sistema inmune. A niveles fisiológicos, los estrógenos aumentan y los andrógenos disminuyen la respuesta inmune (Masi y cols., 1996). En general, los andrógenos (testosterona y DHEA) tienden a suprimir tanto la respuesta humoral como la celular, mientras que los estrógenos y progesterona estimulan la actividad humoral (Th2), pero a altas concentraciones, los estrógenos también inhiben la respuesta inmune celular. Altas dosis de estradiol disminuyen el número de células T CD4+, mientras que la testosterona incrementa el número de células T CD8+ (Wilder, 1996; Cutolo y cols., 1995; Benten y cols., 1989).

Se sabe que, los estrógenos contribuyen a que las hembras sean más susceptibles a padecer enfermedades autoinmunes (Wilder y Sternberg, 1990; Ahmed y cols., 1999; Lahita, 1999). La ovariectomía reduce, mientras que el tratamiento con estrógenos reactivan, los síntomas de inflamación por artritis en roedores (Allen y cols., 1983). En general, el ciclo menstrual y la terapia con estrógenos afecta al eje HPA (Kirschbaum y cols., 1999) y a la función inmune (Zelazowska y cols., 1997).

Las IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6 actúan sobre el eje HPA con el consiguiente aumento de glucocorticoides. Los glucocorticoides producen alteraciones en las gónadas disminuyendo la producción de testosterona y DHEA. Pero no solamente habría una influencia de citoquinas sobre las hormonas sexuales, sino que, de modo contrario, éstas pueden regular la producción de citoquinas. Los ensayos *in vitro* con monocitos, demostró que la administración de andrógenos disminuía la producción de IL-6 y IL-1 $\beta$ , mientras que con igual concentración de estrógenos, se produjo un aumento del ARNm de TNF y liberación de IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ .

### 3.7.3. El eje HPA y hipotálamo-pituitaria-gonadal (HPG) en la Artritis Reumatoide

Uno de los factores causantes de la artritis reumatoide (AR) es la disfunción del eje HPA y del eje HPG (Cutolo y cols., 2000). Se ha descrito como, en mujeres jóvenes, que han padecido situaciones de stress (situaciones personales, infecciones y operaciones, y uso de anticonceptivos) tienen activo el sistema HPA, conllevando un descenso de andrógenos adrenales en los niveles plasmáticos (Masi y cols., 1996; 1999; Haller y cols., 1997).

Cuando se administra testosterona en cultivos de macrófagos sinoviales de pacientes de AR, se observó que inhibía la producción de IL-1 (Dalal y Voskuhl, 1997; Cutolo y cols., 1993; 1996a). Una inhibición similar de IL-1 y IL-6 se encontró en PBMC de pacientes de AR tratados con testosterona (Li 1993). Sin embargo, el tratamiento con estradiol incrementó la secreción de IL-1 en macrófagos peritoneales de rata y la producción de IL-1 e IL-6 en PBMC humanos (Hu y cols., 1987; Cutolo y cols., 1996b; Wilder, 1996). Por otro lado, la dihidrotestosterona, metabolito activo de la testosterona, reprime la expresión y la actividad del promotor del gen IL-6 humano vía inhibición de la activación NFκB y manteniendo de los niveles de IκBa (Keller y cols., 1996). Los macrófagos tanto en humanos como en roedores poseen receptores nucleares y citoplasmáticos para testosterona, y los receptores para andrógenos (de alta y baja afinidad) fueron encontrados en el HLA-DR de macrófagos sinoviales en humanos (Cutolo y cols., 1992). Parece ser que, los macrófagos sinoviales son el nexo de unión entre las hormonas sexuales y los efectores de la respuesta inmune (Cutolo, 1999; Masi y Cutolo, 1995; Wilder y Elenkov, 1999).

También se ha encontrado bajas concentraciones plasmáticas de DHEA y DHEAS en pacientes con AR, este dato se correlaciona con la bajada matutina de los niveles de cortisol y con las altas concentraciones de IL-6 (Masi y Chrousos, 1996). Esta producción reducida de DHEA, y la inesperada reducción de los niveles de cortisol, apoyan el concepto de una hipofunción adrenal en pacientes con AR activa (Mastorakos y cols., 1993). Estos datos de DHEA se contraponen con los altos niveles basales de IL-12 (Cutolo y cols., 1997), citoquina que induce la secreción de IFN-γ y la expansión clonal de células Th1 (Morita y cols., 1996) y que contribuye a que las células Th1 sean predominantes en la AR (Cutolo y cols., 1998).

Del mismo modo, las altas concentraciones de IL-6, que es una citoquina que controla la respuesta adrenal ante el stress y que colabora en el aumento de corticosteroides y en la secreción normal de andrógenos, apoyan la teoría de insuficiencia adrenal en pacientes con AR.

### 3.7.4. El eje HPA y HPG en el Lupus Eritematoso Sistémico

En recientes estudios se ha sugerido que la testosterona puede suprimir la producción de anticuerpos anti-DNA en PBMC al inhibir la hiperactividad de las células B e indirectamente disminuyendo la producción de IL-6 en monocitos (Kanda y cols., 1996).

Las concentraciones séricas de IL-6 e IFN- $\gamma$  se encuentran elevadas en pacientes con LES que padecen linfadenopatía y/o síndrome nefrótico; pero son los niveles de TNF- $\alpha$  los que están elevados en pacientes que desarrollan trombocitopenia. Pacientes de LES con hipogammaglobulinemia presentan niveles aumentados de IL-6 en suero (Al-Janadi y cols., 1993). Recientemente, un polimorfismo dentro del gen del promotor de IL-10 se ha asociado con el aumento de IL-10 en suero, lo que sugiere un papel de esta citoquina en las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Lazarus y cols., 1997). Este dato se ve apoyado por estudios en los que se han encontrado un incremento de citoquinas Th2 (aumento del ratio IL-10:IFN- $\gamma$ ) en pacientes respecto a sujetos sanos (Houssiau y cols., 1995; Richard-Patin y cols., 1995).

Un claro ejemplo del papel dominante que juega la PRL y los estrógenos en el LES, es el hecho de que la enfermedad tiende a progresar o a iniciarse durante el embarazo y que puede remitir después del parto (Elenkov y Chrousos, 1997). A su vez, en situaciones de menopausia, en los que disminuye los niveles de estradiol y cortisol, se observa una baja incidencia de LES, mientras que la incidencia es mayor en las mujeres en edad fértil (Bruce y Laskin, 1997). Del mismo modo, el uso de anticonceptivos orales, aumenta las posibilidades de desarrollar o de agravar los síntomas de la enfermedad (Petri y Robinson, 1997; Brennan y cols., 1997).

En cuanto a los andrógenos, la DHEA incrementa la secreción de IL-2 en linfocitos T activados y disminuye la producción de IL-4, IL-5 e IL-6 (Daynes y cols., 1990; Suzuki y cols., 1995). De hecho, en LES, los niveles IL-4, IL-5 e IL-6 se encuentran disminuidos, independientemente del sexo, edad y actividad de la enfermedad (Masi, 1994; Lahita y cols., 1994) posiblemente por presentar niveles reducidos de DHEA. Recientemente, un ensayo clínico en pacientes de LES a los que se administró DHEA, demostró ser eficaz clínicamente manteniéndose los beneficios obtenidos durante al menos un año en aquellos pacientes que mantuvieron el tratamiento (Van Vollenhoven y cols., 1995; 1998).

Otra andrógeno que se encuentra disminuído es la testosterona. Se ha demostrado que, el tratamiento con testosterona disminuye los síntomas del LES al reducir la proteinuria y la producción de autoanticuerpos (Blank y cols., 1990; Van Griensven y cols., 1997).

## **4 . OBJETIVOS**



Los continuos avances en la investigación sobre el papel que desempeña la melatonina en la regulación y modulación del sistema inmune, nos llevó a realizar este trabajo. El objetivo de este trabajo, es conocer el efecto que ejerce la melatonina sobre las enfermedades autoinmunes. Para ello, elegimos dos tipos de enfermedades autoinmunes: la Artritis Reumatoide, como ejemplo de enfermedad autoinmune mediada por células T; y el Lupus Eritematoso Sistémico, como ejemplo de enfermedad autoinmune mediada por inmunocomplejos. Desarrollamos los siguientes objetivos:

#### **4.1. Acción de la melatonina sobre la Artritis Reumatoide**

1.1.- La Artritis Reumatoide es una enfermedad que origina una erosión y destrucción de las articulaciones. Entre los objetivos de este trabajo está describir cómo afecta a estos cambios la presencia de melatonina. Para ello realizamos un estudio histopatológico de la articulación afectada.

1.2.- Uno de los parámetros indicativos del establecimiento de la enfermedad es la presencia de factores reumatoides en el suero. Por tal motivo, estudiamos la influencia que tendría la administración de melatonina en la producción de dichos factores reumatoides.

1.3.- La Artritis Reumatoide está caracterizada porque en sus estadíos iniciales hay un predominio de la respuesta inflamatoria. Fue nuestro objetivo, investigar qué papel desempeña la melatonina en esa situación proinflamatoria. Para ello, determinamos la producción de IL-1 $\beta$  e IL-6 en distintos tejidos.

1.4.- Los mecanismos oxidativos están acentuados en las enfermedades autoinmunes, al ser la melatonina un buen antioxidante, nos planteamos qué papel puede jugar en este tipo de enfermedades inmunológicas. Para desarrollar este objetivo, evaluamos los niveles de NO y el grado de peroxidación lipídica en distintos tejidos como indicadores del estrés oxidativo.

1.5.- Debido a que las enfermedades autoinmunes tienen una prevalencia mayor en hembras que en machos. Decimos investigar los niveles hormonales y cómo se verían afectados éstos con un tratamiento con melatonina.

1.6.- Medición de todos los parámetros anteriormente citados en otros dos modelos: en ratas pinealectomizadas y en ratas hembras.



## **4.2. Acción y efecto de la melatonina sobre el Lupus Eritematoso Sistémico**

2.1.- Una de las patologías características del LES es el desarrollo de glomerulonefritis. Nuestro objetivo fue averiguar el papel que tendría la administración de melatonina en el curso de dicha patología. Para ello, realizamos un estudio histopatológico de los riñones de los ratones utilizados en el estudio.

2.2.- La respuesta humoral, en especial la presencia de anticuerpos antinucleares en suero, es una de las marcas características del LES. Por tal motivo, cuantificamos la producción de dichos anticuerpos y estudiamos la interacción que tendría la melatonina en dicha producción.

2.3.- Un nuevo objetivo que nos planteamos fue el establecer el papel que jugaría la melatonina en el balance de producción de distintas citoquinas. Para realizar este objetivo, determinamos distintas citoquinas en distintos tejidos:

\* Citoquinas que median en la inmunidad innata: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6.

\* Citoquinas que regulan la activación, proliferación y diferenciación linfocitaria: IL-2.

\* Citoquinas que regulan la inflamación de origen inmunitario: IFN- $\gamma$ , IL-10.

2.4.- Como ya hemos comentado anteriormente, los mecanismos oxidativos están acentuados en las enfermedades autoinmunes. Para cumplir este objetivo evaluamos la respuesta oxidativa (NO y LPO) en distintos tejidos y cómo se vería afectada por la administración de melatonina.

2.5.- Debido al marcado papel que desempeñan las hormonas sexuales en el curso y desarrollo de las enfermedades autoinmunes. Nos planteamos como objetivo la determinación de los parámetros anteriormente citados en un modelo con tratamiento hormonal conjunta: las hembras fueron tratadas con testosterona+melatonina, y los machos con estradiol+melatonina.

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 5.1. Animales de experimentación

Para el estudio de la artritis reumatoide se utilizaron ratas Wistar machos y hembras de 10 semanas de vida, criadas en el animalario del Hospital Universitario Virgen Macarena. Los animales recibieron comida y bebida *ad libitum* y fueron mantenidos bajo un fotoperíodo automático de un ciclo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad (L:O 14:10, luz desde las 06:00 hasta las 20:00 horas), y condiciones constantes de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y de humedad ( $45 \pm 5\%$ ).

En el caso de pinealectomía, ratas de 48 horas de vida fueron pinealectomizados utilizando como anestesia una hipotermia profunda. Los animales que fueron usados como controles se les practicó una falsa pinealectomía. Sólo se usaron las ratas machos de 10 semanas de vida.

Para el estudio del Lupus Eritematoso Sistémico, se adquirieron 4 parejas reproductoras de ratones MRL/lpr<sup>Fas</sup> (laboratorios Jackson, ME, USA) y mantenidos en condiciones de esterilidad en el Centro de Experimentación y Producción Animal de la Universidad de Sevilla ubicado en la localidad de Espartinas. Tras superar el período de cuarentena, las parejas reproductoras fueron cruzadas, al igual que las primeras generaciones, hasta obtener una n considerable de ratones para los posteriores experimentos.

## 5.2. Modelo experimental

### 5.2.1. Inducción de la artritis por colágeno

El colágeno tipo II de pollo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) se disolvió en ácido acético 0,1 M a una concentración final de 1 mg/mL. Posteriormente, se dejó reposar toda la noche a  $4^\circ\text{C}$ , tras lo cual fue emulsionado con adyuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich) en una relación 1:1 (v:v).

Las ratas machos fueron divididas al azar en 4 grupos que fueron denominados: IFA, IFA+MEL, CIA, CIA+MEL. Los grupos IFA y IFA+MEL fueron inyectadas con 500  $\mu\text{l}$  de adyuvante incompleto de Freund en la planta de la pata trasera derecha, y fueron utilizados como controles; CIA y CIA+MEL fueron inyectadas con 500  $\mu\text{l}$  de la emulsión CII/FIA en la planta de la pata trasera derecha.

Los grupos IFA+MEL y CIA+MEL recibieron durante 14 días una inyección subcutánea de 100 µl de una solución que contenía 30 mg de melatonina (Sigma-Aldrich). Los grupos IFA y CIA recibieron inyecciones subcutáneas de 100 µl de vehículo (salino con 1% de etanol).

Las ratas pinealectomizadas y falsamente pinealectomizadas también fueron inyectadas con 500 µl de emulsión CII/FIA. Los grupos fueron denominados PX+CIA y SHAM+CIA. Todas las ratas fueron pesadas e inyectadas bajo anestesia con éter a las 11:00 horas del Día 1.

Las ratas hembras fueron divididas aleatoriamente en dos grupos: H-CIA y H-CIA+MEL. Los dos grupos fueron pesadas e inyectadas con 500 µl de emulsión de CII/FIA en la pata trasera derecha. Durante los 14 días de tratamiento, el grupo H-CIA recibió una inyección subcutánea de 100 µl de vehículo, mientras que el grupo H-CIA+MEL recibió diariamente una inyección de melatonina (30 mg de melatonina en 100 µl).

Tras los 14 días de tratamiento las ratas fueron pesadas y matadas por decapitación. La sangre fue recogida en tubos SST II y centrifugados a 3000g durante 15 minutos para la obtención de suero. El suero fue alicuotado para distintas determinaciones.

### 5.2.2. Lupus Eritematoso Sistémico

Los ratones MRL/lpr<sup>Fas</sup> fueron divididos por sexo. Las hembras con 14 semanas de vida fueron randomizadas al azar en 2 grupos. Un grupo recibió durante 1 mes un tratamiento de 30 mg/kg de peso de melatonina disuelta al 1% en etanol en los biberones de agua y fueron denominadas HM, mientras que el grupo control sólo tenían en los biberones agua con un 1% de etanol, y fueron denominadas HC. Posteriormente, otro 2 grupos de ratones hembras (controles y con melatonina) recibieron durante 1 mes inyecciones subcutáneas cada 2 días de 100 µl de una solución de DMSO con propionato de testosterona (Sigma-Aldrich) a una concentración de 50 mg/kg de peso, fueron anotadas HCT y HMT respectivamente

Por otro lado, los machos de 16 semanas fueron divididos en grupo control con 1% de etanol en el biberón y grupo con melatonina a la misma dosis de 30 mg/kg de peso, y fueron designados MC y MM respectivamente. Posteriormente, otro 2 grupos de ratones (control y melatonina) recibieron cada 2 días, inyecciones subcutáneas de 100 µl de una solución de DMSO con benzoato de estradiol (Sigma-Aldrich) a una concentración de 30 mg/kg de peso, y designados MCE y MME respectivamente.

En todos los casos, tras el mes de tratamiento se pesaron los ratones y se mataron por decapitación, recogiendo la sangre en tubos K3E para la obtención de suero por centrifugación a 3000g durante 15 minutos. El suero fue alicuotado y congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriores determinaciones.

### **5.3. Estudio histopatológico**

El estudio histopatológico se realizó en el Departamento de Citología e Histopatología Normal y Patológica con la colaboración de la Dra. Inés Martín Lacave y el Dr. José María Fernández Santos.

#### **5.3.1. Artritis inducida por colágeno**

En el caso de la artritis inducida por colágeno, el estudio histopatológico se realizó en la extremidad en la que se indujo la enfermedad. Después de ser sacrificadas las ratas, las patas traseras derechas fueron amputadas, despellejadas y fijadas en un buffer neutral de formaldehído al 4%. Las muestras fueron descalcificadas en ácido fórmico al 5%, procesadas, embebidas en parafina y cortadas en secciones de 5  $\mu\text{m}$ . Las secciones fueron teñidas con el colorante tricrómico de Masson y evaluadas a microscopía óptica para observar los cambios morfológicos. El grado de severidad de las lesiones histológicas fueron elevadas como leve, moderada, severa y extremadamente severa. Todo el proceso se realizó siguiendo un estricto control de doble ciego.

#### **5.3.2. Lupus Eritematoso Sistémico**

Para el caso del estudio del Lupus Eritematoso Sistémico se usaron los riñones derechos de los ratones MRL-lpr para el análisis histopatológico. Los riñones fueron diseccionados una vez que fueron sacrificados los ratones y fijados en un buffer neutral de formaldehído al 4% y embebidas en parafina. Las secciones de 5  $\mu\text{m}$  fueron teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) y ácido periódico de Schiff. Todas las secciones de los riñones fueron evaluadas a microscópico óptico por dos observadores distintos en condiciones de doble-ciego. El grado de severidad de las lesiones histológicas características de la nefritis lúpica fue evaluada como ausente (-), leve (+), moderado (++) o severa (+++) de acuerdo con la notación de Nose y cols. (2000), un ratón presenta glomerulonefritis cuando presenta al menos lesiones proliferativas y/o lesiones crecientes en más del 50% de 20 o más glomérulo renales.

## 5.4. Obtención de las preparaciones celulares

### 5.4.1. Células del exudado peritoneal

El procedimiento seguido para el aislamiento de células del exudado peritoneal de ratas y ratones es una modificación del método utilizado por Tsunawaki y Nathan (1984) con algunas modificaciones.

#### *a) Reactivos:*

-Solución salina: NaCl 0,9% (p/v) estéril.

- NaCl 0,2% (p/v) estéril.

- Medio completo: Medio RPMI 1640 (BioWhittaker, Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, Verviers, Bélgica) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (BioWhittaker, Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, Verviers, Bélgica) inactivado (56° C durante 30 minutos), 1% de Glucosa, 1% de Anfotericina B y 1% de L-Glutamina/penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich Co., Ltd., Irvine, UK)

#### *b) Procedimiento:*

Una vez decapitado y desangrado el animal se le practica una incisión en la pared abdominal, se introducen 20 ml (ratas) o 10 ml (ratón) de solución salina fría y se lava la cavidad peritoneal masajeando suavemente el abdomen del animal. Con una pipeta de 1 ml y punta estéril, se recupera la solución portadora de las células peritoneales y se vierte en un tubo de 10 ml estéril. Se centrifuga a 600g durante 10 minutos a 4° C. Se desecha el sobrenadante y se resuspende el pellet en 2 ml de NaCl 0.2%, se incuba durante 30 segundos para producir la lisis osmótica de los hematíes contaminantes. Se restaura la osmolaridad con 8 ml de solución salina y se vuelve a centrifugar a 600g durante 10 minutos a 4° C. Se desecha nuevamente el sobrenadante y se resuspende el sedimento celular en 1 ml de medio completo, procediéndose al conteo con Trypan Blue (Sigma-Aldrich Co.), comprobación de la viabilidad celular y ajuste a la concentración deseada. Las células así obtenidas fueron utilizadas inmediatamente para el experimento.

**c) Ratas con CIA:**

Las células a una concentración final de  $1 \cdot 10^6$  células/ml fueron cultivadas por triplicado en placas de 24 ml e incubadas con  $10 \mu\text{g/ml}$  de LPS (Sigma-Aldrich Co.) a  $37^\circ \text{C}$  en una atmósfera del 5% de  $\text{CO}_2$  durante 4 horas para la producción de IL- $1\beta$  y durante 24 horas para la producción de IL-6 y NO. Tras el tiempo de incubación, las células fueron recogidas y centrifugadas a 600 g durante 5 minutos a  $4^\circ \text{C}$ , desechándose el pellet y guardando el sobrenadante a  $-20^\circ \text{C}$  para las posteriores determinaciones.

**d) Ratones MRL-lpr:**

Las células a una concentración final de  $1 \cdot 10^6$  células/ml fueron cultivadas por triplicado en placas de 24 ml e incubadas con  $10 \mu\text{g/ml}$  de LPS a  $37^\circ \text{C}$  en una atmósfera del 5% de  $\text{CO}_2$  durante 24 horas para la determinación de TNF- $\alpha$ , IL- $1\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-10. Tras el tiempo de incubación, las células fueron recogidas y centrifugadas a 600 g durante 5 minutos a  $4^\circ \text{C}$ , desechándose el pellet y guardando el sobrenadante a  $-20^\circ \text{C}$  para las posteriores determinaciones.

**5.4.2. Células mononucleares de sangre periférica**

El proceso de aislamiento se llevó a cabo según la técnica descrita por Boyum (1968), con algunas modificaciones.

**a) Reactivos:**

- Solución para aislamiento de linfocitos Ficoll-Hypaque ( $d = 1.077 \text{ g/ml}$ ).
- Solución salina: NaCl 0,9% (p/v) estéril.
- Heparina sódica.
- Medio completo: RPMI 1640 + Suero bovino fetal 10% + 1% de Glucosa + 1% de Anfotericina B + 1% de L-Glutamina/penicilina/estreptomina



***b) Procedimiento:***

Cuando se decapita al animal se recoge la sangre en tubos estériles de 10 ml previamente heparinizados con 2 gotas de heparina sódica. Se agita suavemente para conseguir una buena anticoagulación. Se hace una dilución 1:1 añadiendo al volumen de sangre un volumen igual de solución salina y se agita suavemente. Esta preparación, se trasvasa cuidadosamente y se dejan resbalar por la pared de un tubo Falcon de 15 ml estéril que contiene 3 ml de solución de Ficoll-Hypaque teniendo cuidado de que no se mezclen. Se centrifuga durante 20 minutos a 1000g y a 4° C. Se recoge con una pipeta Pasteur estéril la interfase blanquecina que contiene las células mononucleares, transfiriéndola a un tubo de 10 ml estéril. Se lava con solución salina centrifugando a 600 g durante 10 minutos a 4° C. Posteriormente, se desecha el sobrenadante y se resuspende el sedimento celular con 1 ml de medio completo, procediéndose al conteo con Trypan Blue, comprobación de la viabilidad celular y ajuste a la concentración celular deseada. Las células así obtenidas fueron utilizadas inmediatamente para el experimento.

***c) Ratas con CIA:***

Las células a una concentración final de  $2 \cdot 10^6$  células/ml fueron cultivadas por triplicado en placas de 24 ml e incubadas con 10  $\mu$ g/ml de LPS a 37° C en una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 horas para la producción de IL-1 $\beta$  y durante 24 horas para la producción de IL-6. Tras el tiempo de incubación, las células fueron recogidas y centrifugadas a 600 g durante 5 minutos a 4° C, desechándose el pellet y guardando el sobrenadante a -20° C para las posteriores determinaciones.

### 5.4.3. Aislamiento de esplenocitos purificados

Los esplenocitos purificados fueron aislados utilizando el método de Boyum (1968) con algunas modificaciones (Calvo y cols., 1986).

**a) Reactivos:**

- Solución para aislamiento de linfocitos Ficoll-Hypaque (d = 1.077 g/ml).
- Solución salina: NaCl 0,9% (p/v) estéril.
- Medio completo: RPMI 1640 + Suero bovino fetal 10% + 1% de Glucosa + 1% de Anfotericina B + 1% de L-Glutamina/penicilina/estreptomicina

**b) Procedimiento:**

Después de haber extraído y pesado los bazos, se cortan y trituran con tijeras en salino frío y se filtran a través de una tela de nylon previamente esterilizada (por difusión del líquido libre de fragmentos de bazo).

A la solución filtrada se le añade 2 volúmenes de salino y esta mezcla se trasvasa con mucho cuidado a un tubo Falcon de 15 ml estéril que contiene 3 ml de Ficoll-Hypaque, y luego se centrifugó a 1000 g durante 20 minutos a 4° C. La interfase se recogió con una pipeta Pasteur estéril y se depositó en un tubo de 10 ml estéril. A continuación, se lavó 2 veces con solución salina centrifugando 10 minutos a 800 g y a 4° C. Desechando el sobrenadante, se resuspendió en medio completo, se procedió al conteo con Trypan Blue de las células y se ajustó a la concentración deseada, utilizándose de forma inmediata en los experimentos.

*c) Ratas con CIA:*

Las células a una concentración final de  $5 \cdot 10^6$  células/ml fueron cultivadas por triplicado en placas de 24 ml e incubadas con  $10 \mu\text{g/ml}$  de LPS a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera del 5% de  $\text{CO}_2$  durante 4 horas para la producción de IL-1 $\beta$  y durante 24 horas para la producción de IL-6 y NO. Tras el tiempo de incubación, las células fueron recogidas y centrifugadas a 600 g durante 5 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , desechándose el pellet y guardando el sobrenadante a  $-20^\circ\text{C}$  para las posteriores determinaciones.

*d) Ratones MRL-lpr:*

Las células a una concentración final de  $1 \cdot 10^6$  células/ml fueron cultivadas por triplicado en placas de 24 ml e incubadas con  $10 \mu\text{g/ml}$  de LPS a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera del 5% de  $\text{CO}_2$  durante 24 horas para la determinación de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-10. También se incubaron por triplicado células a una concentración de  $1 \cdot 10^6$  células/ml con  $8 \mu\text{g/ml}$  de PHA (Sigma-Aldrich, Co.) durante 48 horas para la determinación de IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-2. Tras el tiempo de incubación, las células fueron recogidas y centrifugadas a 600 g durante 5 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , desechándose el pellet y guardando el sobrenadante a  $-20^\circ\text{C}$  para las posteriores determinaciones.

#### 5.4.4. Aislamiento de células de nódulos linfáticos purificados en ratones

**a) Reactivos:**

- Solución salina: NaCl 0,9% (p/v) estéril.
- NaCl 0,2% (p/v) estéril.
- Medio completo: RPMI 1640 + Suero bovino fetal 10% + 1% de Glucosa + 1% de Anfotericina B + 1% de L-Glutamina/penicilina/estreptomina

**b) Procedimiento:**

Una vez diseccionado los nódulos linfáticos axilares derechos se pesan, se cortan y trituran con tijeras en salino frío y se filtran a través de una tela de nylon previamente esterilizada. A la solución filtrada se le añade 2 volúmenes de salino y se centrifuga durante 10 minutos a 800 g y 4° C. Desechando el sobrenadante, se resuspendió en medio completo, se contó las células y se ajustó a la concentración deseada, utilizándose de forma inmediata.

**c) Ratones MRL-lpr:**

Las células a una concentración final de  $1 \cdot 10^6$  células/ml fueron cultivadas por triplicado en placas de 24 ml e incubadas con 10  $\mu$ g/ml de LPS a 37° C en una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas para la determinación de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-10. También se incubaron por triplicado células a una concentración de  $1 \cdot 10^6$  células/ml con 8  $\mu$ g/ml de PHA durante 48 horas para la determinación de IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-2. Tras el tiempo de incubación, las células fueron recogidas y centrifugadas a 600 g durante 5 minutos a 4° C, desechándose el pellet y guardando el sobrenadante a -20° C para las posteriores determinaciones.

## 5.5. Preparación de homogenados de articulación de ratas

El homogenado de la pata de rata se realizó siguiendo las directrices de trabajos anteriores de Halloran y cols. (1999) y Szekanecz y cols. (2000).

### *a) Reactivos:*

- Tampón de lisis: Solución de PBS que contiene 2  $\mu$ M de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 1  $\mu$ g/mL de antipaina, 1  $\mu$ g/mL de aprotinina, 1  $\mu$ g/mL de leupeptina y 1  $\mu$ g/mL de pepstatina A (todos los productos son de la casa comercial Sigma-Aldrich, Co.).

### *b) Procedimiento:*

Se disecciona la pata derecha trasera del animal, aquella donde se inoculó tanto la emulsión de colágeno como la de control. Se le cortan las garras y se le retira la piel a modo de guante. Con una cuchilla se separan cartílagos y músculos intentando dejar totalmente limpia la estructura ósea..

La extremidad se coloca en un tubo Falcon de 50 mL y se le añade 3-5 mL de tampón de lisis. Entonces se homogeniza en hielo con un politrón seguido de una sonicación durante 30 segundos. Los homogenados se centrifugan a 2000 g durante 10 minutos. Se toman los sobrenadantes y éstos son filtrados usando filtros millipore de 0,2  $\mu$ m de diámetro. El sobrenadante filtrado se alícuota y se congela a  $-80^{\circ}$  C hasta su uso.

## 5.6. Determinación de niveles de anticuerpos en suero

### 5.6.1. Niveles de anticuerpos anticolágeno tipo II en ratas

Los niveles de anticuerpo IgG anticolágeno tipo II fueron determinados en suero de las ratas como ha sido descrito previamente por Brahn y cols. (1994) y Halloran y cols. (1999).

#### a) *Reactivos:*

- Colágeno tipo II disuelto en ácido acético 0.1 M y emulsificado 1:1 (v/v) en adyuvante incompleto de Freund.
- Solución de lavado: PBS-T.
- Solución de bloqueo: PBS con BSA al 1%.
- Anticuerpo antiIgG (H+L) de rata conjugado con peroxidasa (Calbiochem, California USA).
- Solución sustrato. Mezcla 1:1 de Tetrametilbenzidina (TMB) y peróxido de hidrógeno.
- Solución de parada: HCl.

#### b) *Procedimiento:*

- Se incuba la placa con 100  $\mu$ L/ pocillo con 40  $\mu$ g/ mL de la emulsión CII/FIA durante toda la noche a 4° C.
- Se lava la placa 3 veces.
- Se añade 300  $\mu$ L/ pocillo de solución de bloqueo y se deja incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
- Se lava la placa 3 veces.
- Se añade 100  $\mu$ L de suero en cada pocillo. Se incuba durante 3 horas a temperatura ambiente. La dilución es 1:2560 en PBS con BSA al 1%.
- Se lava la placa 3 veces.
- Se añade 100  $\mu$ L/ pocillo de anticuerpo secundario y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente.

- Se lava la placa 5 veces.
- Se añade solución sustrato y se deja incubar en oscuridad durante 20-30 minutos.
- Se para la reacción con solución de parada y se lee en el lector de placas a 490 nm.

### **5.6.2. Niveles de anticuerpos en ratones MRI-lpr**

En el suero de los ratones MRL/lpr<sup>Fas</sup> se determinó los niveles de inmunoglobulinas y anticuerpos antiDNA de doble cadena según la técnica descrita Matsuzawa y cols. (2000) y Zhang y cols. (2000); también se determinó los niveles de anticuerpos anticolágeno tipo II siguiendo la técnica ya descrita para ratas con algunas modificaciones.

#### **5.6.2.1. Cuantificación de niveles de inmunoglobulinas totales**

##### **a) Reactivos:**

- Anticuerpo policlonal IgGAM (H+L) (Zymed, S. Francisco, CA, USA).
- Solución de bloqueo: PBS con BSA al 3%.
- Solución de lavado: PBS con 5% de Tween 20 (PBS-T).
- Suero de referencia de ratón (ICN).
- Anticuerpo antiIgM biotinilado (Calbiochem, Los Angeles, CA, USA).
- Anticuerpo antiIgG biotinilado (Calbiochem, Los Angeles, CA, USA).
- Solución sustrato: mezcla 1:1 (v/v) de TMB y peróxido de hidrógeno.
- Solución de parada: HCl.

**b) Procedimiento:**

- A una placa de ELISA se añade 100 µl/pocillo de anticuerpo anti IgGAM (H+L) a una concentración de 1 mg/mL para la determinación de IgM y de 2 mg/mL para la determinación de IgG.
- Se deja incubar toda la noche a 4° C.
- Se lavan 3 veces las placas en el lavador con una solución de PBS-T.
- Se bloquean las placas con 300 µl de solución de bloqueo. Se deja incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
- Lavar 3 veces las placas.
- Se añaden las muestras de suero previamente diluidas en PBS, 1/10000 para IgM y 1/500000 para IgG, y los estándares. Se realizan las curvas patrones a través de diluciones seriadas, 1000-15,6 ng/mL para IgM y 2000-31,3 ng/mL para IgG.
- Se deja incubar durante 3 horas a temperatura ambiente.
- Se lavan las placas 5 veces.
- Se añade 100 µl/pocillo de anticuerpo secundario (antiIgM o antiIgG biotinilado) diluido a la concentración indicada por el comerciante. Se incuba 1 hora a temperatura ambiente.
- Se lavan las placas 5 veces.
- Se añade solución de sustrato y se deja incubar 20-30 minutos en oscuridad.
- Añadir 50 µL de solución de parada.
- Leer en un lector de placas a 490 nm. Se realiza la curva estándar y se extrapolan las densidades ópticas y se multiplica por el factor de dilución para obtener las concentraciones de IgM e IgG en suero.



**5.6.2.2. Cuantificación de niveles de anticuerpos antiDNA de doble cadena**

**a) Reactivos:**

- Poli-L-Lisina (Sigma, USA).
- DNA de timo de ternero (Sigma, USA).
- Solución de bloqueo: PBS con BSA al 3%.
- Solución de lavado: PBS con Tween 20 al 5% (PBS-T).
- Anticuerpo antiIgM biotinilado (Calbiochem, Los Angeles, CA, USA).
- Anticuerpo antiIgG biotinilado (Calbiochem, Los Angeles, CA, USA).
- Solución sustrato: mezcla 1:1 (v/v) de TMB y peróxido de hidrógeno.
- Solución de parada: HCl.

**b) Procedimiento:**

- Se añade 100  $\mu$ L/pocillo de una solución de 50  $\mu$ g/mL de poli-L-Lisina disuelta en PBS.
- Se deja incubar durante 12 horas a 4° C.
- Se lavan las placas 3 veces.
- Se añaden 200  $\mu$ L de DNA de timo de ternero a 2  $\mu$ g/mL en PBS.
- Se deja incubar toda la noche a 37° C.
- Se lavan las placas 3 veces.
- Se añade 300  $\mu$ L de solución de bloqueo y se deja incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
- Se lavan las placas 3 veces.
- Se añaden las muestras de suero previamente diluidas en PBS, 1/200 para IgM y 1/1000 para IgG, y los estándares 100-1,56  $\mu$ g/ mL para IgM y 200-3,13  $\mu$ g/ mL para IgG.
- Se deja incubar durante 3 horas a temperatura ambiente.
- Se lavan las placas 5 veces.
- Se añade 100  $\mu$ L/pocillo del adecuado anticuerpo biotinilado diluido en PBS. Y se deja incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.

- Se lavan las placas 5 veces.
- Se añade 100  $\mu$ L/ pocillo de solución sustrato y se incuba durante 20-30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
- Se añade 50  $\mu$ L/ pocillo de solución de parada y se lee en el lector de placas a 490 nm.
- Se realiza la curva patrón y se extrapola los valores de las densidades ópticas obtenidas, se multiplica por el factor de dilución y se obtienen las concentraciones de anticuerpos IgM e IgG antiDNA de doble cadena en suero.

### **5.6.2.3. Cuantificación de los niveles de anticuerpos anticolágeno tipo II**

#### **a) Reactivos:**

- Colágeno tipo II disuelto en ácido acético 0,1 M y emulsificado 1:1 (v/v) en adyuvante incompleto de Freund.
- Solución de lavado: PBS-T.
- Solución de bloqueo: PBS con BSA al 1%.
- Estándares de IgM e IgG para la creación de las curvas patrones: 100-1,56  $\mu$ g/ mL para IgM, y 200-3,13  $\mu$ g/ mL para IgG.
- Anticuerpo antiIgM biotinilado (Calbiochem, Los Angeles, CA, USA).
- Anticuerpo antiIgG biotinilado (Calbiochem, Los Angeles, CA, USA).
- Solución sustrato. Mezcla 1:1 de TMB y peróxido de hidrógeno.
- Solución de parada: HCl.

#### **b) Procedimiento:**

La metodología para determinar los niveles de anticuerpos IgM e IgG anticolágeno fue la misma que se siguió para la determinación en el caso de las ratas con artritis inducida por colágeno.

## **5.7. Determinación de citoquinas**

### **a) Determinación de citoquinas en ratas artríticas**

Se determinaron las citoquinas IL-1 $\beta$  e IL-6 por el método de ELISA siguiendo las recomendaciones del fabricante (R&D Systems). Las mediciones se realizaron: en suero, en sobrenadante de cultivo celular: de esplenocitos, de células mononucleares de sangre periférica, de células del exudado peritoneal, y en sobrenadante de homogenado de articulación.

### **b) Determinación de citoquinas en ratones MRL-lpr**

Se determinaron las siguientes citoquinas: IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-2 siguiendo las recomendaciones del fabricante (OptEIA Set, Pharmingen, San Diego, California, USA). Las determinaciones se realizaron en sobrenadante de cultivos celulares de células del exudado peritoneal, de esplenocitos purificados y de nódulos linfáticos.

## 5.8. Determinación de los niveles de Nitrito/Nitrato

La cuantificación de los niveles de nitrito/ nitrato como indicador de la producción de óxido nítrico se realizó siguiendo la metodología estuvo basada en experimentos previos de Spangler y cols. (1996). En ratas con CIA se determinó en suero (diluído 1:10 en PBS), en sobrenadante de homogenado de pata y en sobrenadante de cultivo celular de células del exudado peritoneal y de esplenocitos. En ratones MRL-lpr se determinó en suero (diluído 1:5 en PBS).

### a) *Reactivos:*

- Solución de PBS.
- 600 mU de nitrato reductasa en tampón fosfato 100 mM (pH 7.4).
- 250  $\mu$ M de NADPH en tampón fosfato 100 mM (pH 7.4).
- Reactivo de Griess: mezcla 1:1 (v/v) de sulfanilamida al 1 % en H<sub>2</sub>O destilada y dihidrocloruro de naftiletilendiamida al 0.1% en H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 5%.

### b) *Procedimiento:*

- En una placa de 96 pocillos se aplica 50  $\mu$ L/ pocillo de muestra.
- Se le añade 25  $\mu$ L de nitrato reductasa para que la concentración final sea de 60 mU/ pocillo.
- Se le añade 25  $\mu$ L de NADPH para que la concentración final sea de 25  $\mu$ M/ pocillo.
- Se deja incubar en oscuridad durante 3 horas a temperatura ambiente.
- Se añade 100  $\mu$ L/ pocillo de reactivo de Griess y se deja incubar durante 10 minutos.
- Se lee en el lector de placas a 550 nm.
- Las concentraciones de nitrato se calculan por comparación con una curva patrón de nitrato sódico 100-1  $\mu$ M.

### 5.9. Determinación del grado de peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica (LPO) es un mecanismo bien establecido de daño celular tanto en plantas como en animales, y se usa como indicador de estrés oxidativo en células y en tejidos. Los peróxidos lipídicos son inestables y se descomponen para formar una serie de componentes complejos incluyendo componentes carbonilos reactivos. Los peróxidos de ácidos grasos poliinsaturados generan malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenos (HAE) en la descomposición. La medición de MDA y HAE ha sido utilizada como indicador de peroxidación lipídica (Esterbauer, 1991). El método LPO-586 está diseñado para medir MDA solo (con ácido clorhídrico) o medir MDA con HAE (con ácido metanosulfónico).

El ensayo LPO-586 está basado en la reacción de un agente cromogénico, N-metil-2-fenilindol, con MDA y HAE a 45° C. Una molécula de MDA o de HAE reacciona con 2 moléculas de N-metil-2-fenilindol para formar un cromógeno estable con absorbancia máxima a 586 nm.

#### *a) Reactivos:*

- N-metil-2-fenilindol en acetonitrilo
- Ácido metanosulfónico
- 4-hidroxinonenal, dietilacetal en acetonitrilo
- 1,1,3,3-tetrametoxipropano en Tris-HCl (TMOP)
- Metanol
- Acetonitrilo
- Hidroxitolueno butilado
- HCl 37% (12N)
- Tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7,4

#### *b) Preparación de tejidos:*

Se pesó el cerebro. Para preparar el homogenado se agregó 10 ml de tampón fosfato 20 mM, pH 7,4 por cada 2-3 gramos de tejido y se homogenizó con un politrón. Al homogenado se le añade 10 ml de hidroxitolueno butilado 0.5 M para prevenir la oxidación de las muestras. Se centrifuga el homogenado a 3000g durante 10 minutos a 4° C y se recoge el sobrenadante, una alícuota se guarda para determinación de proteínas.

**c) Procedimiento:**

- Preparar la curva estándar a unas concentraciones finales de: 0, 2.5, 5, 10, 15, 20 mM.
- Añadir 200 µl de muestra en un tubo de 5 mL
- Añadir 650 µl de solución diluida de trabajo (mezcla de 1 volumen de metanol con 3 volúmenes de N-metil-2-fenilindol). Mezclar con vortex.
- Añadir 150 µl de HCl al 37% para el ensayo de MDA o 150 ml de ácido metanosulfónico para el ensayo de MDA+4-HAE. Mezclar con vortex y tapar los tubos.
- Incubar a 45° C durante 45 minutos para el ensayo de MDA, o durante 60 minutos para el ensayo de MDA+4-HAE.
- Parar la reacción durante 5 minutos en hielo.
- Centrifugar las muestras a 15000g durante 15 minutos.
- Transferir el sobrenadante a una cuveta y medir la absorbancia a 586 nm.

**d) Cuantificación:**

Las ecuaciones para determinar las concentraciones de MDA y MDA+4-HAE son:

$$[\text{MDA}] = (A - A_0) \times 5/e$$

$$[\text{MDA+4-HNE}] = (A - A_0) \times 5/e$$

Donde:

- A, es la absorbancia que presenta la muestra
- $A_0$ , es la absorbancia en ausencia de muestra
- 5, es el factor de dilución de la muestra de la cubeta (200ml de muestra en un volumen final de 1 ml)
- e, es el coeficiente de extinción molar. Su valor es de 120,000

Los datos se refieren a cantidad de mg de proteínas del sobrenadante. La determinación de proteínas se realizó siguiendo la metodología de Bradford (1976).

### **5.10. Cuantificación de niveles hormonales en suero**

Se determinaron los niveles de testosterona, estradiol y cortisol en suero de las ratas artríticas. Para efectuar dicha determinación los sueros fueron diluídos 1:5 en PBS y leídos en el Hospital Universitario Virgen Macarena.

### **5.11. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos en los distintos experimentos se analizaron mediante los programas Sigma Stat de Jandel Scientific Software y SPSS de Microsoft Corporation. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM. Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron como significativos.

En el estudio de ratas con CIA, la comparación entre los grupos IFA, IFA+MEL, CIA y CIA+MEL se realizó mediante el test two-way de ANOVA. Las comparaciones de pares múltiples se realizó mediante el test de Student-Newman-Keuls. La comparación entre los grupos PX+CIA y SHAM+CIA, y entre los grupos H-CIA y H-CIA+MEL se realizó mediante el test de one-way de ANOVA seguido del test de Tukey a posteriori.

En el estudio de los ratones MRL-lpr, la comparación entre los grupos HC, HM, MC y MM se realizó mediante el test two-way de ANOVA. Las comparaciones de pares múltiples se realizó mediante el test de Student-Newman-Keuls. La comparación entre los grupos HCT y HMT, y entre los grupos MCE y MME se realizó mediante el test de one-way de ANOVA seguido del test de Tukey a posteriori.

## 6 . RESULTADOS





## 6.1. ESTUDIO DE LA ACCIÓN DE LA MELATONINA EN LA ARTRITIS REUMATOIDE EN RATAS MACHOS

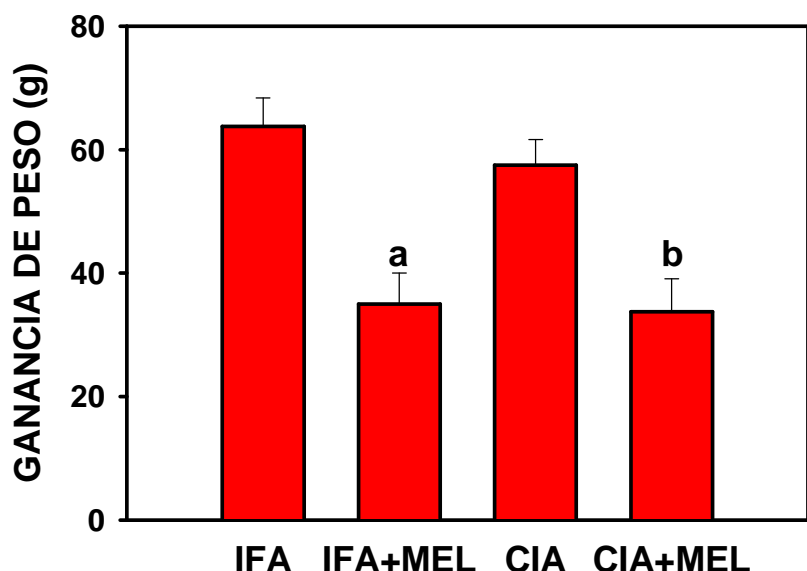
### 6.1.1. Inducción de la enfermedad en ratas Wistar

Para el estudio de la Artritis Reumatoide utilizamos un modelo animal ampliamente empleado en la investigación: artritis inducida por colágeno en ratas Wistar macho.

Las ratas macho de 14 semanas de edad fueron pesadas antes de ser repartidas en 4 grupos aleatoriamente. Los grupos fueron denominados IFA, IFA+MEL, CIA, y CIA+MEL. Los grupos IFA e IFA+MEL fueron inyectados intraplantarmente en la pata trasera derecha con 0,5 ml de adyuvante incompleto de Freund (FIA), y fueron utilizados como grupos controles. Los grupos CIA y CIA+MEL recibieron una inyección intraplantar de 0,5 ml de una emulsión de colágeno tipo II de pollo disuelta en acético 0,1 M y emulsionada 1:1 (v/v) con FIA (C-II/FIA). Las inyecciones se realizaron bajo anestesia de éter a las 11:00 h y se tomó ese día como día 0 del experimento. Durante 14 días, los grupos IFA+MEL y CIA+MEL recibieron una inyección subcutánea en la base de la cola de las ratas de 0,1 ml conteniendo 30 mg de melatonina disuelta en 1% de etanol y salino. Los grupos IFA y CIA recibieron durante esos 14 días una inyección subcutánea de 0,1 ml de salino con etanol al 1%. Las inyecciones se realizaron diariamente a las 19:00, una hora antes del período de oscuridad (ciclo 14:10).

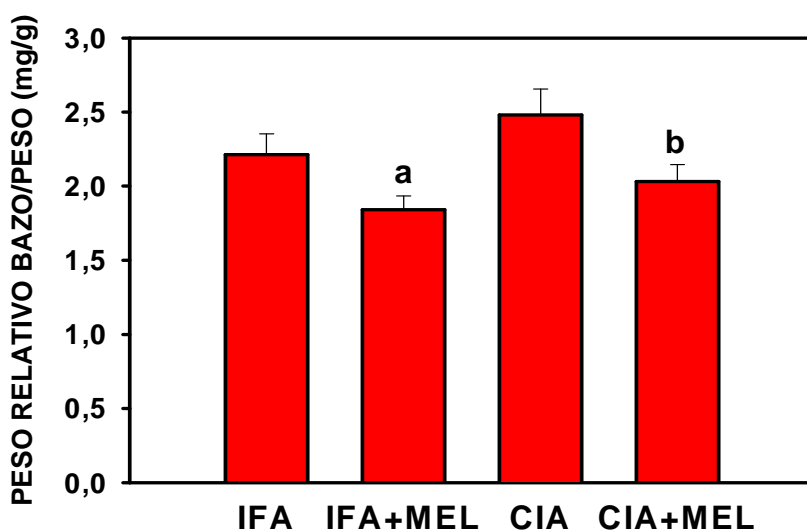
Tras 14 días de tratamiento, las ratas volvieron a ser pesadas y sacrificadas por decapitación. La sangre fue recogida en tubos para la obtención de suero y los tejidos fueron extirpados asépticamente para los posteriores estudios.

En la figura 14, observamos la ganancia de peso ocurrida durante los 14 días de tratamiento. Esta ganancia de peso fue obtenida restando el peso en el día 14 del peso del día 0. Observamos que el tratamiento diario con melatonina reduce la ganancia de peso respecto a sus grupos controles (IFA versus IFA+MEL  $p < 0.05$  y CIA versus CIA+MEL,  $p < 0.05$ ) independientemente de tratarse de una situación normal (en el caso de los grupos controles), o de tratarse de una situación patológica (en el caso de los grupos en los que ha sido inducida la enfermedad).



**Figura 14.** Efecto de la melatonina en la ganancia de peso en ratas inyectadas con emulsión FIA o C-II/FIA. Los datos se obtuvieron restando el peso de las ratas en el día 14 y el día 0, los valores están expresados como la media  $\pm$  SEM de 10 animales por grupo. a, IFA versus IFA+MEL,  $p < 0,05$ ; b, CIA versus CIA+MEL,  $p < 0,05$ .

En la figura 15, podemos observar el peso relativo del bazo en los distintos grupos. En ambos casos, situación normal y situación con artritis, la administración de melatonina reduce el tamaño y peso del bazo (IFA versus IFA+MEL,  $p < 0.05$ ; CIA versus CIA+MEL,  $p < 0.05$ ), sin que haya diferencia significativa entre los grupos.



**Figura 15.** Efecto de la melatonina en el peso relativo de los bazos de cada grupo. Los datos se obtuvieron dividiendo el peso del bazo (mg) entre el peso del animal al día 14 (g). Los valores están expresados como la media  $\pm$  SEM de 10 animales por grupo. a, IFA versus IFA+MEL,  $p < 0,05$ ; b, CIA versus CIA+MEL,  $p < 0,05$ .

## 6.1.2. Estudio histopatológico de la articulación afectada por la enfermedad

Tratamiento	Inflamación tisular	Hiperplasia sinovial	Inflamación linfocítica Sinovial	Erosión del Cartílago	Formación ósea superiosteal	Hiperplasia de la médula ósea
<b>IFA</b>	++	-	+	-	++	+
<b>IFA+MEL</b>	+++	+	++	-	++	+
<b>CIA</b>	+++	+++ (P)	++	+	++	+
<b>CIA+MEL</b>	++++	++ (P)	++	+	+	++

**Tabla 1.** Examen histopatológico de las articulaciones, de los tejidos periarticulares circundantes y de los huesos de las extremidades afectadas en todos los grupos experimentales. Negativo (-); Leve (+); Moderado (++); Severo (+++); Grave (++++); (P), pannus ocasional.

Como se puede observar en la Tabla 1, el grado de gravedad de las lesiones histológicas fue evaluada como leve, moderada, severa o extremadamente severa. En todos los animales se encontró evidencias de inflamación y edema en la articulación afectada. En las ratas que fueron inyectadas con FIA, se observó una infiltración celular leve y tejido intracapsular en el sinovio (C), siendo la inflamación mayor en el grupo IFA+MEL (D). Sin embargo, los cambios histopatológicos fueron más evidentes en los grupos inyectados con la emulsión CII/FIA que en los grupos controles.

Otra característica que se pudo detectar es la presencia de infiltrado linfocítico en el sinovium. El infiltrado celular estaba compuesto principalmente por leucocitos y macrófagos y éste aumentaba en todos los grupos tras la administración de melatonina. Tanto en el grupo CIA como en el grupo CIA+MEL se pudieron observar una inflamación de la cápsula sinovial y de los tejidos adyacentes, presentado infiltrado celular en el grupo CIA (E) y una hiperplasia de la membrana sinovial en el grupo CIA+MEL (F).

## **7 . DISCUSIÓN**



## 7.1. ACCIÓN DE LA MELATONINA EN LA ARTRITIS REUMATOIDE

Para investigar el papel que tiene la melatonina en la AR nos planteamos al principio tres objetivos: a) estudiar el efecto que tendría la administración de melatonina exógena en ratas machos; b) investigar si la pinealectomía altera el desarrollo de la enfermedad; c) estudiar el efecto que tendría la administración de melatonina exógena en la patología en función del género.

Para realizar todos estos puntos, utilizamos el modelo animal de la artritis inducida por colágeno (CIA) en ratas. Este modelo experimental fue descrito en ratas por primera vez por Trentham y cols. en 1977 y puede ser inducido además en ratones (Wooley y cols., 1981) y en primates (Trentham, 1982) con inyecciones de colágeno tipo II del cartílago articular. La patología observada en las articulaciones es muy similar a la que podemos encontrar en pacientes artríticos (Stuart y cols., 1982a, 1982b) y en la patogénesis de la enfermedad está involucrada tanto la respuesta inmune celular como la humoral.

La CIA se caracteriza, como en humanos, por desarrollar una poliartritis simétrica en las articulaciones que origina su destrucción por erosión y por presentar elevados niveles de anticuerpos anti-colágeno en suero (Brahm, 1991; Aono y cols., 1997). Por ese motivo, analizamos los niveles de anticuerpos anti-colágeno en los distintos grupos. Nuestros resultados indican que, en machos los niveles de melatonina endógena son necesarios para la producción de anticuerpos anti-colágeno. Este resultado concuerda con lo expuesto por Hansson y cols., (1992, 1993) que observaron que la administración de melatonina elevaba los niveles de anticuerpos anticógeno en ratones con artritis, mientras que la pinealectomía los reducía. El mecanismo de acción propuesto para esta elevación de la respuesta humoral tras la administración de melatonina es a través del sistema opioide, mientras que la pinealectomía inhibía la función inmune humoral a través de la disminución de G-CSF y GM-CSF en médula ósea (Maestroni y cols., 1987; Kuci y cols., 1988).

Los niveles de producción de anticuerpos están más elevados en hembras que en machos. Este hecho se entiende en el contexto de que las hembras, en general, presentan una respuesta inmune humoral mayor que en machos (Törnwall y cols., 1999) y por la mayor disposición a padecer AR de las hembras sobre los machos, con un ratio de 4:1 respectivamente (Abbas y cols., 1994). En segundo lugar observamos que, la administración de melatonina en hembras disminuye los niveles de anticuerpos anti-colágeno en suero. Esto sugiere el que, la melatonina juegue un papel distinto dependiendo del sexo en la respuesta inmune humoral y que la acción de la melatonina sobre esta respuesta sea a través de un mecanismo

indirecto o bien dependiente de las hormonas sexuales.

El modelo experimental de CIA está íntimamente asociado a una respuesta inmune celular y concretamente con una elevada producción de citoquinas inflamatorias que contribuyen a la degradación y erosión articular (Issekutz y cols., 1994; van de Loo y cols., 1995; Koch y cols., 1995; van Lent y cols., 1995; Zubelewicz y cols., 1999). Entre estas citoquinas inflamatorias se encuentran la IL-1 $\beta$  y la IL-6. La IL-1 $\beta$ , producida principalmente por los macrófagos en el sinovium (Szekanecz y cols., 2000), es clave en la inflamación, en el aumento de la producción de NO, en la reabsorción ósea y en la inhibición de la matriz del cartílago (Cochran y cols., 1966; Dayer y Demczuk, 1984; van de Loo y van den Berg, 1990; Arend y Dayer, 1990; Roodman, 1993). La IL-6 es producida principalmente por monocitos, células T y fibroblastos en respuesta a los niveles de TNF- $\alpha$  y IL-1 $\beta$  producidos en el sinovium.

Como era previsible, todos los grupos que fueron inmunizados con colágeno tipo II de pollo presentaron niveles de IL-1 $\beta$  y de IL-6 muy superiores a sus respectivos controles. En todos los tejidos en los que fueron determinadas estas citoquinas se observó el siguiente patrón: la administración de melatonina exógena eleva los niveles de IL-1 $\beta$  e IL-6, tanto en hembras como en machos; por el contrario, la disminución de la síntesis endógena de melatonina produjo una disminución de la producción de citoquinas inflamatorias, lo que confirma que la melatonina actúa como un agente proinflamatorio posiblemente a través de la activación de los monocitos y los linfocitos Th por el mecanismo de la PKC (Morrey y cols., 1994; García-Mauriño y cols., 1997, 1998 y 1999). Otro resultado interesante de la determinación de citoquinas inflamatorias fue que las hembras artríticas tuvieron niveles de IL-1 $\beta$  y IL-6 más elevados que los machos artríticos.

Por lo tanto podemos concluir que los grupos que tuvieron unos niveles de citoquinas inflamatorias más elevados tuvieron una mayor erosión y degradación del cartílago. De hecho, esta conclusión se confirmó con el estudio histopatológico de las articulaciones dañadas con artritis, pues los grupos con niveles de citoquinas inflamatorias más elevados presentaron signos más evidentes de inflamación.

De esta forma, podemos asegurar que la melatonina juega un papel fundamental en el curso y desarrollo de la AR por su acción proinflamatoria. Esta afirmación está en contraposición con lo descrito por Harbuz y cols. (1996 y 1998). Estos autores otorgan este papel proinflamatorio a la serotonina basándose en que los niveles plasmáticos de serotonina y la actividad serotoninérgica se encuentran elevados en este modelo (Persch y cols., 1993).



---

Su observación se basó en la administración de p-Clorofenilalanina, un inhibidor reversible de la TH, que disminuía los niveles de serotonina y con ello se reducía la severidad de la inflamación articular. Obviamente, al inhibir la TH, se reducen los niveles plasmáticos de serotonina, pero con ellos también se reducen los niveles de melatonina, porque la serotonina es un intermediario en la ruta sintética de la melatonina. Por lo tanto, es la melatonina, y no la serotonina, el agente proinflamatorio y el que provoca la anómala producción de ARNm de CRF en el núcleo paraventricular.

Una de las consecuencias del incremento de la producción de IL-1 $\beta$  es que estimula la producción de NO. NO se produce en los condrocitos articulares por acción de la enzima iNOS en respuesta a la activación inducida por IL-1 y otros agentes (Tamura y Ohmori, 2001). La relación entre la severidad de la artritis y los niveles de NO fue puesta de manifiesto por McCartney-Francis y cols. en 1993. En nuestro estudio, determinamos los niveles de NO en distintos tejidos (suero, bazo, exudado peritoneal y en articulación) y encontramos que al igual que ocurriría con las citoquinas inflamatorias hay una gran diferencia cuando se compara la producción de NO en hembras y en machos, siendo mayor en las primeras que en los segundos en todos los tejidos estudiados. La segunda observación es que la acción que ejerce la melatonina en la producción de NO varía según la situación: alejada del foco inflamatorio o en el mismo foco inflamatorio.

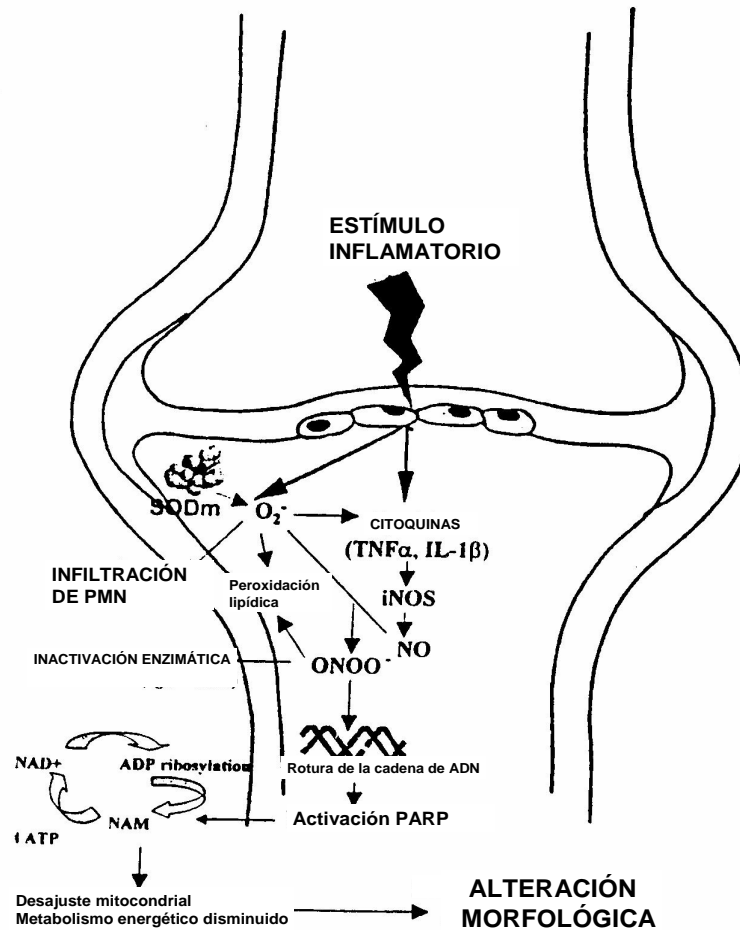
En tejidos alejados del foco inflamatorio (suero, esplenocitos y células del exudado peritoneal) la administración de melatonina en machos ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad NOS (Pozo y cols., 1994) provocando una disminución de los niveles de NO en estos tejidos. Esta tendencia también se observa en aquellos machos artríticos que fueron pinealectomizados, ya que al tener reducida la síntesis de melatonina endógena, presentaron niveles de NO más altos que en aquellas ratas macho falsamente operadas. Esta acción ejercida por la melatonina es un mecanismo de regulación y de control ejercido por la propia neurohormona. Hemos descrito anteriormente, como la melatonina posee un marcado efecto estimulador que incrementa la producción de distintas citoquinas inflamatorias que a su vez estimulan la producción de NO. Para controlar la adecuada respuesta y restablecer el equilibrio inmune la melatonina controla la producción de NO para que la respuesta inflamatoria no se exceda en el tiempo.

Este control se pierde sin embargo en una situación severa como es el caso de una articulación afectada de artritis. En esta situación, en la que las células T y los monocitos que han emigrado al foco inflamatorio se encuentran hiperactivados (los niveles de IL-1 $\beta$  y de IL-6 fueron mayores en la articulación que en suero), la melatonina sólo ejerce la capacidad proinflamatoria, bien porque ha perdido o porque no puede ejercer su acción reguladora sobre la producción de NO. Es por ello, que en la articulación de las ratas tratadas con melatonina, los niveles de NO son mayores que en las ratas que recibieron salino. Esta observación se confirma en el grupo de ratas artríticas pinealectomizadas que presentaron niveles de NO menores que el grupo falsamente operadas. Estos datos concuerdan con los experimentos realizados por Cutolo y cols. (1999b) en cultivos de macrófagos sinoviales de pacientes artríticos, donde la administración de melatonina aumentaba la producción de NO y de IL-12.

Esta misma explicación se puede aplicar al grupo de hembras artríticas. Las hembras tratadas con melatonina presentaron niveles más bajos de NO en suero, pero presentaron niveles elevados tanto en la articulación como en cultivos de esplenocitos y de células del exudado peritoneal. En el caso de las hembras, las células T y los monocitos de bazo y células del peritoneo se encuentran tan hiperactivadas que la administración de melatonina no consigue regular la producción de NO.

El NO reacciona con el anión superóxido, una potente molécula citotóxica y proinflamatoria, originando peroxinitritos (Beckman y cols., 1990; Cuzzocrea y cols., 2000b; Salvemini y cols., 2001), que al descomponerse da lugar a la aparición de radicales hidroxilos altamente reactivos (Andersson y Ekström, 1997). Estos peroxinitritos y otros ROS originan daño y necrosis celular a través de varios mecanismos, entre los que se incluye desnaturalización proteica, daño en el DNA y peroxidación de la bicapa lipídica de las membranas celulares (Cuzzocrea y cols., 2000b). Con el objeto de estudiar este efecto en nuestro modelo, determinamos el grado de LPO en distintos tejidos.

La melatonina actúa como un potente antioxidante que regula la actividad de la G6PDH y GSH-PX y aumenta los niveles de la superóxido dismutasa y de la glutatión peroxidasa incluso a niveles fisiológicos (Tan y cols., 1994; Barlow-Walden y cols., 1995; Pablos y cols., 1995; Pierrefiche y Laborit, 1995; Reiter y cols., 1995b y 1997; Antolín y cols., 1996; Kotler y cols., 1998; Benot y cols., 1999). En suero y en cerebro, tejidos alejados del foco inflamatorio, los niveles de LPO fueron menores en los grupos que recibieron melatonina exógena y en el grupo falsamente operados (por tanto, con la capacidad de producir melatonina endógena intacta).

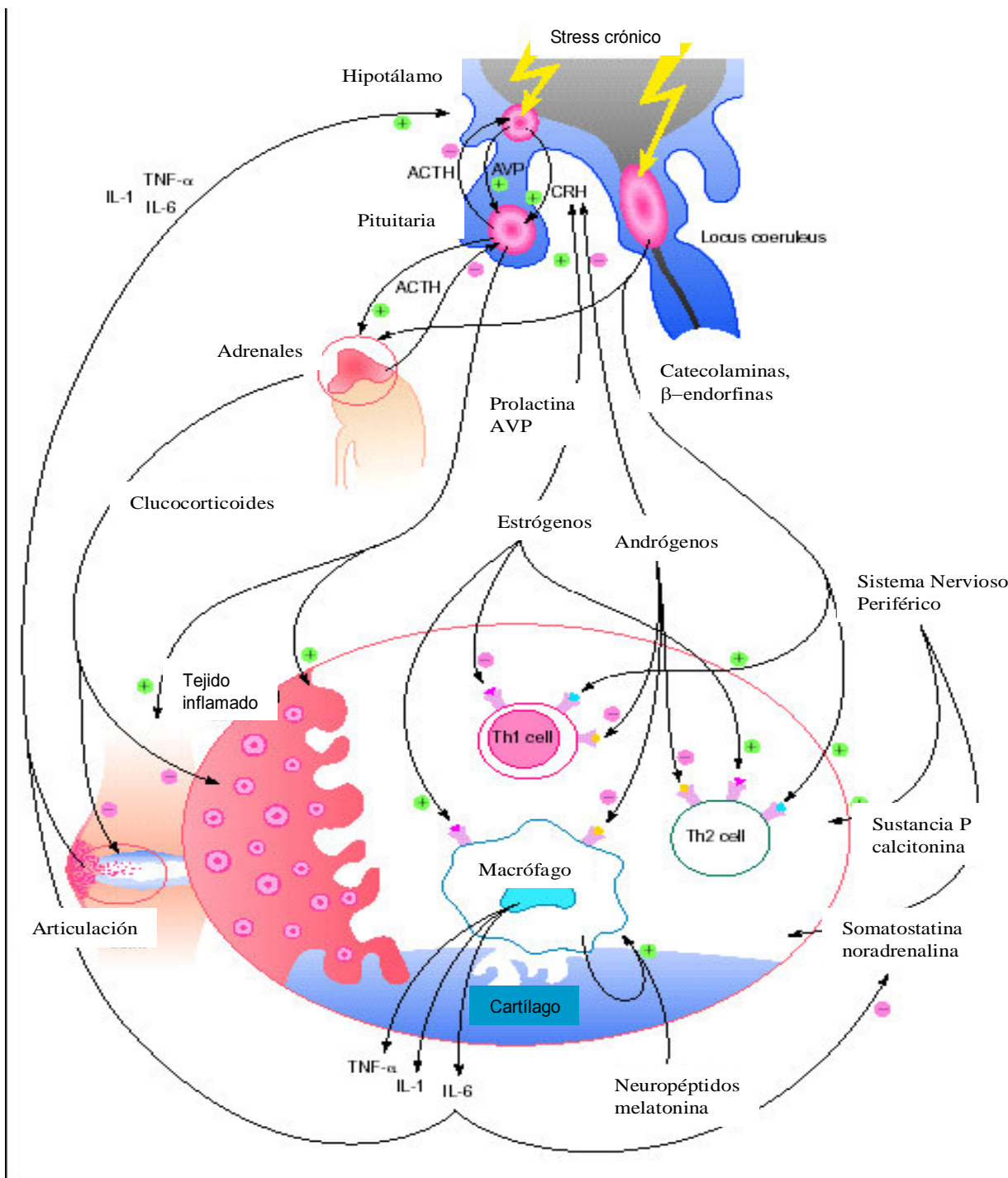


**Figura 76.** Esquema de los acontecimientos que ocurren en una articulación afectada de artritis.

Este dato refuerza la teoría antes expresada, en la que la melatonina en zonas alejadas del foco inflamatorio posee capacidad proinflamatoria y antioxidante, con lo que regula de manera eficiente la respuesta inmune celular.

Por el contrario, en la articulación donde se encuentra el foco inflamatorio, la melatonina sólo posee la capacidad proinflamatoria porque como observamos en los tres grupos de experimentación, los niveles de LPO fueron mayores en aquellos grupos tratados con melatonina y en el falsamente operado. Estos resultados confirman el papel regulador que tendría la melatonina y como la pérdida de ese control desemboca en una activación crónica de las células implicadas en la degradación y erosión del cartílago.

Por último, y debido a las diferencias observadas en la severidad de la enfermedad entre machos y hembras procedimos a determinar la influencia del eje HPA a través de los niveles de cortisol, y la influencia del eje HPG midiendo los niveles de testosterona y estradiol en suero de las ratas estudiadas.



**Figura 77.** Esquema simplificado de las interacciones neuroinmunoendocrinas en el tejido sinovial inflamado en Artritis Reumatoide. La estimulación de una ruta está indicada con '+' y la inhibición con '-'. Por ejemplo, los estrógenos estimulan la producción de cortisol (a través de CRH), a los macrófagos y a las células Th2, pero inhibe a las células Th1. ACTH: hormona adrenocorticotropa; AVP: Arginina vasopresina; calcitonina grp: péptido relacionado con el gen de la calcitonina; CRH: Hormona liberadora de corticotropina; IL: interleuquinas; Th: linfocitos T helper; TNF: factor de necrosis tumoral.

Los datos obtenidos tras la medida de cortisol mostraron que los niveles se correlacionaban con la severidad de la enfermedad, es decir, aquellos grupos de ratas artríticas que presentaron una respuesta inflamatoria mayor presentaron mayores niveles de cortisol y viceversa. En este sentido, las hembras artríticas tuvieron un mayor grado de hipercortisolinemia que los machos y los grupos que recibieron melatonina exógena, o que tenían intacta la síntesis de melatonina endógena, presentaron más hipercortisolinemia que los grupos artríticos que sus respectivos controles. Estos datos tienen relevancia en el sentido de que, el aumento de la producción de cortisol es una respuesta normal ante situaciones de estrés o de inflamación y que está mediado por acciones centrales y periféricas de las propias citoquinas (Cutolo y cols., 2000). De hecho, está demostrado que las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  (del Rey y Besedovsky, 2000) estimulan el eje HPA de forma sinérgica o independiente activando la CRH a nivel hipotalámico (Bijlsma y cols., 1999). La capacidad de estimulación es mayor para la IL-1 $\beta$ , que estimula la producción de CRH, ACTH y corticosterona (Berkenbosch y cols., 1987; Sapolsky y cols., 1987; Uehara y cols., 1987). Una vez activado el eje HPA, se elevan los niveles de glucocorticoides en la corteza adrenal que actúan a nivel de la transcripción de los genes inhibiendo la producción de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  y la producción de leucotrienos y prostaglandinas (Williams y Yarwood, 1990; O'Connor y cols., 2000), con lo que se recstabiliría la situación de equilibrio.

De este modo, la hipercortisolinemia encontrada en los grupos artríticos sería una respuesta normal ante la inflamación. Pero hay evidencias que sugieren que esta regulación está alterada en AR. En recientes estudios realizados en pacientes con AR se ha descrito que la actividad global del eje HPA permanece extraordinariamente normal, con niveles de ACTH normales y con una inapropiada producción normal de niveles de cortisol (West, 1957; Gudbjörnsson y cols., 1996; Crofford y Wilder, 1997b). Esto nos lleva a pensar en dos posibles causas: la primera es que la alteración se encuentre a nivel hipotalámico en la producción de CRH. En este sentido, varios autores han observado una disminución de los niveles de ARNm de CRF en el núcleo paraventricular en varios modelos experimentales de enfermedades autoinmunes (revisado por Harbuz y cols., 1999). La segunda causa sería a nivel celular. Es lógico pensar que en una situación traumática como el que se produce en el sinovium de una articulación afectada con artritis, las células T y los macrófagos estén continuamente hiperactivadas ante el reconocimiento y presentación de numerosos antígenos, y que ante esta situación de hiperactivación, los linfocitos y los monocitos no respondan ante los estímulos antiinflamatorios del cortisol. El cortisol a través de un mecanismo downregulation presentaría niveles basales normales a largo plazo. Por lo tanto, la hipercortisolinemia

encontrada en el suero de nuestras ratas artríticas tras 14 días de tratamiento, es inversamente proporcional a la baja respuesta que las células inflamatorias presentan ante el cortisol. A mayor hipercortisolínemia, menor acción antiinflamatoria del cortisol sobre las células inflamatorias, con lo que habría una mayor inflamación y por lo tanto, mayor severidad de la artritis, y viceversa. La pérdida del control de la respuesta ante el estrés y la inflamación en la AR estaría originada por el fallo del mecanismo de reconocimiento de lo propio de los linfocitos T que reconocen como extraño sustancias propias de la articulación, con lo que los linfocitos T y los monocitos permanecen en un permanente estado de hiperactivación sin responder ante los estímulos antiinflamatorios, perpetuándose el estado inflamatorio y desencadenándose, finalmente, la erosión y la degradación del cartílago.

Por último con respecto al tercer objetivo que planteamos, los resultados obtenidos de la determinación de hormonas pertenecientes al eje HPG (testosterona y estradiol) demostraron que:

\*En machos, la administración de melatonina reduce los niveles séricos de testosterona y de estradiol.

\* La pinealectomía aumenta los niveles séricos de testosterona.

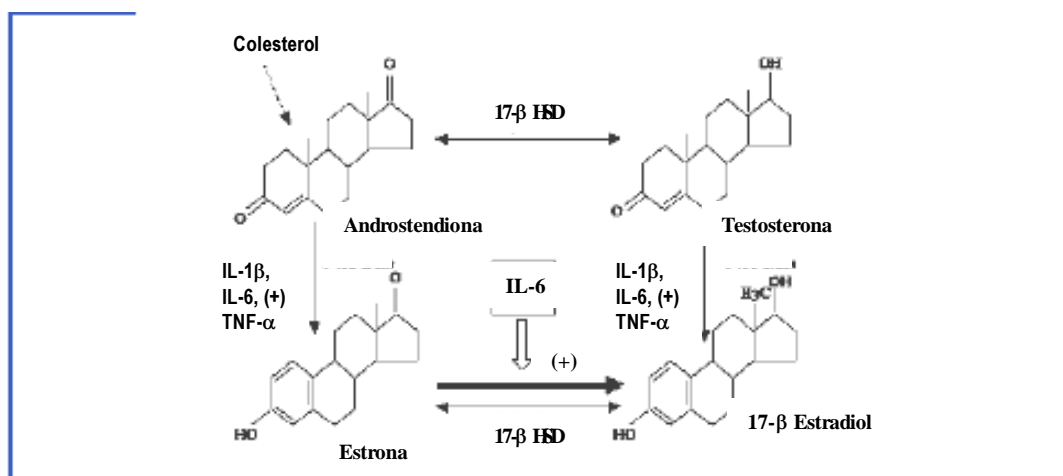
\* En hembras, la administración de melatonina no varía los niveles de testosterona mientras que eleva los de estradiol.

De acuerdo con la bibliografía existente, la respuesta inmune en machos depende más del eje HPG que del eje HPA, en particular, el hipoandrogenismo ha sido involucrado en la patogénesis de la AR en hombres (Cutolo y Straub, 2000). Esto está de acuerdo con nuestros resultados, donde encontramos que los niveles de estradiol no juegan un papel importante y sí los niveles de testosterona en el curso de la CIA. Se ha demostrado que los andrógenos son protectores en la AR, como muestra el hecho de que se hayan encontrado bajas concentraciones de testosterona sérica en hombres artríticos (Wilder, 1996; Cutolo y Castagnetta, 1996b; Cutolo y cols., 1998). En nuestro modelo, la bajada de los niveles séricos de testosterona en las ratas artríticas macho tratadas con melatonina sería indicativo de mayor grado de enfermedad. Posiblemente el mecanismo implicado sea el efecto inhibitorio que posee la melatonina sobre la actividad GnRH (Brzenzinski y cols., 1987a, 1987b). Los efectos inherentes a una menor producción de testosterona son: una menor regulación negativa sobre la producción de citoquinas inflamatorias en macrófagos y sobre la producción de anticuerpos IgG en linfocitos B (Cutolo y Straub, 2000). Todo ello conllevaría a que la melatonina en machos aumentaría la producción de citoquinas inflamatorias y la producción de autoanticuerpos, como ha quedado demostrado en nuestro trabajo.

En una situación de síntesis endógena de melatonina reducida, como la pinealectomía, los niveles de testosterona están más elevados al no sufrir el efecto negativo de la melatonina, de este modo, al tener mayor concentración de testosterona habrá una mayor protección, porque supondría una menor producción de citoquinas inflamatorias y de autoanticuerpos.

En hembras, por el contrario, la respuesta inmune depende más del eje HPA (cortisol) que del eje HPG (testosterona y estradiol) (Cutolo y Straub, 2000), como muestra el hecho de que los niveles de testosterona y de estradiol fueron muy inferiores en hembras que en machos.

La comparación entre los dos grupos de hembras deparó que los niveles séricos de testosterona no variaron con el tratamiento con melatonina pero no así los de estradiol que se vieron aumentados por dicho tratamiento. Este aumento de los niveles circulantes de estradiol puede ser explicado a través de los estudios que demuestran que las citoquinas inflamatorias (IL-6, IL-1 y TNF- $\alpha$ ) pueden estimular la actividad aromatasa en tejidos periféricos (Nestler, 1993; Macdiarmid y cols., 1994; Purohit y cols., 1995). La aromatasa es la enzima encargada de la conversión periférica de andrógenos (testosterona y androstendiona) en estrógenos (estrone y estradiol respectivamente). Además, el aumento en la actividad aromatasa induce a su vez, la producción de las citoquinas inflamatorias a nivel local (Cutolo y Straub, 2000). En tejidos donde abundan los macrófagos, se ha encontrado una fuerte correlación entre la actividad aromatasa y la producción de IL-6, de hecho se ha encontrado que la IL-6 media en la actividad de la enzima 17 $\beta$ -hidroxiesteroide dehidrogenasa, enzima que convierte la estrone en estradiol (Speirs y cols., 1993; Purohit y cols., 1995). Por lo tanto, el aumento de los niveles séricos de estradiol en ratas hembras artríticas tratadas con melatonina se debe a la mayor producción de citoquinas inflamatorias, aunque la severidad de la enfermedad se deba a la respuesta del cortisol.



**Figura 78.** Hormonas sexuales y citoquinas en tejidos sinoviales. El aumento de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , y especialmente IL-6, producen aumento de 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>).

**7.2. ACCIÓN DE LA MELATONINA EN EL LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO**

Para estudiar el papel que desempeña la melatonina en el LES utilizamos ratones MRL/MpJ-Fas<sup>lpr</sup> (MRL-lpr), que es un modelo animal ampliamente utilizado para el estudio de LES. Esta cepa de ratones desarrollan espontáneamente una enfermedad autoinmune generalizada muy semejante al LES humana y que se caracteriza por presentar GMN mediada por inmunocomplejos, linfadenopatía, artritis, vasculitis y producción de anticuerpos (Andrews y cols., 1978; Hang y cols., 1982; Theofilopoulos y Dixon, 1985; Cohen y Eisenberg, 1991; Goulet y cols., 1999). Los ratones MRL-lpr son homocigóticos para el gen linfoproliferativo (lpr), cuya mutación conlleva la inactivación del gen fas y por consiguiente una apoptosis deficiente de los linfocitos autorreactivos (células T CD4-CD8-) que se van acumulando en tejidos linfoides periféricos (Murphy y Roths, 1978; Watanabe-Fukunaga y cols., 1992; Watson y cols., 1992; Nagata y Golstein, 1995b). Aparte del gen lpr, hay otros factores y otros genes que influyen en la severidad y en las manifestaciones de la enfermedad de los ratones MRL-lpr (Izui y cols., 1984; Santoro y cols., 1988). En la patogénesis de los ratones MRL-lpr están implicados los linfocitos T CD4+  $\alpha\beta$ + que estimulan a las células B autorreactivas (Santoro y cols., 1988; Peng y cols., 1996; Kotzin, 1996). Sin embargo, el papel que desempeñan los linfocitos Th1 y Th2 es controvertido, ya que hay indicios de que son las citoquinas producidas por las células Th1 (IFN- $\gamma$ ) las implicadas en la patogénesis de la enfermedad, mientras que otros autores sostienen que son las citoquinas producidas por los linfocitos Th2 (IL-10) las fundamentales en el desarrollo del lupus.

En un estudio realizado por Lechner y cols. en 1996 se pudo constatar que en ratones MRL-lpr la secreción de melatonina no seguía el típico ritmo circadiano, sino que había un pico de producción durante el día, por lo que nos propusimos estudiar cuál sería el efecto que tendría la administración de melatonina en los ratones MRL-lpr.

Debido a que la enfermedad autoinmune es más severa en ratones MRL-lpr hembras que en machos, se dividieron los grupos según el sexo para estudiar cómo actuaría la melatonina según el sexo del animal.



Después de un mes de tratamiento con melatonina se observó que la mortalidad fue mayor en las hembras que en los machos. Este dato tiene correlación con lo ya observado en la literatura, donde las MRL-lpr hembras experimentan una mortalidad más temprana que los machos (Andrews y cols., 1978; Murphy y Roths, 1978; Theofilopoulos y Dixon, 1985). La administración de melatonina redujo la mortalidad en las hembras en comparación con las hembras control, sin embargo, la mortalidad fue mayor en los machos tratados con melatonina en comparación con los machos controles. Estos datos de mortalidad se vieron subrayados con los datos obtenidos referentes a la hiperplasia linfoide y la esplenomegalia características de esta enfermedad (Hagiwara y cols., 2000). En este sentido, los grupos de hembras presentaron una mayor linfadenopatía y esplenomegalia que los machos. Sin embargo, cuando a los ratones se le administró melatonina disminuyó el tamaño del bazo y el de los nódulos linfáticos.

Medimos los niveles de autoanticuerpos IgM e IgG como marcadores de la enfermedad. Los resultados demostraron que:

- a) Las hembras controles presentaban niveles mayores de IgG total que los machos. Este dato está recogido en la bibliografía, en la que se apunta que las hembras poseen mayor respuesta inmune humoral que los machos (Törnwall y cols., 1999).
- b) La administración de melatonina reduce los niveles de autoanticuerpos (Ig total, anticuerpos anti-DNADs y anticuerpos anti-colágeno tipo II) en las hembras y los eleva en machos.

Por consiguiente, si los niveles de producción de anticuerpos anti-DNADs se consideran como los marcadores indicadores del grado y severidad del lupus (Kotzin, 1996), podemos asegurar que la enfermedad es más leve en hembras tratadas con melatonina que en hembras controles, mientras que la administración de melatonina en machos acelera los síntomas de la enfermedad respecto a sus controles.

También se determinaron en suero la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y IL-6) y de los niveles de NO. Los resultados demostraron que:

- a) No había diferencias entre los grupos controles.
- b) La administración de melatonina en hembras provoca una disminución de la capacidad inflamatoria cuando la comparamos con las hembras controles, mientras que en machos provoca un aumento del status inflamatorio en comparación con los controles.
- c) Los machos tratados con melatonina poseen mayor producción de agentes proinflamatorios que las hembras tratadas con melatonina.

El que haya un elevado status proinflamatorio está relacionado con las manifestaciones de la enfermedad, como es el caso de la nefritis, la vasculitis y la artritis (Andrews y cols., 1978; Cohen y Eisenberg, 1991). Esta situación proinflamatoria está provocada por un aumento en la activación de los macrófagos (Dang-Vu y cols., 1987; Weinberg y cols., 1994) que producen mayor cantidad de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y IL-6 (Boswell y cols., 1988; Murray y cols., 1990) y por consiguiente una excesiva producción de NO, que es muy importante en el inicio y progresión de la GMN en los ratones MRL-lpr (Weinberg y cols., 1994; Reilly y cols., 2000). De hecho estas observaciones se vieron confirmadas con el estudio histopatológico de los riñones, donde los grupos que presentaron mayores niveles de citoquinas inflamatorias presentaron mayores lesiones renales.

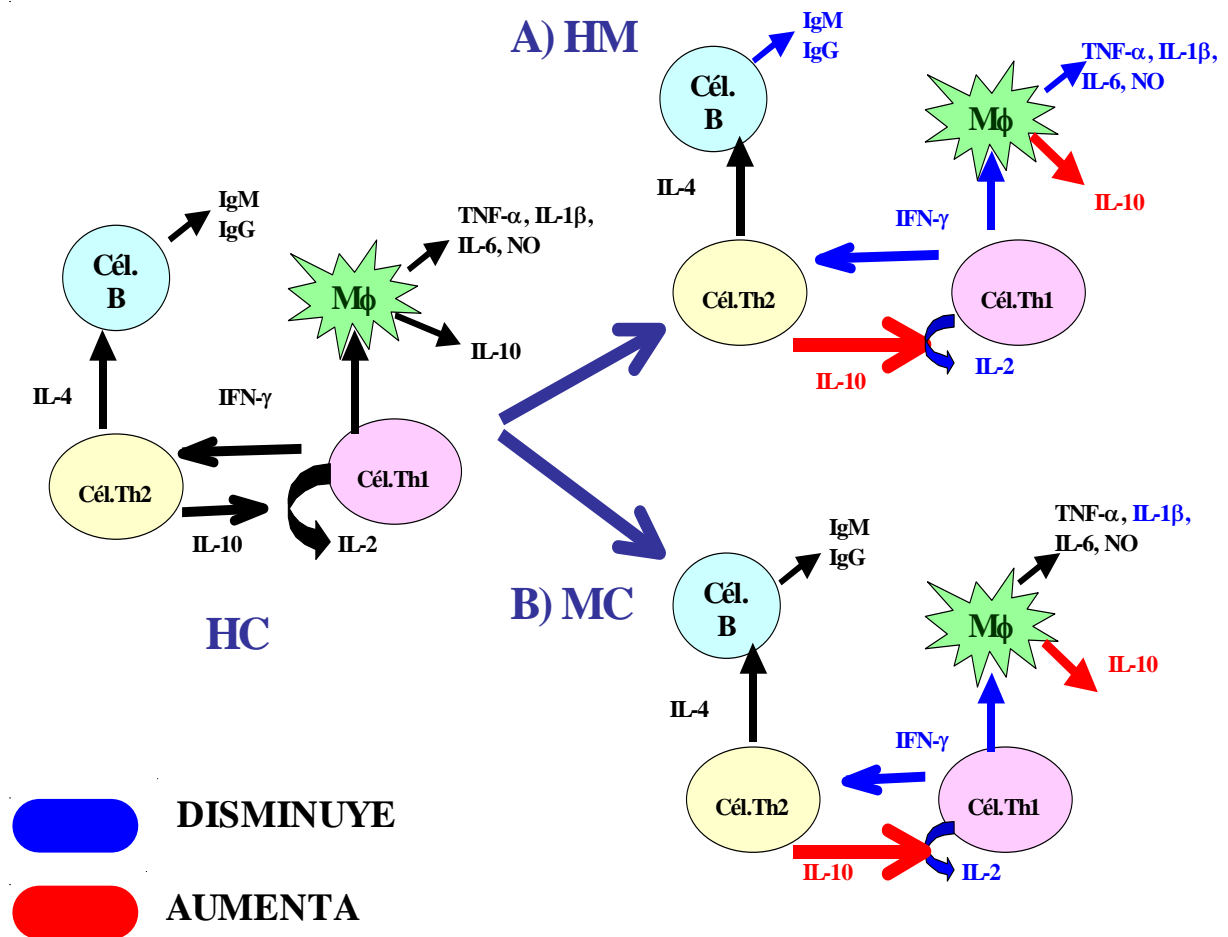
También se determinó en suero la IL-2, esta citoquina regula la activación, la proliferación y la diferenciación linfocitaria. Nuestros datos demostraron que:

- a) Hay mayor producción de IL-2 en las hembras controles que en los machos controles.
- b) La administración de melatonina en hembras reduce los niveles de IL-2.
- c) La administración de melatonina en machos produce un aumento en la producción de IL-2 en comparación con los machos controles y con las hembras tratadas con melatonina.

Es decir, que hay una mayor estimulación y diferenciación de las células Th1 en hembras controles y en machos tratados con melatonina que en los machos controles y que en las hembras tratadas con melatonina.

Se determinaron los niveles de IFN- $\gamma$  e IL-10 por ser citoquinas que regulan la inflamación de origen inmunitario. El IFN- $\gamma$  es una citoquina producida por las células Th1 que estimula la acción proinflamatoria en monocitos y macrófagos e inhibe la acción de las células Th2, mientras que la IL-10, producida por linfocitos Th2 y macrófagos tiene acción antiinflamatoria. Los resultados en suero demostraron que:

- a) Las hembras controles poseen niveles de IFN- $\gamma$  más elevados y niveles de IL-10 más bajos que los machos controles.
- b) Cuando se administra melatonina en hembras disminuyen los niveles de IFN- $\gamma$  y aumentan los niveles de IL-10 respecto a hembras controles. La administración de melatonina en machos produce un aumento de IFN- $\gamma$  y una disminución de los niveles de IL-10 en comparación con los machos controles.
- c) Las hembras tratadas con melatonina poseen un mayor estado antiinflamatorio en comparación con los machos tratados, que poseen un mayor estado proinflamatorio.



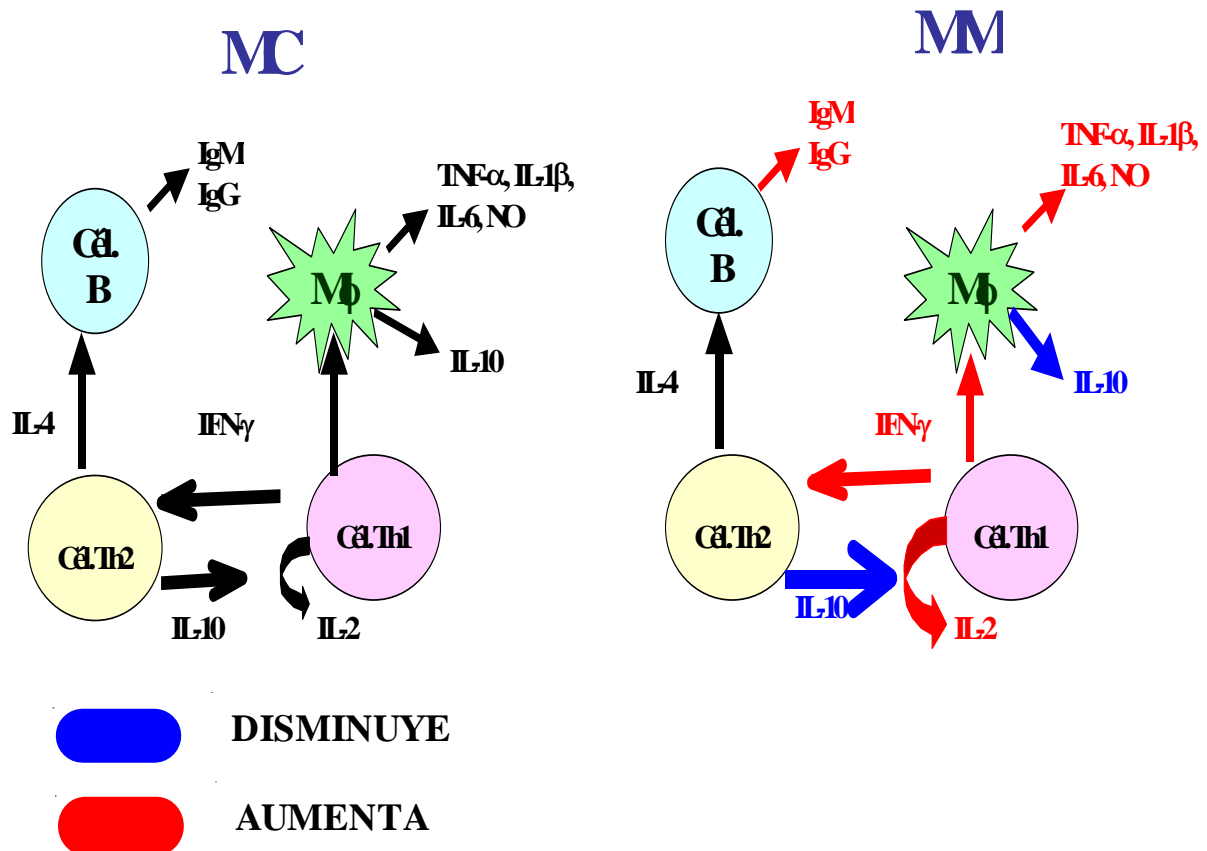
**Figura 79.** Esquema comparativo propuesto de las interacciones celulares en las siguientes situaciones: A) Hembras MRL-lpr tratadas con melatonina (HM) en comparación con hembras controles (HC); B) Machos control (MC) en comparación con HC.

Durante las últimas décadas, numerosos investigadores han centrado sus investigaciones en el IFN- $\gamma$ . Esta citoquina ejerce su acción sobre la mayoría de las células del sistema inmune, incluyendo macrófagos, células T, células B y natural killer (NK). En ratones MRL-lpr el IFN- $\gamma$  aumenta la producción de IgG2a y IgG3, isotipos de IgG que están implicados en la GMN. Además, también acelera el desarrollo del lupus aumentando la expresión de MHC y la presentación de autoantígenos a células T no-tolerantes. También está implicada en los procesos inflamatorios y de respuesta inmune local (Balomenos y cols., 1998). Se ha demostrado que la administración de IFN- $\gamma$  in vivo acelera el progreso de la enfermedad, mientras que el tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-IFN- $\gamma$  o con receptor de IFN- $\gamma$  soluble, retrasa el inicio de la enfermedad en ratones NZB/W F1, y en menor medida en ratones MRL-lpr (Mishra y cols., 2003). Por otro lado, hay evidencias de que la citoquina IL-10, puede modular negativamente el desarrollo del lupus en ratones a través de la inhibición de citoquinas de linfocitos Th1 (Moore 2001).

Este efecto sólo es efectivo en las fases iniciales de la enfermedad, ya que en estadios más avanzados, se ha demostrado que los niveles de IL-10 están elevados (Dayan 2000; Yin 2002). De este modo, en etapas iniciales de la enfermedad, situaciones en la que predomina la capacidad proinflamatoria, es decir aumento de IFN- $\gamma$  y disminución de IL-10, se produce un empeoramiento del desarrollo de la enfermedad, como es en el caso de hembras controles y en machos tratados con melatonina. Sin embargo, en machos controles y en hembras tratadas con melatonina predomina la situación antiinflamatoria, es decir, disminución de IFN- $\gamma$  y aumento de IL-10, que conlleva una mejoría en el desarrollo de la enfermedad. Por lo tanto, podemos asegurar que los grupos con niveles elevados de IFN- $\gamma$  (hembras controles y machos tratados con melatonina) padecen una enfermedad más severa: mayor producción de autoanticuerpos, mayor grado de GMN y mayor inflamación. Mientras que los grupos con niveles de IL-10 más elevados (hembras tratadas con melatonina y machos controles) presentan signos de enfermedad más atenuados.

Con el objetivo de estudiar el papel de los linfocitos Th y de los monocitos/macrófagos en ratones MRL-lpr estudiamos la producción *in vitro* de las citoquinas estudiadas en suero en cultivo celulares de esplenocitos y en células de nódulo linfático. Las células fueron estimuladas con PHA para estudiar la producción de IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-2 por parte de los linfocitos Th1 y Th2. Los resultados demostraron que la producción de citoquinas seguía el mismo patrón que observamos en suero, es decir, mayor capacidad antiinflamatoria en machos controles y en hembras tratadas con melatonina y mayor capacidad proinflamatoria en las hembras controles y en machos tratados con melatonina.

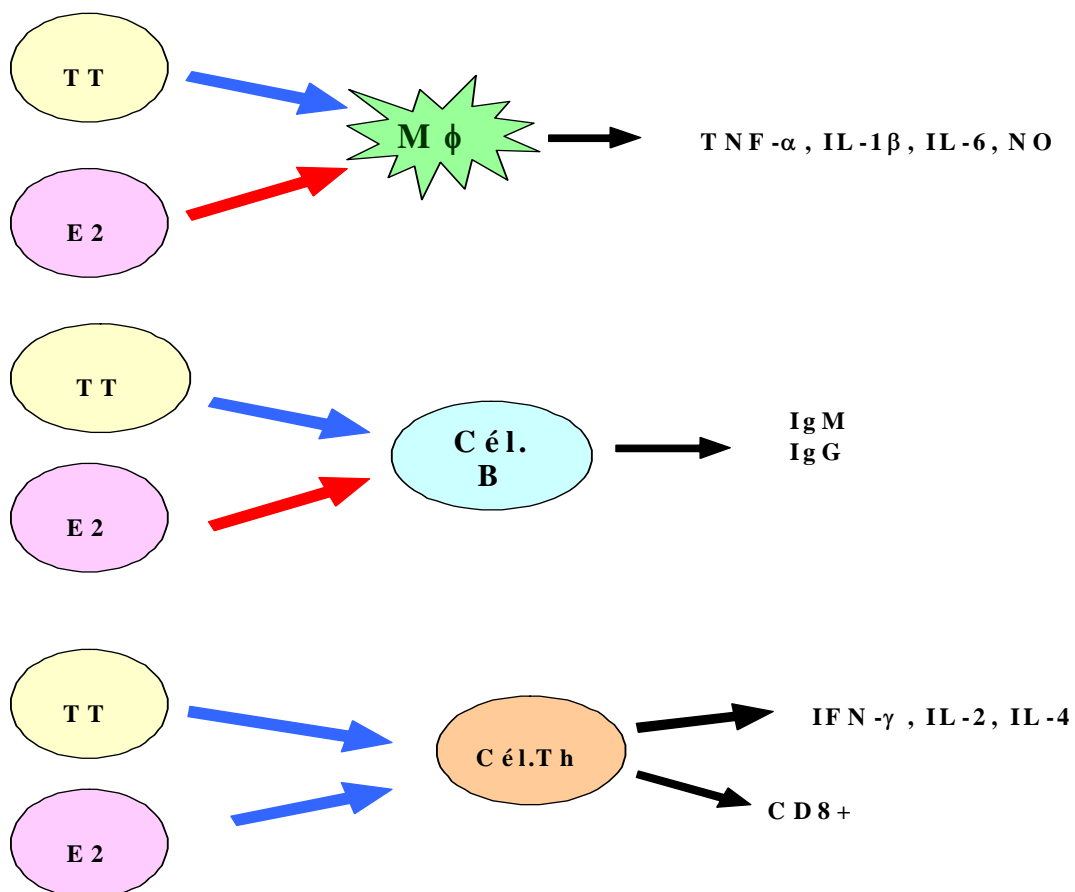
Por otra parte, las células fueron estimuladas con LPS para estudiar la producción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$  y IL-10 por parte de los monocitos/macrófagos y linfocitos Th1. En esta ocasión, los datos obtenidos fueron paradójicos. Se encontró que hubo una mayor respuesta proinflamatoria en los machos controles y en las hembras con melatonina (cuando en suero era lo contrario), y una mayor respuesta antiinflamatoria en hembras controles y en machos tratados con melatonina. Estos datos demuestran que en machos controles y en hembras tratadas con melatonina la respuesta Th1 no está afectada, sino que por acción de la IL-10, hay un predominio de la respuesta Th2 pero sin aumento de la producción de autoanticuerpos. Mientras que en las hembras controles y en machos tratados con melatonina lo que predomina es la respuesta Th1 por acción del IFN- $\gamma$ .



**Figura 80.** Esquema comparativo propuesto de las interacciones celulares en la comparación entre machos MRL-lpr controles (MC) y machos tratados con melatonina (MM).

Para explicar el efecto dependiente del sexo que se observa con la administración de melatonina nos basamos en la acción inhibitoria que posee la melatonina sobre la liberación de la GnRH (Brzezinski y cols., 1987a y 1987b). La GnRH es la hormona responsable de la producción de hormonas sexuales en las gónadas. Por lo tanto, en hembras, la administración de melatonina conlleva una producción disminuida de estrógenos. Está demostrado que los estrógenos acelera el desarrollo del LES (Lahita, 1996; Liang y Karlson, 1996). Los estrógenos estimulan la producción de citoquinas inflamatorias por los macrófagos y monocitos (Cutolo y Straub, 2000), aumentan la producción de autoanticuerpos por linfocitos B (Carlsten y cols., 1989), aumentan los niveles de ARNm de IFN- $\gamma$  y IL-2 (Karpuzoglu-Sahin y cols., 2001a y 2001b). Por lo tanto, con la administración de melatonina disminuimos los niveles de estrógenos y por consiguiente se produce: una disminución en la producción de citoquinas inflamatorias en macrófagos/monocitos, menor producción de autoanticuerpos por parte de células B y disminución de los niveles de IFN- $\gamma$  e IL-2. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en nuestro trabajo.

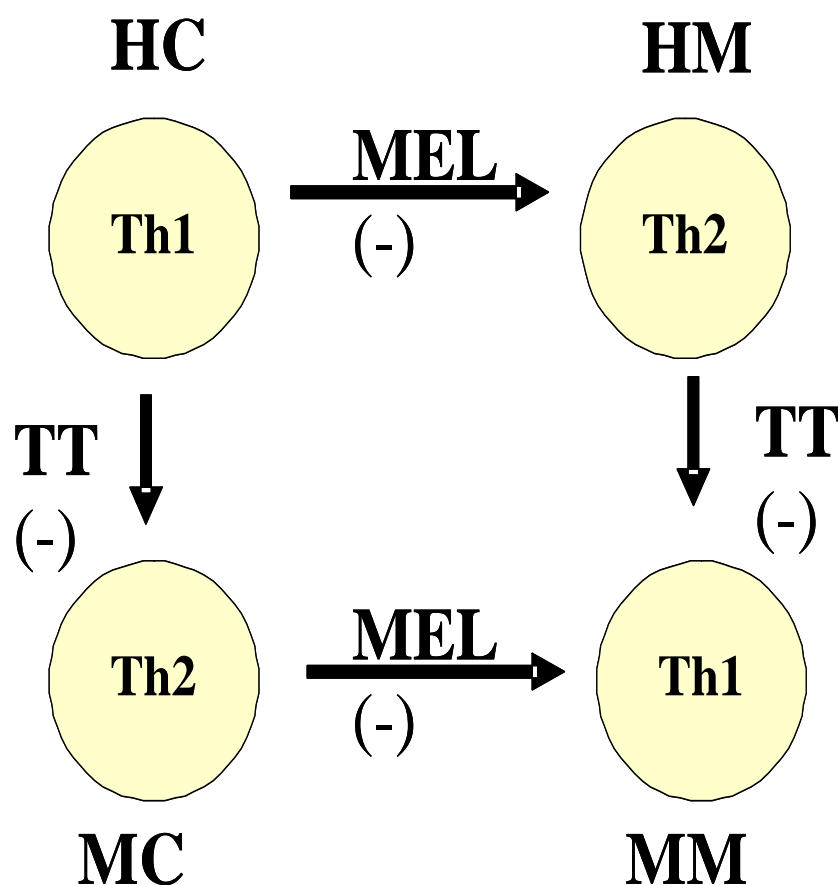
Sin embargo, la administración de melatonina conllevaría una disminución en los niveles de andrógenos. Los andrógenos, principalmente la testosterona, reducen la producción de IL- $\beta$  e IL-6 en monocitos (Cutolo y cols., 1995b; Kanda y cols., 1996), disminuyen la producción de autoanticuerpos (Mosmann y Sad, 1996; van Griensven y cols., 1997) y disminuyen la producción de IL-4, IL-5 e IFN- $\gamma$  sin afectar la producción de IL-2 (Araneo y cols., 1991). Por lo tanto, la disminución de testosterona como consecuencia de la administración de melatonina produjo un aumento de la producción de citoquinas inflamatorias en monocitos y macrófagos, mayor producción de autoanticuerpos, y aumento de IFN- $\gamma$  e IL-2 producidas por los linfocitos T.



**Figura 81.** Efectos estimuladores (rojo) e inhibidores (azul) de los andrógenos (TT) y estrógenos (E2) en la producción de citoquinas e inmunoglobulinas. Basadas en la figura de Cutolo y Straub (2000).

En resumen, las hembras MRL-lpr, en el inicio de la enfermedad tienen una respuesta Th1 predominante (proinflamatoria) y con mayores niveles de autoanticuerpos por acción del IFN- $\gamma$ , mientras que los machos poseen una respuesta Th2 (antiinflamatoria) predominante. Este cambio del tipo de respuesta inmune es producido por las hormonas sexuales y es la responsable de que las hembras padezcan el lupus con mayor virulencia que los machos.

La administración de melatonina produce un cambio en el tipo de respuesta. Así, en hembras, el predominio de la respuesta inmune pasa de ser Th1 a Th2, con la consiguiente mejoría en los síntomas de la enfermedad. En machos, por el contrario, el cambio de respuesta conlleva pasar de una respuesta inmune Th2 a Th1, con lo que se agravan los síntomas y se acelera el desarrollo de la enfermedad.



**Figura 82.** cambio de respuesta de las células Th en ratones MRL-lpr. MEL: Melatonina; TT: Testosterona; HC: Hembras controles; HM: Hembras tratadas con melatonina; MC: Machos controles; MM: Machos tratados con melatonina.

### Ratones MRI-lpr con tratamiento hormonal

Como quedó demostrado en el capítulo anterior, la incidencia del lupus en ratones MRL-lpr está determinada por el sexo de los ratones, y concretamente por las hormonas sexuales: estrógenos y andrógenos. Esta influencia hormonal quedó reflejada cuando se le administró melatonina a los ratones ya que actuaba modulando los niveles de hormonas sexuales. Con el objeto de confirmar lo expuesto anteriormente, diseñamos un experimento con terapia hormonal, tratando a las hembras de MRL-lpr con testosterona y a los machos con estradiol.

Después de 1 mes de tratamiento con estradiol se produjo en machos una elevada mortalidad, como ya había sido descrita por Blank y cols en 1990, siendo mayor en los machos que además recibieron melatonina. En el caso de las hembras tratadas con testosterona, la mortalidad fue mayor en el grupo que además recibió melatonina. Sin embargo descendió en el grupo que sólo recibió testosterona en comparación con el grupo control. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Margolis y Caplan en 1951, que emplearon el propionato de testosterona como terapia, que aunque producía la remisión de la enfermedad fue desestimado por originar reacciones adversas severas.

Del mismo modo, se estudió el índice de esplenomegalia y de hiperplasia linfoide. La administración de melatonina y testosterona en hembras reduce considerablemente tanto la esplenomegalia como la hiperplasia linfoide. En cambio en machos, el tratamiento combinado de melatonina y estradiol aumenta el índice de esplenomegalia y de hiperplasia linfoide.

Al igual que en el experimento anterior, estudiamos y determinamos la producción de niveles de Ig y de autoanticuerpos en suero. Las hembras MRL-lpr presentaron los siguientes resultados:

- a) el tratamiento combinado de melatonina y testosterona reduce significativamente los niveles de IgM e IgG totales y de autoanticuerpos en comparación con los ratones MRL-lpr hembras que sólo recibieron testosterona.
- b) el tratamiento con testosterona reduce la producción de anticuerpos IgG e IgM. Este resultado está en correlación con experimentos en los que el tratamiento con testosterona reducía considerablemente los niveles de autoanticuerpos y por consiguiente la gravedad de la enfermedad (Blank y cols., 1990; van Griensven y cols., 1997).



---

De los resultados obtenidos en machos MRL-lpr tratados con estradiol podemos deducir que:

a) El tratamiento combinado de melatonina y estradiol aumenta significativamente los niveles de autoanticuerpos IgG e IgM respecto al tratamiento sólo con estradiol.

b) En comparación con el grupo de machos sin tratamiento, el tratamiento con estradiol aumenta los niveles de autoanticuerpos en clara correlación con lo ya expuesto por Blank y cols en 1990.

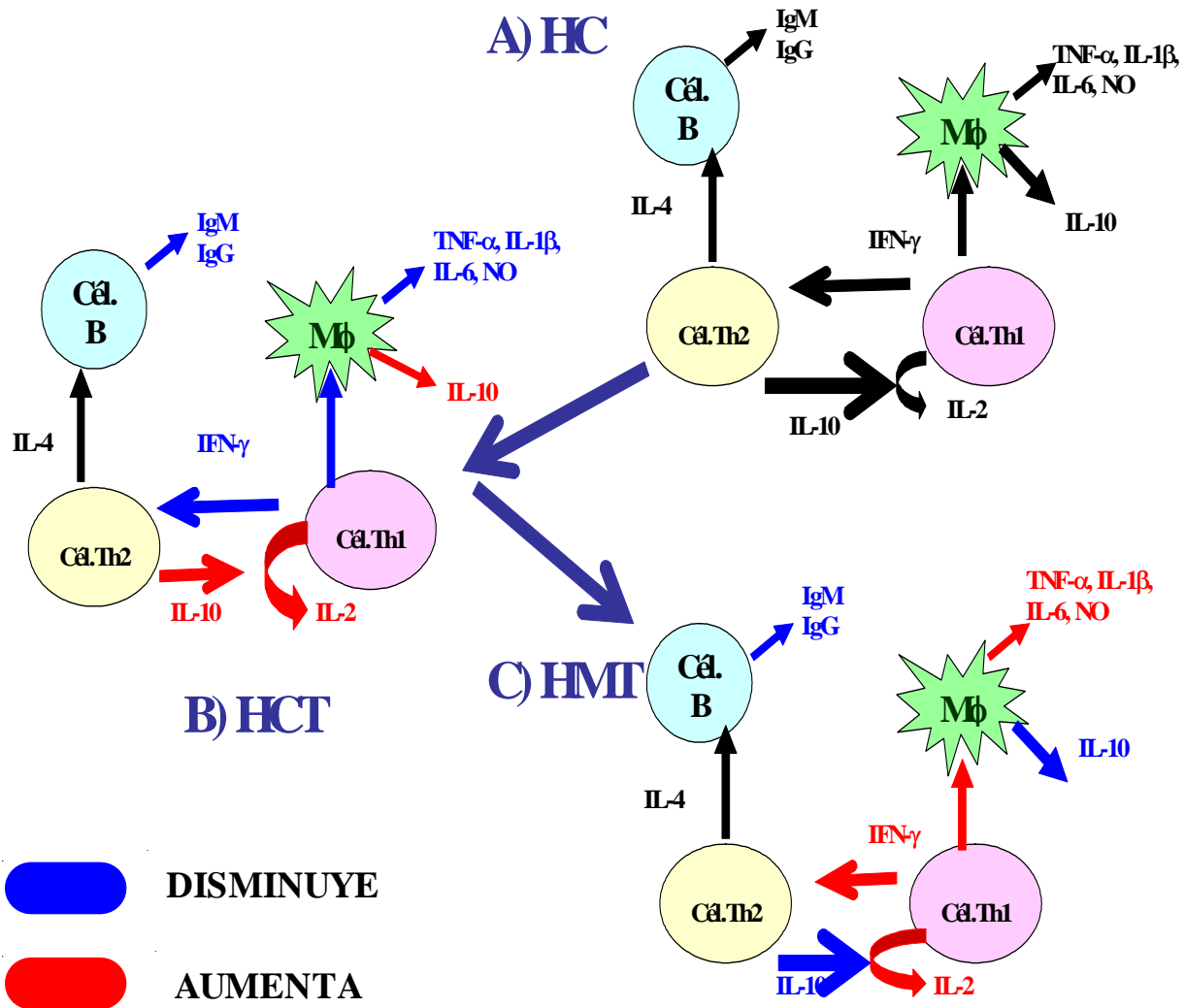
Por consiguiente, podemos asegurar que la tendencia en la producción de autoanticuerpos se mantiene a pesar del tratamiento hormonal, es decir, la administración de melatonina en hembras reduce los niveles de autoanticuerpos, mientras que el mismo tratamiento en machos aumenta dichos niveles.

Con respecto a los niveles séricos de citoquinas y de NO podemos establecer que:

a) En hembras, el tratamiento con testosterona produce un aumento significativo de la IL-10 (citoquina antiinflamatoria), un aumento de la IL-2 (citoquina responsable de la activación, diferenciación y proliferación de células T) y un mantenimiento de las citoquinas inflamatorias y proinflamatorias, que conlleva una disminución en los niveles de NO. Por lo tanto, cabe decir que el tratamiento con testosterona en hembras control provoca un cambio en el tipo de respuesta inmune, de una respuesta Th1 (proinflamatoria) en hembras controles, se pasa a una respuesta Th2 (antiinflamatoria) en hembras tratadas con testosterona. Estos datos confirman el papel inmunosupresor natural que posee los andrógenos (Masi y cols., 1999).

b) En hembras, el tratamiento de melatonina y testosterona produce un aumento de IL-2, de las citoquinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) y proinflamatorias (IFN- $\gamma$ ) y un aumento considerable en los niveles de NO, con un consiguiente descenso de citoquina antiinflamatoria (IL-10). La administración conjunta de melatonina y testosterona provoca un cambio de respuesta, se pasa de una situación Th2 (antiinflamatoria) con sólo melatonina a un tipo de respuesta Th1 (proinflamatoria) con el tratamiento combinado melatonina y testosterona.

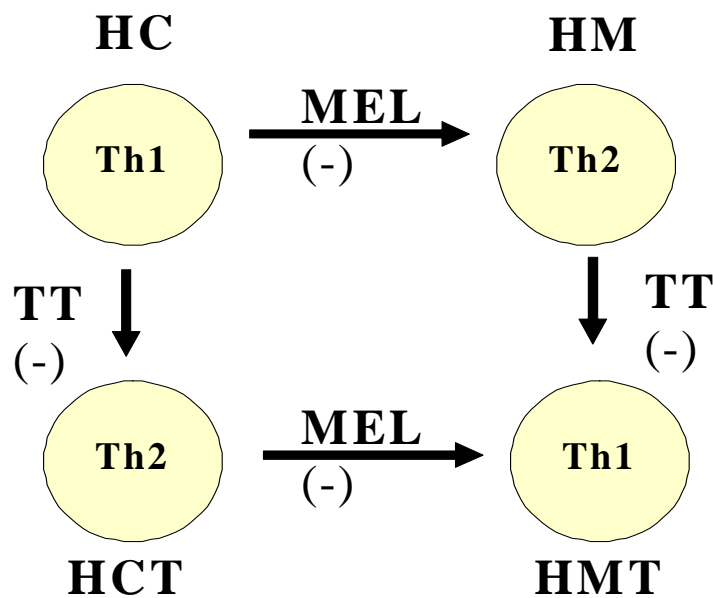
Para confirmar estos resultados procedimos a estudiar la producción de las distintas citoquinas por parte de las células Th1 y Th2 en distintos tejidos estimulados con PHA y con LPS. Cuando estimulamos las células con PHA, obtuvimos que en hembras tratadas con melatonina y testosterona había una respuesta predominantemente antiinflamatoria (Th2), mientras que en las hembras tratadas sólo con testosterona predominaba la respuesta proinflamatoria (Th1). Un resultado paradójico en comparación con lo obtenido en suero.



**Figura 83.** Esquema comparativo propuesto de las interacciones celulares en las siguientes situaciones: A) Hembras MRL-lpr controles (HC); B) Hembras controles tratadas con testosterona (HCT) en comparación con HC; C) Hembras tratadas con melatonina y con testosterona (HMT) en comparación con HCT.

Pero cuando estimulamos las células con LPS para ver el funcionamiento de las células Th1 y monocitos/macrófagos, obtuvimos en las hembras con melatonina una elevada respuesta inflamatoria y proinflamatoria que sugiere que, por la acción reguladora negativa del IFN- $\gamma$  sobre los linfocitos Th2, prevalece la respuesta Th1 en hembras melatonina y testosterona. A su vez, la marcada tendencia antiinflamatoria demostrada en hembras con testosterona, sugiere que en éstas la respuesta predominante sea del tipo Th2.

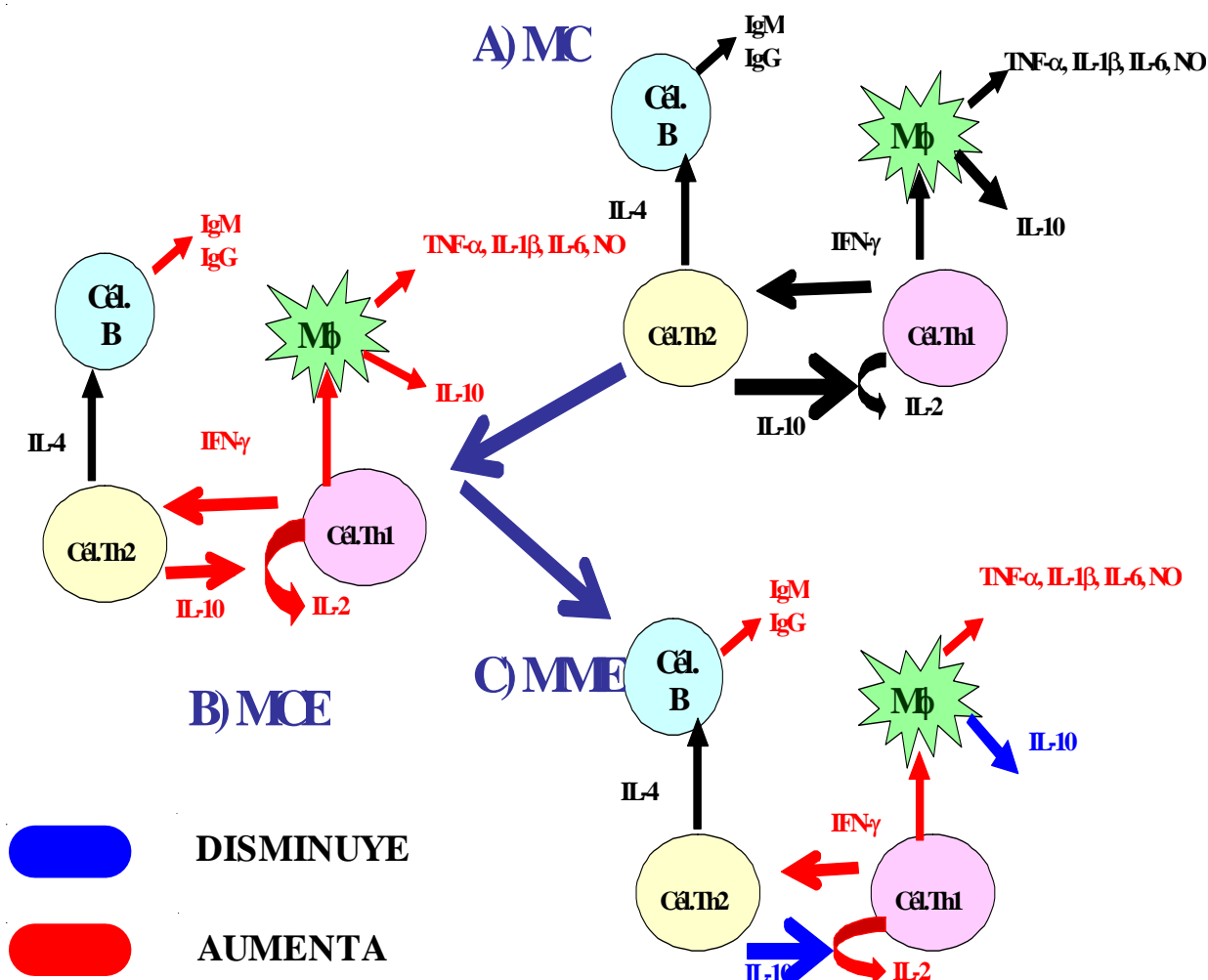
Por lo tanto confirmamos que a las hembras de MRL-lpr, el tratamiento exclusivo con testosterona o exclusivo con melatonina provoca un cambio en el tipo de respuesta inmune, pasando de una respuesta Th1 a una respuesta Th2. Por el contrario, una administración conjunta de ambas sustancias (melatonina y testosterona) no provoca ningún cambio en el tipo de respuesta, manteniéndose el predominio de la respuesta Th1. La única diferencia entre el tratamiento con melatonina o con testosterona, es que con la primera conseguimos además una disminución más significativa en los niveles de autoanticuerpos.



**Figura 84.** Cambio de respuesta en las células Th en ratones MRL-lpr hembras. MEL: Melatonina; TT: Testosterona; HC: Hembras controles; HM: Hembras tratadas con melatonina; HCT: Hembras tratadas con testosterona; HMT: Hembras tratadas con melatonina y testosterona.

El estudio de los niveles séricos de citoquinas y NO en machos demostró que:

- a) El tratamiento con estradiol eleva los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , niveles de NO y de IL-2 e IL-10. Datos que concuerdan con la bibliografía existente (Cutolo y Straub, 2000, Karpuzoglu-Sahin y cols., 2001a y 2001b).
- b) El tratamiento conjunto de estradiol y melatonina eleva considerablemente los niveles de las citoquinas proinflamatorias y de NO, IFN- $\gamma$  e IL-2 y reduce los de la interleuquina antiinflamatoria (IL-10).



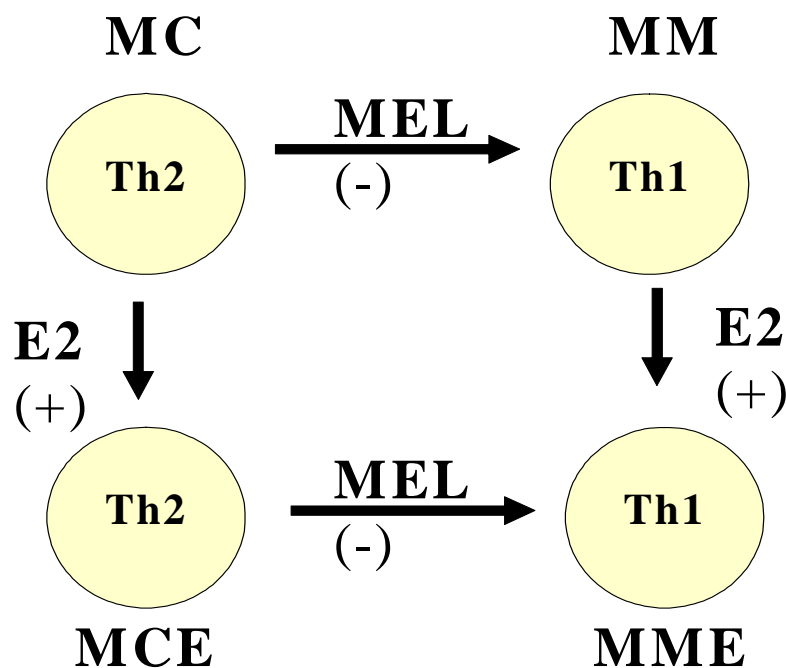
**Figura 85.** Esquema comparativo propuesto de las interacciones celulares en las siguientes situaciones: A) Machos MRL-lpr controles (MC); B) Machos controlados con estradiol (MCE) en comparación con MC; C) Machos controlados con melatonina (MME) y con estradiol en comparación con MCE.

También procedimos a estudiar el comportamiento de los linfocitos Th y de los macrófagos/monocitos en los machos tratados con estradiol. Cuando se estimularon las células con LPS, se demostró que los ratones que recibieron melatonina y estradiol presentaban una capacidad inflamatoria mayor que los ratones que sólo recibieron estradiol. Es decir, en los ratones tratados con estradiol y melatonina hay un predominio de las acciones proinflamatorias ejercidas por monocitos/macrófagos y linfocitos Th1.

Por el contrario de los resultados obtenidos con la estimulación con PHA, vimos que las tendencias eran las contrarias, lo que nos indica que la respuesta Th2 es la que predomina en los tratados sólo con estradiol.

Así, podemos confirmar que los machos MRL-lpr normales poseen una respuesta Th2 marcada por la producción de IL-10 (antiinflamatoria). Cuando a estos ratones se le administra melatonina, los ratones desarrollan un lupus más agresivo por los mecanismos directos e indirectos ya explicados que incluyen un cambio de respuesta inmune del tipo Th1 con elevación de citoquinas inflamatorias, de los niveles de NO, de IFN- $\gamma$ , de IL-2 y en la producción de autoanticuerpos.

Cuando a los ratones controles se le administra estradiol, empeoran por las acciones propias de las hormonas: aumento de la producción de autoanticuerpos, aumento de las citoquinas inflamatorias y de NO por parte de los monocitos, pero sin afectar al tipo de respuesta Th2 y sin afectar a la producción de IL-10 y de IFN- $\gamma$ .



**Figura 86.** Cambio de respuesta en las células Th en ratones MRL-lpr machos. MEL: Melatonina; E2: estradiol; MC: Machos controles; MM: Machos tratados con melatonina; MCE: Machos tratados con estradiol; MME: Machos tratados con melatonina y estradiol.

Cuando a los ratones MRL-lpr machos los tratamos con una terapia conjunta de melatonina y estradiol conseguimos que el empeoramiento y la severidad de la enfermedad del lupus tomen signos dramáticos, porque las acciones que ejerce el estradiol (aumento de las citoquinas inflamatorias y de los niveles de NO en macrófagos y monocitos y al aumento en la producción de autoanticuerpos por los linfocitos B) se ven multiplicadas por acción de la propia melatonina y porque ésta misma provoca un cambio de respuesta del tipo Th1 donde hay un incremento en la producción de IFN- $\gamma$  y un descenso de la producción de IL-10.



## **8. CONCLUSIONES**





Las conclusiones que hemos obtenido a partir de los resultados presentados en este trabajo de tesis doctoral son los siguientes:

### **Melatonina y Artritis Reumatoide**

- 1) La melatonina posee un efecto dependiente del sexo en la producción de autoanticuerpos. En machos aumenta la producción mientras que en hembras la reduce.
- 2) A nivel sistémico la melatonina posee capacidad proinflamatoria, ya que aumenta la producción de citoquinas inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6) en monocitos y linfocitos Th a través de un mecanismo dependiente de la PKC. A nivel del foco inflamatorio el aumento de la producción de citoquinas inflamatorias en la articulación contribuye a la degradación y erosión articular favoreciendo el desarrollo de la enfermedad.
- 3) En situaciones no patológicas, la melatonina contribuye al restablecimiento del equilibrio en la respuesta inmune debido a su efecto antioxidante (reduciendo los niveles de NO y el grado de peroxidación lipídica). Sin embargo, en una situación de Artritis Reumatoide, en donde la respuesta inmune se encuentra desequilibrada en favor de una respuesta inflamatoria, la melatonina no ejerce su acción antioxidante.
- 4) El organismo responde a la inflamación produciendo cortisol para controlar la duración de la respuesta inflamatoria y restablecer el equilibrio original. Pero en una situación patológica como la Artritis Reumatoide, la administración de melatonina colabora en esta hipercortisolemia. Además, la melatonina también contribuye al desarrollo de la enfermedad alterando la producción de hormonas sexuales. De este modo, en machos, produce una disminución de los niveles protectores de testosterona, mientras que en hembras provoca un aumento de los niveles perjudiciales de estradiol.
- 5) En resumen, la administración de melatonina favorece el desarrollo y progreso de la Artritis Reumatoide en ratas, porque contribuye a que haya una mayor respuesta inflamatoria en la articulación, no reduce los radicales libres originados en la articulación dañada, favorece la falta de respuesta al cortisol a nivel celular y modifica la producción de hormonas sexuales.

### **Melatonina y Lupus Eritematoso Sistémico**

- 6) Las hembras MRL-lpr desarrollan la enfermedad con más virulencia que los machos por acción de los estrógenos, estas acciones se traducen en una mayor producción de autoanticuerpos y mayor producción de citoquinas proinflamatorias (principalmente IFN- $\gamma$ ) característicos de una respuesta inmune del tipo Th1. Los machos desarrollan una enfermedad más atenuada por acción de los andrógenos que provocan una respuesta inmune del tipo Th2 (antiinflamatoria).
- 7) La administración de melatonina en el inicio del LES provoca un cambio en el tipo de respuesta celular que produce efectos opuestos según el sexo. Mientras que en hembras la administración de melatonina posee efectos beneficioso debido a un cambio de respuesta del tipo Th2 con prevalencia del status antiinflamatorio, en machos la administración de melatonina posee efectos perjudiciales como consecuencia del cambio de respuesta a tipo Th1, caracterizado por un aumento del status inflamatorio y una elevación de la respuesta humoral.
- 8) La administración de testosterona en hembras posee los mismos efectos beneficiosos que observamos con el tratamiento unitario de melatonina (reducción de los niveles de autoanticuerpos y respuesta del tipo Th2). Sin embargo, la terapia hormonal conjunta de melatonina y testosterona no produce ningún cambio en el tipo de respuesta manteniéndose el tipo Th1.
- 9) La administración de estradiol en machos provoca un empeoramiento de la enfermedad por la elevación de los niveles de autoanticuerpos. La administración conjunta de melatonina y estradiol en machos provoca una acentuación de los efectos negativos observados como consecuencia de la predominancia de la respuesta Th1.
- 10) En resumen, la melatonina presenta un marcado efecto dependiente del sexo en ratones MRL-lpr, teniendo un efecto directo a nivel celular y un efecto indirecto sobre la producción de hormonas sexuales seguramente a través de la GnRH.

## **9 . BIBLIOGRAFÍA**



- Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S. (1994).** Autotolerancia y autoinmunidad. En *Inmunología Celular y Molecular*. Interamericana-McGraw Hill, Healthcare Group, 2ª ed. pp. 423-443.
- Abe M., Reiter R.J., Orhii P.H., Hara M., Poeggeler B., Barlow-Walden L.R. (1994).** Inhibitory effect of melatonin on cataract formation in newborn rats: Evidence of an antioxidative role from melatonin. *J. Pineal Res.* 17: 94-100.
- Acuña-Castroviejo D., Reiter R.J., Menéndez-Peláez A., Pablos M.I., Burgos A. (1994).** Characterization of high-affinity melatonin binding sites purified cell nuclei of liver. *J. Pineal Res.* 16: 100-112.
- Acuña-Castroviejo D., Coto-Montes A., Gaia M.M., Ortiz G.G., Reiter R.J. (1997).** Melatonin is protective against MPTP-induced striatal and hippocampal lesions. *Life Sci.* 60: L23-L29.
- Ader R., Cohen N. (1975).** Behaviourally conditioned immunosuppression. *Psychosom. Med.* 37: 333.
- Ahmed S.A., Hissong B.D., Verthelyi D., Donner K., Becker K., Karpuzoglu-Sahin E. (1999).** Gender and risk of autoimmune diseases: possible role of estrogenic compounds. *Environ. Health Perspectives* 107 Suppl 5: 681-684.
- Al-Janadi M., Al-Ball S., Al-Dalaan A., Raziuddin S. (1993).** Cytokine profile in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases. *J. Clin. Immunol.* 13: 58-67.
- Alarcón-Segovia D., Llorente L. (1983).** Antibody penetration into living cells. IV. Different effects of anti-native DNA and anti-ribonucleoprotein IgG on the cell cycle of activated T gamma cells. *Clin. Exp. Immunol.* 52: 365-371.
- Allen J.B., Blatter D., Calandra G.B., Wilder R.L. (1983).** Sex hormonal effects on the severity of streptococcal cell wall-induced polyarthritis in the rat. *Arthritis Rheum.* 26: 560-563.
- Alleva D.G., Burger C.J., Elgert K.D. (1994).** Tumor-induced regulation of suppressor macrophage nitric oxide and TNF-alpha production. Role of tumor-derived IL-10, TGF-beta, and prostaglandin E2. *J. Immunol.* 153: 1674-1686.
- Amoura Z., Koutouzov S., Piette J.C. (2000).** The role of nucleosomes in lupus. *Curr. Opin. Rheumatol.* 12: 369-372.
- Andersson S.E., Ekström G.M. (1997).** Changes in vascular porosity and joint blood flow during development of collagen induced arthritis in the rat. Modulation by indomethacin and L-NAME. *J. Rheumatol.* 24: 2188-2195.
- Andreassen K., Moens U., Nossent H. (1999).** Termination of human T cell tolerance to histones by presentation of histones and poliomyelovirus T antigen provided that T antigen is complexed with nucleosomes. *Arthritis Rheum.* 42: 2449-2460.
- Andrews B.S., Eisenberg R.A., Theofilopoulos A.N., Izui S., McConahey C.P.J., Murphy E.D., Roths J.B., Dixon F.J. (1978).** Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J. Exp. Med.* 148: 1198-1215.
- Antolín I., Rodríguez C., Sáinz R.M., Mayo J.C., Uría H., Kotler M.L., Rodríguez-Colunga M.J., Tolivia D., Menéndez-Peláez A. (1996).** Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J.* 10:882-890.

- Antón-Tay F., Huerto-Delgadillo L., Ortega-Corona B.G., Benítez-King (1993).** Melatonin antagonism to calmodulin may modulate multiple cellular functions. En: *Melatonin and the Pineal Gland* from Basic Science to Applications (eds. Toitou, Arendt, Pevet) Amsterdam, Elsevier, pp. 41-46.
- Aono H., Morishita M., Sasano M., Okamoto M., Okahara A., Makata K., Mita S. (1997).** Amelioration of type II collagen induced arthritis in rats by treatment with tymulin. *J. Rheumatol.* 24: 1564-1569.
- Araneo B.A., Dowell T., Diegel M., Daynes R.A. (1991).** Dihydrotestosterone exerts a depressive influence on the production of interleukin-4 (IL-4), IL-5, and IFN- $\gamma$ , but not IL-2 by activated murine T cells. *Blood* 78: 688-705.
- Arend W.P., Dayer J.M. (1990).** Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 33: 305-315.
- Arendt J., Wirz-Justice A., Bradtke J. (1977).** Annual rhythm of serum melatonin in man. *Neurosci. Lett.* 7: 327-330.
- Arendt J. (1985).** Mammalian pineal rhythms, *Pineal Research. Review*, vol 3 R.J. Reiter (ed) A.R. Liss, N. Y. pp 16-213.
- Arendt J. (1986).** Role of the pineal gland and melatonin in seasonal reproductive function in mammals. *Oxford Rev. Reprod. Biol.* 8:266.
- Arendt J. (1988).** Melatonin. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 29: 205.
- Armstrong S.M., Redman J.R. (1991).** Melatonin: A chronobiotic with anti-aging properties?. *Med. Hypotheses* 34: 300-309.
- Arnett F.C. (1997).** The genetics of human lupus. En Dubois' *Lupus Erythematosus*, ed 5 by Wallace DJ, Hahn BH. Williams & Wilkins. Baltimore. pp: 77-117.
- Ashwell J.D., Lu F.W., Vacchio M.S. (2000).** Glucocorticoids in T cell development and function. *Ann. Rev. Immunol.* 18: 309-345.
- Axelrod J. (1974).** The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science* 184: 1341-1348.
- Baler R., Klein D.C. (1995).** Circadian expression of transcription factor Fra-2 in the rat pineal gland. *J. Biol. Chem.* 270: 27319-27325.
- Balomenos D., Rumold R., Theofilopoulos A.N. (1998).** Interferon- $\gamma$  is required for lupus-like disease and lymphoaccumulation in MRL-lpr mice. *J. Clin. Invest.* 101: 364-371.
- Barlow-Walden L.R., Reiter R.J., Abe M., Pablos M.I., Menéndez-Peláez A., Chen L.D., Poeggeler B. (1995).** Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem. Int.* 26: 497-502.
- Bartsch C., Bartsch H. (1981).** Effect of melatonin on experimental tumors under different photoperiods and times of administration. *J. Neural Transm.* 52:269-279.
- Bartsch H., Bartsch C., Noteborn H.P., Flehmig B., Ebels I., Salemink C.A. (1987).** Growth-inhibiting effect of crude

- pineal extracts on human melanoma cells in vitro is different from that of known synthetic pineal substances. *J. Neural Transm.* 69: 299-311.
- Bartsch H., Bartsch C., Simon W.E., Fleming B., Ebels I., Lippert T.H. (1992).** Antitumor activity of the pineal gland: effect of unidentified substances versus the effect of melatonin. *Oncology* 52: 279-283.
- Becker-André M., Wiesenberg I., Scaeren-Wiemer N., Andre E., Missbach M., Saurat J.H., Carlberg C. (1994).** Pineal hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J. Biol. Chem.* 269: 28531-28534.
- Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A., Freeman B.A. (1990).** Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1620-1624.
- Ben-Nathan D., Maestroni G.J.M., Lustig S., Conti A. (1995).** Protective effects of melatonin in mice infected with encefalitis viruses. *Arch. Virol.* 140: 223-230.
- Ben-Nathan D., Maestroni G.J.M., Conti A. (1997).** The protective effects of melatonin in viral and bacterial infections. *From Horm. Res.* 23: 72-80.
- Benítez-King G., Antón-Tay F. (1993).** Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia* 49: 635-641.
- Benítez-King G., Ríos A., Martínez A., Antón-Tay F. (1996).** In vitro inhibition of Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin dependent protein kinase II activity. *Biochem. Biophys. Acta* 1290: 191-196.
- Benot S., Molinero P., Soutto M., Goberna R., Guerrero J.M. (1998).** Circadian variation in the rat serum total antioxidant status: correlation with melatonin levels. *J. Pineal Res.* 24: 1-4.
- Benot S., Goberna R., Reiter R.J., García-Mauriño S., Osuna C., Guerrero J.M. (1999).** Physiological levels of melatonin contribute to the antioxidant capacity of human serum. *J. Pineal Res.* 27: 59-64.
- Benson B., Ebels I. (1978).** Pineal peptides. *J. Neural Transm. Suppl.* 13:157-173.
- Benten W.P.M., Wuderlich F., Herrmann R., Kuhn-Velyen W.N. (1989).** Testosterone-induced compared to estradiol-induced immunosuppression against Plasmodium chabaudi malaria. *J. Endocrinol.* 139: 487-494.
- Berga S.L., Mortola J.F., Yen S.S.C. (1988).** Amplification of nocturnal melatonin secretion in women with functional hypothalamic amenorrhea. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66: 242-244.
- Berkenbosch F., van Oers J., del Rey A., tilders F., Besedovsky H. (1987).** Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. *Science* 238: 524-526.
- Bernstein K.A., Valerio R.D., Lefkowitz J.B. (1995).** Glomerular binding activity in MRL/lpr serum consists of antibodies that bind to a DNA/histone/type IV collagen complex. *J. Immunol.* 154: 2424-2433.
- Bettahi I., Pozo D., Osuna C., Reiter R.J., Acuña-Castroviejo D., Guerrero J.M. (1996).** Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *J. Pineal Res.* 20: 205-210.

- Biesalski H.K., Welker H.A., Thalmann R., Vollrath L. (1988).** Melatonina and other serotonin derivatives in the guinea pig membranous cochlea. *Neurosci. Lett.* 91: 41-46.
- Bijlsma J.W.J., Cutolo M., Masi A.T., Chikanza I.C. (1999).** The neuroendocrine immune basis of rheumatic diseases. *Trends Immunol. Today* 20: 298-301.
- Bingaman E.W., Magnuson D.J., Gray T.S., Handa R.J. (1994).** Androgen inhibits the increase of hypothalamic corticotropin-releasing hormone (CRH) and CRH-immunoreactivity following gonadectomy. *Neuroendocrinology* 59: 228-234.
- Binkley S., Muller G., Hernández T. (1981).** Circadian rhythm in pineal N-acetyltransferase activity: phase shifting by light pulses (I). *J. Neurochem.* 37: 798-800.
- Binkley S. (1993).** Structures and molecules involved in generation and regulation of biological rhythms in vertebrates and invertebrates. *Experientia* 49: 648-653.
- Blank M., Mendlovic S., fricje H., Mozes E., Talal N., Shoenfeld Y. (1990).** Sex hormone involvement in the induction of experimental systemic lupus erythematosus by a pathogenetic anti-DNA idiootype in naive mice. *J. Rheumatol.* 17: 311-317.
- Blask D.E. (1984).** The pineal: An oncostatic gland?. In: *The Pineal Gland*. R.J. Reiter, ed. Raven Press, New York, pp. 253-284.
- Blask D.E. (1993).** Melatonin in oncology. En *Melatonin: biosynthesis, physiological effects and clinical implications*. Yu H.S. and Reiter R.J. (Eds Boca Ratón, CRC). pp 447-475.
- Blask D.E. (1994).** Neuroendocrine aspects of circadian pharmacodynamics. En *Circadian cancer therapy*. Hrushesky. W.J.M. (Eds. Boca Ratón, CRC), pp 39-54.
- Blask D.E., Wilson S.T., Zalatan F. (1997).** Physiological melatonin inhibition of human breast cancer cell growth in vitro: evidence for glutathione-mediated pathway. *Cancer Res.* 57: 1909-1914.
- Bluthe R.M., Walter V., Parnet P., laye S., Iestage J., Verrier D., Poole S., Stenning B.E., Kelley K.W., Dantzer R. (1994).** Lipopolysaccharide induces sickness behaviour in rats by a vagal mediated mechanism. *Comptes Rendus de l'Academic des Sciences. Serie III, Sciences de la Vie.* 317: 499-503.
- Bockenstedt L.K., Gee R.J., Mamula M.J. (1995).** Self peptides in the initiation of lupus autoimmunity. *J. Immunol.* 154: 3516-3524.
- Bornmann M.S., Oosthuizen J.M.C., Barnard H.C., Schulenburg G.W., Boomker D., Reif S. (1989).** Melatonin and sperm mobility. *Andrologia* 21: 483-486.
- Boswell J.M., Yui M.A., Burt D.W., Kelley V.E. (1988).** Increased tumor necrosis factor and IL-1 $\beta$  gene expression in the kidneys of mice with lupus nephritis. *J. Immunol.* 141: 3050.



- 
- Boyum A. (1968).** Separation of leucocytes from blood and bone marrow. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21:77-89
- Brahn E. (1991).** Animals models of rheumatoid arthritis: clues to etiology and treatment. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 265: 42-53.
- Brahn E., Tang C., Banquerigo ML. (1994)** Regression of collagen-induced arthritis with taxol, a microtubule stabilizer. *Arthritis Rheum.* 37:839-845.
- Brahn E., Banquerigo M.L., Firestein G.S., Boyle D.L., Salzman A.L., Szabó C. (1998).** Collagen induced arthritis: reversal by mercaptoethylguanidine, a novel antiinflammatory agent with a combined mechanism of action. *J. Rheumatol.* 25: 1785-1793.
- Brainard G.C., Richardson B.A., King T.S., Reiter R.J. (1984).** The influences of different light spectra on the suppression of pineal melatonin content in the Syrian hamster. *Brain Res.* 294: 333-341.
- Brambilla F., Fraschini F., Esposti G., Bossolo P.A., Marelli G., Ferrari E. (1988).** Melatonin circadian rhythm in anorexia nervosa and obesity. *Psychiat. Res.* 23: 267-276.
- Brennan F.M., Chantry D., Jackson A., Maini R.N., Feldmann M. (1989).** Inhibitory effect of TNF- $\alpha$  antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet* 2: 244-247.
- Brinkman K., Termaat R., Berden Berden J.H., Smeenk R.J. (1990).** Anti-DNA antibodies and lupus nephritis: the complexity of crossreactivity. *Immunol. Today* 11: 232-234.
- Brooks E.B., Liang m.H. (1999).** Evaluation of recent trials in "lupus". *Curr. Op. Rheumatol.* 11: 341-347.
- Brown G.M., Young S.N., Gauthier S., Tsui H., Grota L.J. (1979).** Melatonin in human cerebrospinal fluid in the daytime: its origin and variation with age. *Life Sci.* 25: 929-936.
- Brown D.H., Sheridan J., Pearl D., Zwilling B.S. (1993).** Regulation of mycobacterial growth by the hypothalamus-pituitary-adrenal axis: differential responses of Mycobacterium bovis BCG-resistant and -susceptible mice. *Infection and Immunity* 61: 4793-4800.
- Brownstein M. Axelrod J. (1974).** Pineal gland: 24-hour rhythm in norepinephrine turnover. *Science.* 184(133): 153-165.
- Bruce and Laskin (1997).** *J. Rheumatol.* 24: 8.
- Brzezinski A., Lynch H.J., Wurtman R.J., Siebel M.M. (1987a).** Possible contribution of melatonin to the timing of the luteinizing hormone surge. *N. Eng. J. Med.* 316: 1550-1551.
- Brzezinski A., Siebel M.M., Lynch H.J., Deug M.H., Wurtman R.J. (1987b).** Melatonin in human preovulatory follicular fluid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64:865-867.
- Bubenik G.A. (1998).** Prospects of the clinical utilization of melatonin. *Biol. Signals Recept.* 7: 195-219.

- Buchan G., Barrett K., Turner M., Chantry D., Maini R.N., Feldmann M. (1998).** Interleukin-1 and tumor necrosis factor mRNA expression in rheumatoid arthritis: prolonged production of IL-1 $\alpha$ . *Clin. Exp. Immunol.* 73: 449-455.
- Burlingame R.W., Boey M.L., Stakerbaum G., Rubin R.L. (1994).** The central role of chromatin in autoimmune responses to histones and DNA in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 94: 184-192 .
- Buswell R.S. (1975).** The pineal and neoplasia. *Lancet* 1: 34-36.
- Buzzell G.R. Amerongen H.M., Toma J.G. (1988).** Melatonin and the growth of the Dunning R3327 rat prostatic adenocarcinoma. En *Pineal Gland and Cancer. Brain Research Promotion*, Tubingen, pp. 295.
- Cagnacci A., Elliott J.A., Yen S.S.S. (1992).** Melatonin: a major regulator of the circadian rhythm of core temperature in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75: 447-452.
- Cagnacci A., Volpe A. (1996).** Influence of melatonin and photoperiod on animal and human reproduction. *J. Endocrinol. Invest.* 19: 382-411.
- Callaghan B.D. (1995).** The long-term effect of pinealectomy on the crypts of the rat gastrointestinal tract. *J. Pineal Res.* 18: 191-196.
- Calvo J.R., Molinero P., Jiménez J., Goberna R., Guerrero J.M. (1986).** Interaction of vasoactive intestinal peptide (VIP) with rat lymphoid cells. *Peptides.* 7:177-181.
- Cannon G.W., Openshaw S.J., Hibbs J.B., Hoidal J.R., Huecksteadt T.P., Griffiths M.M. (1996).** Nitric oxide production during adjuvant-induced and collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 39: 1677-1684.
- Cardinali D.P., Larin F., Wurtman R.J., (1972).** Action spectra for effects of light on hydroxyindole-O-methyl transferases in rat pineal, retina and Harderian gland. *Endocrinology* 91: 877-886.
- Carlberg C.R., Hooft van Huijsdijken R., Staple J.F., De Lamarter J.F., Becker-André M. (1994).** RZR $\alpha$ s, a novel class of retinoid related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol. Endocrinol.* 8: 757-770.
- Carlsten H., Holmdahl R., Tarkowski A., Nilsson A. (1989).** Oestradiol- and testosterone-mediated effects on the immune system in normal and autoimmune mice are genetically linked and inherited as dominant traits. *Immunology* 68: 209-214.
- Carlsten H., Nilsson N., Jonson R., Backman K., Holmdahl R., Tarkowski A. (1992).** Estrogen accelerates immune complex glomerulonephritis but ameliorates T cell-mediated vasculitis and sialadenitis in autoimmune MRL-lpr/lpr mice. *Cell Immunol.* 144: 190-202.
- Carneiro J.R.M., Sato E.I. (1999).** Double blind, randomised, placebo controlled clinical trial of MTX in SLE. *J. Rheumatol.* 26: 1275-1279.
- Caroleo M.C., Frasca D., Nistico G., Doria G. (1992).** Melatonin as immunomodulator in immunodeficient mice. *Immunopharmacology* 23: 81-89.

- 
- Caroleo M.C., Doria G., Nistico G. (1994).** Melatonin restores immunodepression in aged and cyclophosphamide-treated mice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 719: 343-352.
- Carter D.S., Hall V.D., Tamarkin L., Goldman B.D. (1982).** Pineal is required for testicular maintenance in the Turkish hamster (*mesocricetus brandti*). *Endocrinology* 111: 863-871.
- Cavallo A. (1993).** Melatonin and human puberty: current perspectives. *J. Pineal Res.* 15: 115-221.
- Cazevielle C., Safa R., Osborne N.N. (1997).** Melatonin protects primary cultures of rat cortical neurones from NMDA excitotoxicity and hipoxia/reoxygenation. *Brain Res.* 12: 768.
- Chan A., Ebadi M. (1980).** The kinetics of norepinephrine-induced stimulation of serotonin N-acetyltransferase in bovine pineal gland. *Neuroendocrinology* 31: 244-251.
- Choi E.K., Gatenby P.A., McGill N.W., Bateman J.F., Cole W.G., York J.R. (1988).** Autoantibodies to type II collagen: occurrence in rheumatoid arthritis, other arthritides, autoimmune connective tissue diseases, and chronic inflammatory syndromes. *Ann. Rheum. Dis.* 47: 313-322.
- Chrousos G.P., Gold P.W. (1992).** The concepts of stress and stress system disorders. *J. Am. Med. Assoc.* 267: 1244-1252.
- Claustrat B., Loisy C., Brun J., Beorchia S., Arnaud J.L., Chazot G. (1989).** Nocturnal plasma melatonin levels in migraine: a preliminary report. *Headache* 29: 242-245.
- Clemens P.J., Davis J. (1986).** Cytotoxic drugs: their clinical application to the rheumatic diseases. *Semin. Arthritis Rheum.* 15: 231-254.
- Cochran F.C., Selph J., Sherman P. (1966).** Insights into the role of nitric oxide in inflammatory arthritis. *Med. Res. Rev.* 16: 547-563.
- Colombo L.L., Chen G.J., López M.C., Watson R.R. (1992).** Melatonin induced increase in gamma-interferon production by murine splenocytes. *Immunol. Lett.* 33: 123-126.
- Cohen P.L., Eisenberg R.A. (1991).** Lpr and gld: single gene systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu. Rev Immunol.* 9: 243.
- Conti A., Maestroni G.J.M. (1995).** The clinical neuroimmunotherapeutic role of melatonin in oncology. *J. Pineal Res.* 19: 103-110.
- Cornacoff J.B., Hebert L.A., Smead W.L., Van Amman M.E., Birmingham D.J., Waxman F.J. (1983).** Primate erythrocyte-immune complex clearing mechanism. *J. Clin. Invest.* 71: 236-247.
- Cos S., Blask D.E., Lemus-Wilson A., Hill A.B. (1991).** Effects of melatonin on cycle kinetics and “estrogen-rescue” of MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J. Pineal Res.* 10: 36-42.
- Cos S., Blask D.E. (1994).** Melatonin modulates growth factor activity in MCF-7 human breast cancer cells. *J. Pineal Res.* 17: 25-32.
-

- Cos S., Sánchez-Barceló E.J. (1995).** Melatonin inhibition of MCF-7 human breast cancer cells. *J. Pineal Res.* 17: 25-32.
- Craft C.M., Morgan W.W., Jones D.J., Reiter R.J. (1985).** Hamster and rat pineal gland  $\beta$ -adrenoreceptor characterization with iodocynapindolol and the effect of decreased catecholamine synthesis on the receptor. *J. Pineal Res.* 2:51-66.
- Cremer M.A., Rosloniec E.F., Kang A.H. (1998).** The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. *J. Mol. Med.* 76: 275-288.
- Crofford L.J., Wider R.L. (1997).** Arthritis and autoimmunity in animals. In *Arthritis and Allied conditions* (Koopman W, ed.). Williams and Wilkins. Baltimore. pp 565-583.
- Crofford L.J., Kalogeras K., Mastorakos G. (1997).** Circadian relationship between interleukin (IL)-6 and hypothalamus-pituitary-adrenocortical axis hormone: failure of IL-6 to cause hypercortisolism in patients with early, untreated rheumatoid arthritis. *J. Clin. Endocr. Metab.* 82: 1279-1283.
- Csaba G., Fischer J., Acs T. (1966).** The effect of pinealectomy and thymectomy on the immune capacity of the rat. *Experientia* 22: 168-175.
- Csaba G., Barath P. (1975).** Morphological changes of thymus and the thyroid gland after postnatal extirpation of pineal body. *Endocrinol. Exp.* 9: 59-67.
- Cupps T.R., Fauci A.S. (1982).** Corticosteroid-mediated immunoregulation in man. *Immunol. Rev.* 65: 133-155.
- Cush J.J., Lipsky P.E. (1988).** Phenotypic analysis of synovial tissue and peripheral blood lymphocytes isolated from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31: 1230-1238.
- Cush J.J., Lipsky P.E. (1991).** Cellular basis for rheumatoid inflammation. *Clin. Orthop.* 265: 9-22.
- Cutolo M., Accardo S., Villaggio B., Clerico P., Indiveri F., Carruba G. (1992).** Evidence for androgen receptors in the synovial tissue of rheumatoid arthritis patients and healthy controls. *Arthritis Rheum.* 35: 1007-1015.
- Cutolo M., Accardo S., Villaggio B., Balleari E., Cannella S., Ferrugio R. (1993).** Cultured synovial macrophages from rheumatoid arthritis synovium metabolize testosterone and exhibit inhibition of IL-1 $\beta$  production. *Arthritis Rheum.* 36: S158.
- Cutolo M., Sulli A., Seriola B., Accardo S., Masi A.T. (1995a).** Estrogens, the immune response and autoimmunity. *Clin. Exp. Rheumatol.* 13: 217-226.
- Cutolo M., Accardo S., Villaggio B., barone A., Sulli A., Balleari E. (1995b).** Androgen metabolism and inhibition of interleukin-1 synthesis in primary cultures of human synovial macrophages. *Mediators of inflammation.* 4: 138-143.
- Cutolo M., Villaggio B., Barone A., Sulli A., Granata O.M., Castagnetta L. (1996a).** Primary cultures of human synovial macrophages metabolize androgens. *Ann. NY Acad. Sci.* 784: 237-251.
- Cutolo M., Castagnetta L. (1996b).** Immunomodulatory mechanisms mediated by sex hormones in rheumatoid arthritis. *Ann. NY Acad. Sci.* 784: 534-541.

- Cutolo M., Foppiani L., Giusti M., Prete C., Ballarino P., Briata M. (1997).** The adrenal response to CRH and low dose ACTH in premenopausal rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* 40: S253.
- Cutolo M., Sulli A., Villaggio B., Serio B., Accardo S. (1998).** Relations between steroid hormones and cytokines in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 57: 573-577.
- Cutolo M. (1999).** Macrophages as effectors of the immunoendocrinologic interactions in autoimmune rheumatic diseases. *Ann. NY Acad. Sci.* 876: 32-43.
- Cutolo M., Villaggio B., Candido F., Valenti S., Giusti M., Felli L., Sulli A., Accardo S. (1999b).** Melatonin influences interleukin-12 and nitric oxide production by primary cultures of rheumatoid synovial macrophages and THP-1 cells. *Ann. NY Acad. Sci.* 876: 246-254.
- Cutolo M., Villaggio B., Foppiani L., Briata M., Sulli A., Pizzorni C., Faelli F., Prete C., Felli L., Serio B., Giusti M. (2000).** The hypothalamic-pituitary-adrenal and gonadal axes in rheumatoid arthritis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 917(1): 835.
- Cutolo M., Straub R.H. (2000).** Recent aspects of gonadal hormone and neurotransmitter interactions with synovial and immune cells: implications in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 59: 657-661.
- Cuzzocrea S., Caputi A.P., Zingarelli B. (1998).** Peroxynitrite-mediated DNA strand breakage activates poly(ADP-ribose) synthetase and causes cellular energy depletion in carrageenan-induced pleurisy. *Immunology* 93: 91-101.
- Cuzzocrea S., McDonald M.C., Mota-Filipe H., Mazzon E., Costantino G., Britti D., Mazzullo G., Caputi A.P., Thiemermann C. (2000).** Beneficial effects of tmeopol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 43: 320-328.
- Cuzzocrea S., Mazzon E., Bevilacqua C., Costantino G., Britti D., Mazzullo G., de Sarro A., Caputi A.P. (2000b).** Cloricromene, a coumarine derivative, protects against collagen-induced arthritis in Lewis rats. *Br. J. Pharmacol.* 131: 1399-1407.
- Dalal Kim S., Voskuhl R.R. (1997).** Testosterone therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces a T helper 2 bias in the autoantigen-specific T lymphocyte response. *J. Immunol.* 159: 3-6.
- Dang-Vu A.P., Pisetsky D.S., Weinberg J.B. (1987).** Functional alterations of macrophages in autoimmune MRL/-lpr/lpr mice. *J. Immunol.* 138: 1757.
- Davidson J.R., Graciano F.M., Rothemberg R.J. (1987).** MTX therapy for severe SLE. *Arthritis Rheum.* 30: 1195-1196.
- Davies K.A., Peters A.M., Beynon H.L.C., Walport M.J. (1992).** Immune complex processing in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 90: 2075-2083.
- Dayan M., Segal R., Globerson A., Habut B., Shearer G.M., Mozes E. (2000).** Effect of aging on cytokine production in normal and experimental systemic lupus erythematosus-afflicted mice. *Exp. Gerontol.* 35: 225-236.
- Dayer J.M., Demczuk S. (1984).** Cytokines and other mediators in rheumatoid arthritis. *Springer Semin. Immunopathol.* 7: 387-413.

- Daynes R.A., Dudley D.J., Araneo B.A. (1990).** Regulation of murine lymphokine production in vivo. Dehydroepiandrosterone is a natural enhancer of interleukin 2 synthesis by helper T cells. *Eur. J. Immunol.* 20: 793-801.
- Deguchi J., Axelrod J. (1972).** Sensitive assay for serotonin N-acetyltransferase activity in the rat gland pineal. *Anal. Biochem.* 50: 174-179.
- Del Gobbo V., Libri V., Villani N., Calio R., Nistico G. (1989).** Pinealectomy inhibits interleukin-2 production and natural killer activity in mice. *Int. J. Immunopharmacol.* 11: 567-573.
- Del Rey A., Besedovsky H.O. (2000).** The cytokine-HPA axis circuit contributes to prevent or moderate autoimmune processes. *Z. Rheumatol.* 59: II/26-II/30.
- Demas G.E., Nelson R.J. (1996).** Photoperiod and temperature interact to affect immune parameters in adult male deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *J. Biol. Rhythms* 11: 95-103.
- Depper J.M., Zvaifler N.J. (1981).** Epstein-Barr virus: its relationship to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 24: 755-761.
- Desai D.D., Krishnan M.R., Swindle J.T., Marion T.N. (1993).** Antigen-specific induction of antibodies against native mammalian DNA in nonautoimmune mice. *J. Immunol.* 151: 1614-1626.
- Devecerski V. (1963).** Contributions á l'étude de l'effet de l'épiphysectomie sur l'histophysiologie du thymus. *Acta Anat.* 54: 352-353.
- Di Stefano A., Paulesu L. (1994).** Inhibitory effect of melatonin on production of IFN- $\gamma$  or TNF- $\alpha$  in peripheral blood mononuclear cells of some blood donors. *J. Pineal Res.* 17: 164-169.
- Diamond B., Katz J.B., Paul E., Aranow C., Lustgarten D. (1992).** The role of somatic mutation in the pathogenic anti-DNA response. *Annu. Rev. Immunol.* 10: 731-757.
- Dickson R.B., Lippman M.E. (1987).** Estrogenic regulation of growth and polypeptide growth factor secretion in human breast carcinoma. *Endocr. Rev.* 8: 29-43.
- Dinarello C.A., Moldawer L.L. (1999).** Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis: a primer for clinicians. Thousand Oaks, California. Amgen Inc. pp. 34.
- Dollins A.B., Zhdanova I.V., Wurtman R.J., Lynch H.J., Deng M.H. (1994).** Effect of inducing nocturnal serum melatonin concentrations in daytime on sleep, mood, body temperature, and performance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1824-1828.
- Drake C.G., Rozzo S.J., Vyse T.J., Palmer E., Kotzin B.L. (1995).** Genetic contributions to lupus-like disease in (NZBxNZW)F1 mice. *Immunol. Rev.* 144: 51-74.
- Drijfhout W.J., van der Linde A.G., Kooi S.E., Grol C.J., Westerink B.H. (1996a).** Norepinephrine release in the rat pineal gland: the input from the biological clock measured by in vivo microdialysis. *J. Neurochem.* 66: 748-755.

- 
- Drijfhout W.J., Homan E.J., Brons H.F., Oakley N.R., Skingle M., Grol C.J., Westerink B.H. (1996b).** Exogenous melatonin entrains rhythm and reduces amplitude of endogenous melatonin: an in vivo microdialysis study. *J. Pineal Res.* 20: 24-32.
- Dubocovich M.L. (1995).** Melatonin receptors: are there multiple subtypes?. *Trends Pharmacol. Sci.* 16: 50-56.
- Ebihara S., Marks T., Hudson D.J., Menaker M. (1986).** Genetic control of melatonin synthesis in the pineal gland of the mouse. *Science* 231: 491.
- Ebisawa T., Karne S., Lerner M.R., Reppert S.M. (1994).** Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6133-6137.
- Edberg J.C., Salmon J.E., Kimberly R.P. (1998).** Systemic lupus erythematosus. En: Klippel JH, Dieppe PA, eds. *Rheumatology* 2<sup>nd</sup> edition. Mosby, Philadelphia. pp 357-370.
- Eiguchi K., Chassaing A., Schillacci R. (2000).** Guía de Inmunología. Ed. Letra y Color. Buenos Aires. pp 1-30.
- Eiguchi K., Soneira S.G. (2002).** Psiconeuroinmunoendocrinología en enfermedades autoinmunes (LES). *Arch. Alerg. Inmunol. Clín.* 33: S8-S16.
- El-Domeiri A.A.H., Das Grupta T.K. (1973).** Reversal by melatonin of the effect of pinealectomy on tumor growth. *Cancer Res.* 32: 2830-2833.
- Elenkov I.J., Hoffman J., Wilder R.L. (1997).** Does differential neuroendocrine control of cytokine production control the expression of autoimmune diseases in pregnancy and the postpartum period?. *Mol. Med. Today* 9: 379-383.
- Elenkov I.J., Chrousos G.P. (1999).** Stress hormones, TH1/TH2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. *Trends Endocrinol. Metab.* 10: 359-368.
- Elliott J.A., Goldman B.D. (1981).** Seasonal reproduction. Photoperiodism and biological clocks. En *Neuroendocrinology of Reproduction: Physiology and Behavior*. Plenum Press, N.Y. pp 377.
- Emlen W., Niebur J., Kadera R. (1994).** Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 152: 3685-3692.
- Engwerda C.R., Fox B.S., Handwerker B.S. (1996).** Cytokine production by T lymphocytes from young and aged mice. *J. Immunol.* 156: 3621-3630.
- Erlich P. (1901).** *J. Berl. Klin. Wochenschr.* 38: 251.
- Ernst D.N., Weigle O., Hobbs M.V. (1995).** Aging and lymphokine gene expression by T cell subsets. *Nutrition Rev.* 53: S18-S26.
- Faber E. (1982).** Chemical carcinogenesis, a biological perspective. *Am. J. Pathol.* 2: 271-296.
- Farrar W.L., Hill J.M., Harel-Bellan A., Vinocour M. (1987).** The immune logical brain. *Immunol. Rev.* 100: 361.
- Fava R., Olsen N., Keski-Oja J., Moses H., Pincus T. (1989).** Active and latent forms of transforming factor  $\beta$  activity in
-

synovial effusions. *J. Exp. Med.* 169: 291-296.

**Feldmann M., Brennan F.M., Maini R.N. (1996a).** Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 397-440.

**Feldmann M., Brennan F.M., Maini R.N. (1996b).** Rheumatoid arthritis. *Cell* 85: 307-310.

**Felson D.T. (1993).** Epidemiology of the Rheumatic Diseases. En *Arthritis and Allied Conditions*. McCarty DJ. Koopman WJ. Lea and Febigh. Philadelphia. pp 17-47.

**Ferrara N., Davis-Smyth T. (1997).** The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 18: 4-25.

**Finck B.K., Linsley P.S., Wofsy D. (1994).** Treatment of murine lupus with CTLA4 Ig. *Science* 265: 1225-1227.

**Finocchiaro L.M., Artz E.S., Fernández-Castelo S., Criscuolo M., Finkielman S., 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.

**Floreani M., Skaper S.D., Facci L., Lipartiti M., Giusti P. (1997).** Melatonin maintains glutathione homeostasis in kainic acid-exposed rats brain tissues. *FASEB J.* 11: 1309.

**Foulkes N.S., Borjigin J., Snyder S.H., Sassone-Corsi P. (1996).** Transcriptional control of circadian hormone synthesis via the CREM feedback loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14140-14145.

**García-Mauriño S., González-Haba M.G., Calvo J.R., Raffi-El-Idrissi M., Sánchez-Margalet V., Goberna R., Guerrero J.M. (1997).** Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN- $\gamma$  production by human circulating CD4<sup>+</sup> cells. *J. Immunol.* 159: 574-581.

**García-Mauriño S., González-Haba M.G., Calvo J.R., Goberna R., Guerrero J.M. (1998).** Involvement of nuclear binding sites for melatonin in the regulation of IL-2 and IL-6 production by human blood mononuclear cells. *J. Neuroimmunol.* 92: 76-84.

**García-Mauriño S., Pozo D., Carrillo-Vico A., Calvo J.R., Guerrero J.M. (1999).** Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. *Life Sci.* 65: 2143-2150.

**Garovich M., Agudelo C., Pisko E. (1980).** Oral contraceptives and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 23: 1396-1398.

**Ghosh C., Duckles S.P., Krause D.N. (1998).** Effect of melatonin in the rat tail artery: role of K<sup>+</sup> channels and endothelial factors. *Br. J. Pharmacol.* 123: 1533-1540.

**Gregersen P.K., Silver J., Winchester R.J. (1987).** The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 30: 1205-1213.

**Gillette M.U., Mitchell J.W. (2002).** Signalling in the suprachiasmatic nucleus: selectively responsive and integrative. *Cell Tissue Res.* 309: 99-107.



- 
- Giordano M., Palermo M.S. (1991).** Melatonin induced enhancement of antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Pineal Res.* 10: 117-121.
- Giordano M., Vermeulen M., Palermo M.S. (1993).** Seasonal variations in antibody-dependent cellular cytotoxicity regulation by melatonin. *FASEB J.* 7: 1052-1054.
- Giusti P., Gusella M., Lipartiti M., Milani D., Zhu W., Vicini S., Manev H. (1995).** Melatonin protects primary cultures of cerebellar granule neurons from kainite but not from N-methyl-D-aspartate excitotoxicity. *Exp. Neurol.* 131: 39-46.
- Giusti P., Lipartiti M., Franceschini D., Schiavo N., Floreani M., Manev H. (1996).** Neuroprotection by melatonin from kainite-induced cytotoxicity in rats. *FASEB J.* 10: 891.
- Glaser R., Kiecolt-Glaser J.K. (1998).** Stress-associated immune modulation: relevance to viral infections and chronic fatigue syndrome. *Am. J. Med.* 105: S35-S42.
- Goldman B.D., Carter D.S., Hall V.D., Roychoudry P., Yellon S.M. (1981).** Physiology of pineal melatonin in three hamster species. Melatonin Rhythm Generating System. *Karger, Basel, Berlín.* pp 210.
- Goodnow C.C., Crosbie J., Adelstein S. (1988).** Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 334: 676-682.
- Goulet J.L., Griffiths R.C., Ruiz P., Spurney R.F., Pisetsky D.S., Koller B.H., Coffman T.M. (1999).** Deficiency of 5-lipoxygenase abolishes sex-related survival differences in MRL-lpr/lpr mice. *J. Immunol.* 163: 359-366.
- Govitrapong P., Hama Y., Pfeiffer R., Ebadi M. (1989).** Status of dopamine in bovine pineal glands and the stimulation of N-acetyltransferase activity by D<sub>2</sub>-dopaminergic receptor agonists in the rat pineal glands in culture. *J. Pineal Res.* 6: 17-31.
- Govitrapong P., Pariyanonth M., Ebadi M. (1992).** The presence and actions of opioid receptors in bovine pineal gland. *J. Pineal Res.* 13: 124-132.
- Griffiths M.M., Cannon G.W., Lepnard P.A., Reese V.R. (1993).** Induction of autoimmune arthritis in rats by immunization with homologous rat type II collagen is restricted to the RT1av1 haplotype. *Arthritis Rheum.* 36: 254-258.
- Grossman J.M., Tsao B.P. (2000).** Genetics and Systemic Lupus Erythematosus. *Currents Rheumatology Reports.* 2: 13-18.
- Gudbjörnsson B., Skogseid B., Öberg B. (1996).** Intact adrenocorticotrophic hormone secretion but impaired cortisol response in patients with active rheumatoid arthritis. Effect of glucocorticoids. *J. Rheumatol.* 23: 596-602.
- Guerrero J.M., Reiter R.J. (1992).** A brief survey of pineal gland-immune system interrelationships. *Endocr. Res.* 18: 91-113.
- Guerrero J.M., Pozo D., García-Mauriño S., Carrillo A., Osuna C., Molinero P., Calvo J.R. (2000).** Nuclear receptors are involved in the enhanced IL-2 production by melatonin in U-937 cells. *Biol. Signals Recept.* 9: 197-202.
-

- Guerrero J.M., Reiter R.J. (2002).** Melatonin-immune system relationships. *Curr. Top. Med. Chem.* 2: 167-179.
- Haakenstad A.O., Mannik M. (1974).** Saturation of the reticuloendothelial system with soluble immune complexes. *J. Immunol.* 112: 1939-1947.
- Haas C., Ryffel B., Le Hir M. (1997).** IFN- $\gamma$  is essential for the development of autoimmune glomerulonephritis in MRL/lpr mice. *J. Immunol.* 158: 5484.
- Hagiwara E., Gourley M.F., Lee S., Klinman D.K. (1996).** Disease severity in patients with systemic lupus erythematosus correlates with an increased ratio of interleukin-10:interferon  $\gamma$ -secreting cells in the peripheral blood. *Arthritis Rheum.* 39: 379.
- Hagiwara E., Okubo T., Aoki I., Ohno S., Tsuji T., Ihata A., Ueda A., Shirai A., Okuda K., Miyazaki J., Ishigatsubo Y. (2000).** IL-1 encoding plasmid has a beneficial effect on spontaneous autoimmune disease in MRL/Mp-lpr/lpr mice. *CYTOKINE* 12: 1035-1041.
- Haimov I., Lavie P., Laudon M., Herer P., Vigder C., Zisapel N. (1995).** Melatonin replacement therapy of elderly insomniacs. *Sleep* 18: 598-603.
- Haldar C.D., Haussler D., Gupta D. (1992).** Effect of the pineal gland on circadian rhythmicity of colony forming units for granulocytes and macrophages (CFU-GM) from rat bone marrow cell cultures. *J. Pineal Res.* 12: 79-83.
- Haller C., Holzner B., Mur E. (1997).** The impact of life events on patients with rheumatoid arthritis: a physiological myth?. *Clin. Exp. Rheumatol.* 15: 175-179.
- Halloran M.M., Woods J.M., Strieter R.M., Szekanecz Z., Volin M.V., Hosaka S., Haines K., Kunkel S.L., Burdick M.D., Walz A., Koch A.E. (1999).** The role of an epithelial neutrophil-activating peptide-78-like protein in rat adjuvant-induced arthritis. *J. Immunol.* 162:7492-7500.
- Hammer J., Gallazzi F., Bono E., Karr R.W., Guenot J., Valsasini P., Nagy Z.A., Sinigaglia F. (1995).** Peptide binding specificity of HLA-DR4 molecules: correlation with rheumatoid arthritis association. *J. Exp. Med.* 181: 1847-1855.
- Hang L., Theofilopoulos A.N., Dixon F.J. (1982).** A spontaneous rheumatoid arthritis-like disease in MRL/1 mice. *J. Exp. Med.* 155: 1690.
- Hansson I., Holmdahl R., Mattsson R. (1992).** The pineal hormone melatonin exaggerates development of collagen-induced arthritis in mice. *J. Neurosci.* 39: 23-30.
- Hansson I., Holmdahl R., Mattsson R. (1993).** Pinealectomy ameliorates collagen II-induced arthritis in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 92: 432-436.
- Harbuz M.S., Rooney C., Jones M., Ingram C.D. (1999).** Hypothalamo-pituitary-adrenal axis responses to lypopolysaccharide in male and female rats with adjuvant-induced arthritis. *Brain Behav. Immun.* 13: 335-347.
- Harris E.D. (1990).** Rheumatoid arthritis: pathophysiology and implications for therapy. *N. Engl. J. Med.* 322: 1277-1289.

- 
- Hastings M.H., Duffield G.E., Ebling F.J., Kidd A., Maywood E.S., Schurov I. (1997).** Non-photic signalling in the suprachiasmatic nucleus. *Biol. Cell* 89: 495-503.
- Hemmer B., Fleckenstein B.T., Vergelli M. (1997).** Identification of high potency microbial and self ligands for a human autoreactive class II-restricted T cell clone. *J. Exp. Med.* 185: 1651-1659.
- Hench P.S., Kendall E.C., Slocumb C.H., Polley H.F. (1950).** Effects of cortisone acetate and pituitary ACTH on rheumatoid arthritis, rheumatic fever and certain other conditions. *Arch. Int. Med.* 85: 545-666.
- Henden T., Stokkan K.A., Reiter R.J., Nonaka K.O., Lerchl A., Jones D.J. (1992).** The age-associated reduction in pineal  $\beta$ -adrenergic receptor density is prevented by life long food restriction in rats. *Biol. Signals* 1: 34-39.
- Herinckson M., Giannini E.H., Hirsch R. (1994).** Reduction of mortality and lymphadenopathy in MRL-lpr/lpr mice treated with nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibody. *Arthritis Rheum.* 37: 587-594.
- Hermann G., Tovar C.A., Beck F.M., Allen C., Sheridan J.F. (1993).** Restraint stress differentially affects the pathogenesis of an experimental influenza viral infection in three inbred strains of mice. *J. Neuroimmunol.* 47: 83-94.
- Hermann M., Voll R.E., Zoller O.M. (1998).** Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 41: 1241-1250.
- Heubner O. (1898).** Tumor der glandula pinealis. *M. Tsch. Med. Wschr.* 24: 214.
- Hill B.T., Blask D. (1988).** Effect of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF7) in culture. *Cancer Res.* 48: 6121-6126.
- Hirata F., Hayaishi O., Tokuyama T. (1974).** In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J. Biol. Chem.* 249: 1311-1313.
- Ho A.K., Klein D.C. (1987).** Activation of  $\alpha_1$ -adrenoreceptors, protein kinase C, or treatment with intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$  elevating agents increases pineal phospholipase  $\text{A}_2$  activity. *J. Biol. Chem.* 262: 11761-11770.
- Ho A.K., Thomas T.P., Chilk C.L., Anderson W.B., Klein D.C. (1988).** Protein kinase C: subcellular redistribution by increased  $\text{Ca}^{2+}$  influx. *J. Biol. Chem.* 263: 9292-9297.
- Holoshitz J., Koning F., Coligan J.E., DeBruyn J., Strober S. (1989).** Isolation of CD4- CD8- mycobacteria-reactive T lymphocyte clones from rheumatoid arthritis synovial fluid. *Nature* 339: 226-229.
- Hortelano S., Diaz-Guerra M.J.M., González-García A., Leonardo E., Garnallo C., Bosca L., Martínez C. (1997).** Linomide administration to mice attenuates the induction of nitric oxide synthase elicited by lipopolysaccharide-activated macrophages and prevents nephritis in MRL/Mp-lpr/lpr mice. *J. Immunol.* 158: 1402.
- Houssiau F.A., Lefebvre C., Vanden Berghe M., Lambert M., Devogelaer J.P., Renauld J.C. (1995).** Serum interleukin 10 titers in systemic lupus erythematosus reflect disease activity. *Lupus* 4: 393-395.
-

- Hu S.K., Mitcho Y.L., Rath N.C. (1987).** Effect of estradiol on interleukin 1 synthesis by macrophages. *Int. J. Immunopharmacol.* 10: 247-252.
- Huerto-Delgadillo L., Antón-Tay F., Benítez-King G. (1994).** Effects of melatonin on microtubule assembly depend of hormone concentration: role of melatonin as a calmodulin antagonist. *J. Pineal Res.* 17: 55-62.
- Ibata Y., Okamura H., Tanaka M., Tamada Y., Hayashi S. (1999).** Functional morphology of the suprachiasmatic nucleus. *Front. Neuroendocrinol.* 20: 241-268.
- Iguchi H., Kato A., Ibayashi H. (1982).** Age-dependent reduction in serum melatonin concentration in healthy human subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 52: 27-29.
- Illnerova H., Hoffmann K., Vanecek J. (1984).** Adjustment of pineal melatonin and N-acetyltransferase rhythms to change from long to short photoperiod in the Djungarian hamster *Phodous sungorus*. *Neuroendocrinology* 38: 226-231.
- Illnerova H., Buresova M., Prest J. (1993).** Melatonin rhythm in human milk. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77: 838-841.
- Inoue S., Kawanishi S. (1995).** Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide. *FEBS Lett.* 371: 86-88.
- Ishida H.T., Muchamuel T., Sakaguchi S., Andrade S., Menon S., Howard M. (1994).** Continuous administration of anti-interleukin 10 antibodies delays onset of autoimmunity in NZB/W F1 mice. *J. Exp. Med.* 179: 305.
- Issekutz A.C., Meager A., Otterness I. (1994).** The role of tumor necrosis factor- $\alpha$ , and IL-1 in polymorphonuclear leukocyte and T lymphocyte recruitment to joint inflammation in adjuvant arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 97: 26-32.
- Izui S., McConahey P.J., Clark J.P., Hang L.M., Hara I., Dixon F.J. (1981).** Retroviral gp70 immune complexes in NZB x NZW F2 mice with murine lupus nephritis. *J. Exp. Med.* 154: 517-528.
- Izui S., Kelley V.E., Masuda K., Yoshida H., Roths J.B., Murphy E.D. (1984).** Induction of various autoantibodies by mutant gene *lpr* in several strains of mice. *J. Immunol.* 133: 127.
- Jabs D.A., Kuppers R.C., Saboori A.M. (1993).** Effects of early and late treatment with anti-CD4 monoclonal antibody on autoimmune disease in MRL/Mp-*lpr/lpr* mice. *Cell Immunol.* 154: 66-76.
- Jacob C.O., van der Meide, McDevitt H.O. (1987).** In vivo treatment of (NZB x NZW)F1 lupus-like nephritis with monoclonal antibody to interferon- $\gamma$ . *J. Exp. Med.* 166: 798-803.
- Jafarian-Tehrani M., Stenberg E.M. (1999).** Animal models of neuroimmune interactions in inflammatory diseases. *J. Neuroimmunol.* 100: 13-20.
- James J.A., Gross T., Scofield R.H., Harley J.B. (1995).** Immunoglobulin epitope spreading and autoimmune disease after peptide immunization: Sm B/B` derived PPPGMRPP and PPPGIRGP induce splaisosome autoimmunity. *J. Exp. Med.* 181: 453-461.

- 
- Janavs J.L., Pierce M.E., Takahashi J.S. (1991).** N-acetyltransferase and protein synthesis modulate melatonin production by Y79 human retinoblastoma cells. *Brain Res.* 540: 138-144.
- Jankovic D., Isakovic K., Petrovic S. (1970).** Effect of pinealectomy on immune reactions in the rat. *Immunology* 18: 1-6.
- Janossy G., Panayai G., Duke O., Bofill M., Poulter L.W., Goldstein G. (1981).** Rheumatoid arthritis: a disease of T-lymphocyte/macrophage immunoregulation. *Lancet* 839-841.
- Jara L.J., Lavallo C., Espinosa L.R. (1992).** Does prolactin have a role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus?. *J. Rheumatol.* 19: 1333-1336.
- Jasin H.E. (1985).** Autoantibody specificities of immune complexes sequestered in articular cartilage of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 28: 241-248.
- Jevinkar A.M., Grusby M.J., Glimcher L.H. (1994).** Prevention of nephritis in major histocompatibility complex class II-deficient MRL-lpr mice. *J. Exp. Med.* 179: 1137-1143.
- Joe B., Wilder R.J. (1999).** Animals models of rheumatoid arthritis. *Mol. Med. Today* 5: 367-369.
- Jones M.P., Melan M.A., Witt-Enderby P.A. (2000).** Melatonin decreases cell proliferation and transformation in a melatonin receptor-dependent manner. *Cancer Lett.* 151: 133-143.
- Kalsi J., Ravirajan C.T., Rahman A., Isenberg D.A. (2002).** Structure-function analysis and the molecular origins of anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus. En Expert reviews in molecular medicine. <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk>
- Kamradt T.N. (2001).** Advances in Immunology: Tolerance and autoimmunity. *N. Eng. J. Med.* 344: 655-664.
- Kanda N., Tsuchida T., Tamaki K. (1996).** Testosterone inhibits immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells. *Clin. Exp. Immunol.* 106: 410-419.
- Karasek M., Reiter R.J. (1992).** Morphofunctional aspects of the mammalian pineal gland. *Microsc. Res. Tech.* 21: 136-157.
- Karasek M., Pawlikowski M. (1999).** Pineal gland, melatonin and cancer. *Neuroendocrinol. Lett.* 20: 139-144.
- Karpuzoglu-Sahin E., Zhi-Jun Y., Lengi A., Sriranganathan N., Ansar Ahmed S. (2001a).** Effects of long-term treatment on IFN- $\gamma$ , IL-2, and IL-4 gene expression and protein synthesis in spleen and thymus of normal C57BL/6 mice. *CYTOKINE* 14: 208-217.
- Karpuzoglu-Sahin E., Hissong B.D., Ansar Ahmed S. (2001b).** Interferon- $\gamma$  levels are upregulated by 17- $\beta$ -estradiol and diethylstilbestrol. *J. reprod. Immunol.* 52: 113-127.
- Kaupilla A., Kivelä A., Pakarinen A., Vakkuri O. (1987).** Inverse seasonal relationships between melatonin and ovarian activity in humans in a region with a strong seasonal contrast luminosity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 65: 823-826.
-

- Kebabian J.W., Zatz M., Romero J.A., Axelrod J. (1975).** Rapid changes in rat pineal  $\beta$ -adrenergic receptor: Alterations in 1-( $^3$ H) alprenolol binding and adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 3735.
- Keller T., Chang C., Ershler W.B. (1996).** Inhibition of NF $\kappa$ B activity through maintenance of I $\kappa$ B $\alpha$  levels contributes to dihydrotestosterone-mediated repression of IL-6 promoter. *J. Biol. Chem.* 271: 26267-26275.
- Kim H.J., Kwon J.S. (1999).** Effects of placing micro-implants of melatonin in striatum on oxidative stress and neuronal damage mediated by N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptors. *Arch. Pharm. Res.* 22: 35.
- Kimberly R. (1987).** Immune complexes in the rheumatic diseases. *Rheumatic diseases clinics of North America.* 13: 583-596.
- King T.S., Richardson B.A., Reiter R.J. (1981).** Age-associated changes in pineal serotonin N-acetyltransferase activity and melatonin content in the male gerbil. *Endocr. Res. Commun.* 8: 253.
- Kirschbaum C., Kudielka B.M., Gaab J., Schommer N.C., Hellhammer D.H. (1999).** Impact of gender, menstrual cycle phase, and oral contraceptives on the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Psychosomat. Med.* 61: 154-162.
- Kivelä K., Kauppila A., Leppäuto J., Vakkuri O. (1989).** Serum and amniotic fluid melatonin during human labor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 69: 1065-1068.
- Klein D.C., Weller J.L. (1970).** Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science* 169: 1093-1095.
- Klein D.C., Buda M.J., Kapoor C.L., Krishna G. (1978).** Pineal serotonin N-acetyltransferase activity: abrupt decrease in adenosine 3',5'-monophosphate may be signal for "turn off". *Science* 199: 309-311.
- Klein D.C., Auerbach A.D., Weller J.L. (1981).** Seesaw signal processing in pineal cells: homologous sensitization of adrenergic stimulation of cyclic GMP accompanies homologous desensitization of  $\beta$ -adrenergic stimulation of cyclic AMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 4625-4629.
- Klein D.C., Smoot R., Weller J.L., Higa S., Markey S.P., Greed G.J., Jacobowitz S.M. (1983).** Lesions of the paraventricular nucleus area of the hypothalamus disrupt the suprachiasmatic spinal cord circuit in the melatonin rhythm-generating system. *Brain Research Bulletin* 10: 647-652.
- Klein D.C. (1985).** Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. *Ciba Found Symp.* 11738-56.
- Klein D.C., Roseboom P.H., Coon S.L. (1996).** New light is shining in the melatonin rhythm enzyme: the first postcloning view. *Trends Endocrinol. Metabol.* 7: 106-112.
- Koch A.E., Kunkel S.L., Strieter R.M. (1995).** Cytokines in rheumatoid arthritis. *J. Invest. Med.* 43: 28-38.
- Koh D.R., Ho A., Rahemtulla A., Fung-Leung W.P., Griesser H., Mak T.W. (1995).** Murine lupus in MRL/lpr mice lacking CD4 or CD8 T cells. *Eur. J. Immunol.* 25: 2558-2562.

- Kopin I.J., Pare M.B., Axelrod J., Weissbach H. (1961).** The fate of melatonin in animals. *J. Biol. Chem.* 236: 3072-3075.
- Korvarsky J. (1983).** Clinical pharmacology and toxicology of CPP: emphasis in rheumatic diseases. *Sem. Rheumatic Diseases* 12: 359-372.
- Kotake S., Schumacher Jr H.R., Yarboro C.H., Arayssi T.K., Pando J.A., Kanik K.S., Gourley M.F., Klippel J.H., Wilder R.L. (1997).** In vivo gene expression of type 1 and type 2 cytokines in synovial tissues from patients in early stages of rheumatoid, reactive, and undifferentiated arthritis. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 109: 286-301.
- Kotler M., Rodríguez C., Sáinz R.M., Antolín I., Menéndez-Peláez A. (1998).** Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *J. Pineal Res.* 24: 83-89.
- Kotzin B.L., O'Dell J.R. (1995).** Systemic lupus erythematosus. In Samter's Immunologic Diseases, Fifth Edition, M.M. Frank, K.F. Austen, H.N. Claman, and E.R. Unanue, eds. (Boston: Little, Brown & Co.), pp 667-697.
- Kotzin B.L. (1996).** Systemic lupus erythematosus. *Cell* 85: 303-306.
- Kubo M., Cinaderer B. (1990).** Polymorphism of age-related changes in interleukin (IL) production: differential changes of T helper subpopulations, synthesizing IL-2, IL-3a, IL-3 and IL-4. *Eur. J. Immunol.* 20: 1289-1296.
- Kuci S., Becker J., Veit G., Handgretinger R., Attanasio A., Bruchelt G., Treuner J., Niethammer D., Gupta D. (1988).** Circadian variation in the immunomodulatory role of the pineal gland. *Neuroendocrinol. Lett.* 10: 65-79.
- Kveder S., McIsaac W.M. (1961).** The metabolism of melatonin (n-acetyl-methoxytryptamine) and 5-methoxy-tryptamine. *J. Biol. Chem.* 236: 3214-3220.
- Kvetnoy I.M., Yuzhakov V.V. (1994).** Extrapineal melatonin: non-traditional localization and possible significance for oncology. En *Advance in Pineal Research*. Maestroni GJM, Conti A, Reiter RJ (eds). John Libbey Inc, London, vol 7, pp 197-210.
- Laasko M.L., Porkka-Heiskanen T., Alila A., Stenberg D., Johansson G. (1990).** Correlation between salivary and serum melatonin: dependence on serum melatonin levels. *J. Pineal Res.* 9: 39-50.
- Lahita R.G., Bradlow H.L., Ginzler E., Pang S., New M. (1994).** Low plasma androgens in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 37: 1305-1310.
- Lahita R.G. (1996).** The connective tissue diseases and the overall influence of gender. *Int. J. Fertil. Menopausal Stud.* 41: 156-165.
- Lahita R.G. (1999).** The role of sex hormones in systemic lupus erythematosus. *Curr. Opin. Rheumatol.* 11: 352-356.
- Lakin M.L., Miller C.H., Scott M.L., Winters W.D. (1981).** Involvement of the pineal gland and melatonin in murine analgesia. *Life Sci.* 29: 2543-2551.
- Lazarus M., Hajeer A.H., Turner D., Sinnott P., Worthington J., Ollier W.E.R. (1997).** Genetic variation in the interleukin-10 gene promoter and systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 24: 2314-2317.

- Leadem C.A., Burns D.M. (1987).** Pineal induce inhibition of prolactinoma growth in F344 rats: effects of blinding and melatonin treatment. *Endocrinol. Soc.* 344: 107-112.
- Lechner O., Hu Y., Jafarian-Tehrani M., Dietrich H., Schwarz S., Herold M., Haour F., Wick G. (1996).** Disturbed immunoendocrine communication via the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in murine lupus. *Brain Behav. Immun.* 10: 337-350.
- Lederach D., Bach J.F., Koutouzov S. (1998).** Nucleosomes inhibit phagocytosis of apoptotic thymocytes by peritoneal macrophages from MRL+/+ lupus prone mice. *J. Leukoc. Biol.* 68: 774-780.
- Lee P.P., Pang S.F. (1993).** Melatonin and its receptors in the gastrointestinal tract. *Biol. Signals* 2: 181-193.
- Lefkowitz J.B., Kiehl M., Rubenstein J. (1996).** Heterogeneity and clinical significance of glomerular-binding antibodies in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 98: 1373-1380.
- Lehman T.J., Sherry D., Wagner L. (1989).** Intermittent IV CPP therapy for lupus nephritis. *J. Pediatr.* 114: 1055-1060.
- León-Blanco M.M., Guerrero J.M., Reiter R.J., Calvo J.R., Pozo D. (2003).** Melatonin inhibits telomerase activity in the MCF-7 tumor cell line both in vivo in vitro. *J. Pineal Res.* 35: 204-211.
- Lerner L.J., Holthaus J.F., Thompson C.R. (1958).** A non-steroidal estrogen antagonist 1-(p-2-diethylaminoethoxyphenyl)-1-phenyl-2-p-methoxyphenyl-ethanol. *Endocrinology*. 63:295-63318.
- Lewy A.J., Wehr T.A., Goodwin F.K., Newsome D.A., Markey S.P. (1980).** Light suppresses melatonin secretion in humans. *Science* 210:1267-1269.
- Lewy A.J., Kern H.E., Rosenthal N.E., 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., Newsome D.A. (1983).** Different types of melatonin circadian rhythms in some blind subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 56:1103-1107.
- Li Z.G., Danis V.A., Brooks P.M. (1993).** Effect of gonadal steroids on the production of IL-1 and IL-6 by blood mononuclear cells in vitro. *Clin. Exp. Rheumatol.* 11: 157-162.
- Liang M.H., Karlson E.W. (1996).** Female hormone therapy and the risk of developing or exacerbating systemic lupus erythematosus or rheumatoid arthritis. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 108: 25-28.
- Lieberman H.R., Waldhauser F., Garfield G., Lynch H., Wurtman R.J. (1984).** Effects of melatonin on human mood and performance. *Brain Res.* 323: 201-207.
- Lipartiti M., Franceschini D., Zanoni R., Gusella M., Giusti P., Cagnoli C.M., Kharmalov A. (1986).** Neuroprotective effects of melatonin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 398: 315-321.
- Lipton J.M., Catania A. (1997).** Anti-inflammatory actions of the neuroimmunomodulators alpha-MSH. *Immunol. Today* 18: 140-145.



- 
- Lissoni P., Esposti D., Esposti G., Mauri R., Resentini M., Morabio F., Fumagalli P., Santagostino A., Delitala G., Fraschini F. (1986).** Clinical study of the relationship between the pineal gland and the opioid system. *J. Neural Transm.* 65: 63-73.
- Lissoni P., Barni S., Archili C., Cattaneo G., Rovelli F., Conti A., Maestroni G.J.M., Tancini G. (1990).** Endocrine effects of a 24-hour intravenous infusion of interleukin-2 in the immunotherapy of cancer. *Anticancer Res.* 10: 753-758.
- Lissoni P., Barni S., Ardizzioia A., Brivio F., Tancini G., Conti A., Maestroni G.J.M. (1992a).** Immunological effects of a single evening subcutaneous injection of low-dose interleukin-2 in association with the pineal hormone melatonin in advanced patient cancer. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 6: 132-136.
- Lissoni P., Tisi E., Barni S., Ardizzioia A., Rovelli F., Rescaldani R., Ballabio D., Benenti C., Angeli M., Tancini G. (1992b).** Biological and clinical results of a neuroimmunotherapy with interleukin-2 and the pineal hormone melatonin as a first line treatment in advanced non-small cell lung cancer. *Br. J. Cancer* 66: 155-158.
- Lissoni P., Barni S., Ardizzioia A., Paolorossi F., Crispino S., Tancini G., Tisi E., Archili C., De Toma D., Pipino G., Conti A., Maestroni G.J.M. (1992c).** Randomized study with the pineal hormone melatonin versus supportive care alone in advanced nonsmall cell lung cancer resistant to a first-line chemotherapy containing cisplatin. *Oncology* 49: 336-339.
- Llorente L., Zou W., Levy Y., Richaud-Patin Y., Wijdenes J., Alcocer-Varela J., Morel-Fourier B., Brouet J.C., Alarcón-Segovia D., Galanaud P. (1995).** Role of interleukin 10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* 181: 839.
- Llorente L., Richaud-Patin Y., García-Padilla C., Claret E., Jakez-Ocampo J., Cardiel M.H., Alcocer-Varela J., Grangeot-Keros L., Alarcón-Segovia D., Widjenes J. (2000).** Clinical and biologic effects of anti-interleukin-10 monoclonal antibody administration in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 43: 1790.
- Lorenz H.M., Grunke M., Hieronymus T. (1997).** In vitro apoptosis and expression of apoptosis-related molecules in lymphocytes from patients with systemic erythematosus and other autoimmune diseases. *Arthritis Rheum.* 40:306-317.
- Lotz M., Hashimoto S., Kuhn K. (1999).** Mechanisms of chondrocyte apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage* 7: 389-391.
- Lu C.Y., Unanue E.R. (1982).** Spontaneous T-cell lymphokine production and enhanced macrophage Ia expression and tumoricidal activity in MRL-lpr mice. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 25: 213.
- Luross J.A., Williams N.A. (2001).** The genetic and immunopathological process underlying collagen-induced arthritis. *Immunology* 103: 407-416.
- Lynch H.J., Azaki Y., Wurtman R.J., (1978).** The measurement of melatonin in mammalian tissues and body fluids. *J. Neural Transm.* 13(suppl): 251-264.
-

- Macdiarmid F., Wang D., Duncan L., Wang D.Y., Purohit A., Hilchick M.W., Reed M.J. (1994).** Stimulation of aromatase activity in breast fibroblasts by tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Mol. Cell Endocrinol.* 106: 17-21.
- Maestroni G.J.M., Pierpaoli W. (1981).** Pharmacologic control of the hormonally mediated immune response. *Psychoneuroimmunology*, Academic Press, N.Y., pg 405-425.
- Maestroni G.J.M., Conti A., Pierpaoli W. (1986).** Role of the pineal gland in immunity. I. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody responses and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. *J. Neuroimmunol.* 13: 19-30.
- Maestroni G.J.M., Conti A., 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., Pierpaoli W. (1988).** Role of the pineal gland in immunity. III. Melatonin antagonizes the immunosuppressive effects of acute stress via an opiate mechanism. *Immunology* 63: 465-469.
- Maestroni G.J.M., Conti A., Pierpaoli W. (1989).** Melatonin, stress, and the immune system. *J. Pineal Res.* 7: 203-229.
- Maestroni G.J.M., Conti A. (1990a).** The pineal neurohormone melatonin stimulates activated CD4+, Thy-1+ cells to release opiod agonist(s) with immunoenhancing and anti-stress properties. *J. Neuroimmunol.* 28: 167-176.
- Maestroni G.J.M., Conti A. (1990b).** The melatonin-immune system-opiod network. En *Advances in Pineal Res.* 4, R.J. Reiter and A. Lukaszyk eds., J. Libbey and Co. Ltd., Londres, pp 295-232.
- Maestroni G.J.M., Conti A. (1991).** Anti-stress role of the melatonin-immuno-opiod network: Evidence for a physiological mechanism involving T cell-driven, immunoreactive  $\beta$ -endorphin and MET-enkephalin binding to thymic opiod receptors. *Int. J. Neurosci.* 61: 289-298.
- Maestroni G.J.M. (1993).** The immunoendocrine role of melatonin. *J. Pineal Res.* 14: 1-10.
- Maestroni G.J.M., Covacci V., Conti A. (1994a).** 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., Conti A., Lissoni P. (1994b).** 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., Hertens E., Galli P., Conti A., Pedrinis E. (1996).** Melatonin induced T-helper cell hematopoietic cytokines resembling both interleukin-4 and dynorphin. *J. Pineal Res.* 21: 131-139.
- Marczynski T.J., Yamaguchi N., Ling G.M., 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.
- Margolis H.M., Caplan P.S. (1951).** The effect of some steroids (testosterone propionate, desoxycorticosterone acetate and ascorbic acid, and 21-acetoxy  $\Delta$ -5-pregnenolone, artisonone acetate, Wyeth) in rheumatoid arthritis. *Ann. Intern. Med.* 34: 61-71.

- Martín X.D., Malina H.Z., Brennan M.C., Hendrickson P.H., Lichter P.R. (1992).** The ciliary body –the third organ found to synthesize indoleamines in humans. *Eur. J. Ophthalmol.* 2(2): 67-72.
- Martínez-Cruz F., Pozo D., Osuna C., Espinar A., Marchante C., Guerrero J.M. (2002).** Oxidative stress induced by phenylketonuria in the rat: Prevention by melatonin, vitamin E, and vitamin C. *J. Neurosci. Res.* 69: 550-558.
- Masi A., Medsger T. (1989).** Epidemiology of the Rheumatic Diseases. Rheumatoid Arthritis. En *Arthritis and Allied Conditions*. McCarty D.J. 11<sup>a</sup> ed., Lea and Febiger, Philadelphia, pp 16-54.
- Masi A.T. (1994).** Incidence of rheumatoid arthritis: do the observed age-sex interaction patterns support a role of androgen-anabolic steroid deficiency in its patogénesis?. *Br. J. Rheumatol.* 33: 697-701.
- Masi A.T., Cutolo M. (1995).** Perspectives on sex hormones and the systemic rheumatic diseases. *Clin. Exp. Rheumatol.* 13: 201-202.
- Masi A.T., da Silva J.A.P., Cutolo M. (1996a).** Perturbations of the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis and adrenal androgen (AA) functions in rheumatoid arthritis. In: Neuroendocrine immune mechanisms of rheumatic diseases. Chikanza IC, editor. *Ballières's Clin. Rheumatol.* 10: 295-331.
- Masi A.T., Chrousos G.P. (1996b).** Hypothalamic-pituitary-adrenal-glucocorticoid axis function in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 23: 577-581.
- Masi A.T., Bijlsma J.W.J., Chikanza I.C., Pitzalis C., Cutolo M. (1999).** Neuroendocrine, immunologic and microvascular systems interactions in rheumatoid arthritis: physiopathogenic and therapeutic perspectives. *Semin. Arthritis Rheum.* 29: 65-81.
- Mastorakos G., Chrousos G.P., Weber J.S. (1993).** Recombinant interleukin-6 activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in human. *J. Clin. Endocr. Metab.* 77: 1690-1694.
- Mattson R., Hansson I., Holmdahl R. (1994).** Pineal gland in autoimmunity: Melatonin-dependent exaggeration of collagen-induced arthritis in mice. *Autoimmunity* 17: 83-86.
- Matsuda T., Hirano T. (1990).** Interleukin 6 (IL-6). *Biotherapy* 2: 363-373.
- Matsuzawa A., Yasuda T., Zhang Y., Nagase H., Yoshimoto T., Kimura M., Tsubura A. (2000).** Alleviation of renal disease and lymphadenopathy in MRL-Fas<sup>lprcg</sup>/Fas<sup>lprcg</sup> (MRL-lpr<sup>cg</sup>) mice neonatally infected with mouse mammary tumor virus encoding superantigen strongly reactive with TCR V $\beta$ 8.2 element. *Viral Immunol.* 13:297-311.
- Mayo J.C., Sáinz R.M., Uria H., Antolín I., Esteban M.M., Rodríguez C. (1998).** Melatonin prevents apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuronal cells: implications for Parkinson's disease. *J. Pineal Res.* 24: 179-192.
- McCartney-Francis N., Allen J.B., Mizel D.E., Albina J.E., Xie Q.W., Nathan C.F., Wahl S.M. (1993).** Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 178: 749-754.
- McCord C.P., Allen F.B. (1917).** Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J. Exp.*

Zool. 23207-23224.

**McCune W.J., Golbus J., Sedles W., Bohlke P. (1988).** Clinical and immunology effects of monthly administration of IV CPP in sever SLE. *N. Eng. J. Med.* 318: 1423-1431.

**McIntyre I.M., Norman T.R., Burrows G.D., Armstrong S.M. (1989).** Human melatonin suppression by light is intensity dependent. *J. Pineal Res.* 6: 149-156.

**McNulty J.A., Relfson M., Fox L.M., Kus L., Handa R.J., Schneider G.B. (1990).** Circadian analysis of mononuclear cells in the rat following pinealectomy and superior cervical ganglionectomy. *Brain Behav. Immun.* 4: 292-307.

**Melchiori D., Reiter R.J., Attia A.M., Hara M., Burgos A., Nisticò G. (1995).** Potent protective effect of melatonin on in vivo paraquat-induced oxidative damage in rats. *Life Sci.* 96: 83-89.

**Menéndez-Peláez A., Brizzell G.R., Nonaka K.O., Reiter R.J. (1990).** In vivo administration of isoproterenol or forskolin during the light phase induces increases in the melatonin content of the Syrian hamster pineal gland without a rise in N-acetyltransferase activity. *Neurosci. Lett.* 110: 314-318.

**Menéndez-Peláez A., Reiter R.J. (1993).** Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J. Pineal Res.* 15: 59-69.

**Merino R., Iwamoto M., Fossati L. (1993).** Polyclonal B cell activation arises from different mechanisms in lupus-prone (NZB x NZW)F1 and MRL/MpJ-lpr/lpr mice. *J. Immunol.* 151: 6509-6516.

**Milcu S.M., Pitis M. (1943).** Contributions à l'étude de la corrélation thymo-épiphytaire. *Acta Endocr.* 9: 13-15.

**Mishra N., Reilly C.M., Brown D.R., Ruiz P., Gilkeson G.S. (2003).** Histone deacetylase inhibitors modulate renal disease in the MRL-lpr/lpr mouse. *J. Clin. Invest.* 111: 539-552.

**Mohan C., Adams S., Stanik V., Datta S.K. (1993).** Nucleoside: a major immunogen for pathogenic autoantibody-inducing T cell of lupus. *J. Exp. Med.* 177: 1367-1381.

**Mohan C., Datta S.K. (1995).** Lupus key pathogenic mechanisms and contributing factors. *Clin. Immunol-Immunopathol.* 77: 209-220.

**Molina J. y cols. (1995).** Artritis Reumatoidea. En *Fundamentos de Medicina*. Vélez H. y cols. 4ª ed. Corporación para investigaciones biológicas. Medellín. pp 133-151.

**Molis T.M., Spriggs L.L., Hill S.M. (1994).** Modulation of estrogen receptor mRNA expression by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 8: 1681-1690.

**Moller M., Baeres F.M. (2002).** The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res.* 309: 139-150.

**Moore R.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: 17-33.

- 
- Moore K.W., O'Garra A., de Waal M.R., Vieira P., Mosmann T.R. (1993). Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol.* 11:165-1190.
- Moore K.W., de Waal Malefyt R., Coffman R.L., O'Garra A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 683.
- Morel L., Rudofsky U.H., Longmate J.A., Schiffenbauer J., Wakeland E.K. (1994). Polygenic control of susceptibility to murine systemic lupus erythematosus. *Immunity* 1: 219-229.
- Morita Y., Yamamura M., Harada S., Okamoto H., Imoue H., Makino H. (1996). A role of interleukin-12 in perpetuating Th1 cell-mediated immune responses in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 39: S128.
- Morrey K.M., Mclachlan J.A., Serkin C.D., Bakouche O. (1994). Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. *J. Immunol.* 153: 2671-2680.
- Mosmann T., Sad S. (1996). The expanding universe of T-cell subset: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* 17: 138-142.
- Mountz J.D., Smith H.R., Wilder R.L., Reeves J.P., Steinberg A.D. (1987). CS-A therapy in MRL-lpr/lpr mice: amelioration of immunopathology despite autoantibody production. *J. Immunol.* 138: 157-163.
- Mucha S., Zylinska K., Zerek-Meten G., Swietoslowski J., Stepien H. (1994). Effect of interleukin-1 on in vivo melatonin secretion by the pineal gland in rats. *Adv. Pineal Res.* 7: 177.
- Muñoz-Gómez J. (1989). Artritis Reumatoidea. En *Reumatología Clínica*. Ed. Rotes Querol J. Barcelona. pp 75-98.
- Murphy E.D., Roths J.B. (1978). Autoimmunity and lymphoproliferation: induction by mutant gene lpr, and acceleration by a male-associated factor in strain BXSB mice. In *Genetic Control of Autoimmune Disease*. N.R. Rose, P.E. Bigazzi, and N.L. Warner, eds. Elsevier, North Holland, pp 207.
- Murray L.J., Lee R., Martens C. (1990). In vivo cytokine gene expresión in T cell subsets of the autoimmune MRL/Mp-lpr/lpr mouse. *Eur. J. Immunol.* 20: 163.
- Nagata S., Suda T. (1995a). Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol. Today* 16: 9-43.
- Nagata S., Golstein P. (1995b). The Fas death factor. *Science* 267: 1449.
- Namoodiri M.A.A., Weller J.L., Klein D.C. (1980). Evidence of inactivation of pineal indoleamine N-acetyltransferase by protein thiol: disulfide exchange. *J. Biol. Chem.* 255: 6032-6035.
- Nathan C. (1992). Nitric oxide as secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6: 3051-3064.
- Navarro M.A., Nolla J.M., Machuca M.I. (1998). Salivary testosterone in postmenopausal women with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 25:
- Nelson R.J., Demas G.E., Klein S.L., Kriegsfeld L.J. (1995). The influence of season, photoperiod and melatonin on immune function. *J. Pineal Res.* 19: 149-165.
-

- Nemazee D.A., Burki K. (1989).** Clonal deletion of lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* 337: 562-566.
- Nemazee D.A. (2000).** Receptor selection in B and T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 19-51.
- Neri B., Brocchi A., Carossino A.M., Cini-Neri G., Gemelli M.T., Tommasi M.S., Cagnoni M. (1995).** Effects of melatonin administration on cytokine production in patients with advanced solid tumors. *Oncol. Rep.* 2: 45-47.
- Nestler J.E. (1993).** Interleukin-1 stimulates aromatase activity of human placental cytotrophoblasts. *Endocrinology* 132: 566-570.
- Nietfeld J.J., Wilbrink B., Helle M., van Roy J.L.A.M., den Otter R.W., Swaak A.J.G., Huber-Bruning O. (1990).** Interleukin-1-induced interleukin-6 is required for the inhibition of proteoglycan synthesis by interleukin-1 in human articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 33: 1695-1701.
- Niranjan T.G., Krishnakantha T.P. (2000).** Membrane changes in rat erythrocyte ghosts on ghee feeding. *Mol. Cell Biochem.* 204: 57-63.
- Nose M, Terada M, Nishihara M, Kamogawa J, Miyazaki T, Qu WM, Mori S, Nakatsuru S. (2000).** Genome analysis of collagen disease in MRL/lpr mice: polygenic inheritance resulting in the complex pathological manifestations. *Int. J. Cardiology* 75:S53-S61.
- O'Connor T.M., O'Halloran D.J., Shanahan F. (2000).** The stress response and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: from molecule to melancholia. *Q. J. med.* 93: 323-333.
- Oliver S.J., Cheng T.P., Banquerigo M.L., Brahn E. (1998).** The effect of thalidomide and 2 analogs on collagen induced arthritis. *J. Rheumatol.* 25: 964-969.
- O'Sullivan F.X., Ray C.J., Takeda Y. (1991).** Long-term anti-CD4 treatment of MRL/lpr mice ameliorates immunopathology and lymphoproliferation but fails to suppress rheumatoid factor production. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 61: 421-427.
- Owen A.D., Schapira A.H.V., Jenner P., Marsden C.D. (1997).** Indices of oxidative stress in Parkinson's Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *J. Neural Trans.* 5:1167-1173.
- Ozmen L., Roman D., Fountoulakis M., Schmid G., Ryffel B., Garotta G. (1995).** Experimental therapy of systemic lupus erythematosus: the treatment of NZB/W mice with mouse soluble interferon- $\gamma$  receptor inhibits the onset of glomerulonephritis. *Eur. J. Immunol.* 25: 6-12.
- Pablos M.I., Agapito M.T., Gutiérrez R., Recio J.M., Reiter R.J., Barlow-Walden L.R., Acuña-Castroviejo D., Menéndez-Peláez A. (1995).** Melatonin stimulates the activity of the detoxifying enzyme glutathione peroxidase in several tissues of chicks. *J. Pineal Res.* 19:111-115.
- Paneari A.E. (1993).** Lymphocytes as a source of hormones and peptides. *J. Endocrinol. Invest.* 16: 549-557.

- 
- Panke E.S., Reiter R.J., Rollag M.G. (1979).** Effect of removal of the Harderian glands on pineal melatonin concentrations in the Syrian hamster. *Experientia* 35: 409-412.
- Papolla M.A., Sos M., Omar R.A., Bick R.J., Hickson-Bick D.L., Reiter R.J., Efthimiopoulos S., Robakis N.K. (1997).** Melatonin prevents death of neuroblastoma cells exposed to the Alzheimer amyloid peptide. *J. Neurosci.* 17: 1683-1690.
- Pardridge W.M., Mietus L.J. (1980).** Transport of albumin-bound melatonin through the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 34:1761.
- Park Y.B., Lee S.K., Kim D.S., Lee J., Lee C.H., Song C.H. (1998).** Elevated interleukin-10 correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Rheumatol.* 16: 283.
- Peng S.L., Madaio M.P., Hughes D.P.M., Crispe I.N., Owen M.J., Wen L., Hayday A.C., Craft J. (1996).** Murine lupus in the absence of  $\alpha\beta$  T cells. *J. Immunol.* 156: 4041-4049.
- Peng S.L., Moslehi J., Craft J. (1997).** Roles of interferon- $\gamma$  and interleukin-4 in murine lupus. *J. Clin. Invest.* 99: 1936-1946.
- Peña M. (1997).** Artritis Reumatoidea. 30 años de experiencia. 1ª Edición. Bogotá. Editorial Servioffset. pp 1-12.
- Petri M., Robinson C. (1997).** Oral contraceptives and systemic lupus erythematosus. *Arthr. Rheum.* 40: 797-803.
- Phelps D.T., Ferro T.J., Higgins P.J., Shankar R., Parker D.M., Johnson M. (1995).** TNF- $\alpha$  induces peroxynitrite-mediated depletion of lung endothelial glutathione via protein kinase C. *Am. J. Physiol.* 269: L551-L559.
- Phillips P.E. (1988).** Evidence implicating infectious agents in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 6: 87-94.
- Pierpaoli W., Regelson W. (1994).** Pineal control of aging: Effect of melatonin and pineal grafting on aging mice. *Physiology* 91: 787-791.
- Pierrefiche G., Laborit H. (1995).** Oxygen radicals, melatonin and aging. *Exp. Gerontol.* 30: 213-227.
- Pioli C., Caroleo M.C., Nistico G., Doria G. (1993).** Melatonin increases antigen presentation and amplifies specific and non specific signals for T-cell proliferation. *Int. J. Immunopharmacol.* 15: 463-469.
- Pisetsky D.S., Jelinek D.F., McAnally L.M., Lipsky P.E. (1990).** In vitro autoantibody production by normal adult and cord blood cells. *J. Clin. Invest.* 85: 899-903.
- Pisetsky D.S. (2000).** AntiDNA and autoantibodies. *Curr. Opin. In. Rheumatol.* 12: 364-368.
- Plotnikoff N.P., Miller G.C. (1983).** Enkephalins as immunomodulators. *Int. J. Immunopharmacol.* 5: 437-441.
- Poeggeler B., Reiter R.J., Tan D.X., Chen L.D., Manchester L.C. (1993).** Melatonin, hydroxy radical-mediated oxidative damage and aging: a hypothesis. *J. Pineal Res.* 14: 151-168.
- Polla B.S. (1988).** A role for heat shock proteins in inflammation?. *Immunol. Today* 9: 134-137.
-

- Pozo D., Reiter R.J., Calvo J.R., Guerrero J.M. (1994).** Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci.* 55: PL455-PL460.
- Pozo D., Reiter R.J., Calvo J.R., Guerrero J.M. (1997b).** Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin in the rat. *J. Cell Biochem.* 65: 430-442.
- Prud'homme G.J., Kono D.H., Theofilopoulos A.N. (1995).** Quantitative polymerase chain reaction analysis reveals marked overexpression of interleukin-1 beta, interleukin-1 and interferon-gamma mRNA in the lymph nodes of lupus-prone mice. *Mol. Immunol.* 32: 495-503.
- Puig-Domingo M., Webb S.M., Serrano J., Peinado M.A., Corcoy R., Ruscadella J., Reiter R.J., De Leiva A. (1992).** Melatonin-related hypogonadotropic hypogonadism. *N. Eng. J. Med.* 327: 1356-1359.
- Purohit A., Ghilchick M.W., Duncan L., Wang D.Y., Singh A., Walker M.M. (1995).** Aromatase activity and interleukin-6 production by normal and malignant breast tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 3052-3058.
- Ralph M.R., Foster R.G., Davis F.C. (1990).** Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247: 975-978.
- Rathmell J.C., Townsend S.E., Xu J.C., Flavell R.A., Goodnow C.C. (1996).** Expansion or elimination of B cells in vivo: dual roles for CD 40- and Fas (CD95)- ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell* 87: 319-329.
- Ravetch J.V., Clynes R.A. (1998).** Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 421-432.
- Redecker P. (1993).** Dense accumulations of synaptic-like microvesicles in 'dark' pinealocytes of the gerbil pineal gland. *J. Neurocytol.* 22: 572-581.
- Reiter R.J. (1978).** Interaction of photoperiod, pineal and seasonal reproduction as exemplified by findings in the hamster. *Prog. Reprod. Biol.* 4: 169-190.
- Reiter R.J. (1981).** The mammalian pineal gland: structure and function. *Am. J. Anat.* 162: 287-313.
- Reiter R.J., Vriend J., Brainard G.C., Mathews S.A., Craft C.M. (1982).** Reduced pineal and plasma melatonin levels and gonadal atrophy in old hamsters kept under winter photoperiods. *Exp. Aging* 8: 27-30.
- Reiter R.J., Steinlechner S., Richardson B.A., King T.S. (1983).** Differential response of pineal melatonin levels to light at night in laboratory-raised and wild-captured 13-line ground squirrels. (*Spermophilus tridecemlineatus*). *Life Sci.* 32: 2625-2629.
- Reiter R.J. (1985).** Actions 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. (1988a).** Neuroendocrinology of melatonin. En *Melatonin: Clinical Perspectives*. Oxford Medical Publications. Oxford. pp. 1-42.



- 
- Reiter R.J. (1988b).** Comparative aspects of pineal melatonin rhythms in mammals. En *Animal and Plant Sciences*. Atkins H (ed) ISI Atlas of Science. Philadelphia, vol. 1, n°2, pp 111.
- Reiter R.J. (1989).** The pineal and its indole products: Basic aspects and clinical applications. *The Brain as an Endocrine Organ*, Springer, Viena pp 96-159.
- Reiter R.J., Richardson B.A., Johnson L.Y., Ferguson B.N., Dinh D.T. (1990).** Pineal melatonin rhythm: reduction in aging Syrian hamsters. *Science* 210: 1372-1373.
- Reiter R.J. (1991a).** Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol. Cell Endocrinol.* 79: C153-C158.
- Reiter R.J. (1991b).** The pineal gland: reproductive interaction. En: *Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biochemical Implications*. Vol 4 Academic Press, N.Y. pp 269-310.
- Reiter R.J. (1991c).** Melatonin: that ubiquitously acting pineal hormone. *News Physiol. Sci.* 6: 223-228.
- Reiter R.J., Poeggeler B., Tan D.X., Chen L.D., Manchester L.C., Guerrero J.M. (1993).** Antioxidant capacity of melatonin: A novel actino not requiring a receptor. *Neuroendocrinol. Lett.* 15: 103-116.
- Reiter R.J. (1994).** Pineal function during aging: Attenuation of the melatonin rhythm and its neurobiological consequences. *Acta Neurobiol. Exp.* 54: 31-39.
- Reiter R.J. (1995).** Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J.* 9: 526-533.
- Reiter R.J. (1995b).** Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: antioxidant protection and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol.* 16: 383-415.
- Reiter R.J., Tang L., García J.J., Muñoz-Hoyos A. (1997).** Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci.* 60: 2255-2271.
- Reiter R.J. (1998).** Melatonin and human reproduction. *Ann. Med.* 30: 103-108.
- Reiter R.J. (1999).** Oxidative damage to nuclear DNA: amelioration by melatonin. NEL Review. *Neuroendocrinol. Lett.* 20: 145-150.
- Reilly C.M., Oates J.C., Cook J.A., Morrow J.D., Halushka P.V., Gilkeson G.S. (2000).** Inhibition of mesangial cell nitric oxide in MRL/lpr mice by prostaglandin J<sub>2</sub> and proliferator activation receptor- $\gamma$  agonists. *J. Immunol.* 164: 1498-1504.
- Rekvig O.P., Moens U., Sundsfjord A. (1997).** Experimental expression in mice and spontaneous expression in human SLE of polyomavirus T-antigen: a molecular basis for induction of antibodies to DNA and eukaryotic transcription factors. *J. Clin. Invest.* 99: 2045-2054.
- Reppert S.M., Perlow M.J., Klein D.C. (1980).** Cerebrospinal fluid melatonin. En *Neurobiology of cerebrospinal fluid*, vol. II. Plenum Publishers, Nueva York. pp 579-589.
-

- Reppert S.M., Weaver D.R., Ebisawa T. (1994).** Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13: 1177-1185.
- Reppert S.M., Weaver D.R., Cassone V.M., Godson C. (1995a).** Melatonin receptors are for the birds: Molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *Neuron* 15: 1003-1015.
- Reppert S.M., Godson C., Mahle C.D., Weaver D.R., Slangenaupt S.A., Gusella J.F. (1995b).** Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: The Mel<sub>1b</sub> melatonin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8734-8738.
- Reuss S. (1996).** Components and connections of the circadian timing system in mammals. *Cell Tissue Res.* 285: 353-378.
- Ribelayga C. Gauer F., Calgary C. Pevet P., Simmonneaux V. (1999a).** Photoneural regulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) messenger ribonucleic acid expression: an analysis of its complex relationship with HIOMT activity. *Endocrinology* 140: 1375-1384.
- Ribelayga C., Pevet P., Simmonneaux V. (2000).** HIOMT drives the photoperiodic changes in the amplitude of the melatonin peak of the Siberian hamster. *Am. J. Physiol. Regul. Inter. Comp. Physiol.* 278: R1339-R1345.
- Rice J.F. (1993).** Cellular and molecular mechanisms of aging. *Physiol. Rev.* 73: 149-159.
- Richard-Patin Y., Alcocer-Varela J., Llorente L. (1995).** High levels of Th2 cytokine gene expresión in systemic lupus erythematosus. *Rev. Invest. Clin.* 47: 267-272.
- Rojansky N., Brzezinski A., Schenker J.G. (1992).** Seasonality in human reproduction: an update. *Hum. Reprod.* 7: 735-745.
- Rollag M.D., Morgan R.J., Niswender G.D. (1978).** Route of melatonin in sheep. *Endocrinology* 102: 18.
- Romero M.P., García-Pergañeda A., Guerrero J.M., Osuna C. (1998).** Membrane-bound calmodulin in *Xenopus laevis* oocytes as a novel binding site for melatonin. *FASEB J.* 12: 1401-1408.
- Ronneberg T., Aschoff J. (1990a).** Annual rhythm of human reproduction: I. Biology, sociology, or both?. *J. Biol Rhythms* 5: 195-216.
- Ronneberg T., Aschoff J. (1990b).** Annual rhythm of human reproduction: II. Environmental correlations *J. Biol Rhythms* 5:217-239.
- Roodman G.D. (1993).** Role of cytokines in the regulation of bone resorption. *Calcif. Tissue Int.* 53: S94-S98.
- Roseboom P.H., Klein D.C. (1995).** Norepinephrine stimulation of pineal CREB phosphorylation: primary role of a  $\beta$ -adrenergic cyclic AMP mechanism. *Mol. Pharmacol.* 47: 439-449.
- Roseboom P.H., Coon S.L., Baler R., McCune S.K., Weller J.L., Klein D.C. (1996).** Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology* 137: 3033-3045.

- 
- Rosenthal N.E., Sack D.A., Gillin J.C., Lewy A.J., Goodwin F.K., Davenport Y., Mueller P.S., Newsome D.A., Wehr T.A. (1984).** Seasonal affective disorder. A description of the syndrome and preliminary findings with light therapy. *Archives of General Psychiatry* 41: 72-79.
- Rosenthal N.E., Jacobsen F., Sack D.A., Arendt J., James S.P., Parry B.L., Wehr T.A. (1988).** Atenolol in seasonal affective disorder: A test of the melatonin hypothesis. *Am. J. Psychiatry* 145: 52-56.
- Rothfield N.F., Stollar B.D. (1967).** The relation of immunoglobulin class, pattern of anti-nuclear antibody, and complement-fixing antibodies to DNA in sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 46: 1785-1794.
- Roudier J., Rhodes G.H, Petersen J., Vaughan J.H., Carson D.A. (1988).** The Epstein-Barr virus glycoprotein gp110, a molecular link between HLA DR4, HLA DR1, and rheumatoid arthritis. *Scand. J. Immunol.* 27: 367-371.
- Roudier J., Petersen J., Rhodes G.H. (1989).** Susceptibility to rheumatoid arthritis maps to a T-cell epitope shared by the HLA-Dw4 DR beta-1 chain and the Epstein-Barr virus glycoprotein gp110. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5104-5108.
- Rowley M., Tait B., Mackay I.R., Cunningham T., Phillips B. (1986).** Collagen antibodies in rheumatoid arthritis: significance of antibodies to denatured collagen and their association with HLA-DR4. *Arthritis Rheum.* 29: 174-184.
- Sack R.L., Lewy A.J., Vollmer W.M., Singer C.M. (1986).** Human melatonin production decreases with age. *J. Pineal Res.* 3: 379-388.
- Sack R.L., Lewy A.J., Hughes R. (1998).** Use of melatonin for sleep and circadian rhythm disorders. *Ann. Med.* 30: 115.
- Salgo M.G., Bermúdez E., Squadrito G., Pryor W. (1995).** DNA damage and oxidation of thiols peroxynitrite causes in rat thymocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 322: 500-505.
- Salmon J.E., Millard S., Schaester L.A., Arnet F., Ginzler E.M., Gourley M.F., Ramsey-Goldman R., Peterson M., Kimberly R. (1996).** FcγRIIA alleles are heritable risk factors for lupus nephritis in African-Americans. *J. Clin. Invest.* 97: 1348-1354.
- Salomon G.F., Moos R.H. (1964).** Emotions, immunity, and disease. A speculative theoretical integration. *Arch. Gen. Psychiatry* 11: 657.
- Santoro T.J., Portanova J.P., Kotzin B.L. (1988).** The contribution of L3T4+ T cells to lymphoproliferation and autoantibody production in MRL-lpr/lpr mice. *J. Exp. Med.* 167: 1713-1718.
- Sapolsky R., Rivier C., Yamamoto G., Plotsky P., Vale W. (1987).** Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science* 238: 522-524.
- Sarlis N.J., Chowdrey H.S., Stephanou A., Lightman S.L. (1992).** Chronic activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and loss of the circadian rhythm during adjuvant-induced arthritis in the rat. *Endocrinology* 30: 1775-1779.
-

- Satoh M., Kumar A., Kanwar Y.S., Reeves W.H. (1995).** Anti-nuclear antibody production and immune-complex glomerulonephritis in BALB/c mice treated with pristane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10934-10938.
- Schifferli J.A., Ng Y.C., Peters D.K. (1986).** The role of complement and its receptor in the elimination of immune complexes. *N. Eng. J. Med.* 315: 488.
- Schwarting A., Tesch G., Kinoshita K., Maron R., Weiner H.L., Kelley V.R. (1999).** IL-12 drives IFN- $\gamma$ -dependent autoimmune kidney disease in MRL-Fas<sup>lpr</sup> mice. *J. Immunol.* 163: 6884.
- Schwartz R.S., Ayollar B.D. (1985).** Origins of anti-DNA autoantibodies. *J. Clin. Invest.* 75: 321-327.
- Seaman W.E., Wofsy D., Greenspan J.S. (1983).** Treatment of autoimmune MRL-lpr mice with monoclonal antibody to Thy-1.2: a single injection has sustained effects on lymphoproliferation and renal disease. *J. Immunol.* 130: 1713-1718.
- Segal R., Bermas B.L., Dayan M., Kalush F., Shearer G.M., Mozes E. (1997a).** Kinetics of cytokine production in experimental SLE: involvement of Th1/Th2-type cytokines in the disease. *J. Immunol.* 158: 3009-3016.
- Segal R., Dayan M., Globerson A., Habot B., Shearer G.M., Mozes E. (1997b).** Effect of aging on cytokine production in normal and experimental SLE afflicted mice. *Mech. Ageing Dev.* 96: 47-58.
- Shirai A., Conover J., Klinnman D.M. (1995).** Increased activation and altered ratio of interferon-gamma: interleukin-4 secreting cells in MRL-lpr/lpr mice. *Autoimmunity* 21: 107-116.
- Shorlemmer H.U., Dickneite G., Kanzy E.J., Enssle K.H. (1995).** Modulation of the immunoglobulin dysregulation in GVH- and SLE-like diseases by the murine IL-4 receptor (IL-4R). *Inflamm. Res.* 44: S194-S196.
- Silman R.E., Leone R.M., Hooper R.J., Preece M.A. (1979).** Melatonin, the pineal gland and human puberty. *Nature* 278: 301-303.
- Simpson R.W., McGinty L., Simon L., Smith C.A., Godzski C.W., Boyd R.J. (1984).** Association of parvoviruses with rheumatoid arthritis of humans. *Science* 223: 1425-1428.
- Sitaram B.R., Lees G.J. (1978).** Diurnal rhythm and turnover of tryptophan hydroxylase in the pineal gland of the rat. *J. Neurochem.* 31: 1021-1026.
- Skaper S.D., Ancona B., Facci L., Franceschini D., Giusti P. (1998).** Melatonin prevents the delayed death of hippocampal neurons induced by enhanced excitatory neurotransmission and the nitridergic pathway. *FASEB J.* 12: 725.
- Slaughter L., Carson DA, Jensen FC, Holbrook TL, Vaughn JH (1978).** In vitro effects of Epstein-Barr virus on peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis and normal subjects. *J. Exp. Med.* 148: 1429-1434.
- Smith J.A., Mee T.J.X., Barnes N.D., Thorburn R.J., Barnes J.L.C. (1976).** Melatonin in serum and cerebrospinal fluid. *Lancet* 2: 245.
- Smith J.A., Barnes J.L., Mee T.J.X. (1979).** The effect of neuroleptic drugs on serum and cerebrospinal fluid melatonin concentrations in psychiatric patients. *J. Pharm. Pharmacol.* 31: 246-248.

- 
- Spangler R.S. (1996).** Cyclooxygenase 1 and 2 in rheumatic disease: implications for nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy. *Semin. Arthritis Rheum.* 26:435-446.
- Speirs V., Adams E.F., White M.C. (1993).** The anti-estrogen tamoxifen blocks the stimulatory effects of interleukin-6 on 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in MCF-7 cells. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 46: 605-611.
- Stasny P. (1978).** Association of the B cell alloantigen DRW4 with rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 298: 869-871.
- Stefanovic-Racic M., Morales T.I., Taskiran D., McIntyre L.A., Evans C.H. (1996).** The role of nitric oxide in proteoglycan turnover by bovine articular cartilage organ cultures. *J. Immunol.* 156: 1213-1220.
- Stehle J.H., Foulkes N.S., Molina C.A., Simmoneauz V., Pevet P., Sassone-Corsi P. (1993).** Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature* 365: 314.
- Steinberg A.D., Roths J.B., Murphy E.D. (1980).** Effects of thymectomy or androgen administration upon the autoimmune disease of MRL/Mp-lpr/lpr mice. *J. Immunol.* 125: 871-873.
- Steinberg A.D., Steinberg B.J. (1985).** Lupus disease activity associated with menstrual cycle. *J. Rheumatol.* 12: 816.
- Steinhilber D., Brungs M., Werz O., Wiesenberg I., Danielsson C., Kalen J.P., Nayeri S., Schröder M., Carlberg C. (1995).** The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 270: 7037-7040.
- Steinlechner S. (1996).** Melatonin as a chronobiotic: PROS and CONS. *Acta Neurobiol. Exp.* 56: 363-732.
- Sternberg E.M. (1997).** Neural-immune interactions in health and disease. *J. Clin. Invest.* 100: 2641-2647.
- Sternberg E.M. (2001).** Neuroendocrine regulation of autoimmune/inflammatory disease. *J. Endocrinol.* 169: 429-435.
- Stuart J.M., Cremer M.A.I., Kang A.H. (1982a).** Type II collagen-induced arthritis in rats: passive transfer serum and evidence that IgG anticollagen antibodies can cause arthritis. *J. Exp. Med.* 155: 1-10.
- Stuart J.M., Townes A.S., Ang A.H. (1982b).** the role of collagen autoimmunity in animals and human diseases. *J. invest. Dermatol.* 79: 1-11.
- Sudgen D., Vaneck J., Klein D.C., Thomas T.P., Anderson W.B. (1985).** Activation of protein kinase C potentiates isoprenaline-induced cyclic AMP accumulation in rat pinealocytes. *Nature* 314: 359-361.
- Sudgen D. (1989).** Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia.* 45: 922-932.
- Suzuki N., Harada T., Mizushima Y., Sakane T. (1993).** Possible pathogenic role of cationic anti-DNA autoantibodies in the development of nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 151: 1128-1136.
- Suzuki T., Suzuki N., Engleman E.G., Mizushima Y., Sakane T. (1995).** Low serum levels of dehydroepiandrosterone therapy may cause deficient IL-2 production by lymphocytes in patients with SLE. *Clin. Exp. Immunol.* 99: 251-255.
- Sze S.F., Liu W.K., Ng T.B. (1993).** Stimulation of murine splenocytes by melatonin and methoxytryptamine. *J. Neural Transm. Gen. Sect.* 94: 115-126.
-

- Szekanecz Z., Halloran M.M., Volin M.V., Woods J.M., Strieter R.M., Haines K., Kunkel S.L., Burdick M.D., Koch A.E. (2000).** Temporal expression of inflammatory cytokines and chemokines in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 43:1266-1277.
- Tada Y., Nagasawa K., Ho A., Morito F., Koarada S., Ushiyama O., Suzuki N., Ohta A., Mak T.W. (1999).** Role of costimulatory molecule CD28 in the development of lupus in MRL/lpr mice. *J. Immunol.* 163: 3153-3159.
- Takahashi S., Fossari L., Iwamoto M., Merino R., Motta R., Kobayakawa T., Izui S. (1996).** Imbalance towards Th1 predominance is associated with acceleration of lupus-like autoimmune syndrome in MRL mice. *J. Clin. Invest.* 97: 1597.
- Tamarkin L., Cohen M., Roselle D., Lippman M., Chabner B. (1981).** Melatonin inhibition and pinealectomy enhancement of 7,12-dimethyl-benzanthracene-induced mammary tumors in the rat. *Cancer Res.* 41: 4432-4436.
- Tamura T., Ohmori K. (2001).** Diacerein suppresses the increase in plasma nitric oxide in rat adjuvant-induced arthritis. *Eur. J. Pharmacol.* 419: 269-274.
- Tan C.H., Khoo J.C. (1981).** Melatonin concentrations in human serum, ventricular and lumbar cerebrospinal fluid as an index of the secretory pathway of the pineal gland. *Hormone Res.* 14: 224-233.
- Tan D.X., Chen L.D., Poeggeler B., Manchester L.C., Reiter R.J. (1993).** Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J.* 1: 57-60.
- Tan D.X., Reiter R.J., Chen L.D., Poeggeler B., Manchester L.C., 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.
- Tan E.M. (1989).** Antinuclear antibodies: diagnostic marker in autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv. Immunol.* 44: 93-151.
- Taskiran D., Stefanovic-Racic M., Georgescu H., Evans C. (1994).** Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200: 142-148.
- Theofilopoulos A.N., Dixon F.J. (1985).** Murine models of systemic lupus erythematosus. *Adv. Immunol.* 37: 269.
- Todd J.A., Acha-Orbea H., Bell J.I., Chao N., Fronck Z., Jacob C.O., McDermott M., Sinha A.A., Timmerman L., Steinman L., McDevitt H.O. (1988).** A molecular basis for MHC class II associated autoimmunity. *Science* 240: 1003-1009.
- Toma J.G., Amerongen H.M., Hennes S.C., O'Brien M.G., McBlain W.A., Buzzel G.R. (1987).** Effects of olfactory bulbectomy, melatonin and/or pinealectomy on three sublines of the Dunning R3327 rat prostatic adenocarcinoma. *J. Pineal Res.* 4: 321-326.
- Törnwall J., Carey A.B., Fox R.I., Fox H.S. (1999).** Estrogen in autoimmunity: expression of estrogen receptors in thymic and autoimmune T cells. *J. Gender Specif. Med.* 2: 33-40.

- Tosini G., Menaker M. (1996).** Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* 272:419-421.
- Tosini G., Menaker M. (1998).** The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. *Brain Res.* 789: 221-228.
- Trentham D.E., Townes A.S., Kang A.H. (1977).** Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis. *J. Exp. Med.* 146: 857-868.
- Trentham D.E. (1982).** Collagen arthritis as a relevant model for rheumatoid arthritis: evidence pro and con. *Arthritis Rheum.* 25: 911-916.
- Trentini G.P., De Gaetani C., Criscuolo M. (1991).** Pineal gland and aging. *Aging (Milano).* 3: 103-106.
- Tsai C.Y., Wu T.H., Huang S.F., Sun K.H., Hsieh S.C., Han S.H., Yu H.S., Yu C.L. (1995).** Abnormal splenic and thymic IL-4 and TNF-alpha expression in MRL-lpr/lpr mice. *Scand J. Immunol.* 41: 157-163.
- Tsoufha G., Rook G.A., van-Embden J.D. (1989).** Raised serum IgG and IgA antibodies to mycobacterial antigens in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 48: 118-123.
- Tsunawaki S., Nathan C.F. (1984).** Enzymatic basis of macrophage activation. *J. Biol. Chem.* 259:4305-4312.
- Uehara A., Gottschall P.E., Dahl R.R., Arimura A. (1987).** Interleukin-1 stimulates ACTH release by an indirect action which requires endogenous corticotropin releasing factor. *Endocrinology* 121: 1580-1582.
- Underwood H., Goldman B. (1987).** Vertebrate circadian and photoperiodic systems: Role of the pineal gland and melatonin. *J. Biol. Rhythms* 2: 279-315.
- Uz T., Giusti P., Franceschini D., Kharlamov A., Manev H. (1996).** Protective effects of melatonin against hippocampal DNA damage induced by intraperitoneal administration of kainate to rats. *Neuroscience* 73: 361.
- Vacchio M.S., Ashwell J.D. (1997).** Thymus-derived glucocorticoids regulate antigen-specific positive selection. *J. Exp. Med.* 185: 2033-2038.
- Van de Loo A.A.J., van den Berg W.B. (1990).** Effects of murine recombinant interleukin-1 on synovial joints in mice: measurements of patellar cartilage metabolism and joint inflammation. *Ann. Rheum. Dis.* 49: 238-245.
- Van de Loo F.A., Joosten L.A.B., van Lent P.L.E.M., Arntz O.J., van der Berg W.B. (1995).** Role of interleukin-1, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction. *Arthritis Rheum.* 38: 164-172.
- Van der Berg W.B. (1998).** Joint inflammation and cartilage destruction may occur uncoupled. *Springer Semin. Immunopathol.* 20: 149-164.
- Van Eden W., Thole J.E., van der Zee R. (1988).** Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. *Nature* 331: 171-173.
- Van Griesven M., Bergijk E.C., Bealde J.J., de Heer E., Brujin J.A. (1997).** Differential effects of sex hormones on autoantibody production and proteinuria in chronic graft-versus-host disease-induced experimental lupus nephritis. *Clin. Exp. Immunol.* 107: 254-260.

- Van Houten N., Budd R.C. (1994).** Lessons from the lpr mouse. *Semin. Immunol.* 6: 1-69.
- Van Lent P.L.E.M., van de Loo F.A.J., Astrid E.M. (1995).** Major role for interleukin-1 but not for tumor necrosis factor in early cartilage damage in immune complex arthritis in mice. *J. Rheumatol.* 22: 2250-2258.
- Van Vollenhoven R., Engleman E.G., McGuire J.L. (1995).** Dehydroepiandrosterone in systemic lupus erythematosus. Results of a double-blind, placebo-controlled, randomised clinical trials. *Arthritis Rheum.* 38: 1826-1831.
- Van Vollenhoven R., Morabito L.M., Engleman E.G., MacGuire J.L. (1998).** Treatment in systemic lupus erythematosus with dehydroepiandrosterone: 50 patients treated up to 12 months. *J. Rheumatol.* 25: 285-289.
- Vaughan G.M., Pelham R.W., Pang S.F., Laughlin L.L., Wilson K., Sandock K.V., Vaughan M.K., Koslow S.H., Reiter R.J. (1976).** Nocturnal elevation of plasma melatonin and urinary 5-hydroxyindole-acetic acid in young men: attempts at modulation by brief changes in environmental lighting and sleep and by autonomic drugs. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 42: 742.
- Vaughan M.K. (1981).** The pineal gland. A survey of its antigonadotropic substances and their actions. En *Endocrine physiology III.* University Park press, Baltimore pp. 41-95.
- Venables P.J.W. (1989).** Infection and rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 1: 15-20.
- Vicenti M.P., Clark I.M., Brinckerhoff C.E. (1994).** Using inhibitors of metalloproteinases to treat arthritis. *Arthritis Rheum.* 37: 1115-1126.
- Vilarinho S.T., Costallat L.T. (1998).** Evaluation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in males with systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 25
- Vijayalaxmi, Reiter R.J., Meltz M.L. (1995a).** Melatonin protects human blood lymphocytes from radiation-induced chromosome damage. *Mutat. Res.* 346: 3-31.
- Vijayalaxmi, Reiter R.J., Sewerynek E., Poeggler B., Leal B.Z., Meltz M.L. (1995b).** Marked reduction of radiation-induced micronuclei in human blood lymphocytes pretreated with melatonin. *Radiat. Res.* 143: 102-106.
- Waldhauser F., Weissenbacher G., Tatzer E., Gisinger B., Waldhauser M., Schemper M., Frisch H. (1988).** Alterations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66: 648-652.
- Wahl S.M. (1994).** Transforming growth factor  $\beta$ : the good, the bad, and the ugly. *J. Exp. Med.* 180: 1587-1590.
- Wallace R.B., Altman J., Das G.D. (1969).** An autoradiographic and morphological investigation of the postnatal development of the pineal gland *Am. J. Anat.* 126: 175-183.
- Watanabe-Fukunaga R., Brannan C.I., Copeland N.G., Jenkins N.A., Nagata S. (1992).** Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356: 314-317.
- Watkins L.R., Wieterlak E.P., Goehler L.E., Mooney H.K., Martínez J., Furness L., Smith K.P., Maier S.F. (1994).** Neurocircuitry of illness-induced hyperalgesia. *Brain Res.* 639: 283-299.



- Watson M.L., Rao J.K., Gilkeson G.S., Ruiz P., Eicher E.M., Pisetsky D.S., Matsuzawa A., Rochelle J.M., Seldin M.F. (1992).** Genetic analysis of MRL-lpr mice: relationship of the Fas apoptosis gene to disease manifestations and renal disease-modifying loci. *J. Exp. Med.* 176: 1645-1656.
- Weigle W.O. (1993).** The effect of aging on cytokine release and associated immunologic functions. *Immunol. Clin. N. Am.* 13: 551-569.
- Weinberg J.B., Granger D.L., Pisetsky D.S., Seldin M.F., Misukonis M.A., Mason S.N., Phippen A.M., Ruiz P., Wood E.R., Gilkeson G.S. (1994).** The role of nitric oxide in the pathogenesis of spontaneous murine autoimmune disease: increased nitric oxide production and nitric oxide synthase expression in MRL-lpr/lpr mice, and reduction of spontaneous glomerulonephritis and arthritis by orally administered N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine. *J. Exp. Med.* 179: 651-660.
- Welsch C.W. (1995).** Review of the effects of the dietary fat on experimental mammary gland tumorigenesis: Role of lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 18: 757-773.
- Wener M.H., Mannik M., Schwartz M.M. (1987).** Relationship between renal pathology and the size of circulating immune complexes in patients with systemic lupus erythematosus. *Medicine* 66: 85.
- Wessel G., Abendroth K., Wisheit M. (1987).** Malignant transformation during immunosuppressive therapy (azathioprine) of RA and SLE. A retrospective study. *Scand. J. Rheumatol. Suppl* 67: 73-75.
- West H.F. (1957).** Corticosteroid metabolism and rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 16: 173-181.
- White D.G., Woolf A.D., Mortimer P.P., Cohen B.J., Blake D.R., Bacon P.A. (1985).** Human parvovirus arthropathy. *Lancet* 1: 419-421.
- Wilder R.L., Sternberg E.M. (1990).** Neuroendocrine hormonal factors in rheumatoid arthritis and related conditions. *Curr. Op. Rheumatol.* 2: 436-440.
- Wilder R.L. (1996).** Adrenal and gonadal steroids hormone deficiency in the etiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 23: 10-12.
- Wilder R.L. (1999).** Genetic factors regulating experimental arthritis in mice and rats. In *Current Directions in Autoimmunity* Theofilopoulos AN, ed. Karger. Berlín. pp. 121-165.
- Wilder R.L., Elenkov I.J. (1999).** Hormonal regulation of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-12 and interleukin-10 production by activated macrophages. *Ann. NY Acad. Sci.* 876: 14-31.
- Williams T.J., Yarwood H. (1990).** Effect of glucocorticoids on microvascular permeability. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141: S39-S43.
- Wilson J.G., Fearon D.T. (1984).** Altered expression of complement receptors as a pathogenic factor in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 27: 1321.

- Winfield J.B., Faiferman I., Koffler D. (1997).** Avidity of anti-DNA antibodies in serum and IgG glomerular eluates from patients with systemic lupus erythematosus; association of high avidity antinative DNA antibody with glomerulonephritis. *J. Clin. Invest.* 59: 90-96.
- Withyachummnarnkul B., Nonaka K.O., Attia A.M., Reiter R.J. (1990a).** Changes in indole metabolism in organ cultured rat pineal glands induced by interferon- $\gamma$ . *J. Pineal Res.* 8: 313-322.
- Withyachummnarnkul B., Nonaka K.O., Santana C., Attia A.M., Reiter R.J. (1990b).** Interferon-gamma modulates melatonin production in rat pineal glands in organ culture. *J. Interf. Rev.* 10: 403-411.
- Withyachummnarnkul B., Reiter R.J., Lerchl A., Nonaka K.O., Stokkan K.A. (1991).** Evidence that interferon-gamma alters pineal metabolism both indirectly via sympathetic nerves and directly on the pinealocytes. *Int. J. Biochem.* 23: 1397-1401.
- Wooley P.H., Luthra H.S., Stuart J.M., David C.S. (1981).** Type II collagen-induced arthritis in mice, I. Major histocompatibility complex (I region) linkage and antibody correlates. *J. Exp. Med.* 154: 688-700.
- Wright J.K., Cawston T.E., Hazelman B.L. (1991).** Transforming growth factor  $\beta$  stimulates the production of the tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) by human synovial and skin fibroblasts. *Biochem. Biophys. Acta* 1094: 207-210.
- Wurtman R.J., Axelrod J. (1965).** Adrenaline synthesis: control by the pituitary gland and adrenal glucocorticoids. *Science* 150: 1464-1465.
- Wurtman R.J., Antón-Tay F. (1969).** The mammalian pineal as a neuroendocrine transducer. *Recent Prog. Horm. Res.* 25:493:522.
- Wurtman R.J., Lieberman H.R. (1985).** Melatonin secretion as a mediator of circadian variations in sleep and sleepiness. *J. Pineal Res.* 2: 301-303.
- Yanase K., Smith R.M., Puccetti A., Jarett L., Madaio M.P. (1997).** Receptor mediated cellular entry of nuclear localizing anti-DNA antibody via myosin 1. *J. Clin. Invest.* 100: 25-31.
- Yasuda T., Yoshimoto T., Tsubura A., Matsuzawa A. (2001).** Clear supresión of Th1 responses but marginal amelioration of autoimmune manifestations by IL-12p40 transgene in MRL-Fas<sup>lprcg</sup>/Fas<sup>lprcg</sup> mice. *Cell. Immunol.* 210: 77-86.
- Yao Q.Y., Rickinson A.B., gaston J.S., Epstein M.A. (1986).** Disturbance of the Epstein-Barr virus-host balance in rheumatoid arthritis patients: a quantitative study. *Clin. Exp. Immunol.* 64: 302-310.
- Yin Z., Bahtiyar G., Zhang N., Liu L., Zhu P., Robert M.E., McNiff J., Madaio M.P., Craft J. (2002).** Il-10 regulates murine lupus. *J. Immunol.* 169: 2148-2155.
- Yoshikawa T., Kondo M. (1981).** Lipid peroxide and disease. In Goto Y., Yagi K (eds). Igaku-Shoin, Tokyo, pp. 210.
- Zahir A., Koutouzov S., Piette J.C. (2000).** The role of nucleosomes in lupus. *Curr. Opi. Rheumatol.* 12: 369-373.

**Zelazowska E.B., Singh A., Raybourne R.B., Sternberg E.M., Gold P.W., Deuster P.A. (1997).** Lymphocyte subpopulation expression in women: effect of exercise and circadian rhythm. *Med. Sci. Sports Exercise* 29: 467-473.

**Zhang Y., Yasuda T., Wang C.R., Yoshimoto T., Nagase H., Takamoto M., Tsubura A., Kimura M., Matsuzawa A. (2000).** A pivotal role of cell-bound but not soluble CD4 molecules in full development of lupus-like manifestations in MRL-Fas<sup>lprcg</sup>/Fas<sup>lprcg</sup> mice. *Clin. Exp. Immunol.* 122:124-132.

**Zubelewicz B., Braczkowski R., Renshaw D., Harbuz M.S. (1999).** Central injection of morphine stimulates plasma corticosterone and interleukin (IL)-6 and IL-6R mRNAs in the pituitary and adrenals in adjuvant-induced arthritis. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 13: 103-109.

**Zylinska K., Komorowski J., Robak T., Mucha S., Stepień H. (1995).** Effect of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and granulocyte colony stimulating factor of melatonin secretion in rats in vivo and in vitro studies. *J. Neuroimmunol.* 56: 187-190.

