

## Tesis de Posgrado

# Regulación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos por la glándula pineal

Vermeulen, Mónica

1995

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Vermeulen, Mónica. (1995). Regulación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos por la glándula pineal. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2783\\_Vermeulen.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2783_Vermeulen.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Vermeulen, Mónica. "Regulación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos por la glándula pineal". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2783\\_Vermeulen.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2783_Vermeulen.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**REGULACION DE LA CITOTOXICIDAD CELULAR**  
**DEPENDIENTE DE ANTICUERPOS POR LA GLANDULA PINEAL**

**Autora: MONICA VERMEULEN**

**Directora: Dra. MIRTA GIORDANO**

Lugar de trabajo:  
**Laboratorio de Inmunología**  
**Instituto de Investigaciones Hematológicas**  
**ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA**

Tesis presentada para optar al título de:  
**Dr. de la Universidad de Buenos Aires**  
**área**  
**Ciencias Biológicas**

**BUENOS AIRES 1995**

**A mi familia**

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo realizado en el Laboratorio de Inmunología del Instituto de Investigaciones Hematológicas de la Academia Nacional de Medicina, ha sido posible gracias al apoyo de diferentes personas e instituciones a quienes quiero expresar mi agradecimiento.

A la Dra. Mirta Giordano, Directora de esta Tesis, por el espacio de libertad siempre abierto al debate de ideas y proyectos que permitió no sólo la realización de esta Tesis sino mi crecimiento Científico.

A la Dra. Marina Palermo por su predisposición permanente a compartir mis dudas y preocupaciones, alegrías y desencantos. Por el apoyo y el cariño de todos estos años.

Al Dr. Martín Isturiz por sus invaluables sugerencias y su estímulo permanente así como por su valiosa contribución en la revisión de este manuscrito.

Al Dr. Jorge Geffner por estar siempre que lo necesité.

A la Lic. Analía Trevani, por su afecto y ganas de compartir todo lo que me sucedió a lo largo de estos años.

A la Colo, y a cada uno de mis compañeros de trabajo que con distintos gestos de afecto: litros de mate y café, orejas y tirones de orejas, ayuda en el manejo de la computadora, en la realización de gráficos, algún consejo no siempre escuchado, convirtieron en buenos aún los momentos más difíciles.

A Juan Portaluppi y Antonio Morales, por su cariño e invaluable ayuda técnica; al personal técnico y de apoyo de Inmunología que con su tarea permitieron la realización de este trabajo.

A mis compañeros tesistas.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, que al otorgarme sus becas posibilitó la realización de esta Tesis.

# **INDICE**

## **INTRODUCCION**

Regulación neuroendocrina de la respuesta inmune.....	1
Glándula pineal.....	4
Melatonina.....	5
Síntesis de melatonina.....	6
Receptores para melatonina.....	10
Efectos biológicos de la melatonina.....	12
Efectos endocrinológicos.....	12
Efectos no endocrinológicos.....	16
Modulación de la respuesta inmune por la glándula pineal	
Antecedentes.....	18
Efectos de la pinealectomía sobre la respuesta inmune.....	19
efecto de la melatonina sobre la respuesta inmune.....	21
Sitios de unión para melatonina sobre el sistema inmune.....	24
Papel de la melatonina en el estrés.....	26
Papel de la glándula pineal en el cáncer.....	28
Papel de la glándula pineal en el envejecimiento.....	31
Papel de la glándula pineal en la autoinmunidad.....	32
Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA).....	34
Receptor para el fragmento Fc de la IgG (RFcy ).....	35
Mecanismo lítico de la CCDA.....	37
Regulación de la CCDA.....	40
<b>OBJETIVO.....</b>	<b>43</b>

## **MATERIALES Y METODOS**

1. REACTIVOS GENERALES	
1.1 Medio de lavado.....	44
1.2 Medio de cultivo.....	44
1.3 Medio de cultivo para los experimentos con estradiol.....	44
1.4 Medio de cultivo para los experimentos de citometría de flujo.....	45
2. ANIMALES.....	45
3. TRATAMIENTOS DE LOS ANIMALES	
3.1 Con melatonina.....	45
3.2 Con implantes de estradiol.....	46
4. OPERATORIAS QUIRURGICAS	
4.1 Pinealectomía.....	46
4.2 Ovariectomía.....	48

4.3	Orquidectomía.....	48
5.	DETERMINACION DE LOS NIVELES HORMONALES	
5.1	Determinación de los niveles de melatonina en la glándula pineal.....	48
5.2	Determinación de los niveles de 6-sulfatoximelatonina en plasma.....	49
5.3	Determinación de los niveles plasmáticos de estradiol .....	49
6.	DETERMINACION DE LOS ESTADIOS DEL CICLO ESTRAL.....	50
7.	REACCION DE CITOTOXICIDAD CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUERPOS (CCDA)	
7.1	Células efectoras.....	50
7.2	Células "blanco".....	51
7.3	Preparación del suero anti-eritrocitos de pollo.....	51
7.4	Reacción citotóxica.....	52
8.	ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	
8.1	Melatonina.....	53
8.2	Estradiol.....	53
9.	ANALISIS DE POBLACIONES CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUJO.....	54
10.	ESTADISTICAS.....	55

## RESULTADOS

1.	Niveles de melatonina en la glándula pineal.....	56
2.	Niveles de 6-sulfatoximelatonina en plasma.....	57
3.	Efecto de la administración de melatonina sobre la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) .....	58
4.	Número de dosis de melatonina.....	59
5.	Análisis de la relación dosis-respuesta	
5.a	Curva dosis-respuesta.....	59
5.b	Variaciones estacionales en la modulación que ejerce la melatonina sobre la CCDA .....	60
5.c	Curvas dosis-repuestas de la melatonina a lo largo del año.....	61
6.	Duración del efecto exacerbador de la melatonina sobre la CCDA.....	62
7.	Poblaciones linfocitarias CD4+ CD8+ en el bazo de ratones tratados con melatonina.....	63
8.	Población leucocitaria MAC-1+ en el bazo de ratones tratados con melatonina.....	63

9.	Efecto de la melatonina sobre la expresión de receptores para Fc de la IgG (CD16/32).....	64
10.	Inhibición de la CCDA en ratones pinealectomizados .....	65
11.	Poblaciones esplénicas CD4+, CD8+, MAC-1+ y RFcy + en los animales Px.....	66
12.	Variación de la CCDA de acuerdo a la edad de los ratones Px.....	67
13.	Efecto de la melatonina en ratones Px.....	68
13.a	Efecto de la hora de inoculación de la melatonina en ratones Px.....	69
13.b	Ausencia de variaciones estacionales en el efecto de la melatonina sobre la CCDA en ratones Px.....	69
14.	Efecto de la melatonina <i>in vitro</i> .....	70
15.	CCDA en ratones machos Px.....	70
16.	Efecto de la melatonina en ratones machos.....	71
17.	Curva dosis-respuesta de melatonina en los machos.....	72
18.	Efecto de la melatonina en ratones machos Px.....	72
19.	Participación del eje gonadal.....	73
19.a	Efecto de la ovariectomía sobre los niveles de CCDA en hembras pinealectomizadas.....	74
19.b	Efecto de la melatonina en hembras ovariectomizadas.....	74
19.c	Efecto de la orquidectomía.....	75
19.d	Ensayos <i>in vivo</i> con implantes de estradiol.....	75
19.e	Niveles plasmáticos de 17 $\beta$ -estradiol.....	76
19.f	Efecto del estradiol <i>in vitro</i> sobre la CCDA.....	77
	<b>DISCUSION</b> .....	<b>78</b>
	<b>RESUMEN</b> .....	<b>95</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>100</b>



# **INTRODUCCION**

## **REGULACION NEUROENDOCRINA DE LA RESPUESTA INMUNE**

Numerosas evidencias experimentales han permitido demostrar la existencia de una compleja red de comunicación entre los sistemas nervioso, endócrino e inmune a través de varios mecanismos que incluyen moléculas de reconocimiento y señales comunes. En efecto, es un hecho aceptado que las citoquinas, las hormonas peptídicas y esteroideas y los neurotransmisores, al igual que sus receptores específicos, son moléculas compartidas por los sistemas inmune y neuroendócrino. Las hormonas y los neurotransmisores pueden contactarse con las células del sistema inmune a través de la circulación sanguínea o mediante la inervación simpática y parasimpática de los órganos linfoides.

La existencia de señales generadas en el sistema inmune que son capaces de regular funciones neuroendócrinas se puso en evidencia, originalmente, mediante la remoción de los órganos linfáticos, en particular el timo (15). Se observó que en los animales timectomizados al nacer se producen severas anormalidades de la función reproductora, como retardo en la apertura vaginal y en la primera ovulación, atresia folicular y reducción de la fertilidad (54,146). Por su parte, los estudios iniciados por el grupo del Dr. Hugo Besedovsky, posteriormente confirmados y ampliados por otros investigadores, demostraron que el ingreso de un antígeno al organismo provoca un incremento en los niveles plasmáticos tanto de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) como de los corticoides (16). Finalmente, el hallazgo de que las células linfoides y las accesorias son capaces de sintetizar y secretar factores neurohormonales, como ACTH, hormona del

crecimiento (GH), hormona estimuladora de la tirotrófina (TSH), prolactina (PRL), gonadotrofinas y opiodes endógenos (19) confirma la existencia de una fluida comunicación entre los sistemas neuroendócrino e inmune.

Con relación a la regulación ejercida por el sistema neuroendócrino sobre la reactividad inmune se han propuesto dos niveles de acción: 1) durante la ontogenia linfoide, ya sea en el timo o en la médula ósea y 2) durante el desarrollo de una respuesta inmune, a nivel periférico (172). La regulación de la maduración de los linfocitos por hormonas y neurotransmisores ha sido especialmente analizada en el timo. Así, por ejemplo, se ha visto que ciertas hormonas de la adenohipófisis como la prolactina, la hormona del crecimiento y la ACTH incrementan los niveles de los factores tímicos indispensables para que se complete la maduración de los linfocitos T (54).

Con respecto a la regulación de las células inmunocompetentes a nivel periférico, prácticamente todas las hormonas y neurotransmisores conocidos son capaces de modificar la actividad de los linfocitos T, B o de las células accesorias. En general, los glucocorticoides, los estrógenos, la progesterona y las endorfinas deprimen las funciones inmunes, mientras que la hormona del crecimiento, la prolactina, la tetraiodotironina, la insulina y la melatonina ejercen un efecto inmuno-estimulador (123,54).

El efecto último de la estimulación neurohormonal depende de un sistema complejo de regulación intracelular que varía, dependiendo del linaje celular involucrado, el estado de diferenciación y el grado de activación de las células.

Los procesos fisiológicos de todos los animales están organizados según un sistema temporal que incluye ciclos diurnos y estacionales. Si se aísla a un animal, de manera que las condiciones de luz, temperatura, humedad y demás factores ambientales permanezcan constantes, la mayoría de los ritmos diurnos persiste; lo que significa que estos ritmos están generados internamente. En los mamíferos, este sistema interno utiliza marcapasos neurales, siendo el más importante el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (NSQ) (190). Sin embargo, en condiciones constantes, los ritmos biológicos generados por los marcapasos no son de 24 horas exactas, de allí su nombre "circadianos" (circa: aproximadamente, dies: día). Por este motivo, es necesario un mecanismo que ajuste diariamente el marcapasos según un indicador del horario ambiental. Si bien la temperatura, la presión, la humedad y otras medidas físicas varían a lo largo del día, y por lo tanto, podrían actuar como indicadores, el más confiable de todos es la alternancia diurna regular de luz y oscuridad. De manera que todos los mamíferos utilizan como indicador para ajustar sus ritmos circadianos la percepción de luz-oscuridad que llega al NSQ a través de la vía retino-hipotalámica. Pero además es necesario sincronizar una multitud de ritmos celulares, tisulares y orgánicos, para lo cual resulta indispensable un indicador interno que actúe como mensajero químico capaz de llegar por la circulación a todas partes. Este papel lo cumple la glándula pineal a través de la liberación de su hormona, la melatonina.

## **GLANDULA PINEAL**

La glándula pineal se origina a partir de la región posterodorsal del diéncéfalo, pero su tamaño y posición varían en las diferentes especies. En los vertebrados inferiores es considerada el "tercer ojo", ya que es un órgano de fotorrecepción directa. En aves y reptiles desarrolla funciones fotorreceptoras y secretorias, mientras que en los mamíferos es considerada de naturaleza netamente secretoria. Anatómicamente, la pineal se encuentra dividida en una zona parenquimática y una zona intersticial. La primera está compuesta por los pinealocitos que se colorean positivamente con enolasa, un marcador inmunohistoquímico específico para neuronas y células neuroendócrinas centrales. La zona intersticial está constituida por células de soporte de origen glial. Además de células del tejido conectivo y endotelial, se han descrito fibras musculares estriadas y linfocitos; estos últimos pueden presentarse en forma dispersa como infiltrado linfoide o en forma de nódulos (225).

En los mamíferos la pineal se encuentra inervada por las fibras simpáticas del ganglio cervical superior (89), siendo esta inervación esencial para que funcione en relación a los ciclos de luz-oscuridad. La glándula tiene una inusual propensión a calcificarse en etapas tempranas de la vida, por la deposición de hidroxapatita dentro de los pinealocitos. Sin embargo, la correlación entre calcificación de la pineal y la disminución de su actividad neuroendócrina es, por el momento, controvertida.

## MELATONINA

La melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina es el principal producto secretorio de la glándula pineal. Se trata de una indolamina con un peso molecular de 232 cuya síntesis y secreción se realizan de acuerdo con un ritmo circadiano regular, siendo la luz el factor sincronizador del ciclo. La síntesis de melatonina se inicia por la estimulación, durante la noche, de las fibras post-ganglionares  $\beta$ -adrérgicas del ganglio cervical superior. La hormona así sintetizada no se almacena en la glándula sino que es liberada inmediatamente por difusión simple al plasma o, en algunas especies, al fluido cerebroespinal a través del plexo coroide. En muchos mamíferos, las concentraciones de la hormona en el fluido cerebroespinal son menores que las detectadas en plasma (179). La vida media de la melatonina en el plasma es de 10-40 minutos y durante un simple pasaje a través del hígado, el 90 % de la misma es clareado. En los hepatocitos, la mayor parte de la hormona es convertida en 6-hidroximelatonina, que luego se conjuga formando 6-sulfatoximelatonina, siendo éste el metabolito que se excreta por orina (101). Apimadamente el 70 % de la melatonina circulante está unida a albúmina (179).

En general se considera que los mamíferos recién nacidos no son capaces de sintetizar melatonina. Sin embargo, existen marcadas diferencias entre especies en relación al momento en que ocurre la maduración funcional de la pineal. Así, en especies precoces como la oveja, los ritmos circadianos de melatonina empiezan a la semana de vida, mientras que en especies como el hámster, que nacen siendo muy inmaduros, la

producción se retrasa hasta la segunda o tercera semana de vida (51). Se ha visto que existe transferencia placental de melatonina desde la madre hacia el feto (178), así como a través de la leche materna. Esta transferencia de melatonina podría influenciar la fisiología neonatal antes que ocurra la síntesis de melatonina endógena (177). Es interesante destacar que, en el caso de la oveja, la glándula pineal es capaz de secretar melatonina *in vitro* en respuesta a la estimulación  $\beta$  adrenérgica durante los últimos 10 días de gestación (137). Por lo tanto, el hecho que la pinealectomía de la madre resulte en pérdida de los ritmos diarios de melatonina en el feto, debería atribuirse a la falta de maduración de los procesos nerviosos que controlan la síntesis de la hormona y no a la incapacidad de la glándula fetal para producirla. No ocurre lo mismo en el caso de la rata, ya que la actividad de algunas de las enzimas necesarias para la biosíntesis de la hormona no se observa hasta el final de la segunda semana de vida (70).

En el hombre, la glándula pineal comienza su producción cíclica de melatonina entre los 3 y 4 meses de edad (70). Sin embargo, se ha demostrado que la falta de luz durante las primeras 72 horas de vida provoca un aumento significativo en los niveles plasmáticos de melatonina, lo que indicaría que la pineal humana puede sintetizar melatonina desde el nacimiento, pero no de una manera rítmica (84).

### **Síntesis de la melatonina:**

La síntesis de la melatonina se inicia por estimulación noradrenérgica de las fibras

simpáticas post-ganglionares con receptores  $\beta_1$  en sus terminales, seguido por una clásica secuencia de aumento del AMPc (99,217). La noradrenalina y sus receptores están acoplados rítmicamente en la producción de la hormona. Mientras que en el período de luz, el nivel de receptores presentes en la membrana se encuentra elevado, luego de la estimulación noradrérgica que se inicia en la fase de oscuridad, se produce una disminución de los receptores  $\beta_1$ . Estos fenómenos reflejan el estatus funcional de la sinapsis noradrérgica en la pineal y dan como resultado la liberación rítmica de la melatonina para que actúe como un marcador de los ritmos circadianos.

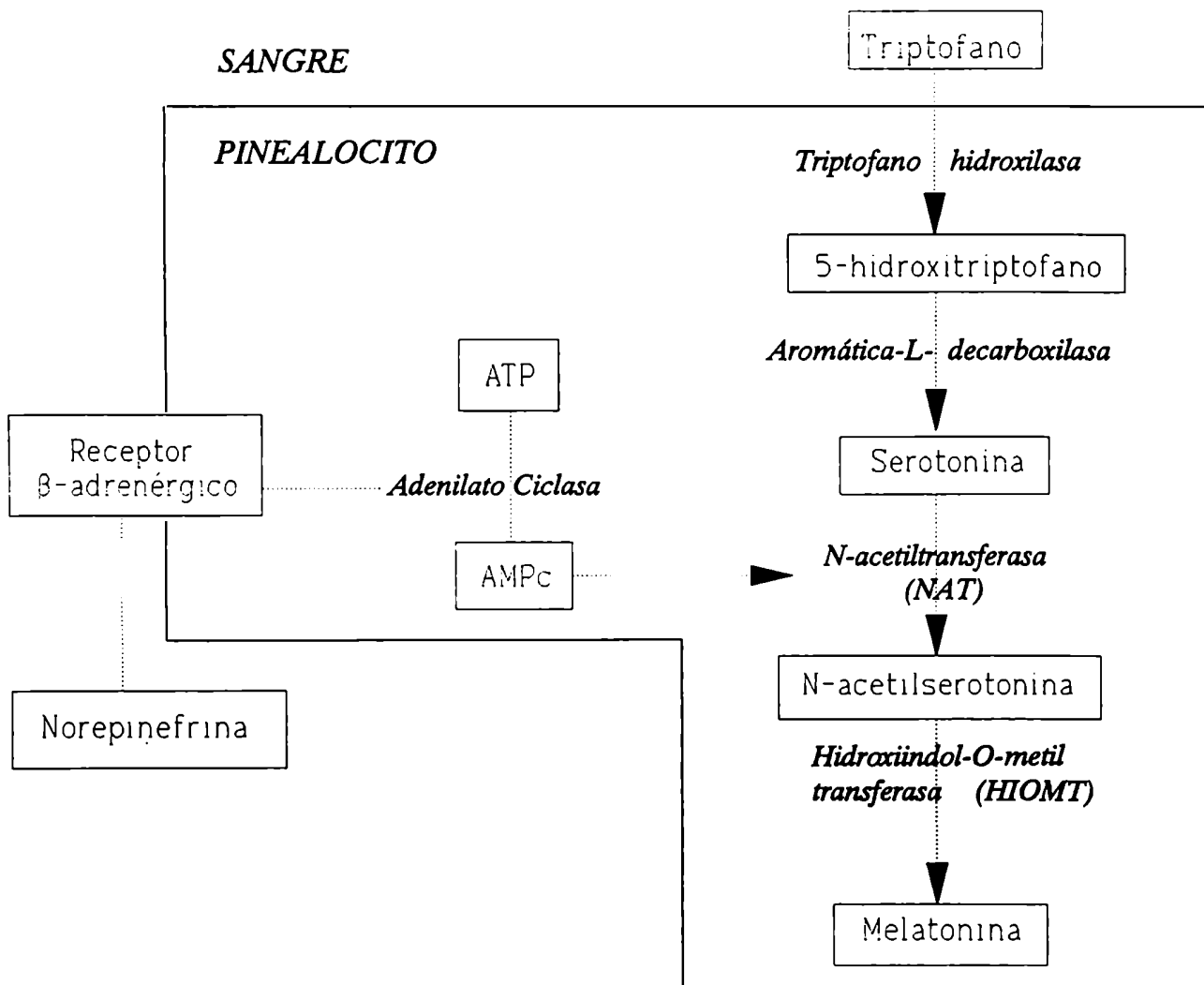
El precursor inicial para la síntesis es el triptofano que es tomado del plasma por la pineal (53) (Figura 1). La captación del mismo por los pinealocitos involucra un mecanismo activo que ocurre contra un gradiente de concentración (202).

El ritmo de actividad de la N-acetil-transferasa (NAT), que es la enzima limitante en la síntesis de melatonina, se describió originalmente en ratas (98). En esta especie la actividad de la enzima varía entre 20 a 80 órdenes durante la fase oscura lo que provoca que la síntesis de la melatonina ocurra exclusivamente por la noche en condiciones normales (109,182). En otros mamíferos el incremento de la enzima es menor, confirmando que las diferentes curvas de actividad enzimática que se obtienen en las distintas especies correlacionan con los diferentes niveles de melatonina observados (184).

La producción nocturna de melatonina en la glándula pineal no está asociada al ciclo circadiano de actividad locomotora que las distintas especies desarrollan. Es decir



**FIGURA 1: Síntesis de melatonina.**



que, ya sea en animales de actividad diurna, nocturna o aquellos con patrones de actividad crepuscular, la producción y secreción de la mayor parte de la hormona por los pinealocitos, ocurre por la noche. Sin embargo, existe un pequeño número de mamíferos, como el hámster europeo, en los cuales la oscuridad no está asociada con un aparente incremento en la producción de la hormona pineal, aún cuando poseen la maquinaria enzimática necesaria para producir el indol (165,181).

La magnitud del aumento en la síntesis de melatonina varía entre 2 y 12 órdenes dependiendo de las especies consideradas. En base a estas diferencias, es posible clasificar los patrones de secreción de melatonina en tres categorías (184,66). Esta clasificación permite la identificación de las especies de acuerdo al ritmo en la síntesis de la hormona pineal a lo largo de las 24 horas del día.

El **patrón A** se caracteriza por mostrar niveles de melatonina que se incrementan sólo en la segunda fase del período de oscuridad. Este patrón en la producción de la hormona es el que se observa en el hámster sirio (152) y en el ratón (50). Cuando estas especies están expuestas a ciclos de luz-oscuridad de 14 y 10 horas respectivamente, el aumento en los niveles de melatonina no ocurre sino hasta aproximadamente la segunda mitad de la fase oscura, cuando se verifica un pico de 1 a 2 horas, a partir de aquí los niveles de la hormona comienzan a bajar. Este tipo de patrón de secreción podría deberse a la necesidad de procesos intracelulares adicionales a la síntesis de melatonina (64). Por ejemplo, en el hámster se produce la transcripción de ARNm para la enzima NAT lo que determina un retardo en la producción de melatonina con respecto al comienzo de la fase

oscura.

El patrón más común en la producción de melatonina es el representado por el **patrón B**, en el que se observa un pico neto que abarca la mitad de la fase oscura. Tanto la rata (87) como el hombre (8) exhiben este patrón de síntesis.

Los animales que presentan el **patrón C** sintetizan melatonina durante la mayoría de la fase oscura, dando lugar a una alta meseta de producción. Como ejemplos podemos citar a la oveja (6,79) y el hámster siberiano (65), entre otros.

La pineal no es el único sitio de síntesis de melatonina. Así, por ejemplo, se ha demostrado que hay una producción rítmica de la hormona en la retina (151,215), aunque no ha sido definida una función para la melatonina retinal. Las glándulas Harderianas de las aves y los mamíferos también secretan melatonina en forma rítmica y su actividad no se ve modificada por la pinealectomía (75). Finocchiaro y colaboradores (58) encontraron que los leucocitos mononucleares de sangre humana periférica son capaces de sintetizar melatonina y que esta producción se estimula por el agregado de interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) al cultivo. Por último, el tracto gastrointestinal es una fuente importante de melatonina, aunque la contribución de este sitio de síntesis a los niveles de melatonina circulante es controvertido. Se ha propuesto que los niveles basales diurnos de melatonina se deben a la actividad de las células enterocromafines del tracto gastrointestinal y que estos niveles están controlados por la disponibilidad de triptofano de la ingesta. Por el contrario, las fluctuaciones circadianas y circanuales de melatonina plasmática son consecuencia de la

producción de la misma en la pineal como respuesta a los cambios en el fotoambiente, lo que está confirmado por el hecho de que tanto la pinealectomía como la denervación simpática de la glándula previenen el incremento plasmático nocturno de la hormona (151,6).

### **Receptores para melatonina**

Los primeros trabajos que demostraron la existencia de sitios de unión de alta afinidad para melatonina en cerebro de mamíferos se remontan a 1979 (31,180). Sin embargo, estas observaciones no pudieron ser reproducidas por otros investigadores en ese momento, lo que hizo dudar de la validez de los resultados. El ligando utilizado en ese entonces era melatonina tritiada. Más tarde se comprobó que entre los inconvenientes que tenía este ligando estaban su tendencia a una disociación rápida del receptor y un alto grado de unión inespecífica (228).

Posteriormente, Laudon y colaboradores introdujeron el uso de la  $^{125}\text{I}$ -melatonina, que es un potente análogo de la hormona *in vitro* y que se une con alta afinidad (picomolar) a un único tipo de sitio de unión en los sinaptosomas de cerebro de rata, siendo la unión dependiente del tiempo y reversible (228). Este sitio de unión para melatonina se conoce actualmente como receptor  $\text{ML}_1$ . Existe un segundo sitio de unión en la membrana denominado  $\text{ML}_2$  que une melatonina con una afinidad nanomolar (49). Hasta ahora, estos receptores  $\text{ML}_2$  se han encontrado en pocos tejidos y sus funciones

permanecen desconocidas.

Recientemente ha sido posible clonar los genes que codifican para el receptor  $ML_1$  en distintas especies, entre ellas, el hombre (71). Por técnicas de hibridización *in situ* se demostró la presencia de ARNm para este receptor en las regiones esperables, como ser el pars tuberalis de la hipófisis y el núcleo supraquiasmático.

En cuanto a la distribución de estos receptores en el cerebro de rata, se comprobó que, aunque abundantes en todo el órgano, sólo los del hipotálamo, hipocampo y pons medula exhiben variaciones diurnas que correlacionan con las respuestas fisiológicas de melatonina. Además de variaciones circadianas, la densidad de los sitios de unión varía considerablemente con la edad y los niveles circulantes de hormonas esteroideas. Por ejemplo, se produce una dramática disminución en el hipotálamo y en el hipocampo con el envejecimiento. Por su parte, la ovariectomía reduce la expresión de sitios de unión para melatonina en el hipotálamo, pero no en otras zonas del cerebro. Mientras que la inyección de estradiol 2 horas antes del ensayo, recupera los niveles controles de unión. También se han descrito sitios de unión para melatonina en tejidos extraneurales. Por ejemplo, Cohen y colaboradores (37) analizando distintos tejidos de rata, de hámster y también humanos, encontraron unión específica de  $^3\text{H}$ -melatonina en útero, ovario, piel, testículo e hígado. Esta amplia distribución de los sitios de unión para melatonina es esperable si se tiene en cuenta la gran variedad de órganos y de sistemas que son susceptibles de ser modulados por la hormona.

## **EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LA MELATONINA**

La glándula pineal, a través de la melatonina, juega un papel fundamental en la organización de muchos procesos metabólicos, fisiológicos y del desarrollo (5). A grandes rasgos, los efectos que ejerce pueden clasificarse en **endocrinológicos** y **no endocrinológicos**.

### **Efectos endocrinológicos:**

La glándula pineal juega un papel importante en la regulación de la fisiología reproductiva de los animales de reproducción estacional (180), gracias a que convierte los cambios anuales en la longitud del día (fotoperiodo) en señales endócrinas que llegan a los órganos "blanco".

Inicialmente se consideraba que la melatonina sólo tenía efectos antigonadotróficos tanto en mamíferos sexualmente inmaduros como adultos. Distintas evidencias experimentales llevaban a esta aseveración. Por ejemplo, se encontró que la administración crónica de melatonina en ratas sexualmente inmaduras provoca un retardo en el incremento del peso normal del ovario, en la apertura vaginal y una disminución en la incidencia de estros (226); mientras que en ratas machos adultas conduce a una disminución en el tamaño de las vesículas seminales (53). Por el contrario, se demostró que los animales que viven en un ambiente de oscuridad constante, experimentan atrofia

de los órganos sexuales como consecuencia de la estimulación de la glándula (53). Asimismo, la pinealectomía quirúrgica acelera la maduración de la función gonadal (148) e induce una alta incidencia de estros, siendo estos efectos bloqueados por la administración de la melatonina (53).

Sin embargo, la melatonina no siempre tiene efectos antigonadotróficos (180). La administración exógena de la hormona puede producir efectos contrapuestos anti o progonadotróficos sobre la función reproductiva que dependen del momento del ciclo luz-oscuridad en que es administrada, la longitud del fotoperiodo, la dosis inoculada y, fundamentalmente, de las especies consideradas. Por ejemplo, se ha encontrado que en el hámster turco, una especie con reproducción estacional, la pinealectomía provoca la involución de las gonadas, lo que indicaría que la melatonina puede actuar como progonadotrófica (49).

La regulación de las funciones reproductoras por parte de la melatonina ocurre a dos niveles: 1) actuando directamente sobre las células del tejido reproductor o 2) actuando sobre el eje hipotalámico-pituitario-gonadal. Con respecto al primer nivel, se demostró que la incubación de tejidos ováricos humanos *in vitro* con melatonina incrementa la esteroidogénesis medida como la incorporación de [ $^{14}\text{C}$ ] en la molécula de androstenediona (118) que es precursora en la síntesis de testosterona y estradiol. Asimismo, se comprobó que la melatonina tiene un efecto directo estimulador *in vitro* sobre la producción de progesterona en células de la granulosa ovina, observándose además un efecto sinérgico con la hormona luteinizante (LH) (11). Esta modulación

ejercida por la melatonina depende del grado de diferenciación de las células, siendo sólo observada en estadios maduros y no en células indiferenciadas. Estos datos fueron también corroborados en células de la granulosa de ratas y humanos.

La melatonina no sólo es capaz de modular la síntesis de hormonas esteroideas, sino también la expresión de sus receptores, siendo sus efectos distintos según el tejido de que se trate. Así por ejemplo, Danforth y colaboradores encontraron que la melatonina aumenta la expresión de los receptores para estrógeno en células de útero tanto *in vitro* como *in vivo* (43). Por su parte, la inoculación de melatonina provoca una reducción de los receptores para estrógeno en el cerebro de ratas ovariectomizadas (189).

Con respecto a la regulación de la reproducción a través del eje hipotalámico-pituitario-gonadal, existen numerosos trabajos que avalan un papel inhibitorio de la melatonina sobre dicho eje. Por ejemplo, se ha demostrado que la glándula pineal interviene en la regulación del pulso de la LH (210), apoyando las evidencias que indican que la melatonina es inhibitoria de la ovulación (53,7). En ratas recién nacidas la administración de melatonina exógena inhibe en forma aguda la secreción de LH y de la hormona folículo estimulante (FSH) inducida por la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) (128). La melatonina inoculada durante la maduración sexual (entre los días 20 y 40 de vida en la rata) inhibe no sólo el aumento en los niveles de LH propios de este periodo, sino también el aumento en la expresión de receptores hipofisarios para GnRH (104). Estos resultados, junto con la observación de que la melatonina estimula la secreción de la GnRH en hipotálamos perfundidos *in vitro*, sugieren que el efecto de la



hormona sobre la actividad gonadal involucra una acción directa a nivel hipotálamico (206).

Merece destacarse el hecho de que en el hombre y en otros primates no parece existir una asociación causal entre la disminución de las concentraciones nocturnas de melatonina y el aumento de los esteroides sexuales gonadales responsables de la maduración sexual. Trabajando con hembras de mono rhesus, Wilson y colaboradores (223) observaron que ni la ovariectomía ni el tratamiento con estradiol modifican la amplitud del pico nocturno de melatonina durante la maduración sexual. Sin embargo, el efecto de la melatonina sobre el eje hipotalámico-pituitario-ovárico en el hombre sigue siendo muy controvertido. Algunos autores no encuentran modificaciones en los parámetros endócrinos del ciclo ovulatorio normal por efecto de la melatonina (6), mientras que otros describen inhibición de la ovulación con tratamientos similares (53,7).

Por último cabe señalar que la administración de la melatonina en ratas disminuye significativamente los niveles circulantes de prolactina. Trabajos más recientes demuestran que la inoculación de la hormona disminuye la concentración de dopamina en la eminencia media concomitantemente con la supresión de los niveles hipofisarios y plasmáticos de prolactina (2).

En cuanto a los efectos endocrinológicos no relacionados con la reproducción, numerosas evidencias sugieren una probable interacción de la pineal con el eje hipotalámico-pituitario-adrenal. Si bien existen algunos datos discordantes en cuanto al

efecto ejercido por la melatonina, la mayoría de los estudios indican que la hormona es inhibitoria de dicho eje (126). Se ha observado, por ejemplo, que la pinealectomía causa hipertrofia de las adrenales. Por otra parte, la melatonina provoca la inhibición de la síntesis de corticosterona cuando se agrega a cultivos de células de adrenal (148). También se demostró que la melatonina incrementa la sensibilidad a los glucocorticoides en cerebro, exacerbando, de esta manera, los mecanismos de retroalimentación negativo, lo que resulta en una disminución de la actividad adrenocorticotrófica (126). Otros autores, sin embargo, no encuentran alteraciones de las hormonas adrenales por efecto de la melatonina, tanto *in vivo* (126) como *in vitro* (162).

#### **Efectos no endocrinológicos:**

Los efectos no endocrinológicos de la glándula pineal no han sido tan sistemáticamente explorados como los endocrinológicos; aunque no cabe duda que la melatonina modifica distintas respuestas metabólicas y del comportamiento. En los mamíferos, la melatonina tiene propiedades hipnóticas tanto en los roedores, como en el hombre (53), es inductora del sueño y posee actividad analgésica y anticonvulsiva (203). Asimismo, la melatonina reduce la actividad locomotora en ratas (176) y hámsters (53) e inhibe el comportamiento de respuesta ante la agresión territorial (154). No se conocen con exactitud los mecanismos por los cuales la melatonina ejerce sus efectos sedantes y anticonvulsivos. Las hipótesis más aceptadas proponen una interacción con neuronas

serotoninérgicas o con receptores cerebrales para benzodiazepinas (203).

La pineal también está involucrada en la termoregulación y la hibernación. En humanos y primates se ha observado que cuando los niveles de melatonina son altos se produce una disminución en la temperatura corporal (8), mientras que la exposición durante la noche a una luz brillante, atenúa tanto la disminución en la temperatura como la secreción de melatonina (53,91). A nivel experimental, se comprobó que la supresión de la secreción nocturna de melatonina con el bloqueante  $\beta$  adrenérgico, atenolol, atenúa el descenso nocturno en la temperatura del cuerpo (29). La melatonina podría actuar directamente sobre el hipotálamo anterior, donde se localiza el centro regulador de la temperatura (91), ya que posee receptores específicos en dicha región. Por su parte en la rata, se han detectado receptores funcionales para melatonina en las arterias del círculo de Willis en la base del cerebro y en las arterias caudales, sitios estos que están involucrados en la termoregulación (29).

La influencia que tendría la glándula pineal en distintas enfermedades siquiátricas ha sido objeto de discusión en los últimos años. Algunos trabajos han relacionado la existencia de anomalías en la secreción de melatonina con patologías como la depresión aguda (39). Se ha encontrado, además, que sujetos pertenecientes a grupos de alto riesgo para padecer desórdenes afectivos muestran supersensibilidad a la supresión de la melatonina por la luz (108). Sin embargo, otros autores no han logrado establecer una relación consistente entre los niveles de melatonina y diferentes características de los pacientes depresivos como: presencia o no de melancolía, historia familiar, subtipos

endógenos, etc. (53,6). En el síndrome afectivo estacional, la terapia lumínica, es decir la exposición de los pacientes a luz brillante, resulta muy efectiva. Considerando que esta patología se pone en evidencia en invierno, cuando el periodo de oscuridad es mayor, se propuso que la melatonina estaría involucrada. Sin embargo, Wehr y colaboradores (219) demostraron que no es necesaria la supresión de la secreción de melatonina para que se induzca el efecto anti-depresivo de la luz. Es decir que la eficacia de la terapia lumínica en el síndrome afectivo estacional no parece involucrar la disminución de los niveles de la hormona.

## **MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE POR LA GLÁNDULA PINEAL**

### **Antecedentes**

La existencia de interacciones de la glándula pineal con el sistema inmune fue postulada hace más de 70 años por Berman, sobre la base de que el timo y la pineal actuarían en forma conjunta para regular el crecimiento celular (14). En 1943, Milcu y Pitis encontraron que la administración por tiempo prolongado de extractos pineales daba como resultado un incremento en el peso del timo, acompañado de una hiperplasia linfoide en las zonas cortical y medular de la glándula (134). Por su parte, Brainard y col. encontraron que cuando se exponía a hámsters a fotoperíodos largos, desarrollaban un incremento en el peso esplénico que estaba asociado a un aumento en el número de

linfocitos y monocitos. Es decir, que los órganos del sistema inmune son sensibles a los cambios en la longitud del fotoperiodo (25).

Los estudios cronobiológicos de las funciones inmunes han aportado evidencias indirectas de la asociación entre glándula pineal y sistema inmune. Así, por ejemplo, Fernandes y colaboradores encontraron que existe un ritmo circadiano en la respuesta de células formadoras de placa y en la actividad natural killer (NK) tanto en ratas (57) como en ratones (56). También en humanos fue posible establecer ritmos circadianos y circanuales no sólo en el número de linfocitos circulantes, sino además en la funcionalidad de estas células (1,92).

Cabe señalar que, en un principio, se consideró que la serotonina era la molécula responsable de los efectos de la glándula pineal sobre el sistema inmune. Este supuesto se basaba en el hecho que la serotonina, que se encuentra muy concentrada en la glándula pineal por ser precursora en la síntesis de melatonina, es un mediador importante de las reacciones inflamatorias.

### **Efectos de la pinealectomía sobre la respuesta inmune.**

Uno de los posibles modos de investigar el papel que juega la glándula pineal en la regulación de las funciones inmunes consiste en evaluar dichas funciones en un animal al que le ha sido extirpada la glándula. Es decir, estudiar los efectos de la pinealectomía. No obstante ser éste un óptimo modelo, hasta el presente se ha utilizado en muy pocos

trabajos. La primera referencia en este sentido data de 1963 con el trabajo de Devecerski, que describe que la pinealectomía neonatal provoca la atrofia tímica (45). Por su parte, los primeros en evaluar las consecuencias de la ablación pineal sobre la reactividad inmune fueron Jankovic y colaboradores, quienes encontraron que la pinealectomía en ratas de seis semanas de vida provoca una disminución parcial y transitoria de la reacción de Arthus, de la hipersensibilidad retardada a albúmina bovina y de la producción de anticuerpos (86). Por el contrario, la pinealectomía en ratas recién nacidas no modificaba estos mismos parámetros evaluados en la edad adulta.

Casi 20 años después, Del Gobbo y colaboradores (44) volvieron a utilizar el modelo de pinealectomía quirúrgica para estudiar la relación glándula pineal-sistema inmune. Trabajando con ratones adultos encontraron que la pinealectomía reduce significativamente la producción de IL-2 por parte de los linfocitos T, siendo este efecto evidente 5 días después de la operación y máximo a los 15 días. Por otra parte, la pinealectomía fue capaz de inhibir la actividad NK de los esplenocitos. Los autores sugieren que la alteración en la actividad NK es consecuencia de la reducción en los niveles de IL-2, citoquina que afecta la proliferación y actividad de las células NK (72). Estos efectos pueden ser revertidos por melatonina administrada en forma aguda y en dosis muy altas.

Además de la pinealectomía quirúrgica es posible impedir la actividad de la pineal mediante la pinealectomía farmacológica, es decir suprimiendo la secreción de melatonina con el uso de inhibidores  $\beta$  adrenérgicos como el propanol. Este abordaje fue utilizado por

Maestroni y colaboradores quienes encontraron que la administración por la tarde de propanolol durante 4 días consecutivos resulta en una depresión de la respuesta primaria de anticuerpos a glóbulos rojos de carnero en ratones (119). Los esplenocitos de estos animales presentan también una disminución en el cultivo mixto de linfocitos autólogos, pero no en el cultivo mixto alogeneico. Se encontraron resultados similares inhibiendo la producción de melatonina con para-cloro-fenilalanina, que interfiere con la síntesis de serotonina. Al igual que en el caso de la pinealectomía quirúrgica, los efectos provocados por la pinealectomía farmacológica pueden revertirse con la administración subcutánea de melatonina. Si bien la dosis usada en estos estudios fue muy elevada (10 mg/kg de peso), los mismos autores publicaron posteriormente resultados similares utilizando dosis mil veces más bajas (124).

### **Efecto de la melatonina sobre la respuesta inmune.**

El segundo modelo utilizado para estudiar el papel de la glándula pineal en la reactividad inmune consiste en la administración de melatonina y el posterior análisis de las funciones inmunológicas. El grupo de investigadores que más trabajó en este tema fue el de Maestroni y colaboradores quienes utilizaron distintas cepas de ratones endocriados para sus experimentos *in vivo*. En primer lugar, estudiaron el efecto de la melatonina en la respuesta primaria de anticuerpos contra glóbulos rojos de carnero. Los ratones se inocularon diariamente con melatonina durante 6 días consecutivos, mientras que la

inmunización con los eritrocitos se realizó al segundo día. En el día séptimo se evaluó la respuesta humoral mediante la cuantificación de células formadoras de placas en el bazo. Se encontró un aumento en la celularidad del bazo de los animales inmunizados tratados con melatonina que se asocia con un aumento en la respuesta anti-eritrocitos. Es de destacar que, en ausencia del antígeno, la melatonina no induce efecto alguno (120). En trabajos posteriores, estos autores demostraron que el efecto de la melatonina era completamente suprimido por la administración simultánea del inhibidor del sistema opioide endógeno, naltrexona. Por otra parte, los péptidos opioides como la 1-13 dinorfina y la  $\beta$  endorfina mimetizan el efecto exacerbador de la melatonina cuando se inoculan por la tarde. Mediante experimentos *in vitro*, se encontró que la melatonina induce la secreción de agonistas opioides por parte de esplenocitos previamente estimulados con antígeno (39,122). Teniendo en cuenta este conjunto de resultados, el grupo de Maestroni propone que la actividad inmunomodulatoria de la melatonina se lleva a cabo a través de la estimulación del sistema opioide endógeno.

Pioli y colaboradores estudiaron el efecto de la administración de melatonina en la respuesta de anticuerpos de ratones inmunosuprimidos ya sea por tratamiento con la droga antineoplásica, ciclofosfamida, o por el envejecimiento. Encontraron que, en ambos casos, la melatonina restauró los niveles normales de respuesta (34). Para determinar si el efecto de la melatonina se produce a nivel de la presentación antigénica, se obtuvieron macrófagos esplénicos de animales tratados o no con la hormona y se evaluó la liberación de IL-1 y el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) en respuesta al LPS. Los macrófagos



provenientes de animales que recibieron melatonina tuvieron una mayor producción de estas citoquinas, así como un incremento en la expresión de moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (167).

Existen muchas evidencias que indican que la administración de melatonina en animales exacerba la reactividad inmune. No ocurre lo mismo con la actividad de la hormona pineal *in vitro*. En primer lugar, algunos de los investigadores que más han trabajado en este tema, como los grupos de Maestroni y Pioli, han señalado que no les fue posible modificar con melatonina *in vitro* diversos ensayos inmunológicos, como la producción de anticuerpos (119) y la secreción de IL-1 (167). En segundo lugar, cuando se encontraron efectos de la melatonina *in vitro*, los resultados no siempre fueron en el mismo sentido. Por ejemplo, Artz y colaboradores (9) encontraron que la incubación de células mononucleares de sangre periférica humana con melatonina inhibe la síntesis de IFN $\gamma$  inducida por mitógenos, mientras que el grupo de Muscettola (142) observó un incremento en la producción del IFN $\gamma$ . Estas diferencias pueden explicarse por distintas razones: 1) variaciones en las concentraciones de melatonina usadas, 2) distintos tiempos de incubación con el mitógeno, 3) dosis óptima versus dosis subóptima del mitógeno, 4) estado de activación de las células del dador, entre otras. La acción directa de la melatonina sobre los monocitos humanos fue evaluada por Morrey y colaboradores (167). Se comprobó que la hormona a bajas concentraciones ( $10^{-9}$ - $10^{-10}$ M) es capaz de activar las células monocíticas a un estado tumoricida y de inducir la producción de IL-1 y de intermediarios reactivos del oxígeno ( $H_2O_2$ ,  $NO_2$  y  $O_2^-$ ). Con respecto a la inducción de

IL-1, se observó que concentraciones menores de melatonina ( $10^{-12}\text{M}$ ) si bien no inducen la síntesis de la citoquina, activan la transcripción del ARNm. Más interesante aún, es que la melatonina ( $10^{-12}\text{M}$ ) fue capaz de aumentar la sensibilidad de los monocitos a la estimulación con LPS, lo que sugiere que la activación de estas células con concentraciones bajas de melatonina puede primarlas y prepararlas para la subsiguiente estimulación con LPS.

### **Sitios de unión para melatonina en el sistema inmune**

Gracias al desarrollo de un ligando altamente específico y de gran afinidad como lo es la  $2[^{125}\text{I}]\text{iodomelatonina}$  fue posible caracterizar en linfocitos humanos dos sitios de unión para melatonina: uno de baja y otro de alta afinidad (208,5 y 5,2 nM) (68,113). Estos sitios cumplen con todos los criterios para ser considerados receptores, ya que la unión del ligando es dependiente de la temperatura y del tiempo, es estable y puede saturarse, además de ser específica y reversible. Asimismo, los nucleótidos de guanina inhiben la unión del ligando a extractos crudos de membrana linfoide, lo que sugiere que esos sitios de unión están acoplados a una proteína reguladora que une nucleótidos de guanina. López-González y colaboradores demostraron también la existencia de sitios de unión para melatonina en neutrófilos humanos (114).

También fueron descriptos sitios de unión para melatonina en el bazo de ratones, cobayos y aves (227,68), así como en el timo de ratas (115,127). En las membranas

tímicas se detectaron sitios de baja ( $K_d$  1226 nM) y de alta afinidad ( $K_d$  1.72 nM). Una característica interesante de estos receptores es su variación en relación con la edad, siendo la expresión menor en los adultos que en los neonatos (127). Esta disminución se debió más a cambios en el número de sitios de unión para el ligando a ambos tipos de receptores que a cambios en la afinidad de los mismos. Estas diferencias podrían responder a variaciones en las concentraciones séricas de melatonina a lo largo de la vida del animal. En efecto, durante la primer semana de vida, los niveles en suero son bajos y el ritmo normal de secreción de melatonina no se establece hasta la segunda semana de vida (70). Los bajos niveles existentes en la primera semana podrían ser responsables del incremento de receptores para melatonina en el timo debido a la ausencia de un mecanismo de retroalimentación negativo.

En cuanto a las señales intracelulares que son gatilladas por la unión de la melatonina a su receptor en la célula inmunocompetente, es muy escasa la información de que se dispone actualmente. El grupo de Guerrero y colaboradores demostró que la melatonina (100 nM) induce la producción de GMPc en linfocitos, mientras que no afecta la producción del AMPc (68). Por otra parte, se encontró que, en estas mismas células, la melatonina a concentraciones fisiológicas (10-100 pM) es capaz de potenciar el efecto del péptido vasoactivo intestinal (VIP) sobre la producción de AMPc (112,69). Estos resultados sugieren que la melatonina podría modular la reactividad inmune a través de la regulación de los niveles de nucleótidos cíclicos, que son importantes segundo mensajeros de las células inmunocompetentes.

Por su parte, Morrey y colaboradores (141) demostraron que la melatonina ( $10^{-9}\text{M}$ ) activa a los monocitos humanos a través de la proteína quinasa C. Estos autores sugieren que la melatonina podría activar directamente a la enzima en el citosol, como lo hacen el forbol miristato y el LPS, ya que por ser una molécula altamente liposoluble puede atravesar la membrana plasmática.

### **Papel de la melatonina en el estrés**

Evidencias de distinto tipo asocian a la glándula pineal con una actividad inhibitoria de las manifestaciones del estrés. Por ejemplo, se demostró que la administración de melatonina a ratas sometidas a diferentes estresores físicos y psicológicos bloquea tanto el aumento en la relación peso de las adrenales/peso corporal, como el de la relación peso de la hipófisis/altura corporal (188), que son parámetros característicos del estrés. Más recientemente, Khan y colaboradores (96) encontraron variaciones circadianas en la respuesta al estrés evaluado por la aparición de úlceras gástricas. Estos autores encontraron que las ratas sometidas a estrés térmico durante la noche desarrollan significativamente menos úlceras que las sometidas durante la fase de luz. La pinealectomía aumentaba la ulceración durante la noche, mientras que la administración de melatonina a los animales pinealectomizados revertía este aumento. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la glándula pineal a través de la secreción de melatonina cumple un papel inhibitorio de los efectos del estrés.

También en el hombre se ha encontrado cierta asociación entre pineal y situaciones de estrés. Por ejemplo, en un estudio llevado a cabo con voluntarios a los que se les impidió dormir durante 64 horas, se observó un incremento en la concentración urinaria de melatonina que correlacionó con la fatiga y la falta de sueño (218).

Una de las consecuencias del estrés que ha merecido mayor atención es la supresión de las funciones inmunes, originada, mayormente, por acción de los glucocorticoides que se liberan de la adrenal. Maestroni y colaboradores estudiaron la influencia de la glándula pineal en la inmunosupresión por estrés o corticoides exógenos, encontrando que la inoculación de melatonina en una dosis de 20 ug/kg de peso a ratones estresados por inmovilización antagoniza la disminución del peso del timo y de la producción de anticuerpos en el bazo provocada por el estrés (123). La melatonina también reduce la mortalidad de ratones estresados e inyectados con dosis subletales del virus de la encefalomiocarditis, que es extremadamente patógeno en estos ratones cuando son estresados (121).

Cuando se estudió el mecanismo por el cual la melatonina revierte la disminución del peso del timo inducida por el estrés, se vio que dicha reversión: 1) sólo ocurre en animales primados por el antígeno y 2) se bloquea con la inoculación simultánea del antagonista opioide, naltrexona. Además, estos autores demostraron que ciertos péptidos opioides como la 1-13 dinorfina y la  $\beta$ -endorfina, mimetizan el efecto anti-estrés de la melatonina, aún en animales no primados. Cuando se estimularon *in vitro* con melatonina esplenocitos de ratones inmunizados, se encontró liberación de agonistas opioides al

sobrenadante. Estos sobrenadantes fueron capaces de restaurar el peso del timo y la producción de anticuerpos de los animales estresados. En base a estos resultados, Maestroni y colaboradores proponen que la melatonina modula la actividad anti-estrés del sistema opioide endógeno.

Otros autores han propuesto que la melatonina podría interferir con los efectos deletéreos del estrés en la inmunidad, modificando la expresión de los receptores para corticoides del timo. En tal sentido, Persengiev y colaboradores demostraron que la administración de melatonina altera la densidad y la afinidad de estos receptores dependiendo del ambiente hormonal. Así, cuando los niveles de corticosterona son bajos, por ejemplo en animales adrenalectomizados, la melatonina disminuye la afinidad de los receptores para corticosterona, mientras que aumenta en animales con altos niveles séricos de corticoides (162,163).

### **Papel de la glándula pineal en el cáncer.**

Existen numerosas evidencias experimentales que adjudican un rol oncostático a la glándula pineal, a través de la secreción de melatonina (22). Algunas de estas evidencias provienen de trabajos *in vivo* con animales de laboratorio sujetos a pinealectomías o tratamientos con melatonina. Otras evidencias surgen de estudiar los efectos de la melatonina sobre células tumorales cultivadas *in vitro*. En pacientes oncológicos se han evaluado los niveles séricos de melatonina para tratar de asociarlos

con el pronóstico y la evolución de la enfermedad y, en algunos pocos casos, se administró melatonina con fines terapéuticos.

Con respecto a los estudios *in vivo*, se encontró que la pinealectomía quirúrgica en ratas acelera el crecimiento de tumores mamarios inducidos por el carcinógeno químico dimetilbenzantraceno (DMBA), mientras que la melatonina lo retarda (38). Se encontraron resultados similares aumentando los niveles endógenos de melatonina mediante la privación de luz y reduciéndolos mediante la exposición a luz constante (pinealectomía funcional) (102). Esta capacidad oncostática de la melatonina se describió para otros tumores como ser: sarcoma de Hoshida, ascitis de Ehrlich, carcinoma Walker 256 (183), entre otros.

En relación a los estudios realizados *in vitro*, Bindoni y colaboradores (17) demostraron que existen compuestos activos en la pineal capaces de inhibir la proliferación de líneas celulares derivadas de tejidos epiteliales o adiposo. Por su parte, Hill y Blask (77) examinaron los efectos de la melatonina sobre células tumorales de mama, encontrando que concentraciones de  $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M detienen el crecimiento e inducen marcadas alteraciones estructurales. Asimismo, Shellard y colaboradores encontraron que la melatonina no sólo es oncostática, sino citotóxica sobre líneas celulares de cáncer mamario, ovárico y prostático (198).

En un principio se atribuyó la capacidad antitumoral a los efectos inhibitorios del ensamblado de microtúbulos que posee la melatonina (208). Sin embargo, en los últimos años se ha dado mucha importancia a su actividad como antagonista del ambiente

oxidativo que favorece la iniciación y progresión tumoral. Es un hecho conocido que los radicales libres del oxígeno juegan un papel fundamental en las etapas de iniciación y promoción de la carcinogénesis, en especial provocando daño en el DNA (187). Se ha demostrado que la melatonina es un potente secuestrador de radicales libres que, cuando se administra *in vivo*, es capaz de proteger al DNA del daño inducido por carcinógenos químicos (207). Otros autores (24) han encontrado que la melatonina induce la síntesis de glutatión, uno de los antioxidantes endógenos más conocidos. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la actividad oncostática de la hormona pineal podría deberse, al menos en parte, a su capacidad para contrarrestar el estado pro-oxidante de las células cancerosas.

Una mención especial merecen los estudios realizados sobre cáncer de mama y melatonina en humanos. Se ha visto que los niveles de melatonina plasmática en mujeres con tumores de mama positivos para receptores de estrógeno son significativamente menores que en las mujeres normales o con tumores negativos para receptores de estrógeno (42). Bartsch y col. (21) encontraron que esta disminución no se debe a un aumento en la velocidad de degradación de la hormona, sino a la menor actividad de la pineal. Se ha postulado que la melatonina sería un antagonista natural del desarrollo del cáncer de mama, en particular de aquellos que son positivos para receptores de estrógeno (42). Los mecanismos a través de los cuales podría actuar la melatonina incluyen la disminución de los niveles de prolactina y estrógenos y la modulación de los receptores para estrógenos. A nivel clínico, se ha probado la terapia con melatonina en pacientes con



cáncer de mama metastásico que no respondían al tratamiento clásico con tamoxifeno (110). En estos estudios se encontró una respuesta positiva parcial en el 30% de las pacientes con regresión temporaria de las metástasis, resultados éstos que alientan a seguir investigando en los efectos terapéuticos de la melatonina en el cáncer de mama.

### **Papel de la glándula pineal en el envejecimiento**

El proceso del envejecimiento puede considerarse como una progresiva pérdida de la capacidad para coordinar y modular las respuestas neuroendócrinas e inmunes a cambios en el ambiente externo e interno. En este contexto, la glándula pineal podría jugar un papel importante. De hecho, se ha encontrado una disminución en la producción circadiana de melatonina con la edad en individuos sanos (218,8). Esta correlación negativa entre niveles séricos de melatonina y edad se observó no sólo en el hombre sino también en el hámster sirio y la rata (81). Si bien los mecanismos involucrados no se conocen totalmente, se ha relacionado la disminución en la secreción de melatonina con los cambios morfológicos que sufre la pineal con la edad, que incluyen aumento en el número de cuerpos densos y en el diámetro de los depósitos de grasa dentro de los pinealocitos (53). También se han sugerido otros posibles causantes de esta reducción funcional: menor actividad de las neuronas noradrenérgicas de la pineal, respuesta reducida de los receptores  $\beta$  de los pinealocitos y alteraciones en el clareado de la melatonina plasmática, entre otras.

A nivel experimental, se observó que la administración oral de melatonina durante varios meses prolonga la vida de ratones de distintas cepas, preservando, además, algunos aspectos externos característicos de la juventud, como el peso corporal y el pelaje en condiciones óptimas (166). Estos mismos autores obtuvieron resultados similares mediante el trasplante de glándulas pineales de ratones jóvenes en el timo de animales viejos. En este caso, además de un incremento de la sobrevivencia, observaron que se preserva la morfología del timo, es decir que el trasplante de pineal logró contrarrestar, en parte, la involución típica del timo. En cuanto a las funciones inmunes que, como es sabido, se deterioran con la edad, se encontró que pueden ser restauradas con la administración exógena de melatonina o con el trasplante de pineales jóvenes (166).

### **Papel de la glándula pineal en la autoinmunidad**

Teniendo en cuenta la probada actividad inmunomoduladora de la melatonina, se ha comenzado a investigar la posible relación de la glándula pineal con las enfermedades autoinmunes. Sandyck y Awerbuch (191), encontraron que los pacientes afectados por esclerosis múltiple presentan una alta calcificación de la pineal, por lo que sugieren una asociación entre la existencia de anomalías en la glándula pineal y este tipo de patologías.

A nivel experimental, se utilizó el modelo de artritis inducida por colágeno para estudiar la relación de la glándula pineal con la autoinmunidad. Se encontró que la

administración de altas dosis de melatonina así como la constante oscuridad que incrementa también los niveles de la hormona, provocan la exacerbación de artritis inducida por colágeno (74). El efecto inmunoestimulador de la melatonina sólo se observa cuando es administrada durante los primeros días posteriores a la inyección del colágeno. Es decir, que actuaría en la fase de inducción de la artritis, incrementando la activación de los linfocitos ya sea de manera directa o indirecta, a través de la liberación de otras hormonas como los esteroides sexuales, prolactina y/o de péptidos opiodes (73). Estos mismos autores encontraron que la pinealectomía reduce la severidad de la artritis ya que: 1) retarda la aparición de la enfermedad, 2) atenúa los síntomas clínicos y 3) disminuye los niveles séricos de anticuerpos anti-colágeno de tipo II (74,130).

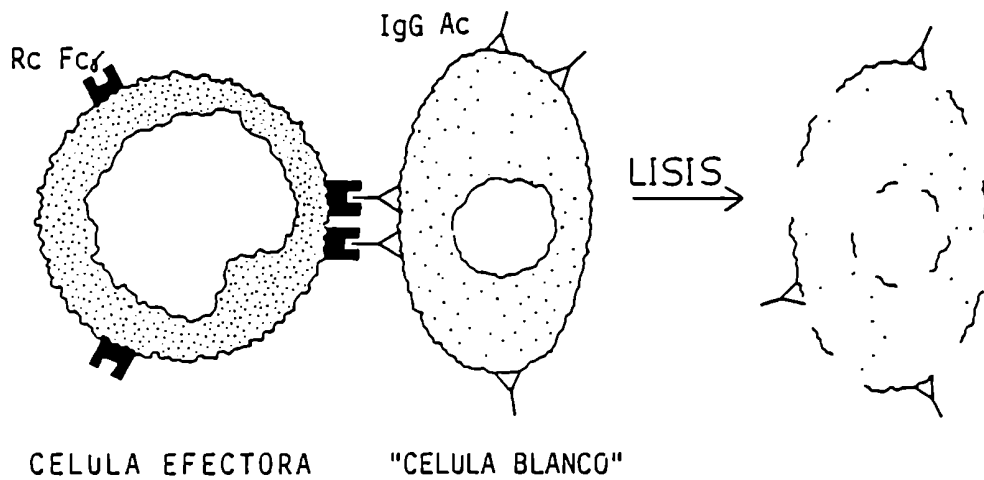
## **CITOTOXICIDAD CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUERPOS**

La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) es una función inmune efectora mediante la cual células no sensibilizadas con el antígeno son capaces de lisar células "blanco" que se encuentren recubiertas con anticuerpos específicos (156) (Figura 2). Por esta razón, se puede decir que para que ocurra *in vivo*, se requieren relaciones integradas entre la respuesta celular y la humoral (159,157). La lisis por CCDA no requiere complemento ni tampoco reconocimiento a nivel del complejo mayor de histocompatibilidad. Se ha demostrado su participación en los mecanismos inmunológicos activos de rechazo de injertos (212) y tumores (95,140,201), así como en algunas infecciones provocadas por hongos (46), parásitos (136) y virus (195,200).

Una gran diversidad de células efectoras son capaces de mediar CCDA, por ejemplo: células K o nulas, llamadas así por carecer de los antígenos marcadores específicos de linfocitos T y B (66), monocitos (105,116), polimorfonucleares (26) e incluso células T (160), aunque muchos autores sólo encuentran esta actividad con células T activadas (12). La condición esencial para que una célula pueda actuar como efectora es que posea en su membrana receptores para el fragmento Fc de inmunoglobulinas (RFc). Este receptor no sólo sirve como sitio de interacción de la célula efectora y la célula "blanco", sino que para que ocurra el evento lítico se necesita un paso posterior y dependiente de la temperatura, que es la redistribución (capping) de RFc sobre la

*FIGURA 2: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.*

CITOTOXICIDAD CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUERPOS



membrana de la célula citotóxica (55).

### **Receptor para el fragmento Fc de la IgG (RFc $\gamma$ )**

Los receptores para Fc constituyen una familia de glicoproteínas heterogéneas. Han sido descritos receptores específicos para la IgG (RFc $\gamma$ ), IgE (RFc $\epsilon$ ), IgM (RFc $\mu$ ), IgA (RFc $\alpha$ ) y IgD (RFc $\delta$ ) (59,78,13). Las consecuencias que surgen de la interacción entre un complejo inmune y el RFc son particulares para cada sistema; dependiendo de la población celular y de la clase de Ig involucrada. Así por ejemplo, la interacción de los CI formados por la IgE con sus receptores específicos (RFc $\epsilon$ ) en células cebadas y basófilos produce degranulación celular y la posterior liberación de sustancias de gran actividad biológica tales como la serotonina e histamina (82).

Los receptores para el fragmento Fc de la Inmunoglobulina G (RFc $\gamma$ ) se expresan en distintas poblaciones celulares. Se han descrito, además de en las células efectoras de CCDA anteriormente nombradas, en células dendríticas (125), plaquetas (41) y en tejidos no relacionados al sistema inmune tales como la placenta (129), el glomérulo renal (135), el saco vitelino (40), el cerebro (4) y también en espermatozoides (192), en ciertas células tumorales (94) y en hepatocitos (80). Asimismo, cabe señalar que las células infectadas por virus Herpes simplex (139), Togavirus (117), Citomegalovirus (222) y Varicella Zoster (147), adquieren la capacidad de expresar RFc $\gamma$ .

Los RFcy transducen las señales necesarias para la manifestación de diferentes respuestas celulares. Median la fagocitosis de células sensibilizadas por anticuerpos de clase IgG, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA), la transferencia de anticuerpos IgG de la madre al feto y la liberación de sustancias de potente acción regulatoria y efectora tales como leucotrienos, prostaglandinas, tromboxanos, intermediarios reactivos del oxígeno, enzimas lisosomales y un amplio conjunto de citoquinas (132,214,175). Por otra parte, son capaces de transducir señales que actúan como potentes moduladores de las respuestas proliferativas de linfocitos T y B (216,60,85).

Las estructuras de los diferentes RFcy y de los genes que los codifican han sido ilucidadas en los últimos 10 años. El hallazgo más llamativo fue su tremenda heterogeneidad. Se han descrito tres formas principales; RFcyI, RFcyII y RFcyIII, que generan al menos 12 isoformas distintas. Un nivel de complejidad, aún mayor, es producido por la existencia de polimorfismos genéticos adicionales (85,133). El análisis de los genes y de los cDNAs que codifican para las tres clases de RFcy revela que derivan de un gen ancestral común y que son miembros de la superfamilia de las Igs. Están compuestos por dominios homólogos extracelulares de unión a la Ig y regiones transmembrana divergentes intracitoplasmáticas. En ratones y humanos los genes para estos receptores mapean en el cromosoma 1 (175).

El RFcyI (CD64), constituye un receptor de alta afinidad para la IgG monómerica,

que se expresa en fagocitos mononucleares. Los RFcγII (CD16) y RFcγIII (CD32), expresados en diversas poblaciones celulares inmunocompetentes, se caracterizan por presentar muy baja afinidad por la IgG monomérica, la que se incrementa notablemente cuando la misma se encuentra formando parte de un CI (78,214,216). En relación a la fisiología de los RFcγ es importante destacar que, la simple unión de la IgG monomérica a los RFcγ es, en todos los casos, incapaz de inducir activación de respuestas celulares. Como condición necesaria y suficiente para que ello se produzca, se requiere la agregación de los RFcγ expresados sobre la superficie celular (132,216). Ello implica, inevitablemente, la polivalencia del ligando, lo que equivale a la presentación de los dominios Fc de los anticuerpos bajo la forma de complejos inmunes (CI). La interacción de un CI con los RFcγ involucra, efectivamente, el establecimiento de uniones múltiples entre diferentes moléculas de anticuerpo (fragmentos Fc) y distintos RFcγ expresados en una localización cercana sobre la membrana celular. Este entrecruzamiento induce la agregación de los complejos "ligando-receptor" en forma de microagregados, proceso que lleva a la activación de vías transduccionales específicas a cada tipo particular de RFcγ (48,107).

### **Mecanismo lítico de la CCDA**

La cinética de la reacción varía según la célula efectora considerada. Para Gelfand y colaboradores, las células fagocíticas inducen una lisis rápida y de corta duración,



mientras que la lisis producida por células linfocíticas es más duradera pero ocurre a menor velocidad (62).

En la mayoría de los casos el anticuerpo con especificidad anti-célula "blanco" capaz de desencadenar la CCDA es del tipo IgG (161,193), aunque la IgE también puede intervenir en este tipo de fenómeno, cuando la célula efectora es un monocito o un polimorfonuclear eosinófilo (30). Adicionalmente, la presencia simultánea de la IgM ó el factor activador (C3b) del complemento tienen una acción amplificadora importante sobre los niveles citotóxicos alcanzados (158). No es necesario que el anticuerpo sea homólogo a la célula efectora (157), pero sí se requiere el fragmento Fc intacto. La actividad máxima de la CCDA se alcanza a concentraciones muy bajas de anticuerpo; efectivamente se ha visto que se necesitan de cien a mil veces menos anticuerpo que lo necesario para que ocurra lisis por complemento (79,156). Este hecho junto con la característica que tanto el anticuerpo como la célula efectora pueden ser reutilizados en varios ciclos líticos con nuevos lotes de células blanco (159), hacen de esta función un mecanismo sumamente eficiente.

La CCDA no presenta restricciones a nivel de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad siendo operativa con células "blanco" iso, alo y xenogéneas respecto de las células efectoras (47,156,160).

Aunque es poco lo que se conoce del mecanismo lítico a nivel molecular, han sido descritos ciertos requerimientos, algunos de los cuales aparentemente dependerían del tipo celular al cual pertenece la célula efectora. Entre ellos, podemos mencionar que:

- 1- Se requiere un contacto íntimo entre la célula efectora y la "célula blanco" (194).
- 2- La reacción puede comenzar aún en presencia de inhibidores de la síntesis proteica a partir de un mecanismo lítico preformado. Sin embargo para que pueda expresarse todo el potencial citotóxico de la célula efectora se requiere una síntesis proteica activa (83).
- 3- Se necesitan ciertos niveles óptimos de producción de energía (211), así la inhibición de los metabolismos aeróbico y anaeróbico inhiben totalmente la CCDA.
- 4- Mientras que para los linfocitos es una reacción dependiente del calcio extracelular (194), para los monocitos y macrófagos no sólo no es necesario, sino que podría actuar inclusive como agente inhibitorio.
- 5- La participación del sistema de microtúbulos y microfilamentos en la CCDA también sería dependiente del tipo celular efector. Así algunos autores, trabajando con linfocitos, han descrito a los inhibidores de estos sistemas, como colchicina y citocalasina B, como potentes inhibidores de la CCDA (168). Sin embargo, Ralph y colaboradores demostraron en macrófagos que distintos agentes que interfieren con el sistema de microtúbulos, no sólo no inhiben, sino que aumentan su capacidad citotóxica (174).

En cuanto al mecanismo de lisis, no está aún determinado con claridad. La mayoría de los estudios se han realizado con monocitos-macrófagos y neutrófilos encontrándose dos sistemas citotóxicos que, aparentemente, pueden dispararse alternativamente. Por ejemplo, si el ligando es internalizable, la lisis de la partícula se produce a través de una serie de sustancias tóxicas derivadas del metabolismo del oxígeno, particularmente el anión superóxido y el agua oxigenada ( $H_2O_2$ ). Mientras que, cuando la internalización de

la célula "blanco" se encuentra bloqueada por la presencia de citocalasina B, se produce la liberación de productos lisosomales que serían los principales responsables de la lisis de la célula "blanco" (90). En este sentido, se ha demostrado la liberación de enzimas como la  $\beta$ -glucosaminidasa como respuesta a estímulos particulados no internalizables (93), mientras que otros autores postulan la participación en el mecanismo lítico de hidrolasas ácidas, proteasas neutras y proteínas catiónicas (165). Paralelamente Nathan y Cohn demostraron que la citotoxicidad dependiente de anticuerpos no es inhibida por catalasa, superóxido dismutasa, peroxidasa, manitol y etanol, sustancias todas que interfieren con la citotoxicidad llevada a cabo por las especies reactivas del oxígeno (144,145). Sin embargo, trabajos de Clark y Klebanoff (36,35) usando neutrófilos humanos como células efectoras demostraron una citotoxicidad contra células tumorales recubiertas con anticuerpo que es dependiente del metabolismo oxidativo y la glicólisis. En resumen, los resultados son controvertidos y a lo sumo podemos inferir que están involucrados más de un mecanismo lítico, cuyo grado de participación dependería tanto de la célula efectora como de la célula "blanco" considerada (97,100).

### **Regulación de la CCDA.**

La CCDA es capaz de ser modulada *in vivo* e *in vitro* por una amplia variedad de mediadores solubles. Entre los factores capaces de aumentar esta citotoxicidad mediada por neutrófilos o monocitos/macrófagos, el IFN $\gamma$  es una de las más importantes. Se ha

demostrado que el IFN $\gamma$  induce un aumento entre 5 y 15 veces de los RFcy , tipo I de alta afinidad (CD64) en monocitos y macrófagos e induce su expresión en los PMN donde en condiciones basales no se expresan. Asimismo, en neutrófilos aumenta la actividad citotóxica potenciando distintos mecanismos celulares como el estallido respiratorio, la producción de metabolitos del oxígeno y la liberación de enzimas proteolíticas (164). Ambos efectos parecen ser los responsables del aumento de la actividad lítica observada luego del tratamiento con IFN $\gamma$ . Es interesante mencionar que la IL-1 y la IL-4 son capaces de contrarrestar el aumento en la expresión de RFcy inducido por el IFN $\gamma$  (63). Además, la IL-4 parece que disminuye la expresión de todos los RFcy expresados por las células fagocíticas. Otros dos factores que merecen ser destacados son el TNF y el factor estimulante de colonias de granulocitos/monocitos (GM-CSF). Ambos activan la CCDA mediada por neutrófilos y eosinófilos contra células tumorales y parásitos, respectivamente (55). La IL-5 incrementa la citotoxicidad dirigida contra células tumorales únicamente mediada por eosinófilos. Se han descrito factores de distinta naturaleza capaces de modular la CCDA, como el factor C5a, producto derivado de la activación del complemento y los péptidos opioides como la met-enkefalina, que aumentan significativamente los valores líticos (63).

En cuanto a los factores que inhiben la capacidad citotóxica se han descrito distintas poblaciones linfoides supresoras de la CCDA. Esta supresión no se debe a muerte celular, impedimento estérico, generación de células citotóxicas o competición por las células "blanco" (143,170). Posteriormente, se demostró que en algunos casos esta

supresión está mediada por prostaglandinas, sin embargo en otros no es inhibible por indometacina. Cabe señalar que los glucocorticoides son importantes inhibidores de la CCDA y de la expresión de RF $\gamma$ . De manera similar, varios compuestos capaces de incrementar los valores intracelulares de AMPc inhiben esta citotoxicidad.

## **OBJETIVOS**

El objetivo central de esta tesis fue estudiar la influencia que ejerce la glándula pineal sobre el sistema inmune, para lo cual se eligió una función inmunológica y se la analizó desde distintas aproximaciones experimentales. La función elegida fue la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) por dos motivos fundamentales: en primer lugar, se trata de una actividad citotóxica cuya participación es fundamental en distintos procesos patogénicos como invasiones parasitarias, bacterianas y virales, procesos neoplásicos y enfermedades autoinmunes. En segundo lugar, es una función llevada a cabo por células altamente sensibles a la regulación inmune y neuroendócrina, lo que convierte a la CCDA en una herramienta útil para el estudio de las interrelaciones de los tres sistemas.

El trabajo experimental se realizó en ratones de la cepa BALB/c en los que se estudiaron los efectos de la administración de melatonina exógena y de la ablación de la glándula pineal sobre la CCDA. En ambos esquemas experimentales se evaluó la importancia de distintas variables en la regulación de la actividad citotóxica por la pineal. Entre otras variables se estudiaron: sexo y edad de los animales, estado hormonal e influencia del medio ambiente considerando el momento del año en que se realizan las experiencias y la hora de inoculación de la melatonina.

Parte de los resultados y conclusiones de los experimentos descritos en esta tesis fueron publicados o comunicados en distintos Congresos.

**MATERIALES**

**y**

**METODOS**



## **1. REACTIVOS GENERALES**

### **1.1 Medio de lavado**

En todos los experimentos se utilizó para el lavado de las suspensiones celulares medio 199 (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA). Las células fueron resuspendidas a su concentración final en medio de cultivo.

### **1.2 Medio de cultivo**

Para la reacción de CCDA se utilizó medio RPMI 1640 (GIBCO, Grand Island, USA) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA), inactivado por calentamiento a 56°C durante 30 minutos y gentamicina 100 U/ml.

### **1.3 Medio de cultivo para los experimentos con estradiol**

En los experimentos *in vitro* con estradiol se utilizó RPMI 1640 sin rojo fenol (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) suplementado con 5 % de suero fetal bovino charcoalizado y gentamicina 100 U/ml.

#### **1.4 Medio de cultivo para los ensayos de citometría de flujo**

En los ensayos de citometría de flujo las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 sin rojo fenol (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) suplementado con 3 % de suero fetal bovino, 0,1 % de azida sódica y 10 mM de Hepes.

## **2. ANIMALES**

Se usaron ratones de la cepa BALB/c de ambos sexos. Para la preparación del antisuero contra eritrocitos de pollo se utilizaron conejos adultos. Los animales fueron provistos por el bioterio de la Sección Medicina Experimental del Instituto de Investigaciones Hematológicas (Academia Nacional de Medicina). Los animales se mantienen en habitaciones con temperatura controlada ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y expuestos a un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, encendiéndose la luz a las 6 de la mañana.

## **3. TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES**

### **3.1 Con Melatonina**

La Melatonina (Mela) (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) se disolvió en

dimetil sulfóxido (DMSO) y luego en solución salina. En la mayoría de los experimentos, la concentración final de DMSO fue de 0.1%. Cuando se administraron dosis altas de melatonina, la concentración final de DMSO inoculado llegó hasta el 5%. En todos los casos, los ratones controles recibieron igual proporción de DMSO disuelto en solución salina (vehículo).

Los animales se inocularon por vía endovenosa a través del seno retroorbital con distintas concentraciones de melatonina en un volumen final de 0.1 ml. Los grupos controles recibieron igual volumen de vehículo.

### **3.2 Con implantes de estradiol**

Los implantes de 17  $\beta$ -estradiol (5 mg/implante) (Hormone Pellet Press, USA) Se colocaron en forma subcutánea en la zona dorsal de los ratones. Los implantes se realizaron antes de que se complete el desarrollo sexual (antes de los 40 días) de los ratones.

## **4. OPERATORIAS QUIRURGICAS**

### **4.1 Pinealectomía**

La pinealectomía neonatal se realizó entre los días 2 y 4 de vida usando hipotermia

profunda como anestesia. Se cortó la piel y el tejido subcutáneo de la zona dorsal de la cabeza, quedando expuesta la calota. A continuación se realizó una incisión en forma de u que involucró el ángulo anterior del hueso occipital en la unión con los parietales. Con sumo cuidado se levantó la zona craneal cortada, exponiéndose la glándula pineal, la cual se extirpó de manera completa usando pinzas de microdissección. Finalmente, se recolocó el tejido craneal y se cerró la piel mediante una sutura quirúrgica. Todos los procedimientos se llevaron a cabo utilizando la lupa. Los ratones con operación simulada (Sham Px) fueron siempre hermanos de camada de los pinealectomizados (Px). En el caso de los Sham Px, el procedimiento quirúrgico fue similar al usado en los Px, con la sola diferencia que la glándula no fue removida. Al momento del sacrificio, todos los ratones fueron examinados macroscópicamente para descartar daño cerebral quirúrgico y verificar la completa remoción de la glándula pineal. Por otra parte, se realizó un estudio histológico de algunas pineales extirpadas para corroborar que hubiesen sido removidas en forma completa. Además, en algunos animales tomados al azar se realizó un análisis histológico del cerebro una vez que alcanzaron la adultez, a fin de descartar daño cerebral.

Todos los animales fueron asignados azarosamente a los distintos grupo de tratamiento y se utilizaron para el diseño experimental a los 2-4 meses de edad, es decir en la etapa adulta.

## **4.2 Ovariectomía**

La ovariectomía se realizó entre los días 18 y 20 de vida. Una vez anestesiados los animales con éter etílico, se procedió a efectuar dos incisiones dorso-laterales y extraer los ovarios. Las hembras con operación simulada (Sham Ovx) se trataron de manera similar sin que los ovarios fuesen extraídos.

## **4.3 Orquidectomía**

La orquidectomía se realizó entre los días 18 y 20 de vida. Como anestésico se usó éter etílico. La operación se efectuó por medio de la incisión de la bolsa escrotal y posterior remoción de los testículos a la altura del epidídimo. Los machos con operación simulada (Sham Gx) se trataron de manera similar sin que fueran removidas las gonadas.

# **5. DETERMINACION DE LOS NIVELES HORMONALES**

## **5.1 Determinación de los niveles de melatonina en la glándula pineal**

Los niveles de melatonina en la glándula pineal, se midieron por la técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en el laboratorio del Dr. Daniel Cardinali (Cátedra de Fisiología de la Facultad de Medicina, UBA). Las pineales fueron extraídas

en distintos momentos del fotoperiodo a fin de localizar el pico de secreción nocturna de melatonina. Todo el procedimiento de extirpación de las glándulas se realizó bajo luz roja para evitar el efecto supresor de la luz blanca sobre la producción de la melatonina. Las pineales fueron inmediatamente congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se conservaron así hasta el momento de su procesamiento.

## **5.2 Determinación de los niveles plasmáticos de 6-sulfatoximelatonina**

Los niveles de 6-sulfatoximelatonina (6-SM) en plasma fueron evaluados en el laboratorio del Dr. Christian Bartsch (Tubingen, Alemania) mediante un radioinmunoensayo (RIA). Las muestras de sangre se obtuvieron por punción del seno venoso retroorbital en distintos momentos del ciclo de luz-oscuridad. Las muestras se centrifugaron en frío y se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su envío a Alemania para su análisis. La 6-SM se cuantificó mediante un Kit de Stockgran (Guildford, UK.) usando un trazador de iodo CIDtech.

## **5.3 Determinación de los niveles plasmáticos de estradiol**

Las muestras de sangre obtenidas por punción retroorbital de animales Px y Sham Px se recogieron en tubos heparinizados, se centrifugaron en frío y los plasmas se conservaron congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Los niveles plasmáticos de  $17\beta$ -estradiol

se cuantificaron por la técnica de radioinmunoensayo (RIA) en el laboratorio del Dr. Charreau, en el Instituto de Biología y Medicina Experimental. Se usó para la determinación un kit comercial ( $^3\text{H}$ -17 $\beta$ -Estradiol, Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA. USA.).

## **6. DETERMINACION DE LOS ESTADIOS DEL CICLO ESTRAL**

Se llevaron a cabo extendidos vaginales de diferentes grupos de animales, como forma de determinar el momento del ciclo estral en que los mismos se encontraban. Los preparados se analizaron por microscopía óptica.

## **7. REACCION DE CITOTOXICIDAD CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUERPOS (CCDA)**

### **7.1 Células efectoras**

Los animales fueron sacrificados y se les extrajo el bazo que se desmenuzó cuidadosamente con tijeras y se hizo pasar a través de una malla fina de acero inoxidable. La suspensión de esplenocitos se lavó tres veces con medio de lavado y se resuspendieron en medio completo para determinar la viabilidad celular por exclusión del colorante azul de tripán, así como el número de células obtenido. En todos los experimentos, más del

80 % de las células fueron viables, siendo el 95 % de las mismas mononucleares y el 5% o menos de leucocitos polimorfonucleares.

## **7.2 Células "blanco"**

Las células "blanco" de la reacción citotóxica fueron eritrocitos de pollo. Se obtuvo sangre de pollo por punción de la vena del ala con una jeringa humedecida con heparina. La sangre se diluyó 1:10 con medio RPMI 1640, marcándose 100 ul de esta suspensión con con 50-100 ul de  $^{51}\text{Cr}$  (cromato de sodio radioactivo, New England Nuclear, Boston, USA) en un volumen total de 150 ul. Luego de 1 hora de incubación a 37°C, los eritrocitos marcados se lavaron 5 veces con medio RPMI 1640 y se resuspendieron en medio completo a una concentración de  $4,0 \times 10^6$  células por mililitro.

## **7.3 Preparación del suero anti-eritrocitos de pollo**

Para la obtención de suero de conejo anti-eritrocito de pollo, se inocularon conejos por vía endovenosa con 1 ml de suspensión de eritrocitos de pollo al 10 % en solución salina. Los animales recibieron dos inyecciones semanales durante un mes. Cuarenta y cinco días después de la primera inoculación, se sangraron los conejos y se separó el suero que fue conservado a -20°C hasta su uso.



#### 7.4 Reacción citotóxica

La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) fue medida según el método de Perlmann y colaboradores, ligeramente modificado (159). Las suspensiones celulares a ensayar se prepararon en medio de cultivo y se mezclaron alícuotas de 0,1 ml conteniendo cantidades variables de células (rango 0,5-2,0 x 10<sup>6</sup>) con 0,1 x 10<sup>6</sup> eritrocitos de pollo marcado con <sup>51</sup>Cr y cantidades subaglutinantes de suero de conejo anti-eritrocitos. Todos los ensayos se hicieron por triplicado en policubetas de 96 pozos. Los controles para determinar la liberación espontánea de <sup>51</sup>Cr y la citotoxicidad inespecífica se realizaron en ausencia de antisuero de conejo.

Las reacciones se incubaron 18 horas a 37°C en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> en aire. Al final de este período, las células fueron centrifugadas 10 minutos a 400 g. La radioactividad de las muestras (sedimentos y sobrenadantes) se determinó en un contador gama (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, California).

La capacidad de las células para mediar CCDA se visualiza por la ruptura de la célula "blanco" (eritrocitos de pollo) y la consiguiente liberación al sobrenadante del <sup>51</sup>Cr con que estaban marcados. Para cuantificar el efecto citotóxico se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de citotoxicidad} = \frac{\text{radioactividad en el sobrenadante}}{\text{radioactividad total}} \times 100$$

Este valor fue corregido por la sustracción de la liberación espontánea de  $^{51}\text{Cr}$ . En la mayoría de los experimentos esta actividad inespecífica fue menor del 5 %.

## **8. ENSAYOS *IN VITRO***

### **8.1 Melatonina**

Los esplenocitos obtenidos de ratones BALB/c hembras fueron incubados con concentraciones decrecientes de melatonina, desde  $10^{-7}$  M a  $10^{-12}$  M en oscuridad. Luego de incubar a las células durante 6 horas con distintas concentraciones de la hormona, se desafían las mismas con los eritocitos de pollo sensibilizados con el anticuerpo. Los porcentajes citotóxicos se determinaron luego de 18 horas de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$ .

### **8.2 Estradiol**

Los esplenocitos fueron incubados con distintas concentraciones de estradiol ( $\text{E}_2$ ), desde  $10^{-3}$  M hasta  $10^{-8}$  M. Luego de 4 horas de incubación, se lavan las células 3 veces con medio de lavado. Finalmente, se llevan las mismas a la concentración deseada con medio completo (RPMI sin rojo fenol suplementado) y se valora la CCDA luego de 18 horas de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$ .

## **9. ANALISIS DE POBLACIONES CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUJO.**

Se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales :

\* Anticuerpo monoclonal anti-ratón CD16/CD32 (Receptor Fcγ II/III ) purificado en rata (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA.).

\* Anticuerpo monoclonal anti-antígeno MAC-1/ CD11b (receptor para C3b1) de ratón, purificado de células de hibridoma ratón-rata (Boehringer Mannheim, USA.).

\* Anticuerpo monoclonal anti-IgG de rata conjugado con isotiocianato de Fluoresceína (FITC) purificado en rata (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA.).

\* Anticuerpo monoclonal anti-CD4 de ratón conjugado con isotiocianato de Fluoresceína (FITC) purificado en rata (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA.).

\* Anticuerpo monoclonal anti-CD8a de ratón conjugado con R-Ficoeritrina purificado en rata (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA.).

Para el análisis de las distintas poblaciones celulares los eritrocitos presentes en las suspensiones de bazo fueron lisadas por lisis osmótica durante 30 segundos. A continuación se incubaron  $1 \times 10^6$  de células resuspendidas en el medio correspondiente con diluciones apropiadas de anticuerpos monoclonales anti-Mac-1 o anti-RFcy a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Luego de dos lavados, se incubaron con fragmento  $\text{F(ab')}_2$  de IgG de ratón anti Ig-rata conjugado con fluoresceína también a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. A continuación se lavaron nuevamente y se resuspendieron en el medio correspondiente a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml. Paralelamente se llevó un control de tinción inespecífica obtenida incubando las células con el segundo anticuerpo sólo (marcado con fluoresceína). En el caso de las poblaciones  $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ , se realizó una doble marcación directa. La frecuencia de las distintas poblaciones celulares se analizó en un FACScan (Becton-Dickinson), con el programa Cell Quest (Becton-Dickinson) considerando 10000 eventos en cada muestra.

## **10. ESTADÍSTICAS**

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó en todos los casos el test de Student.

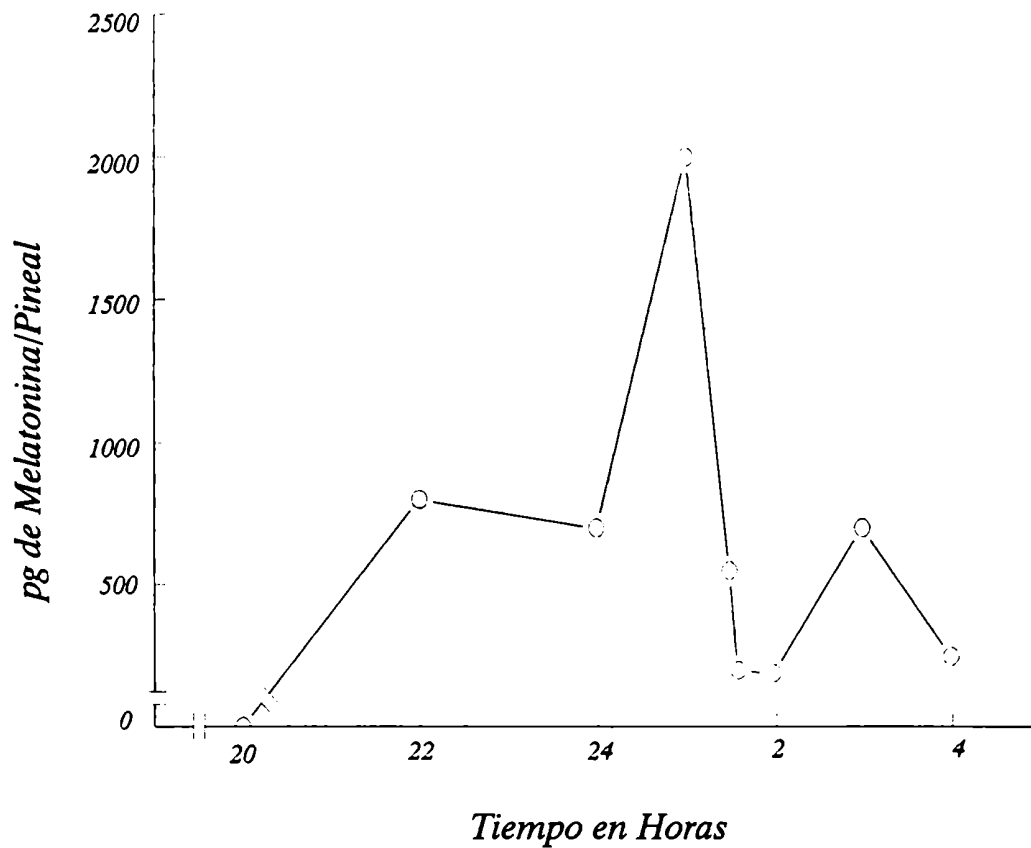
## **RESULTADOS**

Con el fin de estudiar la influencia que ejerce la glándula pineal sobre el sistema inmune se eligió analizar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) utilizando como células efectoras, esplenocitos de la cepa murina BALB/c. Ya que la existencia de un ritmo endógeno de producción de melatonina en algunas cepas murinas, entre ellas la BALB/c, es controvertida (50), la utilización de ratones endocriados ha sido objetada por distintos autores (8). Por esta razón, al inicio de las investigaciones descriptas en esta tesis se decidió evaluar los niveles nocturnos de melatonina en los ratones que se utilizarían posteriormente. Las muestras se enviaron a dos laboratorios distintos, que a su vez las evaluaron mediante dos metodologías diferentes.

### **1- Niveles de melatonina en la glándula pineal:**

La producción de melatonina en la pineal de ratones hembras de la cepa BALB/c se midió por cromatografía líquida de alta presión. En nuestro bioterio, las luces se apagan a las 18 horas y se encienden a las 6 de la mañana. Las glándulas se obtuvieron a distintos tiempos durante la fase oscura del ciclo diario, se congelaron de inmediato y se mantuvieron a -20 °C hasta el momento de ser homogeneizadas para valorar la concentración de melatonina. En la **Figura 3** se observan los resultados obtenidos. La mayor producción de melatonina se encontró entre las horas cero y una de la madrugada con una concentración de 2000 pg/pineal. A partir de las 3 hs. los niveles comienzan a bajar.

*FIGURA 3: Producción nocturna de melatonina en glándula pineal.*



*Los niveles de melatonina se midieron por la técnica de HPLC. Cada punto representa el promedio de la producción de melatonina correspondiente a 4 ratones hembras adultos.*

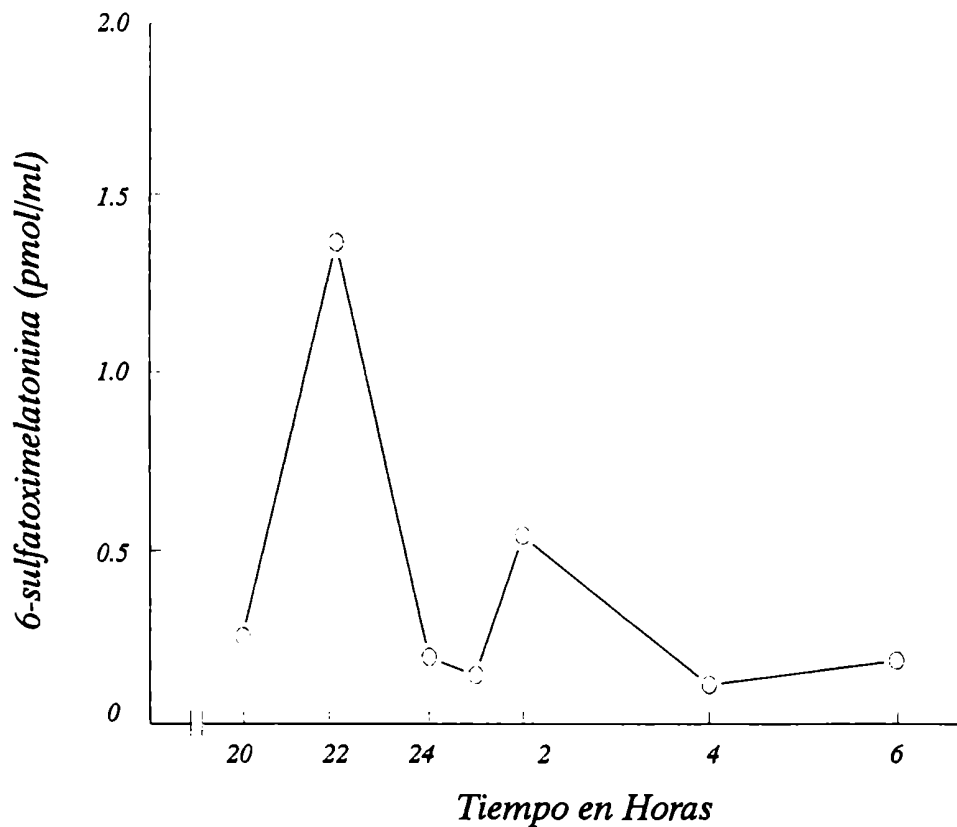
## **2- Niveles de 6-sulfatoximelatonina en plasma:**

La melatonina secretada por la pineal se metaboliza en el hígado, siendo el principal metabolito la 6-hidroxi-melatonina. El 80% de este compuesto se conjuga formando 6-sulfatoximelatonina que se excreta por orina. Los niveles plasmáticos y urinarios de este metabolito son usualmente evaluados por radioinmunoensayo como medida de la secreción de melatonina. Para confirmar la funcionalidad de la glándula pineal de nuestros ratones BALB/c dosamos los niveles plasmáticos de 6-SM en distintos momentos del ciclo luz-oscuridad. Encontramos un aumento en los niveles de 6-SM durante la noche con un máximo a las 22 horas (**Figura 4**). Posteriormente, se observa un pico menor a partir de la 1.

Ambas mediciones, a pesar de haber sido realizadas en distintos momentos del año y por distintos laboratorios, arrojan resultados que convalidan el uso de nuestros ratones BALB/c para estudiar las funciones inmunomoduladoras de la glándula pineal y la melatonina.



*FIGURA 4: Niveles plasmáticos de 6-Sulfatoximelatonina*



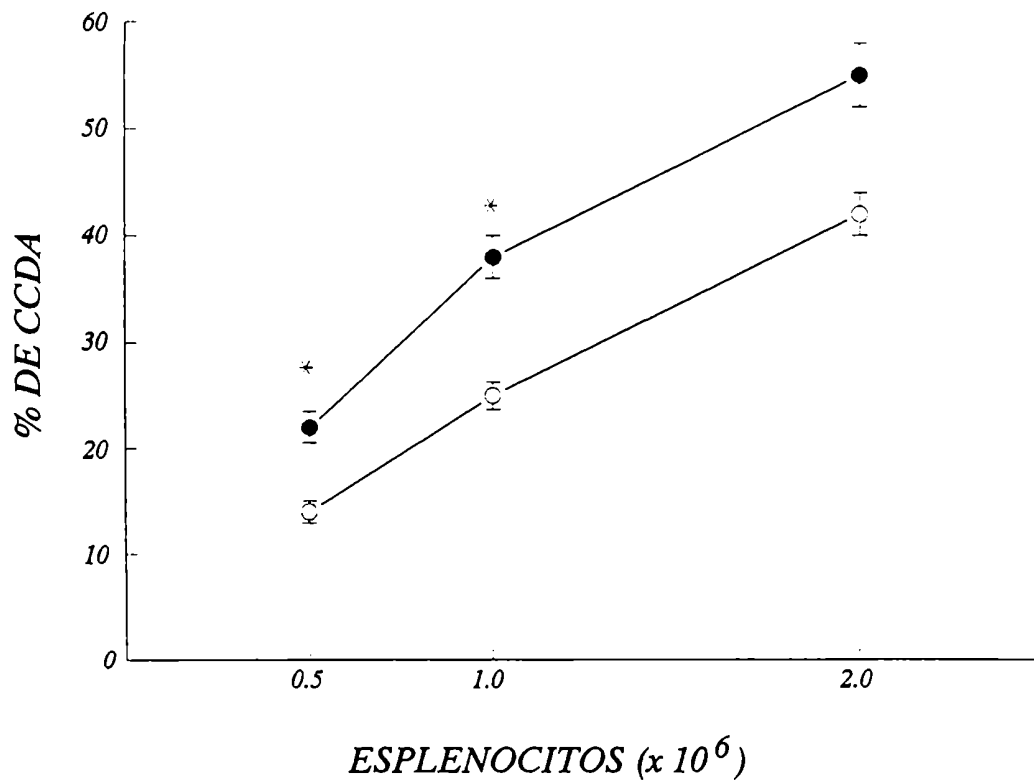
*Los niveles de 6-sulfatoximelatonina se midieron por la técnica de radioinmunoensayo. Cada punto representa los valores promedio de 6 ratones hembras adultos.*

### **3- Efecto de la administración de melatonina sobre la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA):**

Para determinar si la administración de melatonina era capaz de modificar la actividad citotóxica de los esplenocitos así como lo hace con otras funciones inmunes, se inocularon ratones hembras de la cepa BALB/c durante 4 días consecutivos con una dosis diaria de melatonina de 1 mg/kg de peso, en un volumen de 0,1 ml. Este esquema de tratamiento había sido utilizado por otros autores (119) para exacerbar la respuesta primaria de anticuerpos a glóbulos rojos de carnero. Las inoculaciones se hicieron por la tarde, 2 horas antes de que se apaguen las luces del bioterio, y la vía de inoculación usada fue la endovenosa a través del seno venoso retroorbital. Los animales controles se inocularon con igual volumen de una dilución de dimetilsulfóxido (DMSO) en solución fisiológica (ver Materiales y Métodos).

A las 18 horas de la última inoculación de melatonina, se sacrificaron los animales y se evaluó la CCDA empleando células de bazo como células efectoras y eritrocitos de pollo sensibilizados con concentraciones subaglutinantes de anticuerpos específicos como células "blanco". Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 5**. La melatonina incrementó los niveles de CCDA en todas las relaciones de células efectoras a "blanco" evaluadas.

**FIGURA 5: Efecto de la melatonina sobre la CCDA.**



Los ratones se inocularon i.v. a las 16 hs. con melatonina (1mg/kg peso) (●) o vehículo (○) durante 4 días consecutivos. El quinto día se evaluó la CCDA. Cada punto representa la  $\bar{X} \pm ES$  de 15 animales. \*  $p < 0.001$ .

#### **4- Número de dosis de melatonina:**

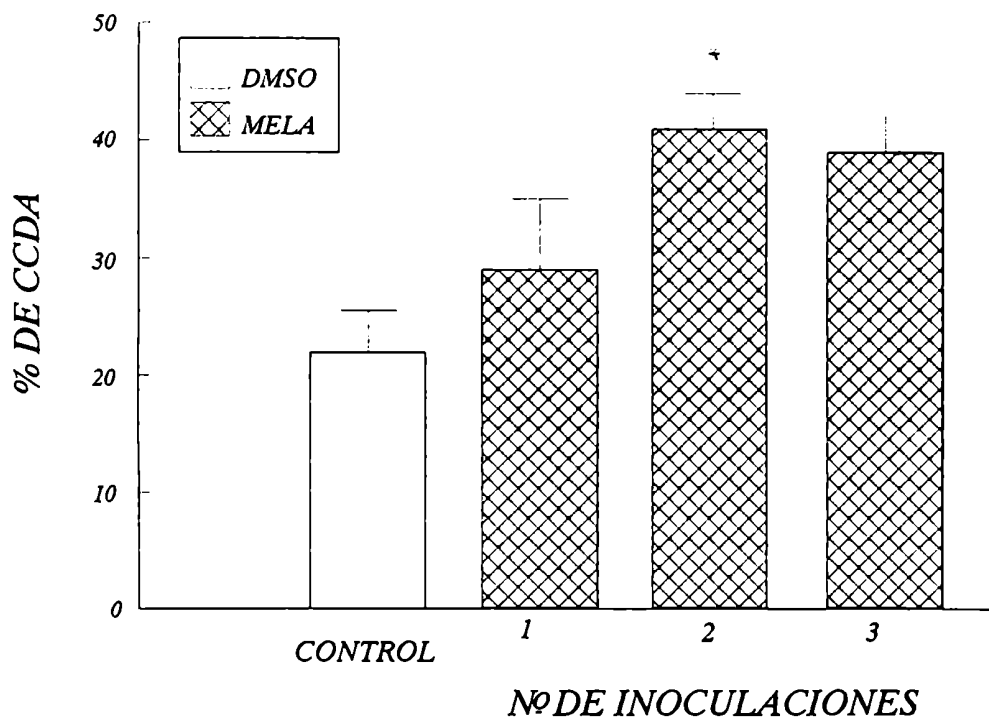
A fin de determinar cuál era el número mínimo de inoculaciones de melatonina necesario para exacerbar la CCDA, se administró una dosis diaria de la hormona durante 1, 2 ó 3 días consecutivos en una concentración de 1 mg/kg de peso. Puede observarse en la **Figura 6** que 2 inoculaciones de melatonina son suficientes para inducir aumentos significativos en los niveles líticos. No hay diferencias apreciables al aumentar el número de dosis, por lo cual se eligió este esquema de inoculación en los experimentos posteriores.

#### **5- Análisis de la relación dosis-respuesta:**

##### **5a- Curva dosis-respuesta:**

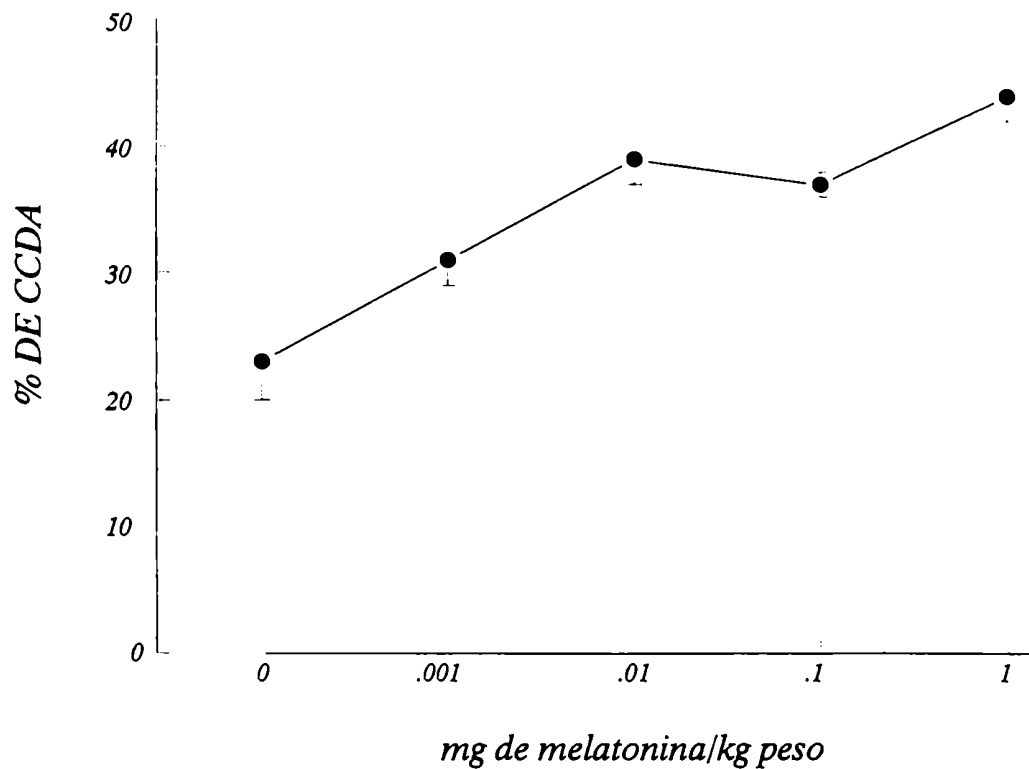
El siguiente paso fue determinar si el efecto de la melatonina sobre la CCDA es dependiente de la dosis inoculada para lo cual se administraron por vía endovenosa, distintas concentraciones de melatonina a ratones hembras adultos. Como se aprecia en la **Figura 7**, el incremento inducido por la melatonina sobre la CCDA es dosis-dependiente.

**FIGURA 6: Efecto del número de inoculaciones de melatonina sobre la CCDA.**



Los ratones se inocularon i.v. a las 16 hs. con 1 mg/kg peso de melatonina durante 1, 2 ó 3 días. Luego de 18 hs. del último inóculo, se evaluó la CCDA utilizando  $1 \times 10^6$  esplenocitos como células efectoras. Cada barra representa la  $\bar{X} \pm ES$  de 6 animales. \*  $p < 0.005$ .

*FIGURA 7: Curva dosis-respuesta de melatonina.*



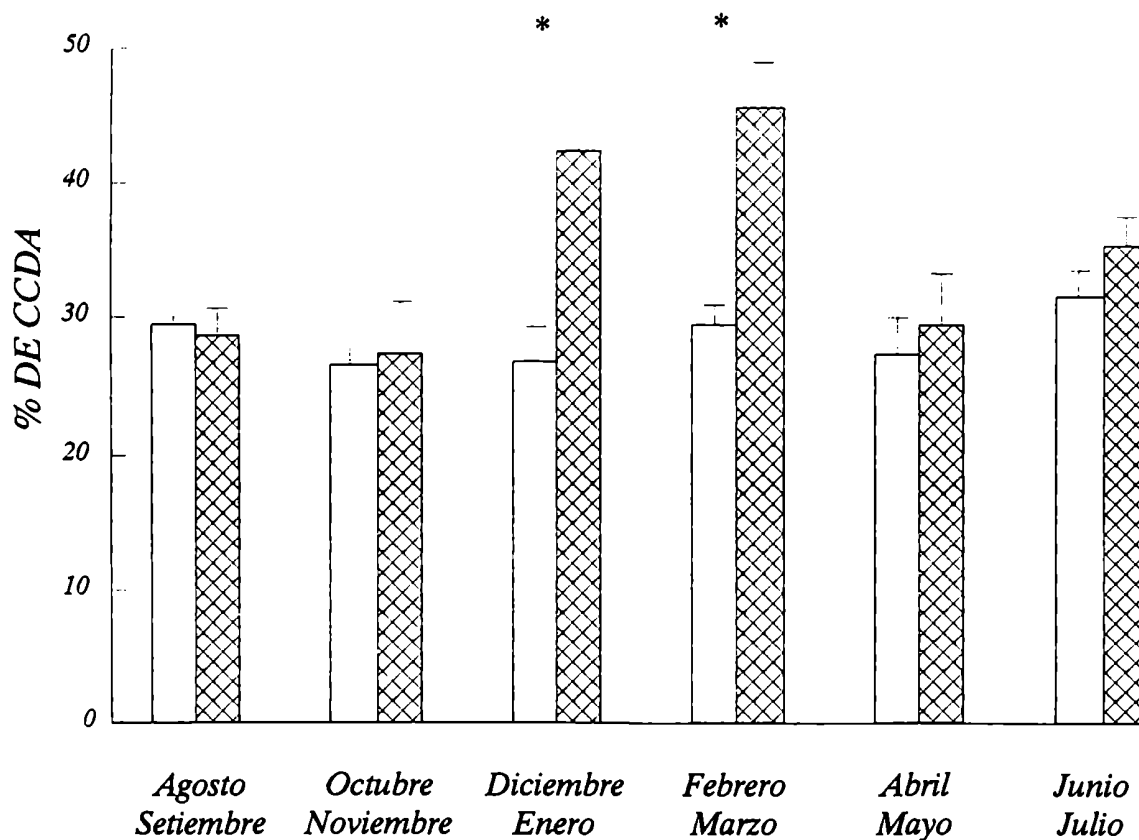
*Los ratones se inocularon i.v. a las 16 hs. con diferentes dosis de melatonina durante 2 días. El día 3 se evaluó la CCDA de los esplenocitos ( $1 \times 10^6$ ). Cada punto representa la  $\bar{X} \pm ES$  de 4 animales. \*  $p < 0.05$ .*

## **5b- Variaciones estacionales en la modulación que ejerce la melatonina sobre la CCDA:**

Los experimentos presentados en esta tesis se llevaron a cabo durante unos 4 años. En el transcurso de estos años se observó que el efecto exacerbador de la melatonina sobre la actividad citotóxica no se manifestaba con la misma intensidad a lo largo del año, sino que presentaba variaciones estacionales. Al comienzo de nuestras investigaciones se determinó la curva dosis-respuesta mostrada en la **Figura 7** y ,en base a estos resultados, se eligió la dosis de 0,1 mg/kg de peso para los experimentos que se realizaran de allí en más. Sin embargo, se observó que, en determinada época del año, esta dosis de melatonina no era capaz de inducir aumentos en los niveles de CCDA. Esta falta de actividad regulatoria fue atribuida, en un principio, a causas de tipo técnico como cambios en la partida de suero o medio usado, cambios en los glóbulos rojos que se emplean como células "blanco", etc. Sin embargo, la persistencia de estas variaciones en años consecutivos nos hizo pensar en otro tipo de causa. Es así que, agrupando los resultados obtenidos mensualmente a lo largo de 4 años consecutivos, se llegó a la conclusión de que la dosis de melatonina de 0,1 mg/kg de peso es capaz de exacerbar la CCDA de esplenocitos murinos sólo durante el periodo que va de diciembre a marzo, es decir durante el verano (**Figura 8**).

Es un hecho conocido que la melatonina exógena debe ser administrada en las últimas 4 horas de la fase de luz del ciclo diurno para que pueda ejercer sus efectos

**FIGURA 8: Efecto estacional de la melatonina sobre la CCDA.**



LA CCDA se evaluó usando como células efectoras  $1 \times 10^6$  esplenocitos. Los datos correspondientes a 1988-1991 se promediaron en grupos bimestrales. Cada barra representa la  $\bar{X} \pm ES$  de 15 a 35 animales tratados con melatonina (barras rayadas) o DMSO (barras blancas). \*  $p < 0.01$ .

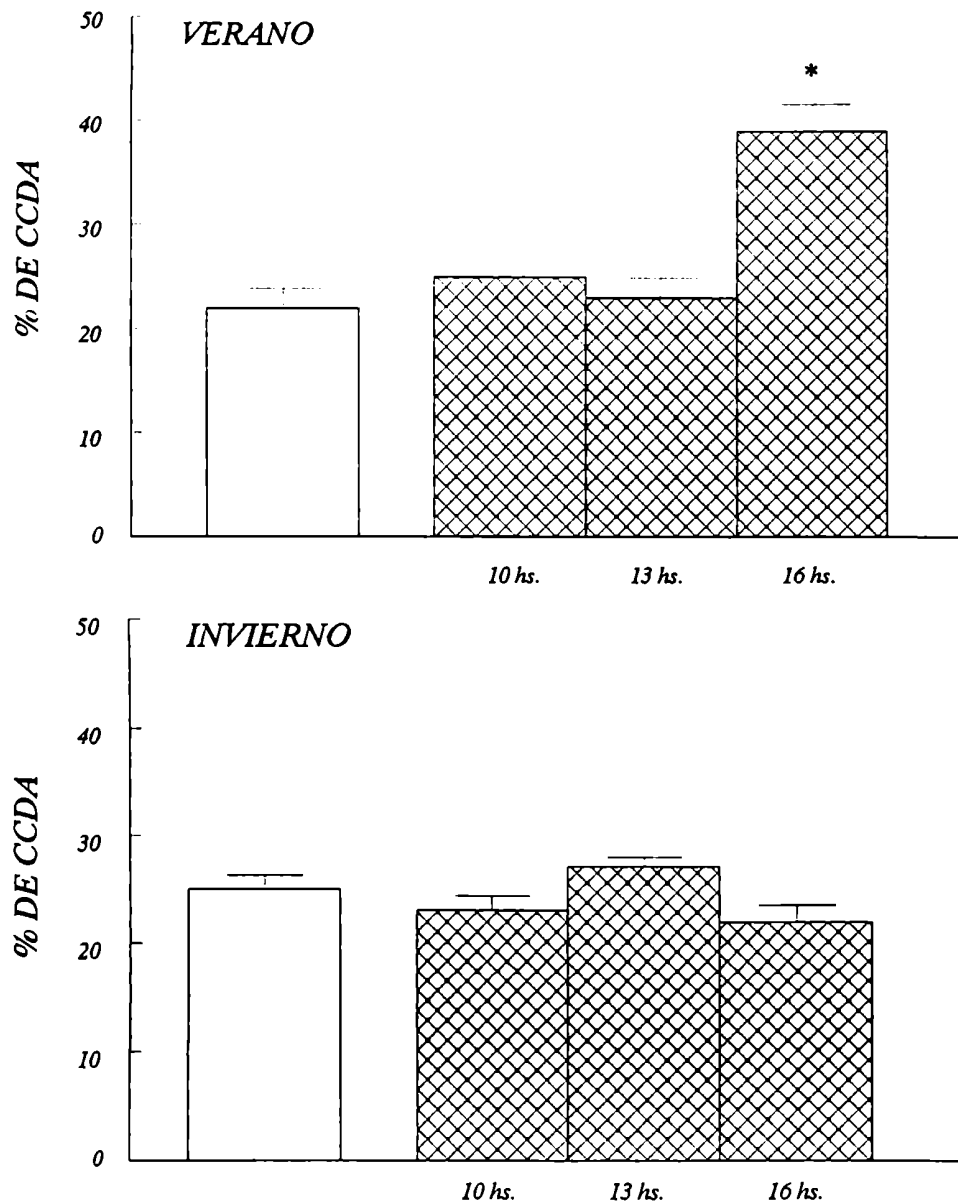


moduladores (20,204). Se ha propuesto que esta restricción en cuanto al momento del día en el que puede actuar la melatonina exógena se debería a que existe una "ventana de sensibilidad" en los tejidos "blanco" de su acción. Aún cuando nuestros ratones se encuentran en condiciones constantes de luz y temperatura, podría ocurrir que otros factores ambientales varíen a lo largo del año provocando un desplazamiento en esta "ventana de sensibilidad" a la melatonina, que le impidiera ejercer su efecto exacerbador de la CCDA. Por este motivo, se probó inocular la dosis de 0,1 mg/kg en diferentes momentos del día: 10, 13 y 18 horas. Sin embargo, no se encontraron diferencias en los niveles de CCDA entre controles y tratados con melatonina a distintas horas, durante el periodo que va de marzo a diciembre (**Figura 9**)

### **5c- Curvas dosis-respuestas de la melatonina a lo largo del año:**

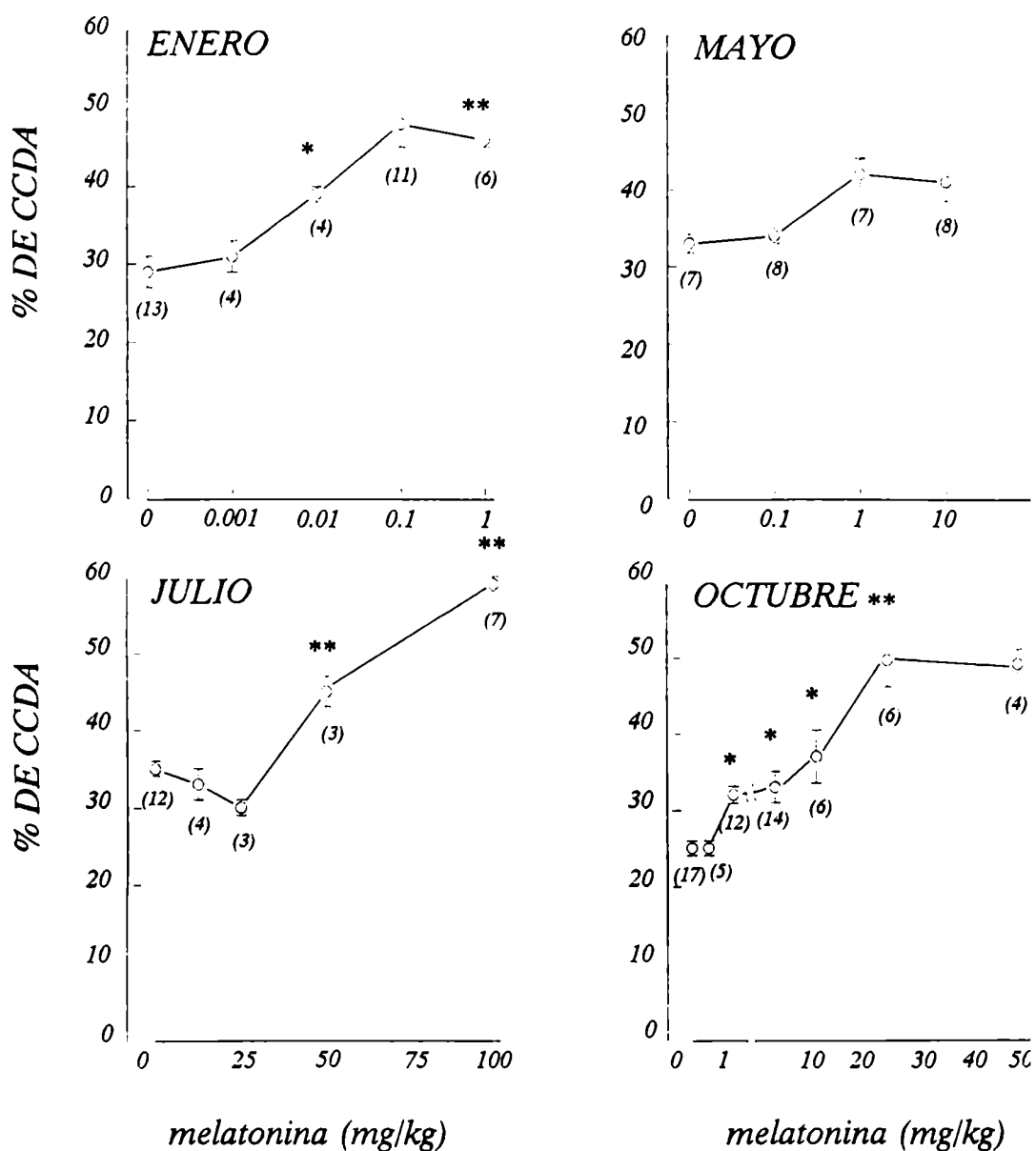
Las variaciones estacionales en la actividad moduladora de la melatonina podrían deberse a diferencias en la sensibilidad de los animales hacia la hormona a lo largo del año. Es decir que el tejido "blanco" de la melatonina, sea éste cual fuere, responda a concentraciones variables de la hormona dependiendo de la época del año. Para analizar esta posibilidad, se probaron distintas concentraciones de melatonina en las 4 estaciones del año. En la **figura 10**, se observa que en el invierno (julio) se necesita administrar concentraciones de melatonina mucho mayores que en verano (enero) para inducir incrementos comparables de la CCDA. Por otra parte, se encontró que en primavera y

**FIGURA 9:** *Influencia de la hora de administración de melatonina sobre los niveles de CCDA.*



Los ratones fueron inoculados con 0,1 mg/kg peso de melatonina (barras rayadas) o vehículo (barras blancas), a distintas horas. Cada barra representa la  $\bar{X} \pm ES$  de 8 animales. \*  $p < 0.01$ .

**FIGURA 10: Curvas dosis-respuesta de melatonina en las diferentes estaciones del año.**



Cada punto representa la  $\bar{X} \pm ES$  de (n) ratones. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ .

otoño las dosis mínimas de melatonina capaces de exacerbar la CCDA (dosis mínima efectiva) son intermedias entre las de verano e invierno.

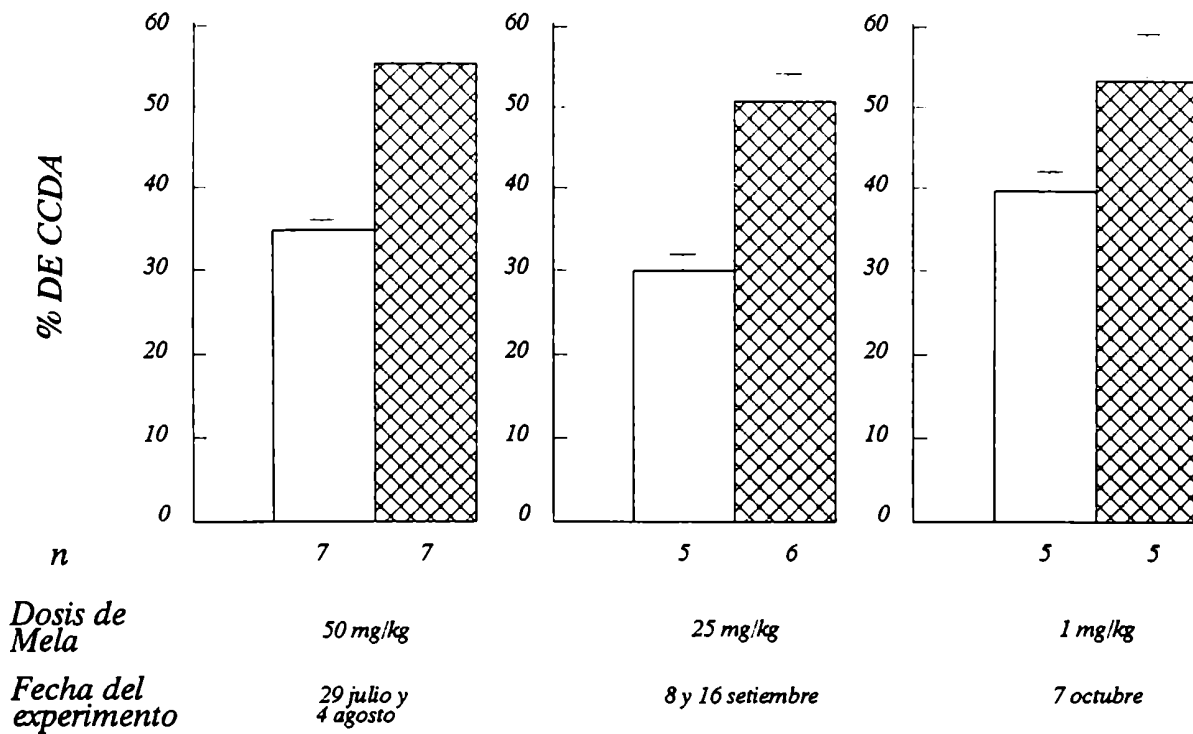
Como dato adicional, se encontró que las variaciones en las dosis mínimas efectivas no fueron graduales a lo largo del año. En este sentido, se observó que entre el mes de agosto y el de octubre la dosis mínima efectiva pasa de 50 mg/kg a 1 mg/kg (**Figura 11**). Sin embargo, la variación no se produjo gradualmente sino que en el lapso de un mes (desde principios de agosto hasta principios de septiembre) la dosis mínima efectiva se redujo a la mitad, mientras que en el mes siguiente disminuyó 25 veces.

Tomados en conjunto, estos resultados indican que existen variaciones estacionales en la actividad moduladora que ejerce la melatonina sobre la CCDA.

#### **6- Duración del efecto exacerbador de la melatonina sobre la CCDA:**

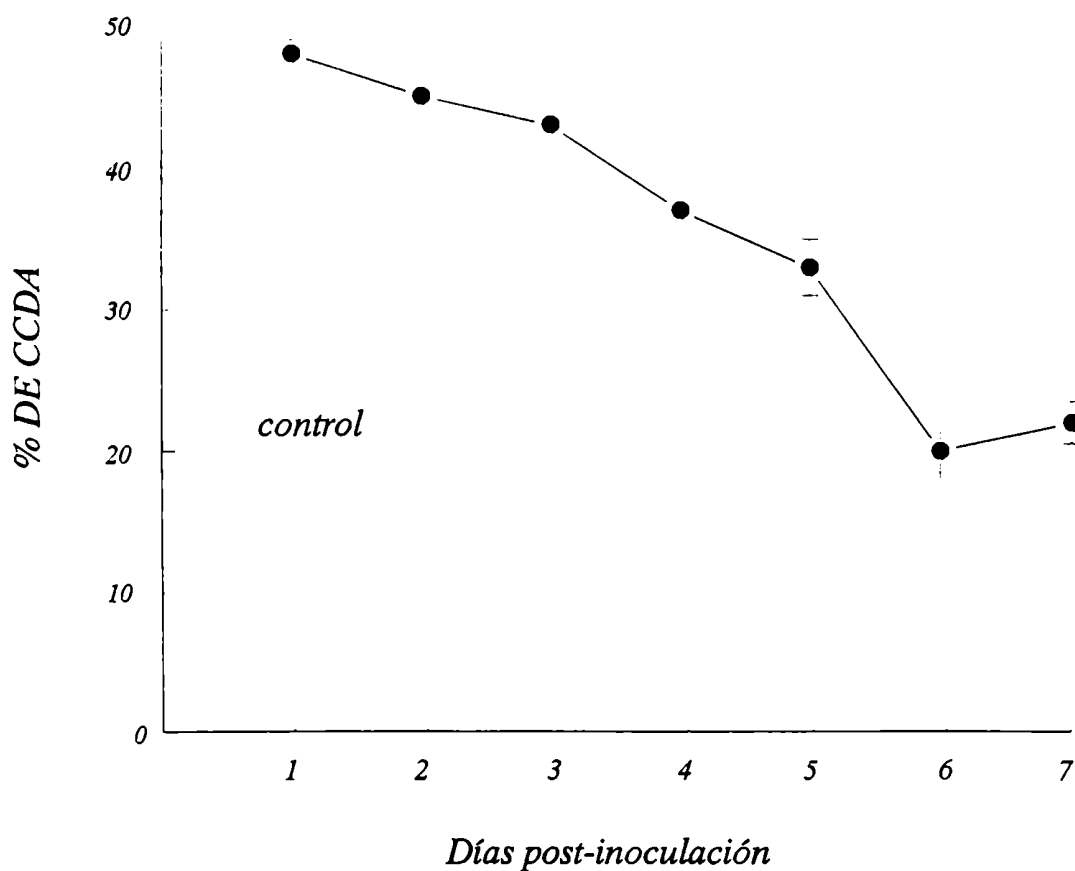
La capacidad de la melatonina para incrementar la actividad lítica de los esplenocitos podría ser un efecto agudo que desapareciese a las pocas horas de finalizada la exposición de las células a la hormona exógena o, por el contrario, podría tratarse de un efecto que se mantuviera durante un periodo prolongado. Para evaluar cuál de estas posibilidades era cierta, se inocularon ratones hembras con melatonina durante dos días consecutivos y se realizaron los ensayos citotóxicos a distintos días post-inoculación. Como se muestra en la **Figura 12** los niveles de CCDA se mantienen elevados hasta el

**FIGURA 11: Variación temporal de la dosis mínima de melatonina capaz de modificar la CCDA.**



Los ratones recibieron 2 inyecciones i.v. de distintas dosis de melatonina. Cada barra representa la  $\bar{X} \pm ES$  de n animales tratados con melatonina (barras rayadas) o vehículo (barras blancas).

**FIGURA 12: Duración del efecto exacerbador de la melatonina sobre la CCDA.**



Los ratones recibieron dos inyecciones i.v. de melatonina (0,1 mg/kg peso), y fueron sacrificados a diferentes días post-tratamiento. La CCDA se evaluó usando  $2 \times 10^6$  esplenocitos. Cada punto representa la  $\bar{X} \pm ES$  correspondiente a 4 animales. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ .

quinto día posterior a la última inoculación, lo que sugiere que las modificaciones provocadas por la melatonina a nivel celular son persistentes en el tiempo.

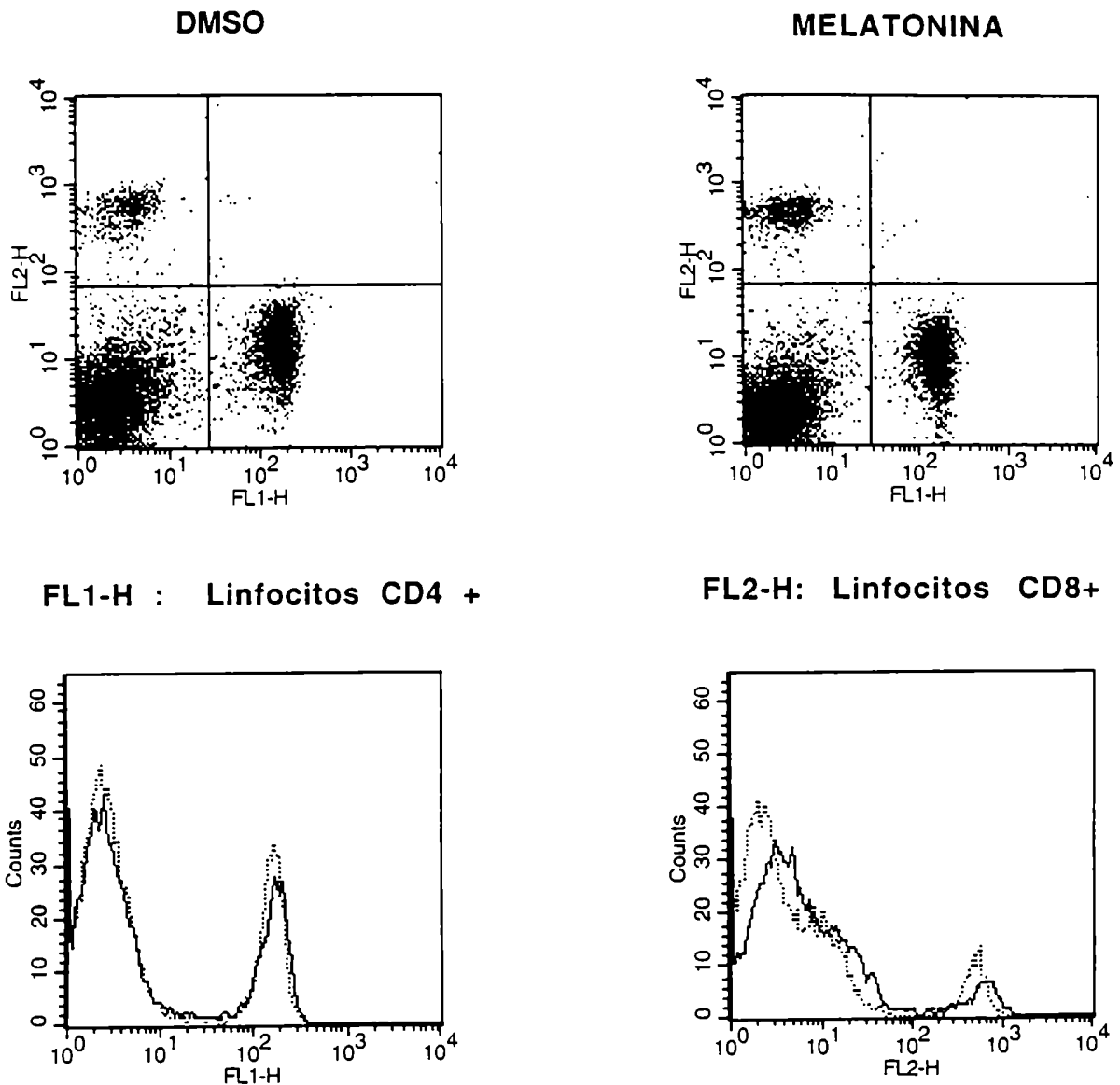
#### **7- Poblaciones linfocitarias CD4+ y CD8+ en el bazo de ratones tratados con melatonina:**

Independientemente de cual sea el mecanismo que utiliza la melatonina para exacerbar la actividad citotóxica, el efecto final a nivel del sistema inmune podría deberse a una alteración en las poblaciones linfocitarias reguladoras, en términos generales, CD4+ y CD8+, o a un efecto directo sobre la población efectora de CCDA. Para evaluar esta hipótesis, se incubaron esplenocitos provenientes de animales tratados con melatonina y sus respectivos controles con anticuerpos monoclonales anti-CD4 marcados con fluoresceína y anticuerpos anti-CD8 marcados con ficoeritrina, analizándose la expresión de estos antígenos por citometría de flujo. Los resultados obtenidos (**Figura 13**) mostraron que la melatonina no indujo alteraciones significativas en la composición porcentual en ambas poblaciones (CD4+: DMSO:  $30.8 \pm 1.8$  %, n=5 ; melatonina:  $30.3 \pm 2.2$  %, n=6 ; CD8+: DMSO:  $7.1 \pm 0.35$  %, n=5 ; melatonina:  $8.0 \pm 1.0$  %, n=6).

#### **8- Población leucocitaria MAC-1+ en el bazo de ratones tratados con melatonina:**

Como se señalara en la Introducción de esta tesis, son varias las poblaciones

*FIGURA 13: Poblaciones CD4+ y CD8+ en bazo.  
Efecto de la melatonina.*



*En los gráficos de puntos se muestra la doble marcación CD4-CD8 para los linfocitos tratados con DMSO o melatonina. En los histogramas se indica con línea clara el control (DMSO) y con línea oscura el tratamiento con melatonina. Los datos corresponden a 6 experimentos.*

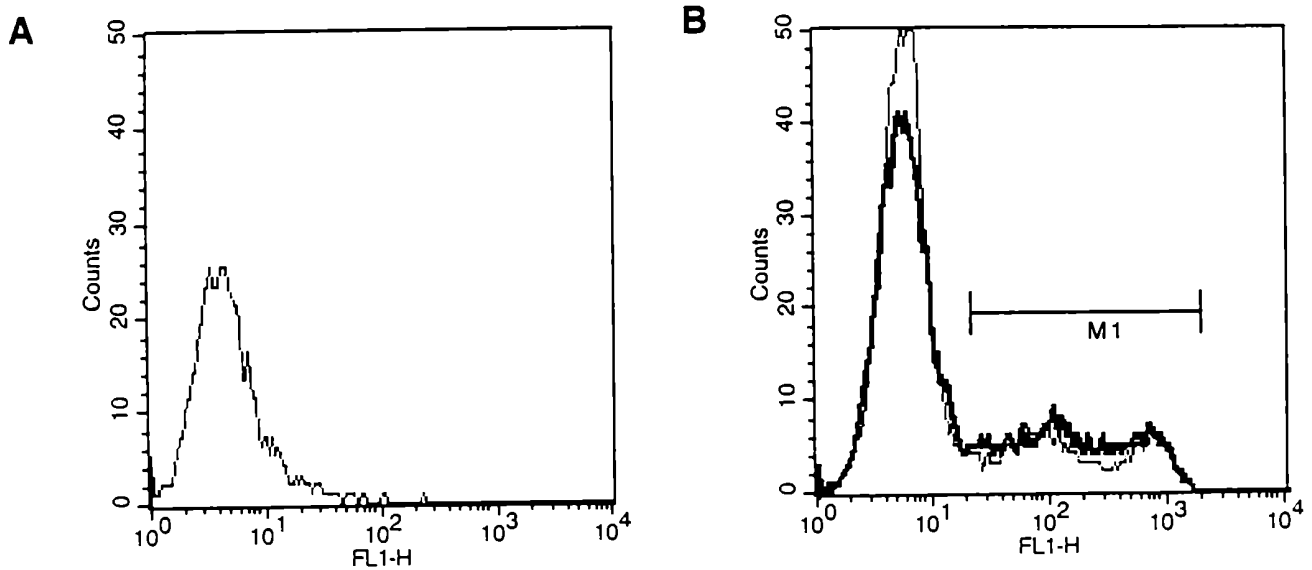


celulares capaces de mediar CCDA: macrófagos, linfocitos K y NK, monocitos y leucocitos polimorfonucleares. Sin embargo, la citotoxicidad esplénica se debe fundamentalmente a la actividad de los monocitos/macrófagos. Esta subpoblación celular expresa en su membrana la molécula MAC-1. Si bien este antígeno fue descrito inicialmente como marcador específico de macrófagos, hoy se sabe que también está expresado en granulocitos y monocitos de sangre periférica. El antígeno MAC-1 es además una molécula de adhesión importante involucrada en varias funciones dependientes de la adhesión, incluyendo quimiotaxis de granulocitos, agregación y fagocitosis. Para determinar si el aumento en los niveles de CCDA inducido por la administración de melatonina se correspondía con cambios cuantitativos en la población efectora, se incubaron los esplenocitos tratados y controles con el anticuerpo monoclonal anti-MAC-1, según se detalla en materiales y métodos. Los resultados mostrados en la **Figura 14** indican que la melatonina no alteró de manera significativa ni el porcentaje de células que expresan MAC-1 (células MAC-1+: DMSO:  $14.1 \pm 5.1$  % ; melatonina:  $11.0 \pm 3.8$  %, n=5), ni el número de moléculas expresadas por célula, medido como la media de la intensidad de fluorescencia (DMSO:  $621 \pm 122.8$  ;MELA:  $611.1 \pm 117$ , n=5).

#### **9- Efecto de la melatonina sobre la expresión de receptores para Fc de IgG (CD16/32):**

Los resultados anteriores indican que la exacerbación de la CCDA inducida por la

**FIGURA 14:** *Expresión de MAC-1 en bazo.  
Efecto de la melatonina.*



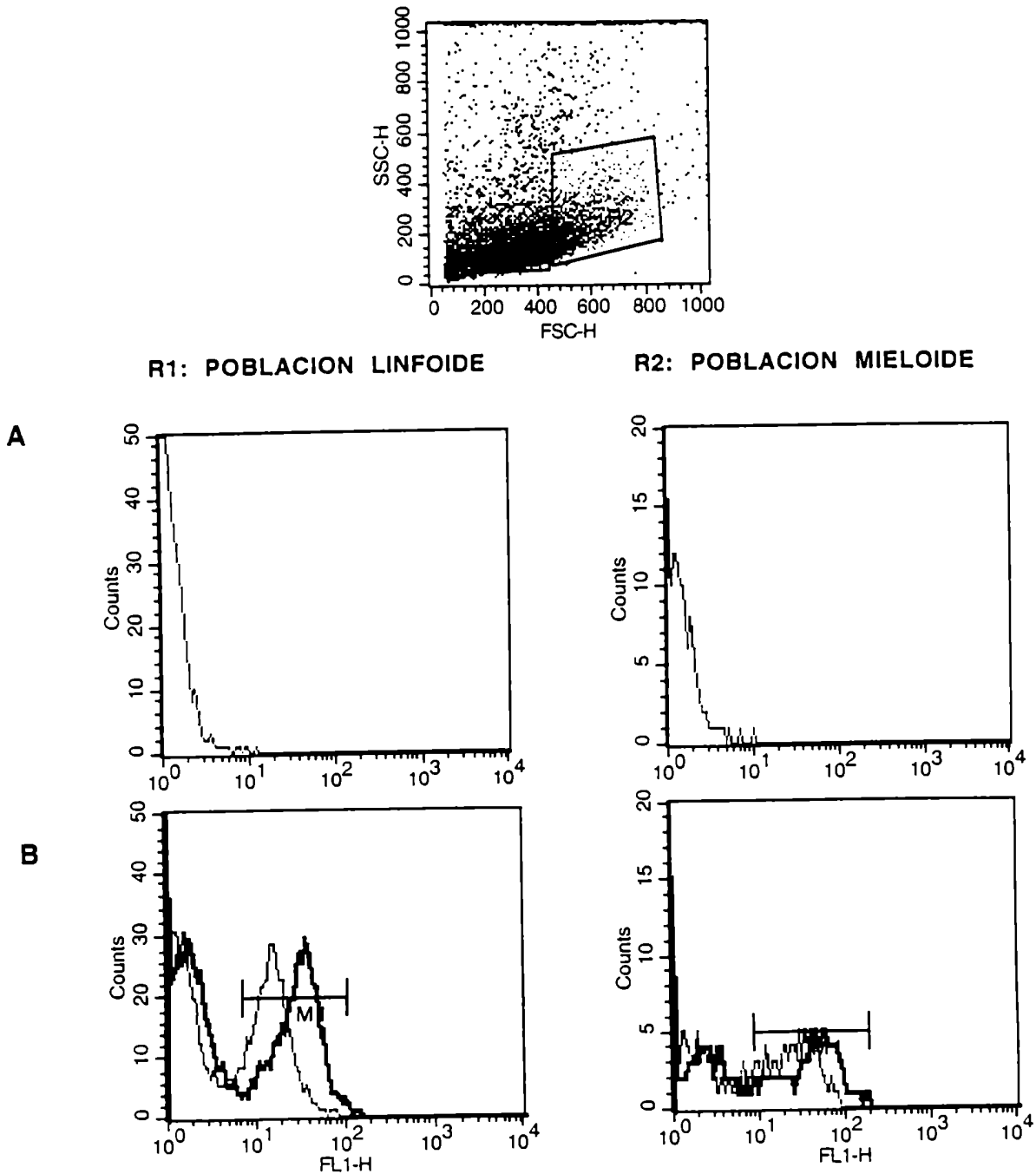
*En el panel A se muestra la fluorescencia inespecífica. En el panel B se muestran las células MAC-1+ provenientes de animales tratados con DMSO (línea clara) o con MELA (línea oscura). Los histogramas representan los datos obtenidos en 6 experimentos. En ellos se grafica el número de células (ordenada) vs. el log de la intensidad de fluorescencia (abcisa).*

melatonina no se debe a un cambio cuantitativo en la principal población efectora. Surje entonces la posibilidad de que la hormona actúe modificando la capacidad citotóxica de cada célula efectora en particular. Como ya se ha señalado, la población efectora de CCDA, sea cual fuere su estirpe celular, tiene como requisito primordial expresar en su membrana receptores para Fc de IgG (RFcy ), siendo esta molécula más que un marcador fenotípico, el receptor de superficie que media la función citotóxica. Es así que la capacidad lítica depende de la expresión de RFcy en la superficie de la célula efectora y de su estado de activación. Con el fin de evaluar si la melatonina exacerba la CCDA a través del aumento del número de células que expresan RFcy y/o el número de RFcy por célula, se analizó la expresión de estos receptores por citometría de flujo en las poblaciones esplénicas tratadas y controles. Los resultados de la **Figura 15** indican que el tratamiento con melatonina fue capaz de aumentar tanto el porcentaje de células RFcy+ como la densidad de los receptores expresados por célula (**Tabla I**) Estos efectos, observados en las poblaciones linfoides y mieloides, sugieren que la exacerbación de la CCDA inducida por la melatonina se debe, al menos en parte, a un aumento en la expresión de RFcy

#### **10 -Inhibición de la CCDA en ratones pinealectomizados (Px):**

Los resultados obtenidos con melatonina exógena demostraron claramente que la administración de la hormona es capaz de aumentar la CCDA. Sin embargo, esto no

*FIGURA 15: Expresión de receptores para Fc en bazo. Efecto de la melatonina.*



*En el panel A se observa la fluorescencia inespecífica. En el panel B se muestran las células  $RFc_{\gamma}+$  provenientes de ratones inoculados con DMSO (línea clara) o con MELA (línea oscura). En el gráfico de granularidad vs.tamaño se muestran las regiones linfóide y mielóide que se analizan en los histogramas correspondientes. Los datos corresponden a 7 experimentos.*

*TABLA I: Expresión de receptores para Fc en esplenocitos. Efecto de la melatonina.*

<i>GRUPO</i>	<i>Población Linfoide</i>		<i>Población Mieloide</i>	
	<i>% de células</i>	<i>intensidad de fluorescencia</i>	<i>% de células</i>	<i>intensidad de fluorescencia</i>
<i>DMSO</i>	$39.9 \pm 1.0$	$18.5 \pm 3.5$	$58.0 \pm 3.8$	$30.0 \pm 3.7$
<i>MELA</i>	$47.7 \pm 2.1$ *	$27.4 \pm 1.3$ *	$68.7 \pm 2.4$ *	$42.0 \pm 1.0$ *

*En la tabla se muestran los valores promedio de la intensidad de fluorescencia y el número de células (con sus correspondientes ES) específicamente marcado como M1 en el histograma correspondiente de la figura 15.*

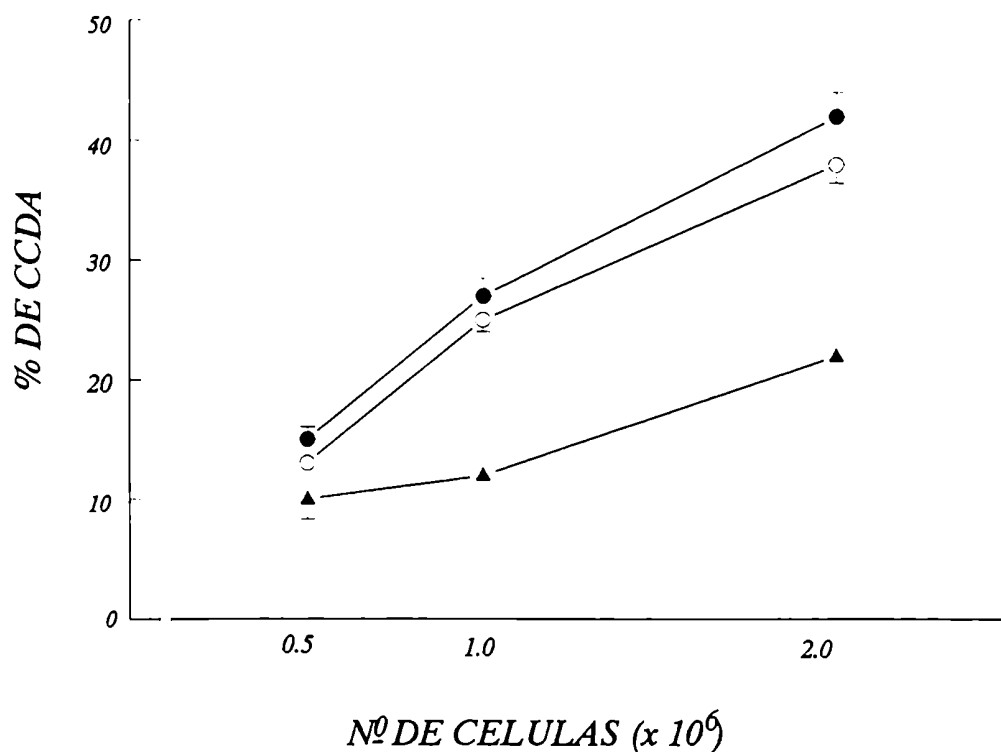
*\*  $p < 0.05$ ;  $n = 7$ .*

significa necesariamente que la secreción rítmica de melatonina juegue un papel fisiológico como inmunoregulador, ya que podría tratarse de un efecto de tipo farmacológico. Una manera de dilucidar si la producción endógena de una hormona es capaz de modular determinada función consiste en estudiar los efectos que provoca la ausencia de dicha hormona por ablación de la glándula que la secreta. Con el objetivo de investigar si la producción endógena de melatonina era capaz de regular la respuesta de CCDA, se evaluaron los niveles citotóxicos en los siguientes grupos experimentales: a) animales intactos, b) pinealectomizados en las primeras 96 horas de vida (Px) y c) con operación simulada (Sham Px), siguiendo la metodología quirúrgica que se detalló en Materiales y Métodos. La **Figura 16** muestra los resultados obtenidos. Como puede observarse, la pinealectomía neonatal provocó una reducción significativa en los niveles de CCDA del adulto que no puede atribuirse a la manipulación quirúrgica, ya que no se observaron diferencias en los valores citotóxicos entre los ratones Sham Px y los intactos. En los experimentos que se realizaron posteriormente siempre se usaron ratones Sham Px como controles.

### **11- Poblaciones esplénicas CD4+, CD8+, MAC-1+ y RFcγ+ en los animales Px:**

Como se demostró anteriormente, la exacerbación de la CCDA inducida por la melatonina correlaciona con un aumento en la expresión de RFcγ. Para determinar si la disminución de los niveles de CCDA encontrada en los ratones Px podría atribuirse a una

**FIGURA 16:** *Inhibición de la CCDA en el adulto por pinealectomía neonatal.*



La CCDA se evaluó usando esplenocitos de ratones intactos (●), sham-operados (○) o pinealectomizados al nacer (▲). Cada punto representa la  $\bar{X} \pm ES$  de 12 animales. \*  $p < 0.0001$ , Px vs intacto o vs sham-Px.

menor presencia de RFcy en los esplenocitos de estos animales, se analizaron las poblaciones correspondientes por citometría de flujo. Los resultados de la **Figura 17** y la **Tabla II** indican que no hubo diferencias significativas en el porcentaje de células RFcy+ entre los Px y sus controles Sham Px. Lo mismo se observó en cuanto al número de receptores por célula

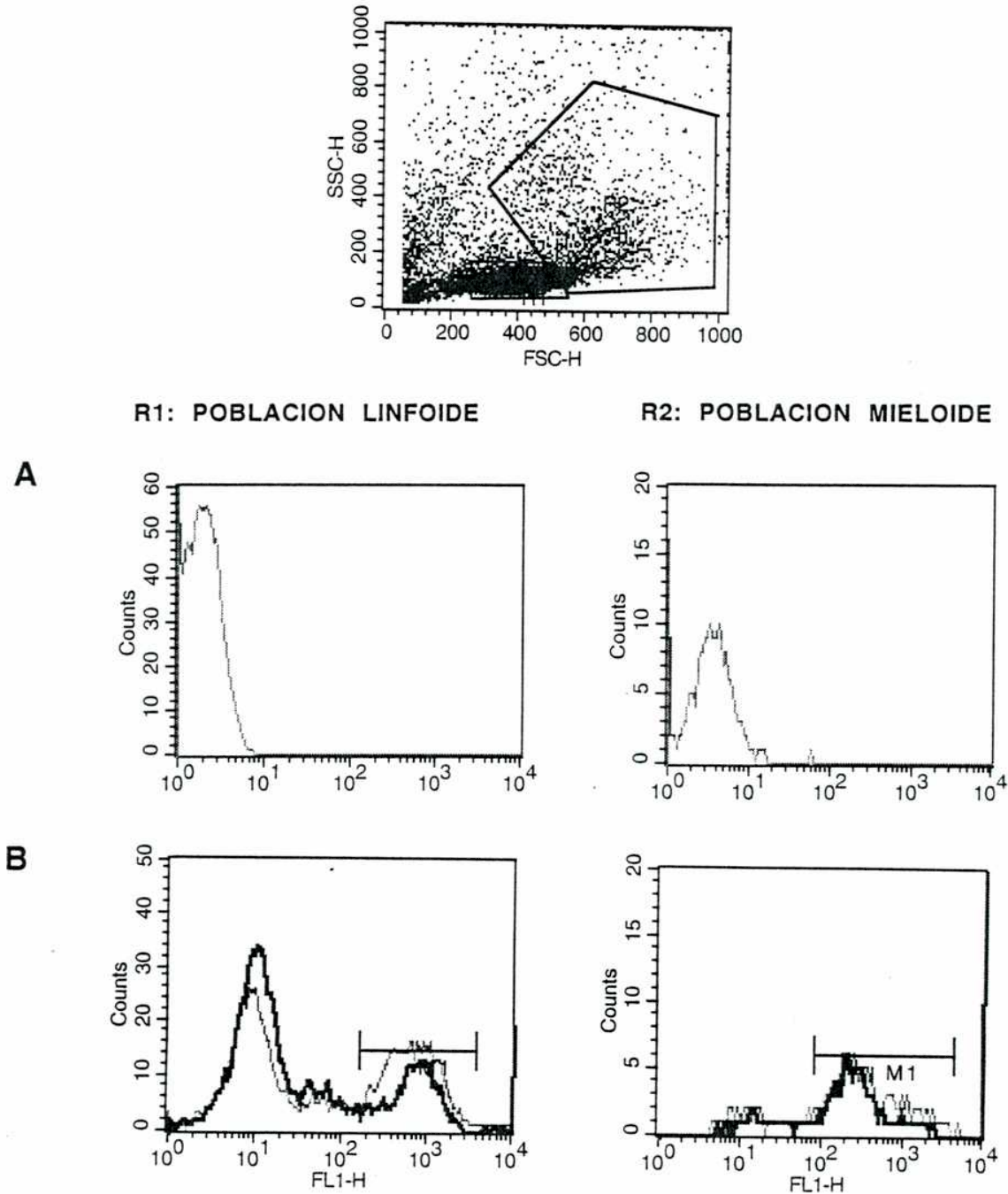
Estos resultados plantean que la regulación de la CCDA en ausencia de la pineal involucra mecanismos distintos a la regulación por melatonina exógena. Se estudió entonces si la pinealectomía neonatal altera la composición de poblaciones reguladoras CD4+ y CD8+ en el bazo mediante citometría de flujo. Como se observa en la **Figura 18** no hay variaciones en el porcentaje de células CD4+ y CD8+ entre los esplenocitos de ratones hembras Sham Px y Px (CD4+:sham Px:  $24.5 \pm 2.5$  % ; Px:  $24.7 \pm 1.1$  % ,n=4; CD8+:sham Px:  $7.8 \pm 1.2$  % ;Px:  $8.4 \pm 0.4$  % ,n=4). Como se observa en la (**Figura 19**) tampoco se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos al analizar la expresión del antígeno MAC-1 (Sham Px:  $17.6 \pm 2.6$  % ; Px:  $13.1 \pm 1.2$  % , n=5). Estos resultados sugieren que las variaciones en los niveles de CCDA provocadas por la ablación neonatal de la pineal no se correlacionan con cambios cuantitativos en las poblaciones reguladoras y efectoras del bazo.

## **12- Variación de la CCDA de acuerdo a la edad de los ratones Px:**

La capacidad de los esplenocitos de mediar CCDA está presente desde el



**FIGURA 17:** *Expresión de receptores para Fc en bazo. Efecto de la pinealectomía.*



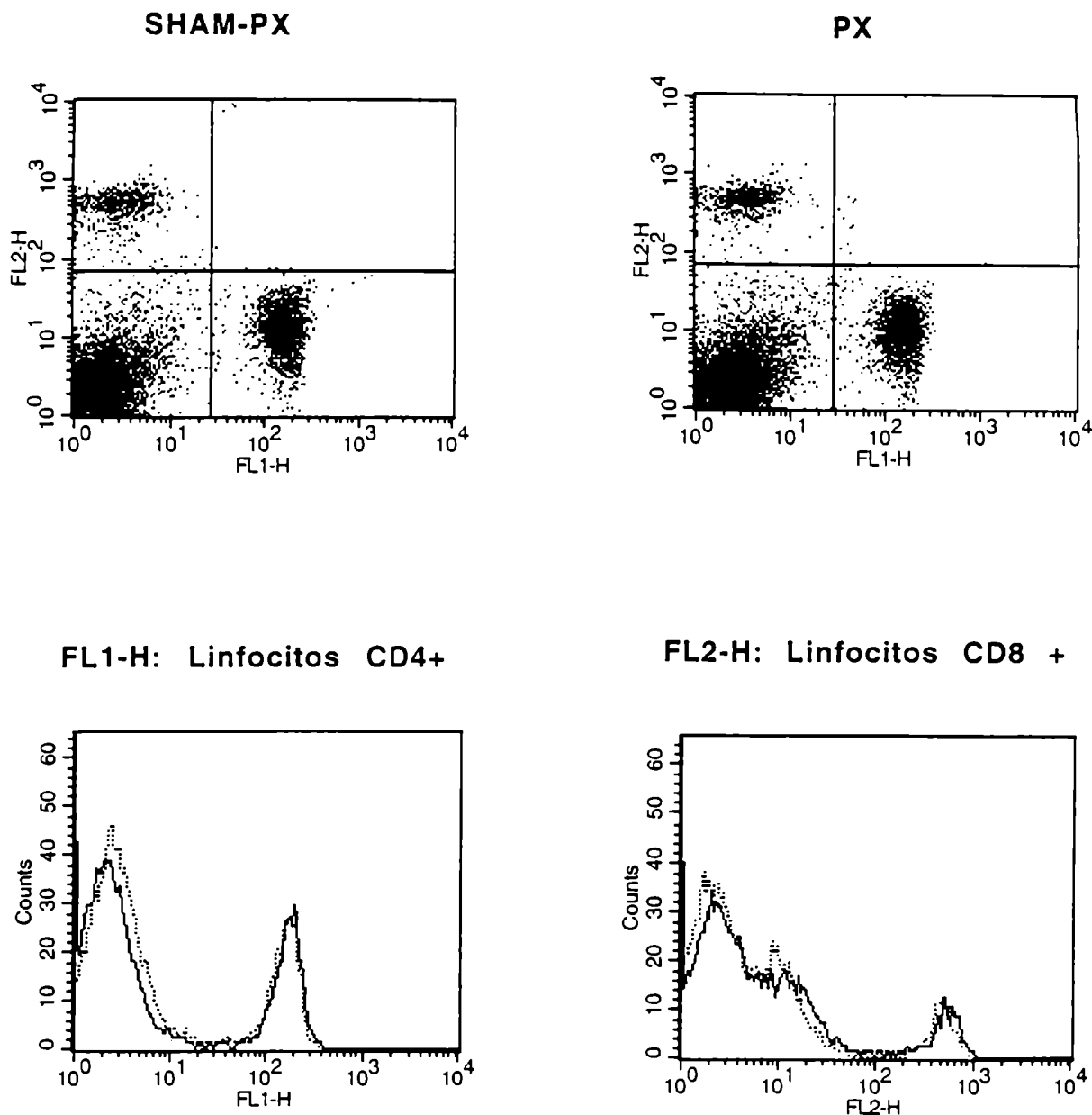
*En el panel A se muestra la fluorescencia inespecífica. En el panel B se muestran las células RFc<sub>γ</sub>+ provenientes de animales Sham Px (línea clara) o Px (línea oscura). Los histogramas representan el número de células (ordenada) vs. el log de la intensidad de fluorescencia (abscisa), correspondientes a 5 experimentos.*

*TABLA II: Expresión de receptores para Fc en esplenocitos.  
Efecto de la pinealectomía.*

<i>GRUPO</i>	<i>Población Linfoide</i>		<i>Población Mieloide</i>	
	<i>% de células</i>	<i>Intensidad de fluorescencia</i>	<i>% de células</i>	<i>Intensidad de fluorescencia</i>
<i>SHAM PX</i>	$40.5 \pm 3.1$	$37.4 \pm 6.2$	$74.3 \pm 1.4$	$75.6 \pm 7.7$
<i>PX</i>	$46.0 \pm 3.5$	$38.7 \pm 1.0$	$76.0 \pm 2.3$	$78.4 \pm 0.5$

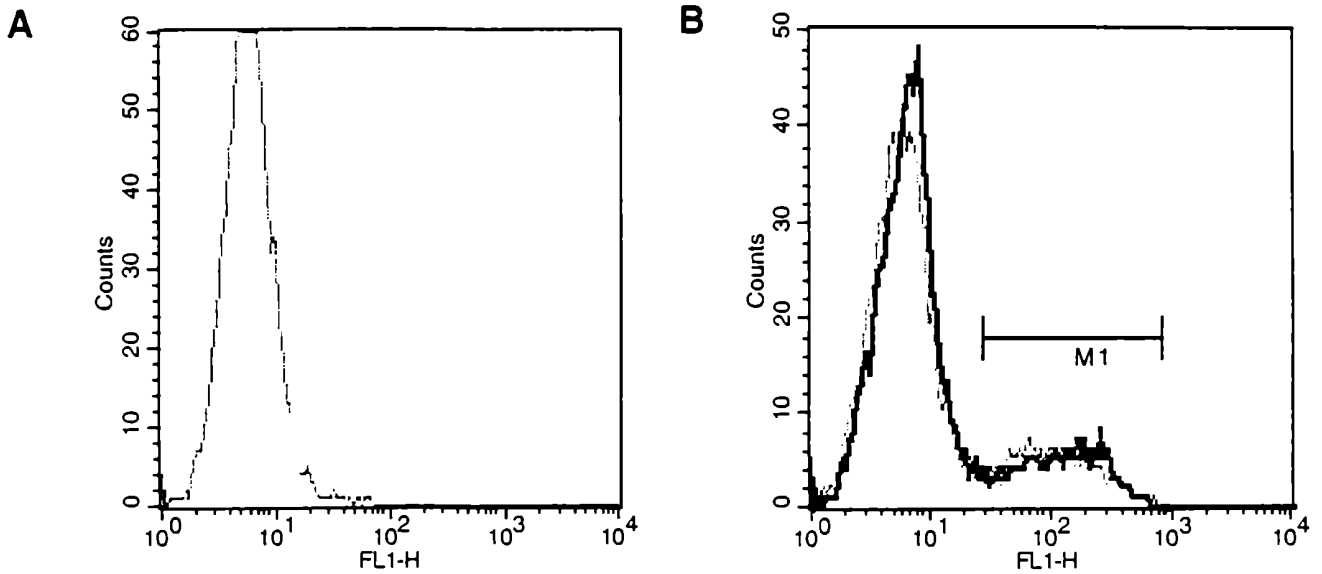
*En la tabla se muestran los valores promedio de la intensidad de fluorescencia y el número de células (con sus correspondientes ES) específicamente marcados como M1 en el histograma correspondiente de la figura 17. Los datos son representativos de 5 experimentos.*

*FIGURA 18: Poblaciones CD4+ y CD8+ en bazo.  
Efecto de la pinealectomía.*



*Los datos corresponden a 5 experimentos. El análisis de las poblaciones CD4/CD8 se hizo de la manera indicada en la figura 13. En línea clara se muestran los linfocitos provenientes de animales Sham Px y en línea oscura de los Px.*

*FIGURA 19: Expresión de MAC-1 en bazo.  
Efecto de la pinealectomía.*



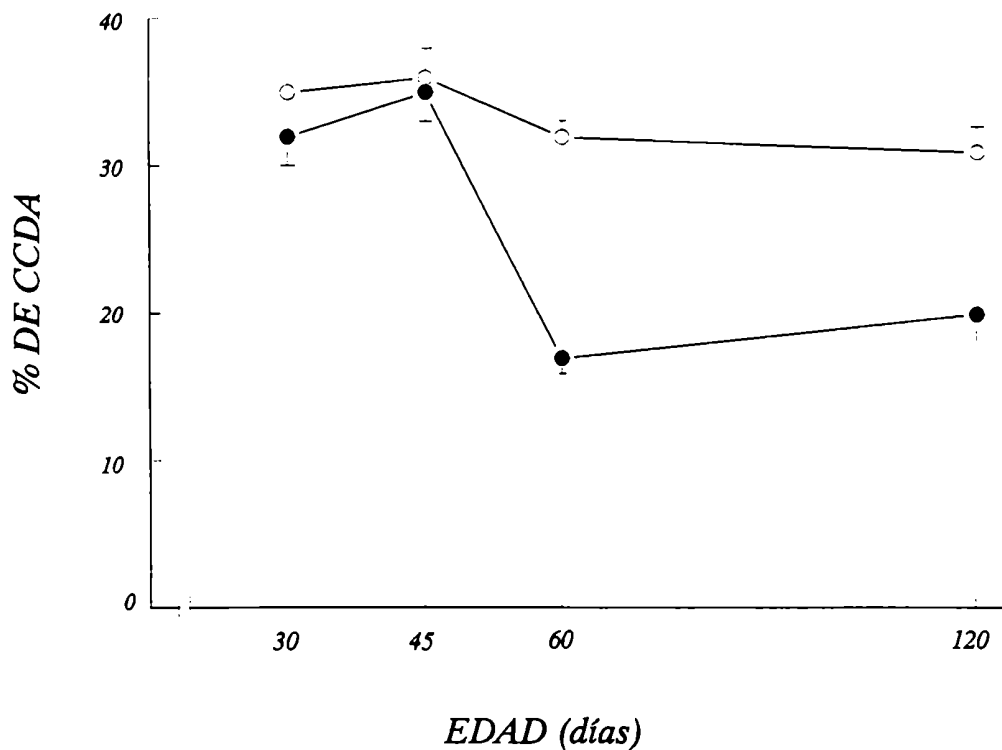
*En el panel A se muestra la fluorescencia inespecífica. En el panel B se muestran las células MAC-1 + provenientes de ratones tratados con DMSO (línea clara) o MELA (línea oscura). Se muestra un experimento representativo de 5.*

nacimiento (169). Ya que la pinealectomía se realiza en las primeras 96 horas de vida, podría ocurrir que la disminución en los niveles de CCDA estuviera presente desde el mismo momento de la ablación de la pineal. Por el contrario, la inhibición de la citotoxicidad podría ser consecuencia de variaciones en la producción de otros factores regulados por la melatonina durante el crecimiento y aparecer en algún momento de su desarrollo. Para determinar cuándo se pone de manifiesto la inhibición de la CCDA en los animales pinealectomizados, se compararon los niveles citotóxicos de ratones Px y Sham-Px de 30, 45, 60 y 120 días de edad. Como se observa en la **Figura 20**, la inhibición se hace evidente sólo a partir de los 2 meses de edad. Teniendo en cuenta que la maduración sexual en los ratones se completa aproximadamente a los 45 días, los resultados obtenidos sugieren que en la regulación de la CCDA por la glándula pineal participan factores que aparecen con la madurez sexual. Por otra parte, los resultados de la figura muestran que los niveles de CCDA en Px permanecen por debajo de los niveles normales por lo menos hasta los 4 meses de edad.

### **13- Efecto de la melatonina en ratones Px:**

Se ha demostrado que, para algunas funciones, la melatonina exógena sólo es capaz de ejercer su actividad moduladora en animales que tienen intactos sus ritmos de producción endógena de melatonina (76,20). En esos casos, la pinealectomía ya sea quirúrgica o funcional elimina los efectos de la melatonina exógena. Para determinar si

*FIGURA 20: Momento de aparición del efecto inhibitorio de la pinealectomía.*



*La reacción citotóxica se evaluó en ratones Px (●) o sham-Px (○) usando como células efectoras  $1 \times 10^6$  esplenocitos, a diferentes edades. Cada punto representa la  $\bar{X} \pm ES$  de 7 animales. \*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.005$ .*

éste era el caso de la CCDA, se trataron ratones hembras Px al nacer con una dosis diaria de melatonina (0,1 mg/kg) durante 2 días. Como se observa en la **Figura 21** la melatonina fue capaz de exacerbar los niveles de citotoxicidad de los ratones Px.

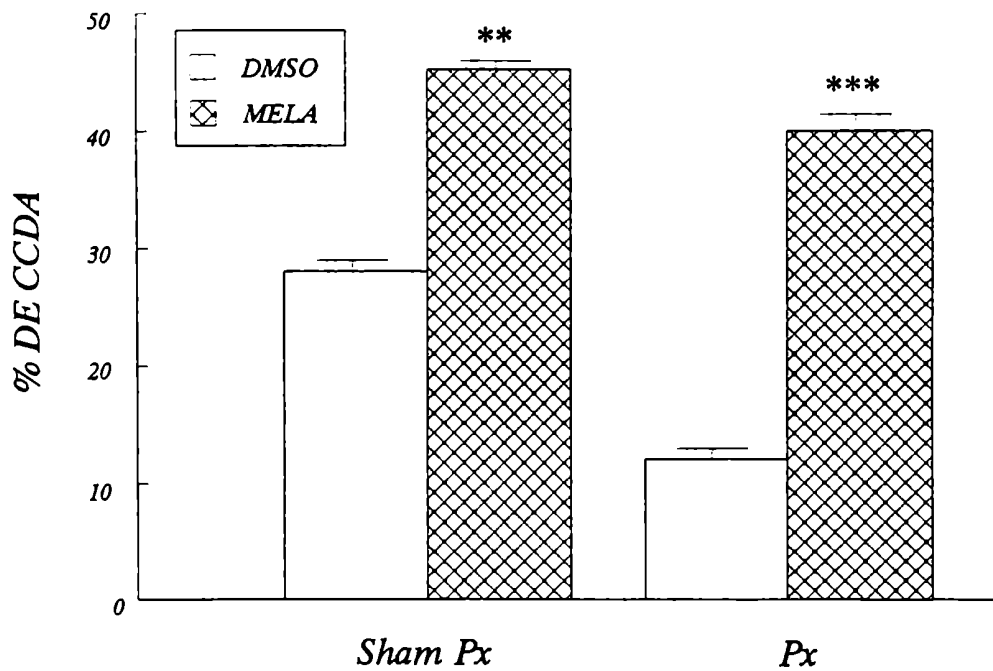
### **13.a- Efecto de la hora de inoculación de la melatonina en ratones Px:**

Como se señalara anteriormente, la melatonina exógena debe ser administrada en las últimas horas de la tarde para que pueda inducir efectos moduladores (204). Por otra parte, se ha visto que, en algunos sistemas, la supresión del ritmo en la producción de melatonina por la pinealectomía elimina las diferencias entre inoculación matutina y vespertina (20). Para determinar si la ausencia del ritmo endógeno en la secreción de la melatonina modifica la capacidad para responder a la administración de melatonina exógena, se evaluó la CCDA en ratones hembras Px y Sham Px inoculados con melatonina a las 10, 13 y 16 horas. Los resultados de la **Figura 22** demuestran que el aumento en la CCDA provocado por la hormona en los Px es independiente de la hora de inoculación de la misma.

### **13.b- Ausencia de variaciones estacionales en el efecto de la melatonina sobre la CCDA en ratones Px:**

Como se demostró anteriormente la sensibilidad a la melatonina varía a lo largo

**FIGURA 21: Efecto de la melatonina en animales pinealectomizados.**

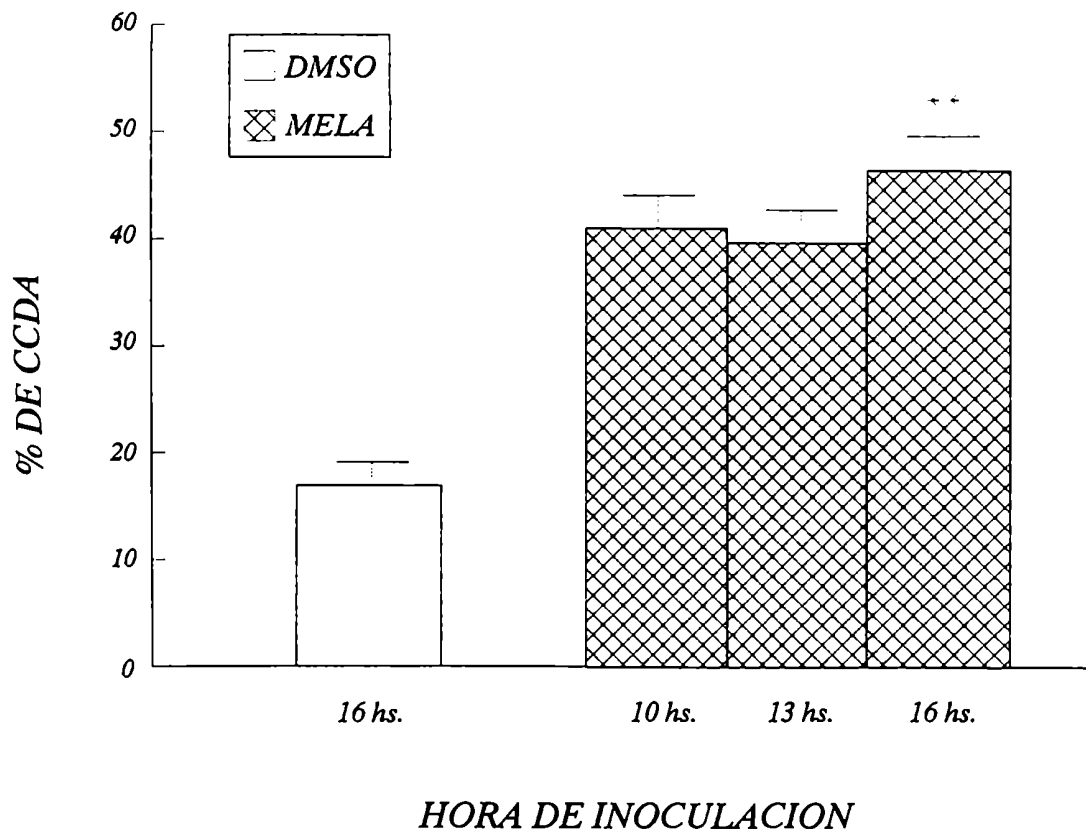


Los ratones recibieron 2 inyecciones i.v. de melatonina (0.1 mg/kg peso) (⊗) o vehículo (□). Los experimentos fueron realizados en verano.

\*\*  $p < 0.0002$ ; \*\*\*  $p < 0.0001$  ( $n = 7$ ).



**FIGURA 22:** Efecto de la hora de inoculación de la melatonina en ratones pinealectomizados.



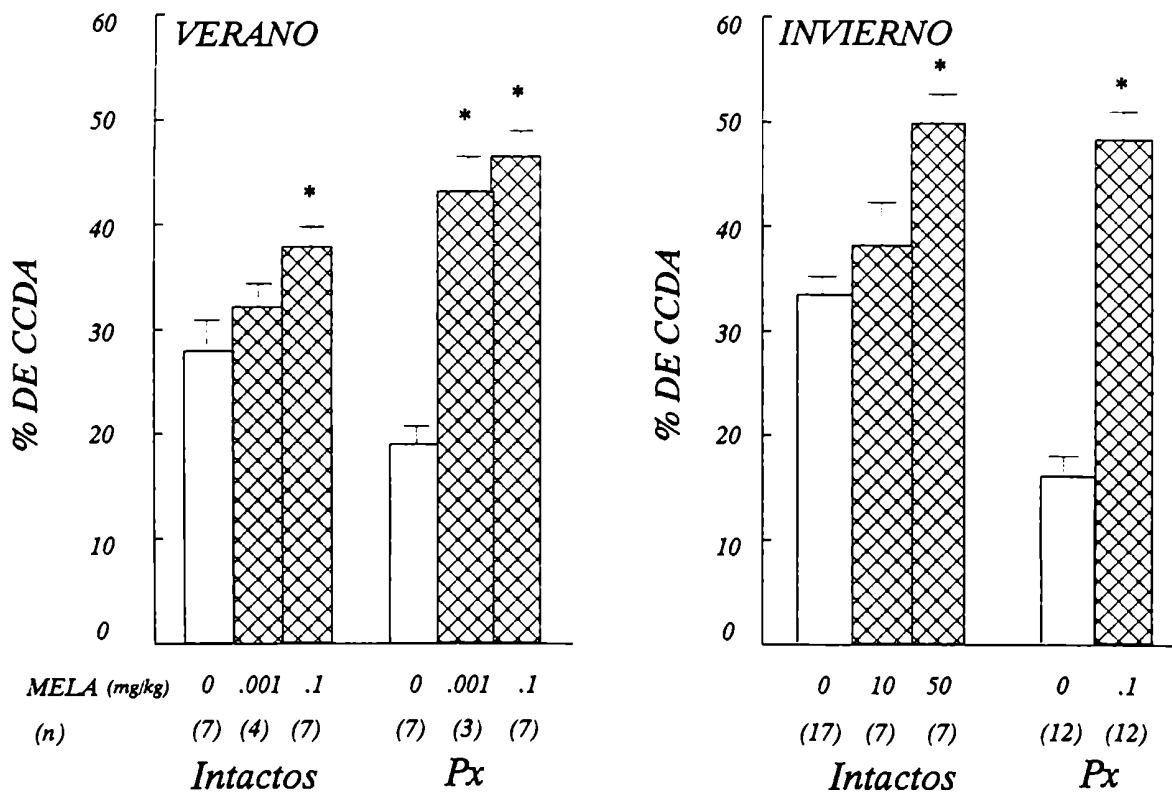
Los ratones Px hembras recibieron 2 inyecciones i.v. de melatonina (0.1 mg kg peso) (barras rayadas) o vehículo (barras blancas) a los tiempos indicados en la figura. La CCDA se ensayó 18 hs. después. Cada barra representa la  $\bar{X} \pm ES$  de 6 animales. \*  $p < 0.002$ ; \*\*  $p < 0.001$ , vehículo vs. melatonina.

del año en ratones hembras intactos, por lo cual fue necesario inocular dosis 100 veces mayores de melatonina en invierno que en verano para obtener incrementos comparables en los niveles de CCDA. Por el contrario, los ratones Px fueron capaces de responder a bajas dosis de melatonina durante todo el año (**Figura 23**). Estos resultados sugieren que la pérdida de los ritmos circadianos de secreción de melatonina aumenta la sensibilidad de las células receptoras a la hormona y las independizan de las variaciones estacionales a que está sujeta dicha sensibilidad.

#### **14- Efecto de la melatonina *in vitro*:**

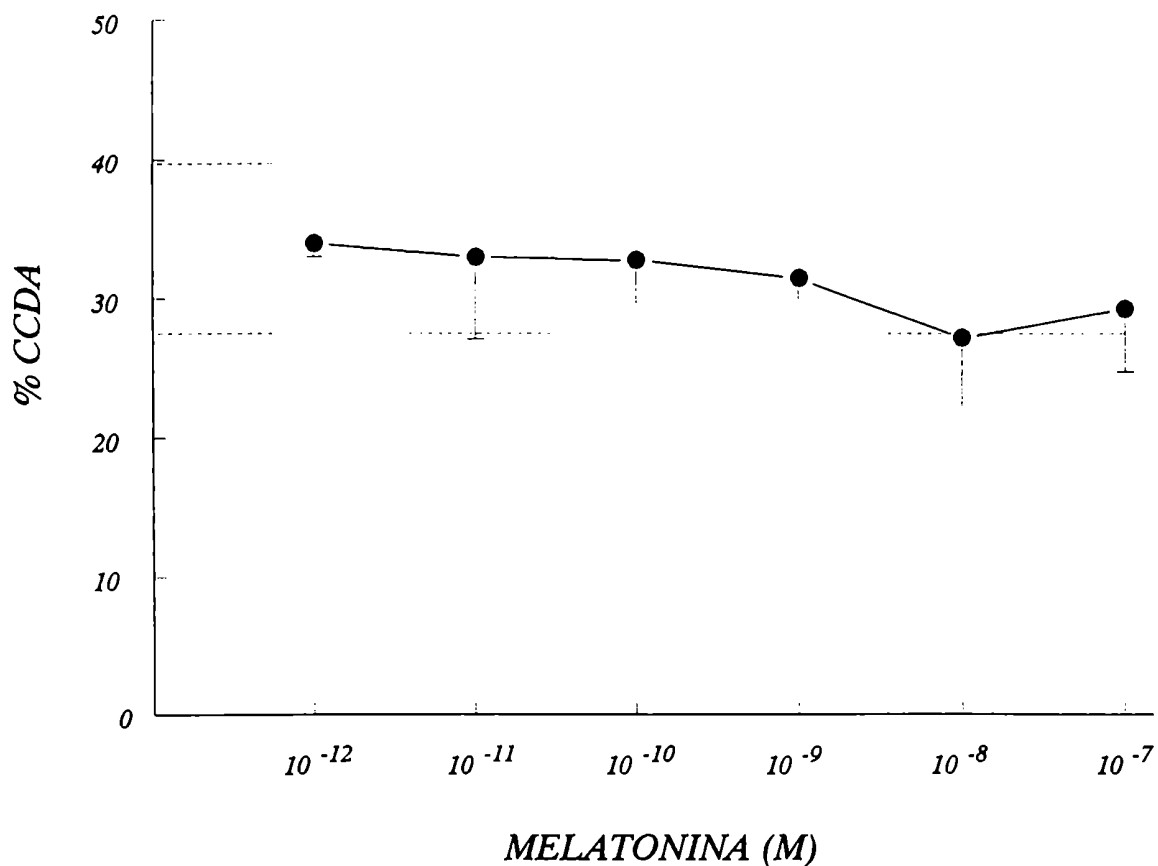
Con el objeto de determinar si la hormona actúa en forma directa sobre las células efectoras de la CCDA, se incubaron esplenocitos de animales Px y Sham Px con diferentes concentraciones de melatonina (desde 0.2 ug/ml hasta 200 ug/ml) durante 24 horas. Como se observa en la **Figura 24** la melatonina no fue capaz de exacerbar la CCDA en ninguna de las concentraciones ensayadas. Tampoco se encontraron modificaciones en los niveles de CCDA cuando los cultivos se prolongaron por 48 horas. Teniendo en cuenta la variación de los niveles de melatonina y de sus receptores a lo largo del día, se probó el efecto de la melatonina *in vitro* sobre células efectoras de CCDA provenientes de animales sacrificados al comienzo o al final de la fase de luz. En ningún caso hubo diferencias significativas en la actividad citotóxica. Estos resultados sugieren que la melatonina no actúa directamente sobre las células efectoras de la CCDA,

**FIGURA 23: Ausencia de variaciones estacionales en respuesta a la melatonina en animales pinealectomizados.**



Se evaluó la CCDA usando como células efectoras  $1 \times 10^6$  esplenocitos provenientes de ratones intactos o Px inoculados con distintas dosis de melatonina. Cada barra representa la  $\bar{X} \pm ES$  de (n) animales. \*  $p < 0.01$ .

**FIGURA 24: Efecto "in vitro" de la melatonina sobre la CCDA.**



*La CCDA se evaluó usando distintas concentraciones de melatonina. Cada punto representa la  $\bar{X} \pm ES$  de 10 animales. La línea punteada indica el rango normal de citotoxicidad.*

sino que requeriría de la participación ya sea de un intermediario o bien de su transformación *in vivo* en otro metabolito.

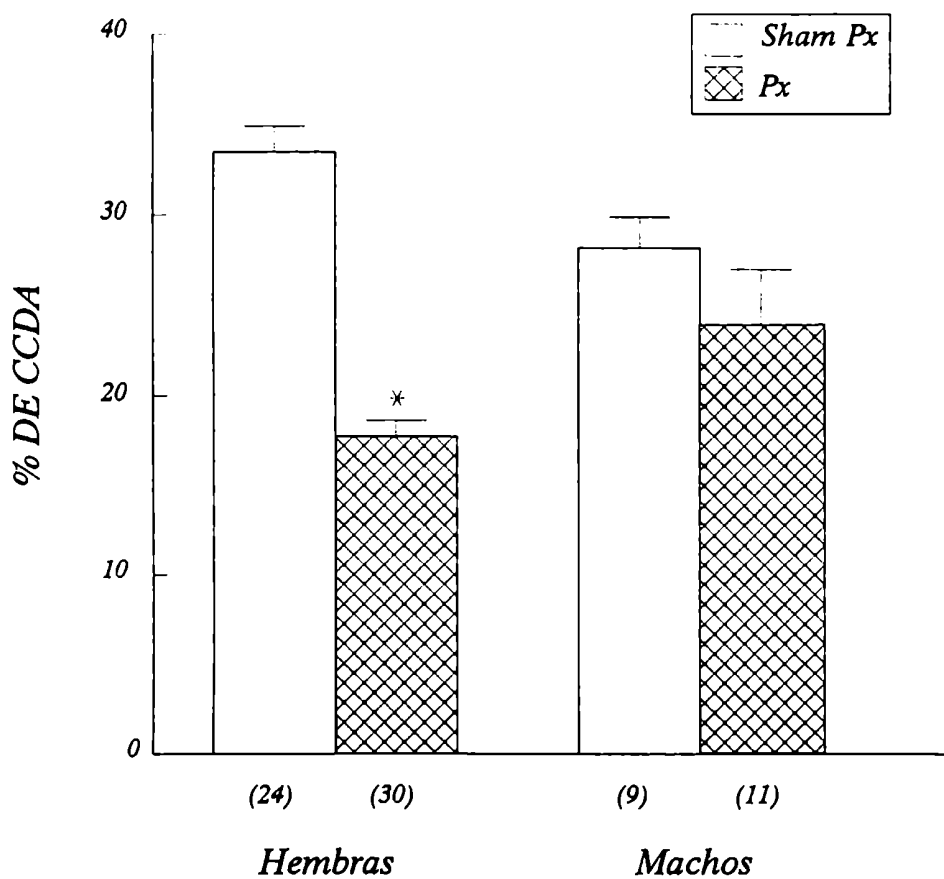
#### **15- CCDA en ratones machos Px:**

Desde el comienzo de las investigaciones que se describen en esta tesis, se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/c. Cuando se encontró que la disminución en los niveles de CCDA en los animales Px se hace evidente con la maduración sexual, se planteó la posibilidad de que las hormonas sexuales femeninas estuvieran involucradas en el efecto regulador de la melatonina sobre la citotoxicidad. Por este motivo, se evaluó la CCDA en ratones machos adultos de la misma cepa que habían sido pinealectomizados al nacer. Como se observa en la **Figura 25**, la ablación de la glándula pineal en los ratones machos no modificó los niveles de CCDA de los esplenocitos.

#### **16- Efecto de la melatonina en los ratones machos:**

Una vez demostrado que la pinealectomía neonatal modifica los niveles de CCDA sólo en las hembras, se estudió si la respuesta a la melatonina exógena muestra también diferencias entre ambos sexos. Para ello, se inocularon ratones machos adultos intactos 2 días consecutivos con una dosis diaria de 0,1 mg/kg de melatonina, evaluándose la CCDA al día siguiente. Estos experimentos se realizaron durante el verano. Los resultados

**FIGURA 25: Efecto de la pinealectomía en ratones machos adultos.**



La CCDA se evaluó en esplenocitos provenientes de ratones machos Px al nacer (barras llenas) y Sham Px (barras vacías). Cada barra representa la  $\bar{X} \pm ES$  de (n) animales. \*  $p < 0.0001$

mostrados en la **figura 26** indican que este tratamiento con melatonina, que es capaz de incrementar significativamente los niveles de CCDA de las hembras en esta época del año, no provocó modificaciones en la respuesta de los machos.

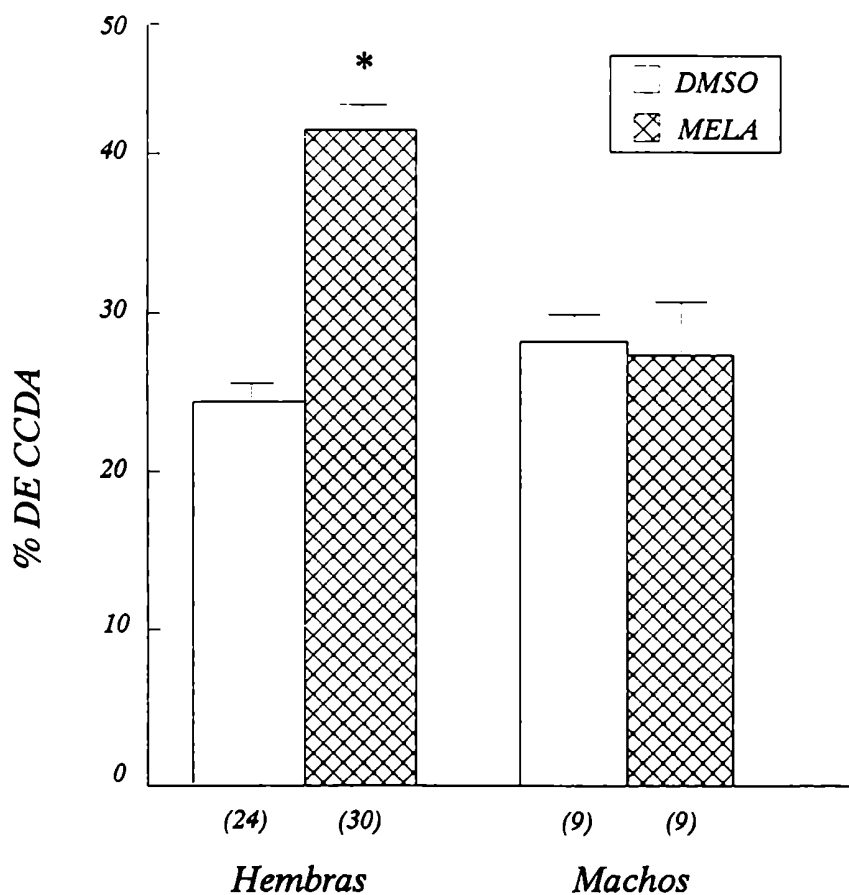
#### **17- Curva dosis-respuesta de melatonina en ratones machos:**

Para determinar si los ratones machos no respondían a la melatonina debido a que las células "blanco" de su acción poseían una sensibilidad menor que las de las hembras, se administraron concentraciones de la hormona que van de 1 a 50 mg/kg de peso. Sin embargo, como se aprecia en la **Figura 27**, los niveles de CCDA no se modificaron con ninguna de las dosis de melatonina evaluadas, lo que indica que los machos no son capaces de responder al efecto regulatorio de la melatonina sobre la CCDA, aún a concentraciones muy altas de la misma.

#### **18- Efecto de la melatonina en ratones machos Px:**

En las hembras la pinealectomía neonatal aumenta la sensibilidad de los animales a la melatonina exógena, haciéndolos respondedores a bajas concentraciones de melatonina en cualquier época del año. Para determinar si en estas condiciones de máxima sensibilidad para las hembras, los machos eran capaces de responder a la melatonina exógena se evaluó la función citotóxica en animales Sham Px y Px inoculados con

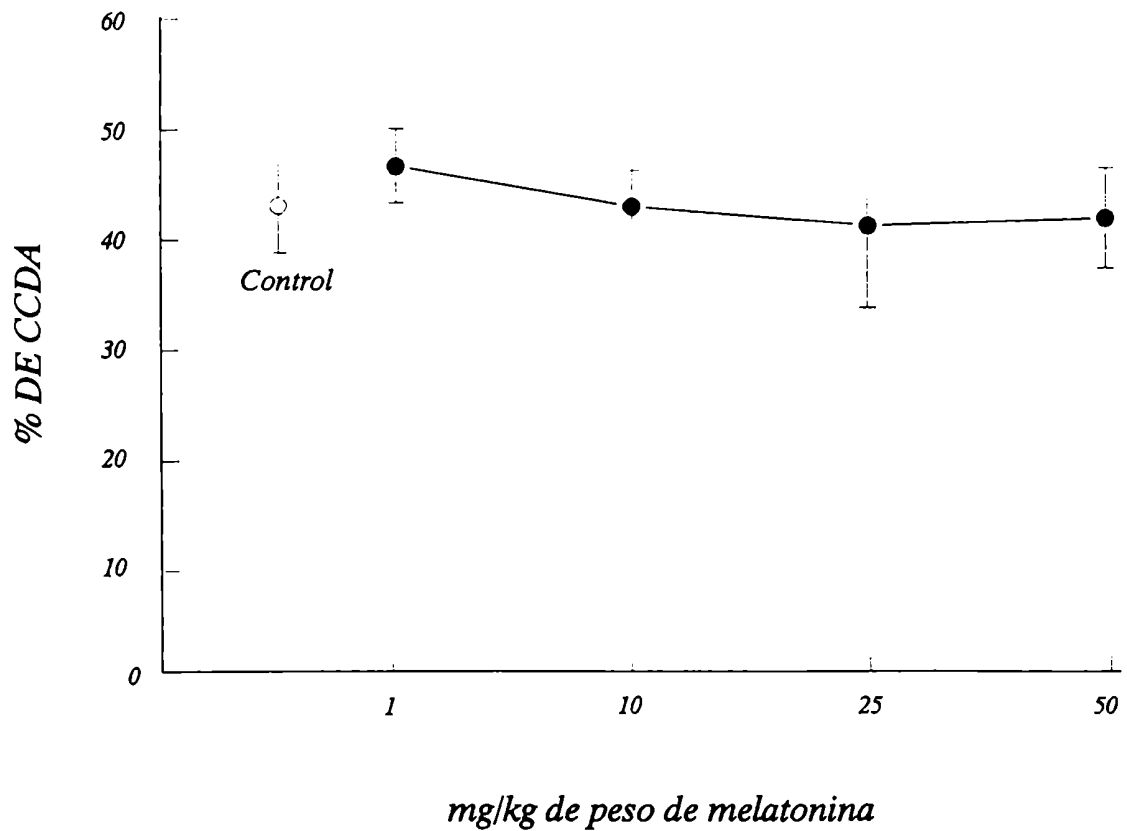
**FIGURA 26: Efecto de la melatonina sobre la CCDA en ratones machos.**



Los ratones recibieron 2 inyecciones i.v. de melatonina (0.1mg/kg peso) (barras rayadas) o vehículo (barras blancas) por la tarde. Luego de 18 hs. de la última inoculación se evaluó la CCDA usando como células efectoras  $1 \times 10^6$  esplenocitos. Cada barra representa la  $\bar{X} \pm ES$  de (n) animales.  
\*  $p < 0.001$ .



**FIGURA 27:** Curva dosis-respuesta de melatonina en ratones machos.



Los ratones se inocularon i.v. a las 16 hs. con distintas dosis de melatonina. Cada punto representa la  $\bar{X} \pm ES$  de 8 animales.

melatonina y DMSO como control. En la **Figura 28** se observa que la hormona no afecta la CCDA. Es decir, que la Px no modifica en los machos la sensibilidad de las células efectoras a la regulación por la melatonina.

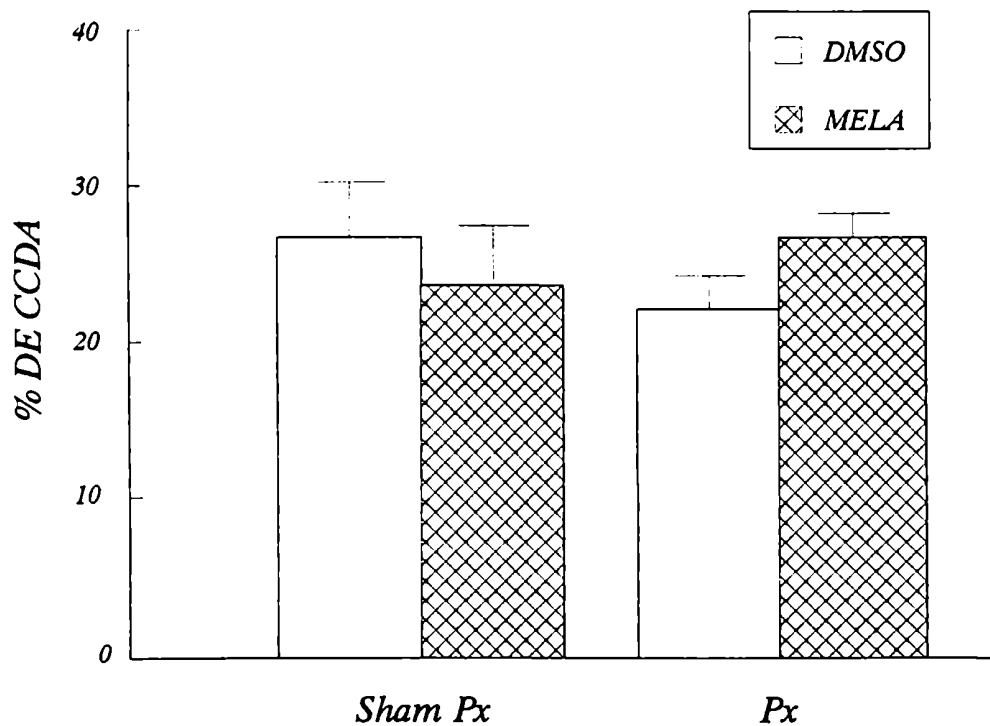
### **19- Participación del eje gonadal:**

Considerados en conjunto, los resultados obtenidos hasta este momento sugerían que las hormonas sexuales femeninas estaban involucradas en la regulación de la respuesta de CCDA por la glándula pineal a través de la melatonina. Como se señalara en la Introducción de esta tesis, existen numerosas evidencias de la influencia recíproca entre la glándula pineal y el eje gonadal. Es así que tanto la melatonina como las hormonas sexuales pueden estimularse o inhibirse recíprocamente, al igual que a sus receptores (196,226,206,43). Por otra parte, es un hecho establecido que los esteroides gonadales, en particular los estrógenos, cumplen un rol importante como reguladores de las funciones inmunes (67).

Con el fin de analizar el papel del eje gonadal en la modulación de la CCDA por la glándula pineal y, en particular el de los estrógenos, se utilizaron los siguientes diseños experimentales en animales tratados con melatonina exógena o pinealectomizados al nacer:

- \* Gonadectomía en hembras y machos.
- \* Administración exógena de estradiol.
- \* Medición de niveles plasmáticos de estradiol.

**FIGURA 28:** Efecto de la melatonina en ratones machos pinealectomizados.



Los ratones Px neonatalmente recibieron 2 inyecciones i.v. de melatonina (0.1 mg/kg peso) (barras rayadas) o vehículo (barras blancas) a las 16 hs. La CCDA se evaluó 18 hs. después de la última inoculación. Cada barra representa la  $\bar{X} \pm ES$  de 10 animales.

\* Cultivo de las células efectoras de CCDA con estradiol.

#### **19.a- Efecto de la ovariectomía en hembras pinealectomizadas sobre la CCDA:**

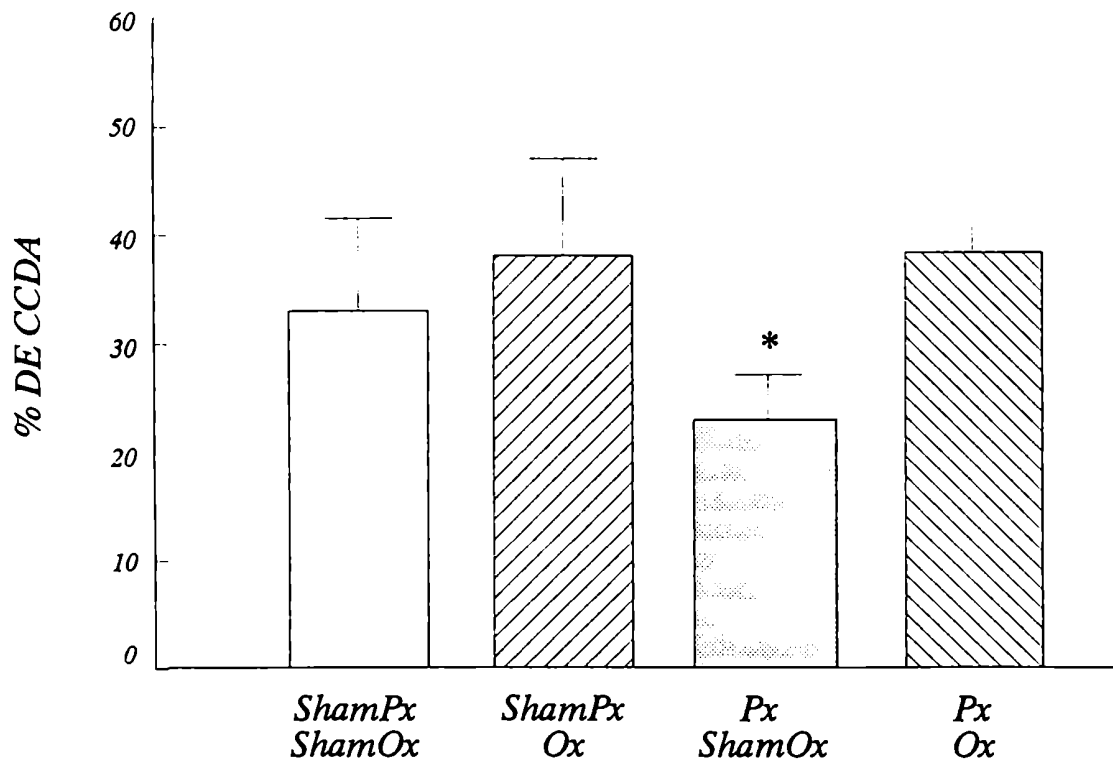
Teniendo en cuenta que la disminución de la CCDA provocada por la pinealectomía neonatal se pone de manifiesto con la maduración sexual, en primer lugar se analizó si la ablación de los ovarios podría revertir el efecto de la pinealectomía.

Para analizar dicha hipótesis, se ovariectomizaron ratones Px y Sham Px antes del mes de vida y a los dos meses de edad, se evaluó la actividad citotóxica de sus esplenocitos. En la **Figura 29** se observa que la ovariectomía no modificó los valores líticos en los animales con pineal. Sin embargo, en los ratones Px, la ablación de los ovarios fue capaz de incrementar los niveles de CCDA hasta hacerlos comparables a los de los controles Sham Px. Estos resultados refuerzan la participación de las hormonas gonadales en la modulación ejercida por la pineal sobre la CCDA.

#### **19.b- Efecto de la melatonina en hembras ovariectomizadas:**

En base a los anteriores resultados, se pensó que el ovario podría actuar como intermediario del efecto modulador de la melatonina sobre la CCDA. De ser cierta esta hipótesis, en ausencia del tejido ovárico la administración de melatonina no debería inducir efecto alguno. Para comprobarlo, se inocularon ratones ovariectomizados con

**FIGURA 29:** Efecto de la ovariectomía sobre los niveles de CCDA de ratones pinealectomizados.



La CCDA se evaluó usando como células efectoras  $1 \times 10^6$  esplenocitos. Cada barra representa la  $\bar{X} \pm ES$  de 7 animales. \*  $p < 0.01$ .

melatonina (1 mg/kg), encontrándose que la hormona exógena es capaz de exacerbar la CCDA de manera semejante en presencia o ausencia de ovarios (**Figura 30**). Estos resultados indican que la melatonina, al menos la que se administra, no necesita la presencia del ovario para regular la actividad citotóxica de los esplenocitos.

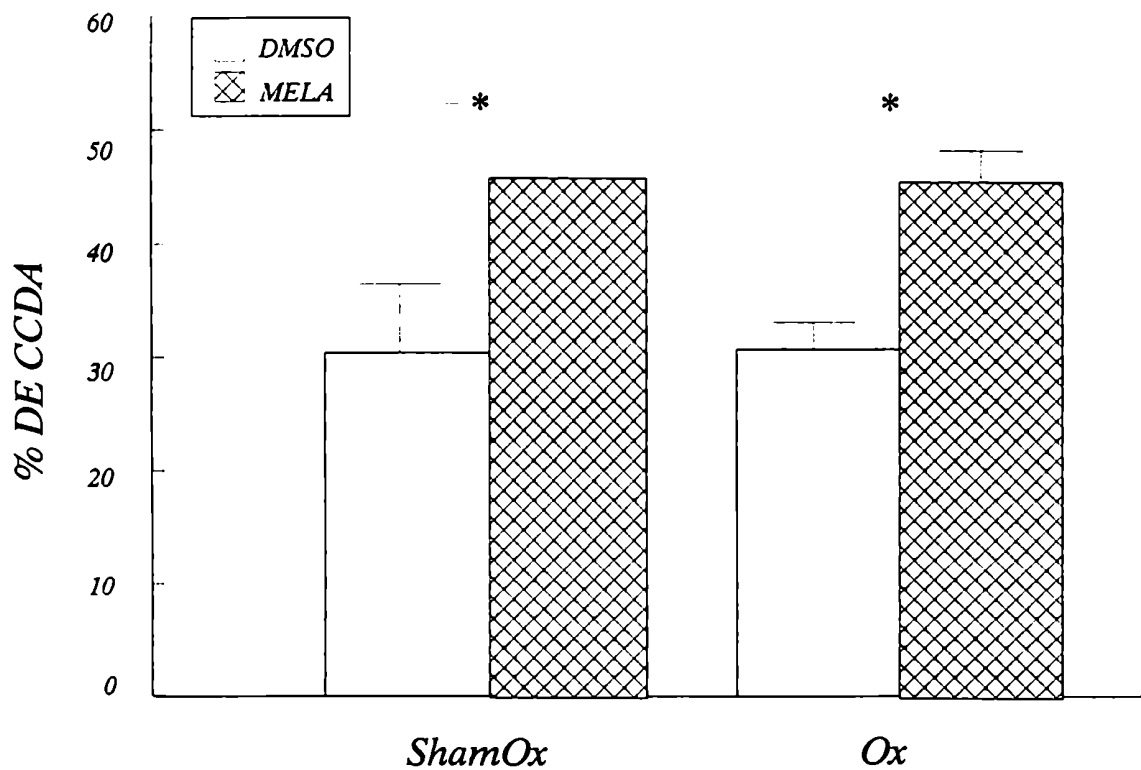
#### **19.c- Efecto de la Orquidectomía (Gx):**

Teniendo en cuenta que en los machos ni la pinealectomía ni la melatonina exógena pudieron regular la CCDA, se planteó la posibilidad de que las gonadas masculinas y/o las hormonas por ellas producidas impidieran que la melatonina pueda ejercer sus efectos reguladores sobre la CCDA. Para analizar dicha hipótesis se procedió a la orquidectomía de ratones machos Px y Sham Px antes del mes de vida. Cuando cumplieron 2 meses, se evaluó la actividad de CCDA de sus esplenocitos. Contrariamente a lo esperado, se observó que la extirpación de las gonadas indujo un aumento significativo en la CCDA tanto de los Sham Px como de los Px (**Figura 31**). Estos resultados sugieren que la ausencia de efectos reguladores de la pineal en los machos no puede atribuirse a la interferencia de las hormonas gonadales.

#### **19.d- Ensayos *in vivo* con implantes de estradiol:**

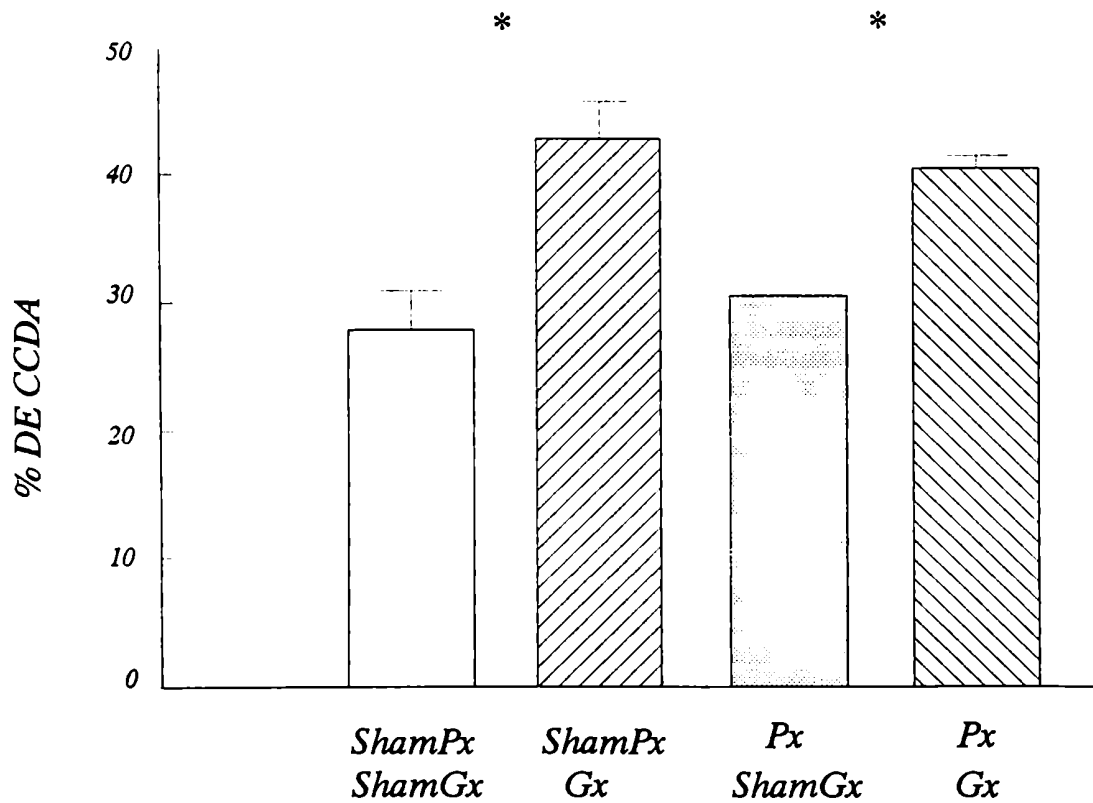
La observación de que la ovariectomía en hembras Px restaura los valores controles

*Figura 30: Efecto de la melatonina sobre la CCDA en ratones ovariectomizados.*



*Los ratones recibieron 2 inyecciones i.v. de melatonina (0.1 mg/kg peso) (barras rayadas) o vehículo (barras blancas) a las 16 hs. Cada barra representa la  $\bar{X} \pm ES$  de 6 animales. \*  $p < 0.05$ .*

**FIGURA 31: Efecto de la orquidectomía sobre la CCDA en ratones machos pinealectomizados.**



La CCDA se evaluó utilizando como células efectoras  $1 \times 10^6$  esplenocitos. Cada barra representa la  $\bar{X} \pm ES$  de 6 animales. \*  $p < 0.01$ .

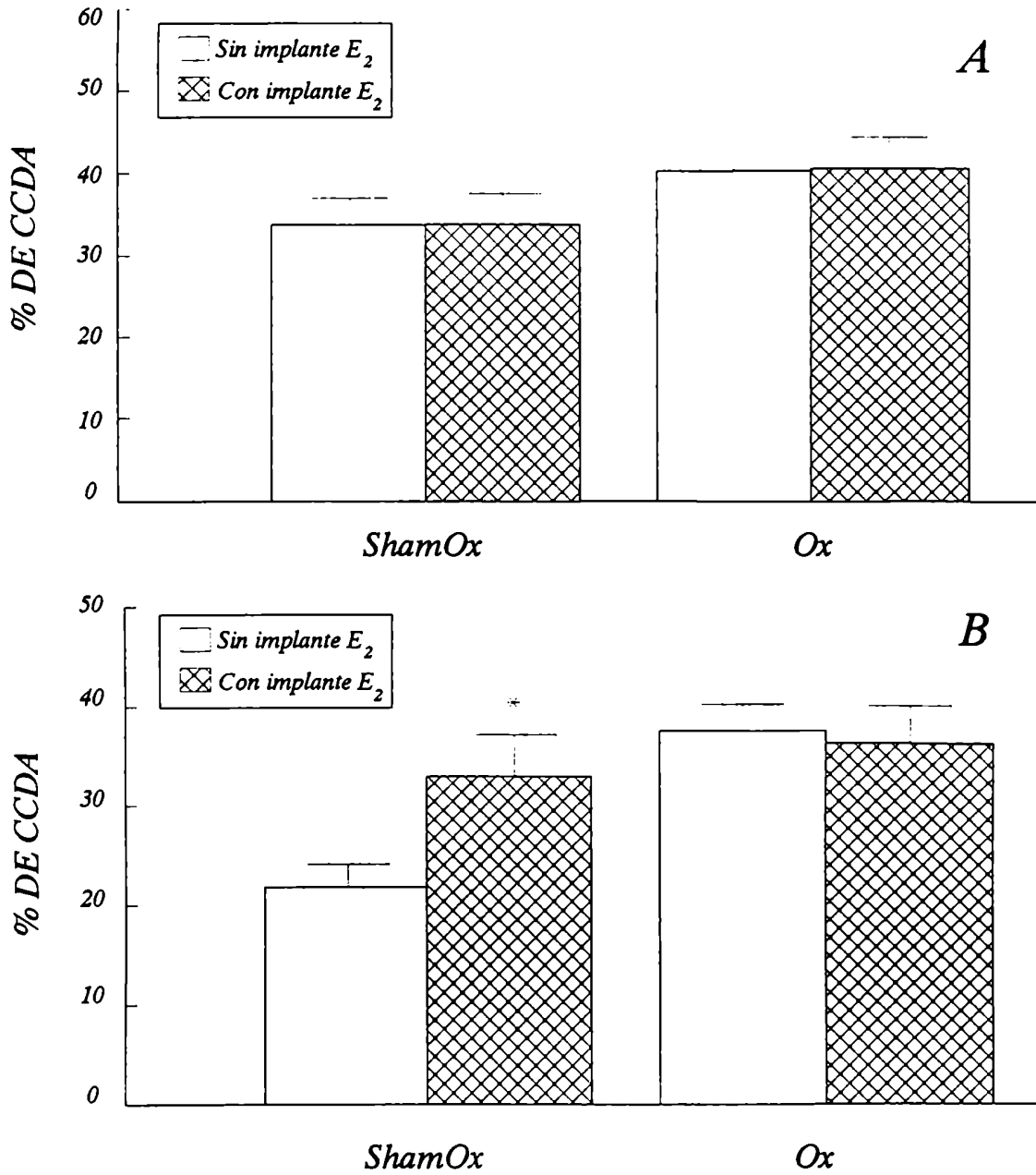


de CCDA (**Figura 29**) sugería la participación de las hormonas gonadales. Para determinar si en las hembras Px los estrógenos ováricos son los responsables de la inhibición de la citotoxicidad, se colocaron implantes de  $17\beta$ -estradiol en hembras prepúberes Px-Ox. Con este tratamiento se mantienen los niveles plasmáticos de estradiol elevados durante varias semanas. La CCDA se ensayó en la edad adulta. Como controles se utilizaron esplenocitos provenientes de hembras adultas de los siguientes grupos: Px-Sham Ox, Sham Px-Ox y Sham Px-Sham Ox. En la **Figura 32** (panel B) se aprecia que el incremento en los niveles circulantes de estradiol no inhibió la CCDA en el grupo Px-Ox, lo que sugiere que los estrógenos no serían los responsables de disminuir los valores citotóxicos en las hembras Px. Tampoco se observaron efectos del esteroide en los animales Sham Px tengan o no ovarios (panel A). Sin embargo, el mismo tratamiento aumentó los porcentajes de CCDA en los ratones Px hasta llevarlos a los niveles normales.

#### **19.e- Niveles plasmáticos de $17\beta$ -estradiol.**

Para evaluar la posibilidad de que la inhibición de la CCDA inducida por la pinealectomía fuera consecuencia de alteraciones en los niveles de estrógenos, se tomaron muestras de sangre de hembras Px y Sham Px y se midieron los niveles plasmáticos de  $17\beta$ -estradiol. Previamente a la obtención de la sangre se realizaron extendidos vaginales para determinar la fase del ciclo estral en la que se encontraba cada animal. Las muestras

**FIGURA 32: Efecto de los estrógenos en animales pinealectomizados.**



La CCDA se ensayó utilizando  $1 \times 10^6$  esplenocitos de animales Sham Px (panel A) o animales Px al nacer (panel B).

se agruparon en dos categorías según provinieran de animales que al momento de la toma se encontraran en diestro/proestro o estro. Los resultados de la **Tabla III** muestran que no hubo diferencias significativas en ninguno de los grupos evaluados. Estos datos, coincidentes con los de otros autores (205,23), indican que la pinealectomía no induce modificaciones importantes en los niveles basales de estrógenos.

#### **19.f- Efecto del estradiol *in vitro* sobre la CCDA.**

La modulación de la CCDA por la glándula pineal en las hembras podría relacionarse con cambios en la capacidad de las células efectoras para responder a los estrógenos. A fin de determinar si el  $17\beta$ -estradiol es capaz de modificar los niveles de CCDA mediada por esplenocitos provenientes de animales tratados con melatonina, se hicieron experimentos *in vitro* con distintas concentraciones del esteroide. Los resultados de la **Tabla IV** muestran que ninguna de las concentraciones de estradiol ensayadas modificó los niveles de CCDA mediada por células provenientes de ratones hembras que recibieron ya sea melatonina o DMSO. Por otra parte, en la **Tabla V** se muestra que el estradiol tampoco fue capaz de modular la CCDA de esplenocitos de hembras Px al nacer.

Estos resultados sugieren que la modulación de la CCDA por la glándula pineal no involucra modificaciones en la capacidad de respuesta de las células efectoras a los estrógenos.

*TABLA III: Niveles séricos de 17 $\beta$ -Estradiol en ratones pinealectomizados.*

<i>GRUPO</i>	<i>CICLO ESTRAL</i>	<i>ESTRADIOL</i>	
		<i>pg/ml</i>	<i>(n)</i>
<i>SHAM PX</i>	<i>ESTRO</i>	29.2 $\pm$ 3.6	(6)
	<i>DIESTRO/PROESTRO</i>	39.2 $\pm$ 3.9	(6)
<i>PX</i>	<i>ESTRO</i>	21.7 $\pm$ 4.5	(4)
	<i>DIESTRO/PROESTRO</i>	23.0 $\pm$ 3.1	(9)

*Se muestran los niveles plasmáticos de E<sub>2</sub> en ratones Px y Sham-Px, correspondientes a los distintos estadios del ciclo estral. No se observaron diferencias significativas.*

*TABLA IV: Efecto "in vitro" de los estrógenos sobre la CCDA.*

		<i>17β-Estradiol</i>				
		<i>control</i>	$10^{-8}$	$10^{-9}$	$10^{-10}$	$10^{-11}$
<i>DMSO</i>	$30.5 \pm 7$ <i>(n=7)</i>	$40.6 \pm 8.6$ <i>(n=7)</i>	$31.2 \pm 0.1$ <i>(n=5)</i>	$39.3 \pm 10$ <i>(n=7)</i>	$43.7 \pm 10$ <i>(n=7)</i>	
<i>MELA</i>	$49.9 \pm 7$ <i>(n=11)</i>	$49 \pm 8$ <i>(n=11)</i>	$38.4 \pm 6$ <i>(n=8)</i>	$57.7 \pm 11$ <i>(n=8)</i>	$59.1 \pm 10$ <i>(n=9)</i>	

*Los datos representan la  $\bar{X} \pm ES$  de (n) ratones tratados con melatonina o DMSO como vehículo.*

*TABLA V: Efecto "in vitro" de los estrógenos sobre la CCDA de animales pinealectomizados.*

	<i>17β-Estradiol</i>				
	<i>control</i>	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$	$10^{-10}$
<i>ShamPx</i>	$34 \pm 2.1$	$31 \pm 5.0$	$34 \pm 3.8$	$36 \pm 5.5$	$35 \pm 6.8$
<i>Px</i>	$19.3 \pm 4.2$	$21 \pm 1.5$	$23 \pm 7.2$	$19 \pm 1.1$	$19.3 \pm 4.2$

*La CCDA se evaluó usando  $1 \times 10^6$  esplenocitos de ratones ShamPx o Px. Los datos representan la  $\bar{X} \pm ES$  de 6 animales.*

## **DISCUSSION**

Los resultados presentados en esta tesis demuestran que la glándula pineal, a través de la secreción de melatonina, es capaz de modular la actividad citotóxica dependiente de anticuerpos (CCDA). Esta actividad moduladora se produce sólo en las hembras y no en los machos, lo que sugiere la participación de hormonas sexuales. Asimismo, fue posible demostrar variaciones estacionales en la regulación ejercida por la melatonina sobre la CCDA ya que, dependiendo de la época del año, se necesita administrar diferentes concentraciones de melatonina para inducir aumentos comparables de citotoxicidad. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la glándula pineal cumple un papel regulador de las funciones inmunes.

En primer lugar se estudió el efecto de la administración de melatonina sobre la CCDA, utilizando como células efectoras esplenocitos de ratones BALB/c hembras. Se observó que la inoculación de una dosis diaria de melatonina por la tarde durante dos días consecutivos fue capaz de incrementar los niveles de CCDA y mantenerlos elevados durante cinco días. Es decir, que la melatonina no estaría induciendo sobre las células citotóxicas efectos agudos que se revierten en pocas horas, sino que provocaría un estado de activación que persistiría por varios días.

Maestroni y colaboradores (119,124) encontraron que la inoculación de una dosis diaria de melatonina durante 5 días aumenta la respuesta primaria de anticuerpos medida como células formadoras de placas en el bazo. Los autores observaron un aumento en la celularidad del bazo de los ratones inmunizados tratados con melatonina. Por el contrario,



en ausencia del antígeno la melatonina no incrementó el número de células del bazo por lo que concluyen que la hormona actuaría sobre las células activadas por el antígeno. Aunque en el caso de la CCDA no está involucrado un antígeno existe la posibilidad de que la melatonina modifique las poblaciones celulares en el bazo de tal modo que los esplenocitos de los animales tratados tengan una mayor proporción de células efectoras de CCDA o una alteración en las proporciones relativas de células moduladoras. Cuando se investigó si las variaciones en los niveles de CCDA estaban asociadas a alteraciones cuantitativas en las poblaciones CD4+ y CD8+, no se encontraron diferencias en ninguno de los grupos evaluados. Sin embargo no pueden descartarse alteraciones funcionales en dichas poblaciones que, a través de perfiles de secreción de linfoquinas distintos, influyan finalmente sobre los niveles de citotoxicidad. Otros autores han encontrado que la melatonina es capaz de modificar la secreción de algunas citoquinas. En este sentido, Pioli y colaboradores demostraron que los macrófagos provenientes de animales tratados con melatonina tienen una producción incrementada de IL-1 y TNF $\alpha$  en respuesta al lipopolisacárido (167). Recientemente se han encontrado resultados similares utilizando monocitos de sangre humana periférica y evaluando la acción de la melatonina *in vitro* sobre estas células (141). En efecto, se observó que la incubación de monocitos durante 12 horas con concentraciones de melatonina superiores a  $10^{-10}$  M aumenta la secreción de IL 1, y la actividad tumoricida de los mismos. En cuanto al efecto de la melatonina sobre la producción de interferón- $\gamma$  se han obtenido resultados contrapuestos. Arzt y col (9), demostraron que la incubación de células mononucleares de sangre periférica humana

activadas por mitógenos con altas concentraciones de melatonina ( $10^{-3}$  a  $10^{-4}$  M) inhibe la producción de IFN- $\gamma$ . Por su parte, Muscettola y colaboradores (142) describieron aumentos en la síntesis de IFN- $\gamma$  con bajas concentraciones de melatonina ( $10^{-9}$  a  $10^{-12}$  M) e inhibición de la misma con  $10^{-6}$  M de la hormona, lo que sugiere una acción bifásica de la melatonina, estimuladora a bajas concentraciones e inhibidora a altas concentraciones.

En relación a los resultados de esta tesis, la exacerbación de la CCDA inducida por el tratamiento con melatonina podría deberse al aumento en la producción de una o más de estas citoquinas. De hecho, se sabe que el IFN- $\gamma$  incrementa los niveles de CCDA mediada tanto por monocitos como por neutrófilos humanos (199).

Son muchas las poblaciones leucocitarias capaces de mediar la CCDA (66,105,26). En un bazo normal se encuentran varias poblaciones efectoras: neutrófilos, macrófagos y linfocitos RFc $\gamma$  positivos. Con respecto a los neutrófilos, si bien son potentes mediadores de CCDA, su proporción en el bazo es tan baja que su contribución a los niveles citotóxicos es insignificante. La principal población leucocitaria responsable de la CCDA esplénica es la de los macrófagos, ya que si se los elimina por adherencia, los porcentajes líticos disminuyen notablemente (171). Para determinar si la exacerbación de la CCDA inducida por tratamiento con melatonina se debía a un cambio en las poblaciones esplénicas efectoras se evaluó, en primer lugar, el porcentaje de neutrófilos utilizando el colorante de Turk. No se encontraron diferencias entre controles y tratados.

En cuanto al porcentaje de macrófagos se determinó por citometría de flujo mediante el marcador específico, MAC-1. Tampoco en el caso de los macrófagos la melatonina modifica su proporción en el bazo. Estos resultados indican que la exacerbación de la CCDA por tratamiento con melatonina no se debe a un incremento relativo de las poblaciones efectoras más eficientes.

La condición esencial para que una célula pueda actuar como efectora de la CCDA es que exprese en su membrana RFcy (153). Este receptor no sólo sirve como sitio de interacción entre la célula efectora y la célula "blanco" a través del anticuerpo que la recubre, sino que además es imprescindible para que se inicie una serie de eventos intracelulares que llevarán a la destrucción de la célula agredida (55). Cuando se analizó, por citometría de flujo, el efecto de la administración de melatonina sobre la expresión de RFcy se encontró que la hormona incrementa el porcentaje de esplenocitos que expresan RFcy y fundamentalmente, la cantidad de receptores expresados por célula. Estos resultados sugieren que el aumento de la CCDA por la melatonina es consecuencia de la mayor expresión de los receptores específicos. Sin embargo, podría ocurrir que la melatonina actúe incrementando el nivel de activación celular y que la mayor expresión de receptores, en particular RFcy, represente una manifestación más de esta activación. Los experimentos realizados en esta tesis no nos permiten discernir cuál de las dos alternativas tiene lugar, ya que sería necesario evaluar otras funciones macrofágicas para determinar si se trata de una activación celular general.

Sea cual fuere el mecanismo por el cual la melatonina exagera la actividad

citotóxica, los resultados obtenidos al incubar los esplenocitos murinos *in vitro* con la melatonina, indican que no actúa directamente sobre las células efectoras sino que lo hace a través de un sistema intermediario. Si bien se han descrito sitios de unión para melatonina en esplenocitos murinos (227), los intentos de regular la actividad de células de ratón con melatonina *in vitro* no han dado resultados positivos (119,167). En el caso de la CCDA no fue posible modificar sus niveles incubando las células de bazo *in vitro* con un amplio rango de dosis de melatonina ( $10^{-7}$  - $10^{-12}$ M) durante periodos que van de pocas horas a dos días. También se tuvo en cuenta la posibilidad de que la expresión de los receptores para melatonina en los esplenocitos variase de manera circadiana, por lo que se realizaron experimentos en los cuales las células efectoras se obtuvieron en distintos momentos del día. En ningún caso fue posible exacerbar la CCDA con melatonina *in vitro*.

La elección de la dosis de melatonina administrada a los animales (0,1 mg/kg) se hizo teniendo en cuenta los resultados obtenidos en una serie de experimentos realizados al comienzo de estos estudios, donde se probó un amplio rango de concentraciones y se eligió la menor dosis que inducía aumentos consistentes. Sin embargo, posteriormente, esta dosis no siempre resultó capaz de exacerbar los niveles de CCDA. Cuando se analizaron en conjunto los resultados obtenidos a lo largo de 4 años consecutivos se encontró que esta dosis de melatonina incrementa la actividad citotóxica únicamente en el verano. Durante el resto del año se necesita administrar cantidades mayores de

melatonina para obtener un efecto comparable. Es decir, que se encontraron efectos estacionales en la actividad moduladora de la melatonina sobre la CCDA. Estos resultados sugieren que los ratones son más sensibles a la acción de la melatonina durante el verano que durante el invierno.

Si bien la principal función de la glándula pineal es la de transformar información fotoperiódica en una señal hormonal (melatonina) capaz de modular distintas funciones, cabe señalar que los ratones usados en estos experimentos no estaban expuestos a cambios en el fotoperíodo ya que viven en un ambiente donde las horas de luz-oscuridad al igual que la temperatura se mantienen artificialmente constantes. Sin embargo, numerosas evidencias indican que existen ritmos estacionales para diversos parámetros, aún en animales mantenidos en condiciones controladas. Por ejemplo, Bissette y colaboradores (18) observaron cambios estacionales en el contenido hipotalámico del factor liberador de la corticotrofina (CRF), la hormona liberadora de la tirotrófina (TRH), la neurotensina y la neuromedina N en ratas adultas criadas desde el nacimiento en un ambiente con 12 horas de luz y 12 de oscuridad. La posibilidad de que factores distintos de la luz puedan influenciar la actividad pineal fue sugerida por otros autores al encontrar ritmos circanuales en la secreción de vasopresina, oxitocina, somatostatina y de sus enzimas de síntesis en animales criados en condiciones constantes de laboratorio (111,61). Por su parte, McNulty y Prechel (138), trabajando con ratas, encontraron variaciones en los niveles de triptofano y serotonina a lo largo del año con un pico durante los meses de invierno. Aunque estos autores no hallaron diferencias en los niveles de melatonina,

Balemans y colaboradores (10) describieron una disminución significativa en primavera y verano. Por el momento, se desconoce la naturaleza de los factores que pueden regular los cambios circanales en condiciones controladas de luz y temperatura. Si bien es posible que factores ambientales, como los campos magnéticos, puedan influir en estos cambios circanales (106), no deben olvidarse los mecanismos oscilatorios endógenos residentes en el sistema nervioso central. En cuanto a los efectos estacionales de la melatonina sobre la CCDA, estos podrían estar relacionados con cambios en la expresión o funcionalidad de los receptores para melatonina involucrados en la modulación inmune. Aunque no hay trabajos que describan variaciones estacionales de los receptores para melatonina en animales que viven en un ambiente controlado, sí se han descrito en el caso de receptores para serotonina (220). Se ha demostrado que muchas de las funciones del sistema inmune exhiben ritmos circanales independientes del fotoperiodo. Así, Brock, M. (27) describió cambios estacionales en las respuestas blastogénicas de esplenocitos murinos a la concanavalina A, fitohemaglutinina y lipopolisacárido, mientras que Pati y colaboradores (155) confirmaron estos resultados y, además, encontraron variaciones estacionales en la actividad NK. Aunque en el caso de la CCDA no se observaron diferencias significativas en los valores controles a lo largo del año, los hallazgos anteriores muestran que las células inmunocompetentes son susceptibles de variar estacionalmente aún en condiciones controladas de luz y temperatura.

Por último cabe señalar que en distintos estudios sobre la actividad inmunomoduladora de la melatonina se ha utilizado un amplio rango de dosis de la

hormona para modificar las funciones inmunes. En efecto, en algunos trabajos fue posible inducir cambios en la inmunidad celular con dosis tan bajas como 10 ug/kg de peso de melatonina (121), mientras que en otros se necesitaron dosis 100 veces más altas (34,44). Es posible que las variaciones estacionales en la actividad inmunoreguladora de la melatonina descritas en esta tesis puedan explicar, al menos parcialmente, estas diferencias.

Las concentraciones de melatonina que se requieren para exacerbar los niveles de CCDA exceden marcadamente los niveles plasmáticos nocturnos. Por ejemplo, con la dosis efectiva en el verano de 0,1 mg/kg de peso se alcanzan niveles séricos de melatonina del orden de ug/ml, mientras que durante el pico nocturno de secreción no se superan los niveles de ng/ml. Aún cuando las dosis usadas en los experimentos que conforman esta tesis están dentro de las consideradas bajas en la bibliografía, son suprafisiológicas y se plantea la posibilidad de que los efectos observados no reflejen lo que ocurre en el animal. Con el objetivo de analizar si la melatonina endógena es capaz de modificar los niveles de CCDA, se procedió a la ablación neonatal de la glándula pineal, es decir se suprimió la secreción circadiana de melatonina desde el nacimiento. Hastings y colaboradores (76) han propuesto que la pineal despliega su mayor funcionalidad durante la maduración postnatal, es decir antes de que el sistema neural que regula la función circadiana se encuentre completamente desarrollado. Por tal motivo, la pinealectomía neonatal se consideró el modelo apropiado para evaluar el papel fisiológico

de la glándula pineal. De manera comparable la extirpación del timo en el neonato provoca una inhibición severa de la inmunidad, mientras que en el animal adulto sus efectos son mucho menos importantes (28).

Los resultados obtenidos mostraron que los esplenocitos provenientes de ratones adultos que habían sido pinealectomizados al nacer inducían menores niveles de CCDA. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la glándula pineal cumple, efectivamente, un papel inmunomodulador fisiológico y sugieren que la producción circadiana de melatonina es necesaria para que se ponga de manifiesto el máximo potencial citotóxico. En concordancia con estas observaciones, Jankovic y colaboradores (86) demostraron que la pinealectomía de ratas adultas conduce a una disminución parcial y transitoria de la reacción de Arthus y la hipersensibilidad retardada a seroalbumina bovina. Por su parte, Del Gobbo y colaboradores (44) encontraron que la ablación de la glándula pineal en ratones provoca la inhibición de la producción de interleuquina-2 (IL-2) y de la actividad NK. Con respecto a la respuesta humoral se ha demostrado que tanto la pinealectomía quirúrgica (86) como la farmacológica (120) disminuyen los niveles de anticuerpos. Considerados en conjunto, estos resultados indican que la ausencia de secreción circadiana de melatonina inhibe la funcionalidad del sistema inmune.

Cuando se analizaron las poblaciones CD4+, CD8+ y MAC-1+ en el bazo de los animales pinealectomizados no se encontraron variaciones con respecto a los ratones con pineal. Tampoco se observaron diferencias significativas en cuanto a la expresión de RFcy, lo que sugiere que el descenso en la actividad citotóxica inducido por la



pinealectomía neonatal se relaciona más con una disminución en el nivel de activación celular que con una menor expresión de los receptores relevantes en la CCDA.

La administración de melatonina a animales pinealectomizados fue capaz de exacerbar la CCDA hasta niveles comparables a los alcanzados por los ratones intactos tratados con la hormona. Sin embargo, la respuesta entre ambos grupos presenta dos importantes diferencias. En primer lugar, en los animales normales, la melatonina debe administrarse a últimas horas de la tarde para que induzca el aumento de los niveles citotóxicos, mientras que en los pinealectomizados es efectiva aún inoculada por la mañana. En segundo lugar, no se observaron variaciones estacionales en ausencia de la pineal, es decir que se pudo exacerbar la CCDA con bajas dosis de melatonina durante todo el año. Estos resultados sugieren que la falta de producción nocturna de melatonina modifica la forma de responder a la melatonina exógena. De hecho, la relación entre la melatonina inoculada y la producción circadiana de la misma parece ser muy compleja y sólo se ha estudiado, en profundidad, en la reproducción estacional de algunos animales. Por ejemplo, en el hámster Sirio la regresión testicular inducida por administración de melatonina es el resultado de las acciones combinadas de la melatonina endógena y exógena (20). En este modelo, el momento de la inoculación de melatonina es crítico siempre que el animal tenga intacta la pineal. Pero no ocurre lo mismo en los hámsters pinealectomizados. También en los estudios sobre pineal y sistema inmune se ha demostrado la importancia de la hora de inoculación de melatonina para que pueda ejercer sus efectos. Así, los primeros ensayos en este campo realizados por Maestroni y

colaboradores (124) mostraron que la exacerbación de la respuesta humoral a glóbulos rojos de carnero sólo se puede inducir administrando la melatonina en la parte final de la fase de luz. De allí en más, este esquema de tratamiento fue adoptado por los distintos grupos que investigaron el papel inmunomodulatorio de la melatonina.

Los datos presentados en esta tesis, al igual que los comentados anteriormente, favorecen el modelo de acción de la melatonina conocido como *de coincidencia interna* (186). Según este modelo, existirían dos ritmos importantes para determinar la respuesta de un sistema dado a la melatonina: el ritmo de secreción de la hormona y un ritmo de sensibilidad a su acción, conocido como "ventana de sensibilidad". En este esquema, el mensaje aportado por la melatonina únicamente es leído cuando el pico de producción coincide con la ventana de sensibilidad. En ausencia de la secreción rítmica de melatonina, es decir en los animales pinealectomizados, este sistema estaría desregulado, por lo que la respuesta a la melatonina exógena se daría con independencia de las variaciones circadianas y circanuales.

Se ha postulado que la melatonina es capaz de regular sus propios receptores en forma negativa (186). Según esta postulación, la melatonina secretada durante la noche inhibiría la expresión de sus receptores al interactuar con ellos. De hecho, algunos trabajos han demostrado variaciones diurnas en la densidad y/o afinidad de los receptores de melatonina en hipotálamo, con un pico al final de la fase de luz (229,52). Estas observaciones han servido de argumento para fortalecer el modelo de coincidencia interna, ya que la mayor expresión de receptores en las últimas horas de la tarde, coincidiría con

la ventana de sensibilidad. Sin embargo, otros autores utilizando técnicas autorradiográficas no han logrado reproducir estos resultados (103). Considerando que los genes que codifican para el receptor de melatonina han sido recientemente clonados, es de esperar que en poco tiempo puedan aclararse estos resultados contradictorios en forma definitiva.

Como se ha señalado, la pinealectomía neonatal disminuye los niveles de CCDA en los ratones hembras adultos. Teniendo en cuenta que los esplenocitos de los ratones recién nacidos alcanzan niveles citotóxicos comparables a los del adulto, se quiso determinar si la pinealectomía neonatal inhibía la CCDA desde el momento mismo de la ablación. Se observó que los niveles citotóxicos en los pinealectomizados permanecen tan altos como en los intactos hasta el día 45 de vida, bajando posteriormente para mantenerse disminuidos por lo menos durante los primeros 4 meses de vida. Una interpretación posible de estos resultados es que la maduración sexual está involucrada en el efecto inhibitorio de la pinealectomía sobre la CCDA; es decir, que para que dicho efecto se manifieste se necesita poseer el patrón hormonal del animal adulto, que se completa aproximadamente, a los dos meses de edad (104).

Los resultados discutidos hasta este momento se obtuvieron en experimentos realizados con ratones hembras. Cuando se estudió tanto el efecto de la administración de melatonina sobre la CCDA como las consecuencias de la pinealectomía neonatal en los machos, no se observaron modificaciones en los niveles citotóxicos comparados con los controles. En relación con la melatonina exógena se encontró que la falta de efectos no

se debe a una menor sensibilidad de los machos a la melatonina, ya que aumentando la dosis inoculada tampoco se logró modificar los niveles de CCDA.

En base a los resultados obtenidos en los machos y debido a que la inhibición de la CCDA por la pinealectomía neonatal en las hembras se observa después de la maduración sexual, es posible pensar que el eje gonadal participe en la modulación ejercida por la pineal sobre la CCDA.

Las diferencias entre machos y hembras con respecto al funcionamiento del sistema inmune, así como la influencia que ejercen las hormonas sexuales en distintas respuestas inmunológicas ha sido ampliamente documentada (67). Estudios realizados en diversas especies de mamíferos demostraron que el nivel de respuesta en las hembras es mayor que en los machos. Así por ejemplo, los ratones hembras desarrollan una respuesta de anticuerpos contra antígenos solubles, como la seroalbúmina bovina, y particulados, como los eritrocitos de carnero, sensiblemente mayor que los machos (209,150). En relación a ciertas patologías autoinmunes, se sabe que las diferencias hormonales entre los sexos son claves para el desarrollo de las mismas. Por ejemplo, las hembras tienen una mayor incidencia de lupus eritematoso sistémico y de artritis reumatoidea y, durante la preñez y el post-parto se observa exacerbación en la sintomatología clínica de ambas patologías (3). Paralelamente, los andrógenos parecen ser protectivos (39).

Tomando en cuenta estos antecedentes se abordó el estudio de la participación de

las gonadas en la regulación de la CCDA por la glándula pineal. Como primera aproximación se evaluó el efecto de la gonadectomía, tanto en hembras como en machos, sobre dicha modulación. Los resultados muestran que la ovariectomía restaura los niveles citotóxicos normales, disminuidos en ausencia de la pineal, sin afectar la CCDA de las hembras intactas. En cuanto a la melatonina exógena se encontró que es capaz de incrementar los niveles citotóxicos aún en hembras ovariectomizadas, lo que sugiere que los mecanismos regulatorios en ambos casos no son idénticos. La imposibilidad de modificar la CCDA en los ratones machos ya sea por administración de melatonina o por pinealectomía neonatal, podría deberse a la ausencia de algún factor indispensable producido por los ovarios. Otra posibilidad sería que la testosterona interfiriera con los efectos moduladores de la glándula pineal. Con el fin de evaluar esta última posibilidad se llevaron a cabo experimentos en animales orquidectomizados. Se encontró que los animales sin testículos tampoco fueron capaces de responder al efecto modulador de la melatonina. Es decir que la falta de respuesta de los machos a la acción reguladora de la glándula pineal sobre la CCDA no puede atribuirse a que los andrógenos interfieran la actividad de la melatonina.

Considerados en conjunto, los resultados indican que la melatonina endógena actuaría a nivel de los ovarios en forma directa o indirecta para modular la CCDA. El modelo más sencillo supone que existe un equilibrio entre hormonas sexuales y melatonina en cuanto a la regulación de la CCDA en las hembras intactas. Cuando se suprime la producción circadiana de melatonina por efecto de la pinealectomía se rompe

este equilibrio, disminuyendo los niveles de CCDA. Finalmente, la extirpación de los ovarios en los animales pinealectomizados restaura el equilibrio primitivo, elevando los niveles citotóxicos a valores semejantes a los del animal intacto.

Numerosas evidencias revelan que la melatonina y las hormonas sexuales femeninas interactúan. Por ejemplo, los esteroides gonadales suprimen la síntesis y secreción de melatonina (221) y sus niveles tienden a ser menores en la fase del ciclo estral (proestro) en que la secreción de estos esteroides es mayor (149). Por su parte, la melatonina ejerce efectos inhibitorios sobre las gonadas (226). Asimismo, se han reportado variaciones en la expresión de receptores para melatonina en las arterias caudal y cerebral anterior de la rata durante el ciclo estral, con una máxima expresión cuando los niveles de estrógeno son mínimos (196). Teniendo en cuenta que existen receptores para melatonina en los ovarios (37), puede pensarse que también están expuestos a la regulación por estrógenos. Finalmente, los receptores para estrógenos presentes en el tejido pineal también se modifican en el curso del ciclo estral y por efecto de la inoculación de estradiol (33). Estas evidencias sugieren que la melatonina y las hormonas gonadales participan de complejos mecanismos de retroalimentación a través de los cuales la glándula pineal y las gonadas se inhiben mutuamente.

De los esteroides gonadales, los estrógenos han sido los más estudiados en relación a sus efectos moduladores sobre el sistema inmune. En general, se considera que son

inhibidores de la inmunidad celular y estimuladores de la inmunidad humoral (67). Por ejemplo, el tratamiento *in vivo* con estrógenos deprime la hipersensibilidad retardada a la tuberculina o la tiroglobulina en conejos y cobayos (88) e incrementa el tiempo requerido para el rechazo de injertos en ratas, ratones y humanos (67). En cuanto a la respuesta inmune humoral, el estradiol estimula la síntesis de inmunoglobulinas a nivel de las células B, en particular, la IgA e IgG (224). Finalmente, se han descrito efectos exacerbadores de los estrógenos sobre la fagocitosis de partículas de carbón e inhibidores de la depuración de eritrocitos sensibilizados con IgG (197). Estos antecedentes llevaron a considerar a los estrógenos como los candidatos más probables para participar de la regulación ejercida por la glándula pineal sobre la CCDA.

En primer lugar, se quiso determinar si la recuperación de los niveles de CCDA mediante la ovariectomía en los animales pinealectomizados se debía a que los estrógenos inhiben la citotoxicidad en ausencia de la pineal. A tal fin se elevaron los niveles plasmáticos de estrógenos utilizando implantes de 17  $\beta$ -estradiol y se encontró que la CCDA de los animales pinealectomizados y ovariectomizados no se modifica con este tratamiento. Tampoco hubo variaciones en los animales intactos. Por el contrario, se observó que el estradiol incrementa los bajos niveles de CCDA de las hembras pinealectomizadas hasta hacerlos comparables con los valores controles. Estos resultados indican, por un lado, que en condiciones normales el aumento en los niveles de estrógenos, al menos en las dosis utilizadas, no altera la CCDA, y por otro lado, que no serían directamente los estrógenos los que inhiben la actividad lítica en las hembras

pinealectomizadas. En segundo lugar, se dosaron los niveles plasmáticos de estrógenos en hembras pinealectomizadas para determinar si la inhibición de la CCDA por la pinealectomía podía correlacionarse con modificaciones de dichos niveles. No se observaron diferencias significativas en los niveles de 17- $\beta$ -estradiol entre animales con o sin pineal sangrados en dos estadios diferentes del ciclo estral: diestro/proestro y estro. Estos resultados son coincidentes con los encontrados por otros autores en rata (205,23), quienes reportaron niveles similares de estrógenos en plasma de animales pinealectomizados durante la edad adulta. Por último, se evaluó el efecto *in vitro* del estradiol sobre la capacidad de los esplenocitos murinos para mediar CCDA. Ninguna de las concentraciones ensayadas modificó los niveles citotóxicos, lo que sugiere que, en caso de participar en la regulación de la CCDA, los estrógenos no actuarían directamente sobre las células efectoras.

El conjunto de resultados obtenidos con los estrógenos no permite contestar la pregunta planteada en un principio, esto es si son los estrógenos los intermediarios en el efecto modulador de la glándula pineal sobre la CCDA. El hecho de que el incremento en los niveles plasmáticos de estradiol actúe en el mismo sentido que la ovariectomía, es decir restaure los valores normales de CCDA disminuidos en las hembras pinealectomizadas, hace pensar que son otros factores relacionados con las gonadas los que actúan como intermediarios en la modulación de la CCDA por la pineal.



**RESUMEN**  
**y**  
**CONCLUSIONES**

El trabajo experimental presentado en esta tesis se realizó con el objetivo de investigar la influencia de la glándula pineal sobre el sistema inmune, eligiéndose como función a evaluar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA). Los experimentos se llevaron a cabo en ratones de la cepa BALB/c de ambos sexos.

Los resultados obtenidos demuestran que:

- 1) La administración de una dosis diaria de melatonina (0,1 mg/kg de peso) por la tarde durante dos días consecutivos en ratones hembras exacerba la CCDA mediada por esplenocitos. El efecto de la melatonina muestra variaciones estacionales siendo necesarias dosis mucho mayores en invierno (50 mg/kg) que en verano (0,1 mg/kg) para modular la CCDA.
- 2) El tratamiento *in vitro* con melatonina no modifica los niveles de CCDA lo que sugiere que la hormona no actúa en forma directa sobre las células efectoras.
- 3) La melatonina no modifica las poblaciones reguladoras CD4+ y CD8+ en el bazo, ni altera el porcentaje de células que expresan el antígeno MAC-1 (CD11b). El mismo tratamiento aumenta tanto el porcentaje de células RFcγ+, como la densidad de receptores expresados por célula.
- 4) La pinealectomía neonatal inhibe la CCDA en las hembras adultas. Esta inhibición no

se correlaciona con una disminución en el porcentaje de células RFcγ+ ni en la densidad de receptores expresados por célula. Tampoco se observan cambios en las poblaciones CD4+, CD8+ y MAC-1+ de los animales Px.

5) La administración de melatonina exagera la CCDA de las hembras Px al nacer en forma independiente de la hora de inoculación y de la época del año.

6) La modulación ejercida sobre la CCDA por la glándula pineal se observa sólo en las hembras, ya que ni la pinealectomía neonatal ni la administración de melatonina modifican los niveles citotóxicos en los ratones machos.

7) La orquidectomía incrementa la CCDA de los ratones con o sin pineal, lo que sugiere que la ausencia de efectos reguladores de la pineal en los machos no puede atribuirse a la interferencia de las hormonas masculinas.

8) La inhibición de la CCDA en las hembras Px se hace evidente después de la maduración sexual. Por su parte, la ovariectomía antes de la edad adulta restaura los niveles normales de CCDA en los animales Px, sin modificarlos en las hembras con pineal.

9) El aumento de los niveles plasmáticos de estrógeno mediante implantes de 17 β-

estradiol, incrementa los niveles de CCDA disminuidos por efecto de la pinealectomía neonatal en las hembras.

10) La pinealectomía neonatal no modifica los niveles basales de estrógenos en plasma.

11) El tratamiento *in vitro* de esplenocitos con 17  $\beta$ -estradiol no modifica los niveles de CCDA, ya sea que las células provengan de hembras Px o Sham Px o de animales intactos tratados con melatonina o vehículo.

Los resultados presentados en esta tesis aportan nuevas evidencias acerca de la regulación de las funciones inmunes por la glándula pineal y sugieren la participación de factores relacionados con el sexo (hormonas, receptores hormonales) en dicha regulación. Asimismo, estos trabajos describen, por primera vez, variaciones estacionales en los efectos inmunomodulatorios de la melatonina.

Considerados en conjunto, los resultados de esta tesis conducen, en un primer análisis, a la conclusión de que la melatonina administrada en forma exógena tiene un efecto exacerbador sobre la CCDA mediada por esplenocitos murinos. Dicho efecto es confirmado a través de los experimentos con animales Px al nacer, los cuales, al carecer de secreción circadiana de melatonina, presentan niveles citotóxicos menores que sus hermanos Sham Px o intactos.

Al profundizar en los **mecanismos** involucrados en dicha modulación el análisis se complica y la interpretación de los resultados se hace difícil. Efectivamente, la participación de factores ligados al sexo es clara: los efectos inmunológicos tanto de la administración de melatonina como de la pinealectomía neonatal, se hacen evidentes **únicamente** en ratones de sexo femenino. Al analizar los factores ligados al sexo que estarían involucrados, se encontró que en las hembras Px tanto la ovariectomía como el incremento de los niveles plasmáticos de estrógenos restauran los valores controles de CCDA. Estos resultados, aparentemente contradictorios, hacen pensar que en la interacción pineal-CCDA participan otras hormonas, no necesariamente los estrógenos, capaces de interactuar con la glándula pineal, como por ejemplo la prolactina o la progesterona.

A diferencia de lo observado en las hembras Px, en las hembras intactas ni la ovariectomía ni los implantes de estrógeno modifican la respuesta a la melatonina exógena. Estos resultados sugieren que al administrar melatonina se observan efectos farmacológicos, mientras que a través de la pinealectomía se manifiestan los efectos fisiológicos resultantes de la ausencia de dicha hormona. Si bien en muchos casos hay coincidencia de efectos, en otros a través de la administración de melatonina se estarían pasando por alto modulaciones más finas y complejas que ocurren en condiciones normales o fisiológicas. Esto no significa, de ninguna manera, que los efectos de la melatonina sean inespecíficos. Como pudo observarse, la melatonina administrada a ratones Px induce modificaciones en la CCDA, independientemente de la hora de

inoculación, con dosis mucho menores que en animales intactos a lo largo de todo el año. Estos resultados sugieren que, en ausencia de la pineal, se pierde la capacidad de responder en forma rítmica a la melatonina, tal vez por una desregulación en la expresión de los receptores de la hormona, y reforzando a la vez la idea de que los efectos observados por administración de melatonina son específicos.

Cualquiera sea la interpretación, esta tesis aporta nuevas evidencias de una estrecha y compleja relación entre los sistemas nervioso, endócrino e inmune. Es válido pensar que las conclusiones parciales y limitadas que puedan obtenerse de cada sistema experimental enriquecen el conocimiento global de tal interrelación.

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized cursive letters, possibly reading 'A. de S.', followed by a horizontal line underneath.

## **BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

- 1- Abo, T.; Kawate, T.; Itoh, K. & Kumagai, K.  
Studies on the bioperiodicity of the immune response: I. Circadian rhythms of human T, B and K cell traffic in the peripheral blood. *J. Immunol.* **126**:1360, 1981.
- 2- Acuña-Castroviejo, D.; Fernández, B.; Castillo, J.L. & del Aguila, C.M.  
Similarity between the effects of suprachiasmatic nuclei lesions and of pinealectomy on gonadotropin release in ovariectomized, sulpiride-treated and melatonin-replaced rats. *Experientia* **49**:797, 1993.
- 3- Ahmed, A. S.; Penhale, W.J. & Talal, N.  
Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanism of sex hormone action. *Am. J. Pathol.* **121**:531, 1985.
- 4- Anderson, C.L. & Looney, R.J.  
Review: Human leukocyte IgG Fc receptors. *Immunol. Today* **7**: 264, 1986.
- 5- Antón-Tay, F.  
Melatonin: Effects on brain function. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* **11**:315, 1974.
- 6- Arent, J.  
Mammalian pineal rhythms. *Pineal Res. reviews* **3**:161, 1985.
- 7- Arendt, J.; Aldhous, M.; Marks, M.; Folkard, S.; English, J. & Marks, V.  
Some effects of jet-lag and its treatment by melatonin. *Ergonomics* **30**:1379, 1987.
- 8- Arendt, J.  
Melatonin. *Clin. Endocrinol.* **29**:205, 1988.
- 9- Arzt, E.S.; Fernandez-Castelo, S.; Finocchiaro, L.M.E.; Criscuolo, M.; Diaz, A.; Finkielman, S. & Nahmod, V.E.  
Immunomodulation by indoleamines: serotonin and melatonin action on DNA and interferon synthesis by human peripheral blood mononuclear cells. *J. Clin. Immunol.* **8**:513, 1988.
- 10- Balemans, M.G.M.; Bary, F.A.M.; Legerstee, W.C. & Van Benthem, J.  
Seasonal variations in HIOMT activity during the night in the pineal gland of 21-day-old male Wistar rats. *J. Neural Trans.* **49**:107, 1980.



- 11- Baratta, M. & Tamanini, C.  
Effect of melatonin on the *in vitro* secretion of progesterone and estradiol 17 $\beta$  by ovine granulosa cells. *Acta Endocrinol.* **127**:366, 1992.
- 12- Basten, A.; Miller, J.F.A.P; Sprent, J. & Pye, J.  
A receptor for antibody on B lymphocytes. I. method of detection and functional significance. *J. Exp. Med.* **135**: 610, 1972.
- 13- Beaven, M.A. & Metzger, H.  
Signal transduction by Fc receptors: the Fc $\epsilon$  case. *Immunol. Today* **14**:222, 1993.
- 14- Berman, L.  
The glands regulating personality, McGrath, College Park, 1921.
- 15- Besedovsky, H.O & Sorkin, E.  
Thymus involvement in female sexual maturation. *Nature* **249**: 356, 1974.
- 16- Besedovsky, H.O.; Sorkin, E.; Kelier, M. & Muller, J.  
Changes in blood hormone levels during the immune response. *Proc. Soc. Exp. Med.* **150**:466, 1975.
- 17- Bindoni, M.; Jutisz, M. & Ribot, G.  
Characterization and partial purification of a substance in the pineal gland which inhibits cell multiplication *in vitro*. *Biochem. Biophys. Acta* **437**:577, 1976.
- 18- Bissette, G.; Griff, D.; Carnes, M.; Goodman, B.; Lavine, M. & Levant, B.  
Apparent seasonal rhythms in hypothalamic neuropeptides in rats without photoperiod changes. *Endocrinol.* **136**:622, 1995.
- 19- Blalock, J.E.  
Production of neuroendocrine peptide hormones by the immune system. En: *Neuroimmunoendocrinology ( Progress in Allergy)* Eds. Blalock, J.E. & Bost, K.L. *Basel Karger* **43**:1, 1988.
- 20- Bartness, T.J. & Goldman, B.D.  
Mammalian pineal melatonin: a clock for all seasons. *Experientia* **45**:939, 1989.
- 21- Bartsch, C.; Bartsch, H.; Fuchs, U.; Lippert, T.H.; Bellman, O. & Gupta, D.  
Stage-dependent depression of melatonin in patients with primary breast cancer. *Cancer Res.* **64**:426, 1989.

- 22- Blask, D.E.  
The emerging role of the pineal gland and melatonin in oncogenesis. En: Extremely low frequency magnetic fields: the question of cancer, eds. Wilson, B.W.; Stevens, R.G. & Anderson, L.E. pp: 319-335, Columbus Ohio: Battelle, 1990.
- 23- Blask, D.E.; Pelletier, D.B.; Hill, S.M.; Wilson, A-L, Grosso, D.S., Wilson, S.T. Wise, M.E.  
Pineal melatonin inhibition of tumor promotion in the N-nitroso-N-methylurea model of mammary carcinogenesis: potential involvement of antiestrogenic mechanisms *in vivo*. J. Cancer Res. Clin. Oncol. **117**:526, 1991.
- 24- Blask, D.E.; Wilson, S.T. & Cemus-Wilson, A.L.  
The oncostatic and oncomodulatory role of the pineal gland and melatonin. Adv. Pineal Res. **7**:235, 1994.
- 25- Brainard, G.C.; Knobler, R.L.; Podolin, P.L.; Lavasa, M. & Lublin, F.D.  
Neuroimmunology: modulation of the hamster immune system by photoperiod. Life Sci. **40**:1319, 1987.
- 26- Britton, S.; Perlmann, H. & Perlmann, P.  
Thymus-dependent and thymus-independent effector functions of mouse lymphoid cells. Comparison of cytotoxicity and primary antibody formation *in vitro*. Cell. Immunol. **8**:420, 1973.
- 27- Brock, M.A.  
Seasonal rhythmicity in lymphocyte blastogenic responses of mice persists in a constant environment. J. Immunol. **130**:2586, 1983.
- 28- Butcher, E.C. & Weissman, I.L.  
Lymphoid tissues and organs. En: Fundamental Immunology, ed. Paul, W.E. pp:117-137, Raven Press, NY., 1989.
- 29- Cagnacci, A.; Elliot, J.A. & Yen, S.S.C.  
Melatonin: A major regulator of the circadian rhythm of core temperature in humans. J. Clin. Endocrinol. Metab. **75**: 447, 1992.
- 30- Capron, A.; Capron, M. & Dessaint, J.P.  
ADCC as primary mechanism of defense against metazoan parasite. En: Fourth International Congress of Immunology. Progress in Immunology IV. Ed.: Fougereau, M. & Dausser, J.C., Inc. pp:782-793, 1980.

- 31- Cardinali, D.P., Lynch, H.J., Wurtman, R.J.  
Binding of melatonin to human and rat plasma proteins. *Endocrinology* **91**:1213, 1972.
- 32- Cardinali, D.P.  
Nuclear receptor-estrogen complex in the pineal gland. Modulation by sympathetic nerves. *Neuroendocrinol.* **24**:333, 1977.
- 33- Cardinali, D.P.; Gejman, P.V. & Ritta, M.N.  
Further evidence of adrenergic control of translocation and intracellular levels of estrogen receptors in rat pineal gland. *Endocrinol.* **112**:492, 1983.
- 34- Caroleo, M.C.; Frasca, D.; Nistico, G.  
Melatonin as immunomodulator in immunodeficient mice. *Immunopharmacol.* **23**:81, 1993.
- 35- Clark, R.A.; Klebanoff, S.J.; Einstein, A.B. & Fefer, A.  
Peroxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-halide system: cytotoxic effect on mammalian tumor cells. *Blood* **45**:161, 1975.
- 36- Clark, R.A. & Klebanoff, S.J.  
Studies on mechanism of antibody-dependent polymorphonuclear leukocyte-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* **119**:1413, 1977.
- 37- Cohen, M.; Roselle, D. & Chabner, B.  
Evidence for a cytoplasmatic melatonin receptor. *Nature* **274**: 894, 1978.
- 38- Coleman, M.P & Reiter, R.J.  
Breast cancer, blindness and melatonin. *Eur. J. Cancer* **28**: 501, 1992.
- 39- Conti, A. & Maestroni, G.J.M.  
Melatonin-induced immuno-opioids: role in lymphoproliferative and autoimmune diseases. *Advances in Pineal Res.* **7**:83, 1994.
- 40- Coobs,C.S.; Shaw,A.R.; Hilman,K. & Schlamowitz,M.  
Assay and partial characterization of detergent solubilized rabbit yolk sac membrane Fc receptors. *J.Immunol.* **124**:1648, 1980.
- 41- Cheng,C.G. & Hawiger,J.  
Affinity and characterization of immunoglobulin G Fc fragment binding glycoprotein from human blood platelets. *J.Biol.Chem.* **254**:2165, 1979.

- 42- Danforth, D.N.; Tamarkin, L. & Lippman, M.E.  
Decreased nocturnal plasma melatonin peak in patients with estrogen receptor positive breast cancer. *Science* **216**: 1003, 1982.
- 43- Danforth, D.N.; Tamarkin, L.; Do, R. & Lippman, M.E.  
Melatonin-induced increase in cytoplasmic estrogen receptor activity in hamster uteri. *Endocrinology* **113**:81, 1983.
- 44- Del Gobbo, V.; Libri, V.; Villani, N.; Calio, R. & Nistico, G.  
Pinealectomy inhibits interleukin-2 production and natural killer activity in mice. *Int. J. Immunopharmacol.* **5**:567, 1989.
- 45- Devecerski, V.  
Contributions à l'étude de l'effet de l'épiphisectomie sur l'histologie du thymus. *Acta Anat.* **54**:352, 1963.
- 46- Diamond, R.D.  
Antibody-dependent killing of *Cryptococcus neoformans* by human peripheral blood mononuclear cells. *Nature* **247**:148,1974.
- 47- Dickler, H.B.  
Lymphocyte receptors for immunoglobulins. *Adv.Immunology* **24**: 167, 1976.
- 48- Dower, S.K.; De Lisi, C.; Titus, J.A. & Segal, P.M.  
The mechanism of binding of multivalent immune complexes to Fcγ receptors. *Biochemistry* **20**:6335, 1981.
- 49- Dubocovich, M.L.  
Pharmacology and function of melatonin receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **16**:50, 1995.
- 50- Ebihara, S., Marks, T., Hudson, D.J., Menaker, M.  
Genetic control of melatonin synthesis in the pineal gland of the mouse. *Science* **231**:491, 1986.
- 51- Ebling, F.J.P. & Foster, D.L.  
Pineal melatonin rhythms and the timing of the puberty in mammals. *Experientia* **45**:946, 1989.

- 52- English, J. & Arendt, A.  
Characterization and circadian rhythmicity of a melatonin binding site in the rat hypothalamus. *J. Reprod. Fertil. Abstr. Series n° 1*, Abstr. 6, 1988.
- 53- Erlich, S.S., & Apuzzo, M.L.J.  
The pineal gland: anatomy, physiology, and clinical significance. *J. Neurosurg.* **63**:321, 1985.
- 54- Fabris, N.  
Neuroendocrine regulation of immunity. *Adv. Pineal Res.* **7**: 41, 1994.
- 55- Fanger, W.M.; Shen, L.; Graziano, R.F. & Guyre, P.M.  
Cytotoxicity mediated by human Fc receptors for IgG. *Immunol. Today* **10**:92, 1989.
- 56- Fernandes, G.; Halderberg, F.; Yunis, E.J. & Good, R.A.  
Circadian rhythmic plaque-forming cell response of spleens from mice immunized with SRBC. *J. Immunol.* **117**:962, 1976.
- 57- Fernandes, G.; Caradente, F. Halberg, E.; Halberg, F. & Goog, R.A.  
Circadian rhythm in activity of lympholytic natural killer cells from spleens of fisher rats. *J. Immunol.* **123**:622, 1979.
- 58- Finocchiaro, L.M.E.; Arzt, E.S.; Fernandez-Castelo, S.; Criscuolo, M.; Finkielman, S. & Nahmod, V.E.  
Serotonin and melatonin synthesis in peripheral blood mononuclear cells: stimulation by interferony as part of immunomodulatory pathway. *J. Interferon Res.* **8**:705, 1988.
- 59- Fornusek, L. & Vétvicka, V.  
Fc receptor. More answers, more questions. *Folia Microbiol.* **29**:476, 1984.
- 60- Fridman, W.H.; Bonnerot, C.; Daeron, M.; Amigorena, S.; Teillaud, J.L. & Sautes, C.  
Structural bases of Fc $\gamma$  receptor functions. *immunol. Rev.* **125**:49, 1992.
- 61- Gauquelin, G.; Gharib, G.; Ghaemmaghani, F.; Allevard, A-M.; Cherbal. F.; Geelen. G.; Bouzegrane, F. & Legros, J.J.  
A day/night rhythm of vasopressin and oxytocin in rat retina, pineal and harderian gland. *Peptides* **9**:289, 1988.

- 62- Gelfand, E.W.; Resh, J.; Prester, M.  
Antibody-mediated target cell lysis by non-immunecells. Characterization of antibody and effector cell populations. *Europ. J. Immunol.* **2**:419, 1972.
- 63- Geffner, J.R.  
Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. En: *Encyclopedia of immunology*. Eds. Roitt, I.M. & Delves, P.J. pp: 100-102, Academic Press, 1993.
- 64- G3n3lez-Brito, A., Troiani, M.E., Menendez-Pelaez, A., Delgado, M.J., Reiter, R.J.  
mRNA transcription determines the lag period for the production of pineal melatonin synthesis in the Syrian hamster pineal gland. *J. Cell Biochem.* **44**:55, 1990.
- 65- Goldman, B.D., Carter, D.S., Hall, B.D., Roychoudry, P., Yellon, S.M.  
Physiology of pineal melatonin in three hamster species. En: Klein, D.C. (ed). *Melatonin Rhythm Generating System*. Karger, Basel, pp 210, 1981.
- 66- Grenenberg, A.H.; Cheever, M.A. & Fefer, D.  
Erradication of disseminated murine leukimia by chemoimmunotherapy with cyclophosphamide and adoptively transferred immune syngeneic Lyt 1<sup>+</sup>2<sup>-</sup> lymphocytes. *J.Exp. Med.* **154**:952, 1981.
- 67- Grossman, Ch.J.  
Regulation of the immune system by sex steroids. *Endocrine Reviews* **5**:435, 1985.
- 68- Guerrero, J.M. & reiter, R.J.  
A brief survey of pineal gland-immune system interrelationships. *End. Rev.* **18**:91, 1992.
- 69- Guerrero, J.M; Calvo, J.R.; Osuna, C. & Lopez-Gonzalez, M.A.  
Binding of melatonin by lymphoid cells in human and rodents. *Adv. Pineal Res.* **7**:109, 1994.
- 70- Gupta, D.  
The pineal gland in relation to growth and development in children. *J. Neural Transm.* **21**:217, 1986.
- 71- Hagan, R.M. & Oakley, N.R.  
Melatonin comes of age? *TIPS* **16**: 81-83, 1995.

- 72- Hanney, C.S.; Kuribayashi, K.; Kern, D.E. & Gillis, S.  
Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature* **291**:335, 1991.
- 73- Hansson, I.; Holmdahl, R.; Mattson, R.  
Constant darkness enhances autoimmunity to type II collagen and exaggerates development collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. *J. Neuroimmunol.* **27**:79, 1990.
- 74- Hansson, I.; Holmdahl, R. & Mattson, R.  
The pineal hormone melatonin exaggerates development of collagen-induced arthritis in mice. *J. Neuroimmunol.* **39**:23, 1992.
- 75- Hansson, I.; Holmdahl, R. & Mattson, R.  
Pinealectomy ameliorates collagen II-induced arthritis in mice. *Clin. Exp. Immunol.* **92**:432, 1993.
- 76- Hastings, M.H.; Vance, G. & Maywood, E.  
Phylogeny and function of the pineal. *Experientia* **45**:903, 1989.
- 77- Hill, S.M. & Blask, D.E.  
Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cell (MCF-7) in culture. *Cancer Res.* **48**:6121, 1988.
- 78- Hogg, N.  
The structure and function of Fc receptors. *Immunology Today* **9**:185, 1988.
- 79- Holm, G.; Engvall, E.; Hammarstrom, S. & Natvig, J.B.  
Antibody-induced hemolytic activity of human blood monocytes. The role of antibody class and subclass. *Scand. J. Immunol.* **3**:173, 1974.
- 80- Hopf, U.; Meyer zum Buschenfelde, K.H. & Dierich, M.P.  
Demonstration of binding sites for IgG Fc $\gamma$  and the third component (C $_3$ ) on isolated rat hepatocytes. *J. Immunol.* **117**:639, 1976.
- 81- Iguchi, H.; Kato, K-I. & Ibayashi, H.  
Age-dependent reduction in serum melatonin concentrations in healthy human subjects. *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism* **55**:27, 1982.

- 82- Ishizaka, K.  
Regulation of the IgE response. *Progress in Immunology*. Vol. 4, pp 815-828. Ed. por Fougereau, M. & Dausset, J. Acad. Press, 1980.
- 83- Isturiz, M.A. & Cardoni, R.L.  
The role of protein synthesis in ADCC. *Cell Immunol.* **31**: 332, 1977.
- 84- Jaldo-Alba, F.; Muñoz-Hoyos, A.; Molina-Carballo, A., Molina-Font, J.A. & Acuña-Castroviejo, D.  
Light deprivation increases plasma levels of melatonin during the first 72 h of life in human infants. *Acta Endocrinol.* **129**:442, 1993.
- 85- Jan, G.J.; van de Winkel & Capel, P.J.A.  
Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunology Today* **5**:214, 1994.
- 86- Jankovic, B.D.; Isakovic, K. & Petovic, S.  
Effect of pinealectomy on immune reactions in the rat. *Immunology* **18**:1, 1970.
- 87- Johnson, L.Y., Vaughan, M.K., Richardson B.A.; Petterborg, L.J., Reiter, R.J.  
Variation in pineal melatonin content during the estrous cycle of the rat. *Proc. soc. Exp. Biol. Med.* **169**:416, 1982.
- 88- Kappas, A.; Jones, H.E.H. & Roit, I.M.  
Effects of sex hormones on immunological phenomena. *Nature* **198**:902, 1963.
- 89- Kappers, J.A.  
Innervation of the epiphysis cerebri in albino rat. *Anatomical Record. Anatomical Record* **136**:220, 1960.
- 90- Katz, P.; Simone, C.B.; Henkart, P.A. & Fauci, A.S.  
Mechanism of antibody-dependent cellular cytotoxicity. The use of effector cells from chronic granulomatous disease patients as investigatives probes. *J. Clin. Invest.* **65**:55, 1980.
- 91- Kavaliers, M.  
Peptides, the pineal gland and thermoregulation. *Prog. Clin. Biol. Res.* **92**:207, 1982.



- 92- Kawate, T.; Hinuma, S. & Kumagi, K.  
Studies on the bioperiodicity on the immune response: II. Co-variations of murine T and B cells and the role of corticosteroid. *J. Immunol.* **126**:1364, 1981.
- 93- Keeling, P.J. & Henson, P.M.  
Lysosomal enzyme release from human monocytes in response to particulate stimuli. *J. Immunol.* **128**:563, 1982.
- 94- Kerbel, R.S. & Davies, A.J.S.  
The possible biological significance of Fc receptors on mammalian lymphocytes and tumor cells. *Cell* **3**:105, 1974.
- 95- Key, M.E. & Haskill, S.  
The role of macrophage-mediated ADCC in defense against disease. A potential antitumor defense mechanism. En: "Macrophage-mediated antibody dependent cellular cytotoxicity. Ed. Koren, H.S., Marcel Dekker, Inc., pp:237-261, 1983.
- 96- Khan, R.; Daya, S. & Potgieter, B.  
Evidence for modulation of the stress by the pineal gland. *Experientia* **46**:860, 1990.
- 97- Klassen, D.K. & Sagone, A.L.  
Evidence for both oxygen and non-oxygen dependent mechanisms of antibody sensitized target cell lysis by human monocytes. *Blood* **56**:985, 1980.
- 98- Klein, D.C., Weller, J.L.  
Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science* **169**:1093, 1970.
- 99- Klein, D.C.  
Circadian rhythms in the pineal gland. En *Endocrine Rhythms* (ed. D.T. Krieger), pp 203-223, Raven Press, New York, 1979.
- 100- Koller, C.A. & LoBuglio, A.F.  
Monocyte-mediated antibody-dependent cell mediated cytotoxicity: the role of the metabolic burst. *Blood* **58**: 293, 1981.
- 101- Kopin, I.J., Pare, C.M.B., Axelrod, J. et al.  
The fate of melatonin in animals. *J. Biol. Chem.* **236**:3072, 1961.

- 102- Kothari, L.S.  
Influence of chronic melatonin on 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene-induced mammary tumors in female hozman rats exposed to continuous light. *Oncology* **44**:64, 1987.
- 103- Laitinen, J.T.; Castre, E.; Vakkuri, O. & Saavedra, J.M.  
Diurnal rhythm of melatonin binding in the rat suprachiasmatic nucleus. *Endocrinol.* **124**:1585, 1989.
- 104- Lang V., Aubert M.L., Conne B.S., Bradtke , and Siznenko P.C. Influence of exogenous melatonin on melatonin secretion and the neuroendocrine reproductive axis of intact males rats during sexual maturation. *Endocrinology* **112**:1578, 1983.
- 105- Lawrence, E.C.; Poplack, D.G.; Holiman, B.J.; Dooley,N.D.; Koski, I.R. & Blaese, R.M.  
Studies of monocytes Fc receptor avidity and monocyte mediated antibody dependent cellular cytotoxicity (MMADCC) in man. En: "regulatory mechanism in lymphocyte activation". Ed. Pick, E. Academic Press, N.Y., vol 7, pp:1-21, 1982.
- 106- Lerchl, A.; Honaka, K.O. & Reiter, R.J.  
Pineal gland magnetosensitivity to static magneto fields is a consequence of induced eletric currents (eddy currents). *J. Pineal Res.* **10**:109, 1991.
- 107- Leslie, R.C.Q.  
Macrophage handling of soluble immune complexes: evaluation of mechanism involved in the selective clearance of complexes from the circulation. *Molecular Immunol.* **22**:513, 1985.
- 108- Lewy, A.J.; Wehr, T.A. & Goodwin, F.G.  
Manic-depressive patients may be supersensitive to ligh. *Lancet* **1**:383, 1981.
- 109- Lewy, A.J.  
Biochemistry and regulation of mammalian melatonin production. In: Relkin R.(ed). *The Pineal Gland.* Elsevier Biomedical, New York, pp 77, 1983.
- 110- Lissoni, P.; Barni, S.; Meregalli, S.; Fossati, V.; Cazzaniga, M.; Esposti, D. & Tancini, G.  
Modulation of cancer endocrine therapy by melatonin: a phase II study of tamoxifen plus melatonin in metastatic breast cancer patients progressing under tamoxifen alone. *British Journal of Cancer* **71**:854, 1995.

- 111- Liu, B. & Burbach, P.H.  
Changes in vasopressin-converting aminopeptidase activity in the rat pineal gland during summer: Relationship to vasopressin contents. *Peptides* 9:1235, 1989.
- 112- Lopez-Gonzalez, M.A.; Calvo, J.R.; Osuna, C.; Rubio, A. & Guerrero, J.M.  
Melatonin potentiates cyclic AMP production stimulated by vasoactive intestinal peptide in human lymphocytes. *Neurosci. Lett.* 136:150, 1992.
- 113- Lopez-Gonzalez, M.A.; Calvo, J.R.; Osuna, C. & Guerrero, J.M.  
Interaction of melatonin with human lymphocytes: evidence for binding sites coupled to potentiation of cyclic AMP stimulation by vasoactive intestinal peptide and activation of cyclic GMP production. *J. Pineal Res.* 12:97, 1992.
- 114- Lopez-Gonzalez, M.A.; Calvo, J.R.; Segura, J.J. & Guerrero, J.M.  
Characterization of melatonin binding sites in human peripheral blood neutrophils. *Biotech. Ther.* 4:253, 1993.
- 115- Lopez-Gonzalez, M.A.; Martín-Cacao, A.; Calvo, J.R.; Reiter, R.J.; Osuna, C. & Guerrero, J.M.  
Specific binding of 2-[<sup>125</sup>I]melatonin by partially purified membranes of rat thymus. *J. Neuroimmunol.* 45:121, 1993.
- 116- Lowel, G.H.; Smith, L.F.; Artenstein, M.S.; Nash, C.S. & Mac-Dermott, R.P.  
Antibody-dependent cell-mediated antibacterial activity of human mononuclear cell. I. K lymphocytes and monocytes are effective against meningococci in cooperation with human immune sera. *J. Exp. Med.* 150:127, 1979.
- 117- Lussenhop, N.; Homes, B.; Cafruny, W.A. & Plageman, P.G.W.  
Acute infection of mice with lactate dehydrogenase elevating virus enhances Fc and complement receptors activity of peritoneal macrophages. *J. Gen. Virol.* 61:25, 1982.
- 118- MacPhee, A.A.; Cole, F.E. & Rice, B.F.  
The effect of melatonin on steroidogenesis by the human ovary *in vitro*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 40:688, 1975.
- 119- Maestroni, G.J.M.; Conti, A.; Pierpaoli, W.  
Role of the pineal gland in immunity: circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. *J. Neuroimmunol.* 13:19, 1986.

- 120- Maestroni, G.J.M.; Conti, A. & Pierpaoli, W.  
The pineal gland and the circadian, opiategic immunoregulatory role of melatonin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **496**:67, 1987b.
- 121- Maestroni, G.J.M.; Conti, A. & Pierpaoli, W.  
Role of the pineal gland in immunity. III. Melatonin antagonizes the immunosuppressive effect of acute stress via an opiategic mechanism. *Immunology* **63**:465, 1988.
- 122- Maestroni, G.J.M.; Conti, A. & Pierpaoli, W.  
Melatonin, stress, and the immune system. En: *Pineal Research Reviews* (ed) Reiter, R.J. New York. pp: 203-216, 1989.
- 123- Maestroni, G.J.M. & Conti, A.  
The pineal hormone melatonin stimulates activated CD4+, thyl+ cells to release opiod agonist(s) with immunoenhancing and anti-stress properties. *J. Neuroimmunol.* **28**:167, 1990.
- 124- Maestroni, G.J.M.; Conti, A. & Pierpaoli, W.  
Role of the pineal gland in immunity: II. Melatonin enhances the antibody response via an opiategic mechanism. *Clin. Exp. Immunol.* **68**:384, 1991a.
- 125- Mandel, T.E.; Phipps, R.P.; Abbot, A.P. & Tew, J.G.  
Long term antigen retention by dendritic cells in the popliteal lymph node of immunized mice. *Immunol.* **43**:353, 1981.
- 126- Marinova, C.; Persengiev, S.; Konarkchieva, R.; Alieva, A. & Patchev, V.  
Melatonin effects on glucocorticoid receptors in rat brain and pituitary significance in adrenocortical regulation. *Int. J. Biochem.* **23**:479, 1991.
- 127- Martín-Cacao, A.; Lopez-Gonzalez, M.A.; Reiter, R.J.; Calvo, J.R. & Guerrero, J.M.  
Binding of 2-[<sup>125</sup>I]melatonin by rat thymus membranes during postnatal development. *Immunol. Lett.* **36**:59, 1993.
- 128- Martin, J.E.; Mckellar, S. & Kelin, D.  
Melatonin inhibition of the *in vivo* pituitary response to luteinizing hormone-releasing hormone in the neonatal rat. *Neuroendocrinol.* **31**: 13, 1980.

- 129- Matre,R.; Kleppe,G. & Tonder,O.  
Isolation and characterization of Fcγ receptors from human placenta. Acta Pathol.Microbiol.Scand.Sect.C. **89**:209, 1981.
- 130- Mattsson, R.; Mattson, A.; Hansson, I.; Holmdahl, R.; Rook, G.A.W. & Whyte, A.  
Increased levels of prolactin during, but no after, the immunization with rat collagen II enhances the course of arthritis in DBA/1 mice. Autoimmunity **11**:163,1992.
- 131- Mellman, I. & Plutner, H.  
Internalization and degradation of macrophage FcγR bound polyvalent immune complexes. J. Cell. Biol. **98**:1170, 1984.
- 132- Metzger, H. & Kinet, J.P.  
How antibodies work: focus on Fc receptors. FASEB J. **2**:3, 1988.
- 133- Metzger, H.  
The receptor with high affinity for IgE. Immunol. Rev. **125**:37, 1992.
- 134- Milcu, S.M. & Pitis, M.  
Contributions a l'etude de la correlation thymo-epiphysaire. Acta Endocrinol. (Bucarest) **9**:13, 1943.
- 135- Mizoguchi,Y. & Horiuchi,Y.  
Localization of IgG-Fc receptors in human renal glomeruli. Clin.Immunol. **24**:320, 1982.
- 136- Mkwanzani, J.B.; Franks, D. & Baker, J.R.  
Cytotoxicity of antibody-coated trypanosomes by normal human lymphoid cells. Nature **259**:403, 1976.
- 137- McMillen, I.C.; Parkington, H.C. & McCance, I.C.  
The effect of isoprenaline on the melatonin output from the fetal and newborn lamb pineal gland *in vitro*. Acta Endocrinol.(Copenh) **121**:773, 1989.
- 138- McNulty, J.A. & Prechel, M.M.  
Circannual analysis of pineal gland indoles and vasotocin-like immuno-reactivity in male rats kept on constant photos chedules and temperature. Biol. Signals **1**:150, 1992.

- 139- Mc Taggard,S.; Burns,W.; White,D. & Jackson,D.  
Fcy receptor induced by herpes simplex virus i) Biological and biochemical properties. J.Immunol. **112**:726, 1978.
- 140- Montovani, A.; Biondi, A. & Peri, G.  
Antibody-dependent tumoricidal activity of human mononuclear phagocytes. En: "Macrophage-mediated antibody dependent cellular cytotoxicity. Ed. Koren, H.S., Marcel Dekker, Inc., pp:19-31, 1983.
- 141- Morrey, K.M.; McLachlan, J.A.; Serkin, C.D. & Bakouche, O.  
Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. J. Immunol. **153**:2671, 1994.
- 142- Muscettola, M.; Tanganelli, C. & Grasso, G.  
Melatonin modulation of interferony production by human peripheral blood mononuclear cells. Advances in Pineal Res. **7**:119, 1994.
- 143- Nair, M.P.N. & Schwartz, S.A.  
Suppression of human natural killer activity and ADCC by cultured human lymphocytes. J. Immunol. **126**:2221, 1981.
- 144- Nathan, C.F.; Brukner, L.H.; Kaplan, G.; Unkeless, J. & Cohn, Z.A.  
Role of activated macrophages in antibody-dependent lysis of tumor cells. J. Exp. Med. **152**:183, 1980.
- 145- Nathan, C.F. & Cohn, Z.A.  
Role of oxygen-dependent mechanism in antibody-induced lysis of tumor cells activated macrophages. J. Exp. Med. **152**:198 , 1980.
- 146- Nishizuka, Y. & Sakakura, T.  
Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. Science **166**:753, 1969.
- 147- Ogata,M. & Shigeta,S.  
Appearence of immunoglobulin G Fc receptor in cultured human cells infected with Varicella Zoster virus. Infect.Immun. **26**:770, 1979.
- 148- Ogle, T.F.; Kitay, J.I. (1976).  
Effects of pinealectomy on adrenal function *in vivo* and *in vitro* female rats. Endocrinol. **98**:20, 1976.

- 149- Ozaki, Y. Wurtman, R.J.; Alonso, R. & Lynch, H.J.  
Melatonin secretion decreases during the proestus stage of the rat estrous cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **75**:531, 1978.
- 150- Paavonen, T.; Anderson, L.C. & Adlercreutz, H.  
Sex hormone regulation of *in vitro* immune response. Estradiol enhances human B cell maturation via inhibition of suppressor T cells in pokeweed mitogen-stimulated cultures. J. Exp. Med. **154**: 1935, 1981.
- 151- Pang, S.F.; Brown, J.M; Crota, L.J.; chambers, J.W. & Rodman, R.L.  
Determination of N-acetyl serotonin and melatonin activities in the pineal gland, retina, Harderian gland, brain and serum of rats and chickens. Neuroendocrinol. **23**:1, 1977.
- 152- Panke, E.S., Rollag, M.D., Reiter, R.J.  
Pineal melatonin concentrations in the Syrian hamster. Endocrinology **104**:194, 1979.
- 153- Paraskevas, R.; Lee, S.T.; Orr, K.B. & Israels, L.G.  
A receptor for Fc in mouse B-lymphocytes. J. Immunol. **108**: 1319, 1972.
- 154- Paterson, A.T.; Rickerby, J. & Simpson, J.  
Possible interaction of melanocyte-stimulating hormone (MSH) and the pineal in the control of territorial aggression in mice. Physiol. Behav. **24**:843, 1980.
- 155- Pati, A.K.; Florentin, I.; Chung, V.; De Sousa, M.; Levi, F. & Mathe, G.  
Circannual rhythm in natural killer activity and mitogen responsiveness of murine splenocytes. Cell. Immunol. **108**: 227, 1987.
- 156- Pearson, G.R.  
*In vitro* and *in vivo* investigations on Antibody-dependent cellular cytotoxicity. Current Topics in Microbiology and Immunology **80**:66, 1978.
- 157- Perlmann, H. & Perlmann, P.  
Contactual lysis of antibody coated chicken erythrocytes by purified lymphocytes. Cell. Immunol. **1**:300, 1970
- 158- Perlmann, H.; Perlmann, P.; Moretta, L. & Ronnholm, M.  
Regulation of IgG antibody-dependent cellular cytotoxicity *in vitro* by IgM antibodies. Mechanism and characterization of effector lymphocytes. Scand. J. Immunol. **14**:47, 1981.

- 159- Perlmann, P. & Holm, G.  
Cytotoxic effect of lymphoid cells *in vitro*. *Adv. Immunology* **11**:117, 1969.
- 160- Perlmann P.; Perlman, H. & Wigzell, H.  
Lymphocyte-mediated cytotoxicity *in vitro*. Induction and inhibition by humoral antibody and nature of effector cells. *Transplat. Rev.* **13**:91, 1972.
- 161- Perlmann, P.; Perlmann, H. & biberfeld, P.  
Specifically cytotoxic lymphocytes produced by preincubation with antibody-complexed target cells. *J. Immunol.* **108**:558, 1972.
- 162- Persengiev, S.; Marinova, Ch. & Patchev, V  
Steroid hormone receptors in the thymus: A site of immunomodulatory action of melatonin. *Int. J. Biochem.* **23**: 1483, 1991.
- 163- Persengiev, S.; Patchev, V. & Velev, B.  
Melatonin effects on thymus steroid receptors in the course of primary antibody responses: significance of circulating glucocorticoid levels. *Int. J. Biochem.* **23**:1487, 1991.
- 164- Perussia, B.; Kobashashi, M.; Rossi, M.E.; Anegon, I. & Trinchieri, G.  
Immune interferon enhances functional properties of human granulocytes: role of Fc $\gamma$  receptors and effect of lymphotoxin, tumor necrosis factor, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol.* **138**:765, 1987.
- 165- Pevet, P., Vivien-Roels, B., Masson-Pevet, M., Steinlechner, S., Skene, D., Canguilhem, B.  
Melatonin, serotonin, 5-hidroxyindole-3-acetic acid and N-acetyltransferase in the pineal gland of the European hamster (*Cricetus cricetus*) kept under natural environmental conditions: Lack of day/night rhythm in melatonin formation in spring and early summer. *J. Pineal Res.* **6**:233, 1989.
- 166- Pierpaoli, W. & Regelson, W.  
Pineal control of aging: effect of melatonin and pineal grafting on aging mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**:787, 1994.
- 167- Pioli, C.; Caroleo, M.C.; Nistico, G. & Doria, G.  
Melatonin increases antigen presentation and amplifies specific and non specific signals for T-cell proliferation. *Int. J. Immunopharmacol.* **15**:463, 1993.



- 168- Plaut, M.; Lichtenstein, L.M. & Henney, C.S.  
Studies on the mechanism of lymphocyte mediated cytotoxicity. III. The role of microfilaments and microtubules. *J. Immunol.* **110**:771, 1973.
- 169- Pollack, S.B. & Kraft, D.S.  
Effector cells which mediate antibody-dependent cell cytotoxicity. II. Ontogeny of effector activity in murine spleen. *Cell. Immunol.* **34**:1, 1977.
- 170- Pollack, S.B. & Emmons, S.L.  
Inhibition of human killer cells by autologous lymphocytes. *J. Immunol.* **122**:718, 1979.
- 171- Pollack, S.B. & Emmons, S.L.  
Cell-cell interactions suppress antibody-dependent cellular cytotoxicity to tumor targets. "Mediation of cellular immunity in cancer by immune modifiers", (ed) Chirigos, M.A. y col.; Raven Press, N.Y.; pp: 225-235, 1981.
- 172- Provinciali, M. & Fabris, N.  
Models and mechanisms of neuroendocrine-immune interactions during ontogeny. *Adv. Neuroimmunology* **1**:124, 1991.
- 173- Pure, E.; Luster, A.D. & Unkeless, J.C.  
Cell surface expression of murine, rat and human Fc receptors by xenopus oocytes. *J. Exp. Med.* **160**:606, 1984.
- 174- Ralph, P. & Nakoinz, I.  
Augmentation of macrophage antibody dependent killing of tumor targets by microtubule inhibitors. *Cell. Immunol.* **70**:321, 1982.
- 175- Ravetch, J.V. & Kinet, J-P.  
Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **9**:457, 1991.
- 176- Redman, J.; Armstrong, S. & Ng, K.T.  
Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science* **219**:1089, 1983.
- 177- Reppert, S.M., Klein, D.C.  
Transport of maternal [<sup>3</sup>H]-melatonin to suckling rats and the fate of [<sup>3</sup>H]-melatonin in neonatal rat. *Endocrinology* **102**:582, 1978.

- 178- Reppert, S.M., Chez, R.A. & Anderson, A.  
Maternal-fetal transfer of melatonin in the non-human primate. *Pediatr. Res.* **13**:788, 1979.
- 179- Reppert, S.M., Perlow, M.J., Klein, D.C.  
Cerebrospinal fluid melatonin, in Wood J.H. (ed): *Neurobiology of Cerebrospinal Fluid 1*. New York:Plenum Press, pp 579-589, 1980.
- 180- Reiter, R.J.  
The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endoc. Rev.* **1**:106, 1980.
- 181- Reiter, R.J., Britt, J.H., Armstrong, J.D.  
Absence of a nocturnal rise in either norepinephrine, N-acetyltransferase, hydroxyindole-O-methyltransferase, or melatonin in the pineal gland of the domestic pig kept under natural environmental photoperiods. *Neurosci. Lett* **81**:171, 1987.
- 182- Reiter, R.J.  
Neuroendocrinology of melatonin. En: Miles A., Philbrick D.R.S., Thompson C. (eds). *Melatonin: Clinical Perspectives*. Oxford University Press, Oxford, U.K., pp 1, 1988.
- 183- Reiter, R.J.  
Pineal gland, cellular proliferation and neoplastic growth: an historical account. In: *The Pineal Gland and Cancer*. Ed. Gupta, D. West Germany, pp 41-64, 1988.
- 184- Reiter, R.J.  
Comparative aspects of pineal melatonin rhythm in mammals. In: Atkins H. (ed). *ISI Atlas of Science: Animal and Plant Sciences*. ISI Press, Philadelphia, vol. 1, n° 2, pp 111, 1988.
- 185- Reiter, R.J.  
The pineal and its indole products: basic aspects and clinical applications . In: Cohen, M.P., Foa, P.P. (eds). *The Brain as an Endocrine organ*. Springer-Verlag, New York, pp 96, 1989.
- 186- Reiter, R.J.  
Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Reviews* **12**:151, 1991.

- 187- Reiter, R.J.; Tan, D-X.; Poeggeler, B.; Chen, L-D. & Menendez-Pelaez, A.  
Melatonin, free radicals and cancer initiation. *Adv. Pineal Res.* 7:211, 1994.
- 188- Richardson, J. & Keeling, M.  
The mechanisms of stress and immunosuppression. *Medical Hypotheses* 7:765, 1981.
- 189- Roy, E.J. & Wilson, M.A.  
Diurnal rhythm of cytoplasmatic estrogen receptors in the rat brain in the absence of circulating estrogens. *Science* 213:1525, 1981.
- 190- Rusak, B. & Zucker, I.  
Neural regulation of circadian rhythms. *Physiol. Rev.* 59: 449, 1979.
- 191- Sandyck, R. & Awerbuch, G.I.  
The pineal gland in multiple sclerosis. *Int. J. Neurosci.* 61:1, 1991.
- 192- Sethi, K.K. & Brandis, H.  
IgG Fc-binding receptors on spermatozoa. *Eur. J. Immunol.* 10:964, 1980.
- 193- Scornick, J.C.; Cosenza, H.; Lee, W.; Kohler, H. & Rowley, D.A.  
Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. I. differentiation from antibody-independent cytotoxicity by "normal" IgG. *J. Immunol.* 113:1511, 1974.
- 194- Scornick, J.C.  
Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. I. Early interactions between effector and target cells. *J. Immunol.* 113:1519, 1974.
- 195- Scott, R.; De Landazuri, M.D.; Gardner, P.S. & Owen, J.J.T.  
Human antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against target cells infected with respiratory syncytial virus. *Clin. Exp. Immunol.* 28:19, 1977.
- 196- Seltzer, A.; Viswanathan, M. & Saavedra, J.M.  
Melatonin-binding sites in brain and caudal arteries the female rat during the estrous cycle and after estrogen administration. *Endocrinol.* 130:1896, 1992.
- 197- Shear, H.L.; Roubinian, J.R.; Gil, P. & Talal, N.  
Clearance of sensitized erythrocytes in NZB/NZW mice. Effects of castration and sex hormone treatment. *Eur. J. Immunol.* 11:776, 1981.

- 198- Shellard, S.A. Whelan, R.D.H. & Hill, B.T.  
Growth inhibitory and cytotoxic effect of melatonin and its metabolites on human tumor cell lines in vitro. *Br. J. Cancer* **60**:288, 1989.
- 199- Shen, L.; Guyre, P.M.; Anderson, C.L. & Fanger, M.  
Heteroantibody-mediated cytotoxicity: Antibody to the high affinity Fc receptor for IgG mediates cytotoxicity by human monocytes that is enhanced by interferon- $\tau$  and is not blocked by human IgG. *J. Immunol.* **137**:3378, 1986.
- 200- Shore, S.L.; Black, C.M.; Mewicz, F.M.; Wood, P.A. & Nahmias, J.  
Antibody dependent cell mediated cytotoxicity to target cells infected with type 1 and type 2 herpes simplex virus. *J. Immunol.* **116**:194, 1976.
- 201- Skurzak, H.M.; Klein, E.; Yoshida, T.O.; Lamon, E.W.  
Synergistic or antagonistic effect of different antibody concentrations on in vitro lymphocyte cytotoxicity in the moloney sarcoma virus system. *J. Exp. Med.* **135**:997, 1972.
- 202- Sudgen, D.  
Circadian changes in the rat pineal tryptophan content: lack of correlation with serum tryptophan. *J. Neurochem.* **33**:811, 1979.
- 203- Sudgen, D.  
Pharmacological effects of melatonin in mouse and rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **227**:587, 1980.
- 204- Tamarkin, L.; Westrom, W.K.; Hamill, A.I. & Goldman, B.D.  
effect of melatonin on the reproductive systems of male and female Syrian hamsters: a diurnal rhythm in sensitivity to melatonin. *Endocrinol.* **99**:1534, 1976.
- 205- Tamarkin, L.; Cohen, M.; Roselle, D.; Reichert, C.; Lippman, M. & Chabner, B.  
Melatonin inhibition and pinealectomy enhancement of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in the rat. *Cancer Res.* **41**:4432, 1981.
- 206- Tamarkin L.; Baird, C.J.; Almeida, O.F.X.  
Melatonin: A coordinating signal for mammalian reproduction?. *Science* **227**:714, 1985.

- 207- Tan, D-X.; Chen, L-D.; Poeggeler, B.; Manchester, L.C. & Reiter, R.J.  
Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J.* **1**:57, 1993b.
- 208- Tapp, E.  
The pineal gland in malignancy. In: Reiter, R.J. (Ed), *Pineal Gland Vol III. Extra-reproductive effects.* CRC Press, Boca Raton, pp 171, 1982.
- 209- Terres, G.; Morrison, S.L. & Habicht, G.S.9  
A quantitative difference in the immune response between male and female mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **49**:67, 1968.
- 210- Trentini, G.P.; Botticelli, C.S.; Silva, C.B.  
Decreased ovarian LH incorporation after melatonin treatment. *Hormone and Metabolic Research* **8**:234, 1976.
- 211- Trinchieri, G. & De Marchi, M.  
Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity in humans. II. Energy requirements. *J. Immunol.* **115**:256, 1975.
- 212- Thomas, J.M.; Thomas, F.T.; Kaplan, A.M.; Lee, H.M.  
Antibody-dependent cellular cytotoxicity and chronic renal allograft rejection. *Transplantation* **22**:94, 1976.
- 213- Unkeless, J.C.; Fleit, H. & Mellman, I.S.  
Structural aspects and heterogeneity of immunoglobulin Fc receptor. *Adv. Immunol.* **31**:247, 1981.
- 214- Unkeless, J.C.  
Function and heterogeneity of human Fc $\gamma$  receptors for immunoglobulin G. *J. Clin. Invest.* **83**:355, 1989.
- 215- Vakkuri, O.; Tervo, J.; Luttinen, R.; Ruotsalainen, H.; Rahkamara, E & leppaluoto, J.  
A cyclic isomer of 2-hydroxymelatonin-a novel metabolite of melatonin. *Endocrinol.* **120**:2453, 1987.
- 216- Van de Winkel, J.G.J. & Anderson, C.L.  
Regulation of Fc $\gamma$  receptors. *J. Leukocyte Biol.* **49**:511, 1991.

- 217- Vaughan, G.M. & Reiter, R.J.  
The Syrian hamster pineal gland responds to isoproterenol in vivo at night. *Endocrinology* **120**:1682, 1987.
- 218- Waldhauser, F.; Weiszenbacher, G. & Tatzler, E.  
Alterations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **66**:648, 1988.
- 219- Wehr, T.A.; Jacobsen, F.M.; Sack, D.A.; Arend, T.J.; Tamarkin, L. & Rosenthal, N.E.  
Phototherapy of seasonal affective disorder. Time of day and suppression of melatonin are not critical for antidepressant effects. *Archs. Gen. Psychiat.* **43**:870, 1986.
- 220- Weiner, N.; Clement, H.W.; Gemsa, D. & Wesemann, W.  
Circadian and seasonal rhythms of 5-HT release subtypes, membrane anisotropy and 5-HT release in hippocampus and cortex of the rat. *Neurochem. Internat.* **21**:7, 1992.
- 221- Weiss, B. & Crayton, J.  
Gonadal hormones as regulators of pineal adenyl cyclase activity. *Endocrinol.* **76**:527, 1970.
- 222- Westmoreland, D.; St Jeor, R. & Raff, F.  
The development of cytomegalovirus infected cells of binding activity for normal human immunoglobulins. *J. Immunol.* **116**:1566, 1976.
- 223- Wilson, M.E.; Lackey, S.; Chikazawa, K. & Gordon, T.P.  
The amplitude of nocturnal melatonin concentration is not decreased by oestradiol and does not alter reproductive function in adolescent or adult female Rhesus Monkeys. *Endocrinol.* **137**:299, 1993.
- 224- Wira, C.R. & Sandoe, C.P.  
Hormonal regulation of Immunoglobulins: influence of estradiol on Igs. A and G in the rat uterus. *Endocrinol.* **106**:1020, 1980.
- 225- Vollrath, L.  
The Pineal Organ. Springer-Verlag, Heidelberg, 1981.
- 226- Wurtman, R.J.; Axelrod, J. & Chu, E.W.  
Melatonin, a pineal substance: effect on the rat ovary. *Science* **141**:277, 1963.

- 227- Yu, Z.H.; Yuan, H.; Lu, Y. & Pang, S.F.  
[125] Iodomelatonin binding sites in spleens of birds and mammals. *Neurosci. Lett.* **125**:175, 1991.
- 228- Zisapel, N.  
Melatonin receptors revisited. *J. Neural Transm.* **73**:1, 1988.
- 229- Zisapel, N.; Nir, I. & Laudon, M.  
Circadian variations in melatonin-binding sites in discrete areas of the male rat brain. *FEDS Lett.* **232**:172, 1988.