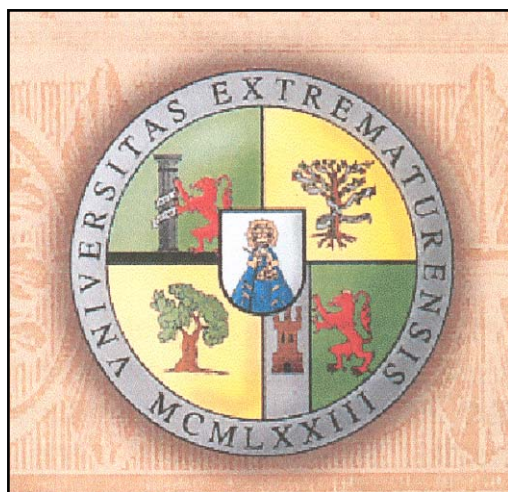


Universidad de Extremadura
Facultad de Ciencias (Sección Biológicas)
Departamento de Fisiología
2004

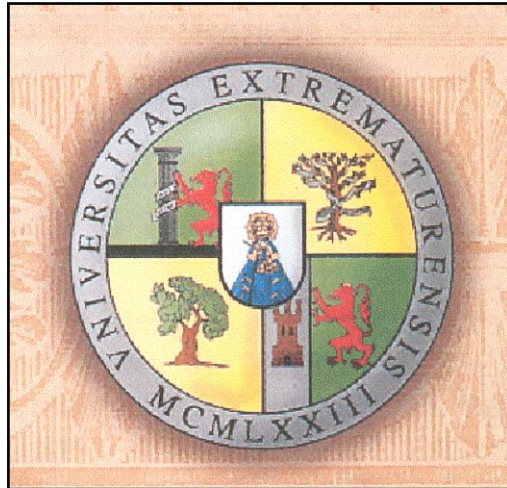


TESIS DOCTORAL

M^a DEL PILAR TERRÓN SÁNCHEZ

“Melatonina: fagocitosis y metabolismo oxidativo en heterófilos de *Streptopelia risoria*. Variaciones con la edad”.

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



**“MELATONINA: FAGOCITOSIS Y METABOLISMO
OXIDATIVO EN HETERÓFILOS DE *STREPTOPELIA
RISORIA*. VARIACIONES CON LA EDAD”.**

Memoria presentada por M^a del Pilar Terrón Sánchez para optar al Grado de Doctor Europeo por la Universidad de Extremadura.

Badajoz, 17 de Diciembre de 2004

La realización de la presente tesis doctoral se ha llevado a cabo gracias al apoyo económico de dos proyectos (Ref.: PM98-0032 y Ref.: BF12002-04583-C02-01) del Ministerio de Ciencia Y Tecnología, y gracias a una Beca de Formación del Personal Investigador (F.P.I.) (Ref.: FIC00B013) de la Consejería de Educación, Ciencia y Tecnología de la Junta de Extremadura, cofinanciado por el Fondo Social Europeo.

ABREVIATURAS

AA-NAT: arylalkilamina N-acetil-transferasa
ABP: Actina binding protein
ADCC: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
AFMK: N-acetil-N-formil-e-metoxikinuramina
AMPc: Adenosín monofosfatos cíclico
ARN: Ácido ribonucleico
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
ATP: Adenosín trifosfato
Ca⁺⁺ e: Calcio extracelular
Ca⁺⁺ i: Calcio intracelular
CAT: Catalasa
DHA: Dehidroascórbico
DNA: Ácido desoxirribonucleico
ETC: Cadena de transferencia de electrones
FAD: Flavín adenín dinucleótido
FSC: Factor estimulador de colonias
GCS: Ganglio cervical superior
GMPc: Guanosín monofosfatos cíclico
GPx: Glutación peroxidasa
GRd: Glutación reductasa
G6PD: Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
GSH: Glutación reducido
GSSG: Glutación oxidado
HIOMT: Hidroxindol-O-metil-transferasa
5-HT: 5-Hidroxitriptofano
IFN: Interferón
IL: Interleukina

Kd: Constante de disociación
LPS: Lipopolisacárido
MAD: Malondialdehido
MIF: Factor inhibidor de los melanocitos
MIOS: Sistema opioide inducido por melatonina
MPO: Mieloperoxidasa
NA: Noradrenalina
NADPH: Nicotín adenín difosfato hidroxilasa
NAT: N-acetil-transferasa
NK: “Natural Killer”
NO: Óxido nítrico
NPV: Núcleo periventricular
NSQ: Núcleo supraquiasmático
PHA: Fitoheмоaglutinina
PMNs: Polimorfonucleares
RI: Radicales libres
RNS: Especies reactivas de nitrógeno
ROI: Oxígeno reactivo intermediario
ROS: Especies reactivas de oxígeno
SCG: Ganglio cervical superior
SNC: Sistema Nervioso Central
SNE: Sistema neuroendocrino
SOD: Superóxido dismutasa
SRBC: Sheep red blood cell
TF: Factor tisular
TNF: Factor de necrosis tumoral
TOPH: Triptófano hidrolasa

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE LA GLÁNDULA PINEAL.....	12
1.1.1.- Reseña histórica.....	12
1.1.2.- Aspectos evolutivos del complejo epifisial y la melatonina.....	15
1.1.3.- Papel fisiológico de la glándula pineal.....	17
1.2. GLÁNDULA PINEAL Y MELATONINA: ASPECTOS GENERALES Y PARTICULARIDADES EN AVES.....	19
1.2.1. Anatomía del complejo epifisial en aves.....	19
1.2.1.1. Fototransducción en el fotorreceptor modificado de aves.....	22
1.2.2. Síntesis y metabolismo de la melatonina.....	23
1.2.2.1. Efecto de la luz sobre la biosíntesis pineal de melatonina.....	25
1.2.2.2. Metabolismo y farmacocinética de la melatonina.....	27
1.2.3. Regulación de la secreción de melatonina.....	28
1.2.3.1. Control intracelular de la biosíntesis pineal de indolaminas en mamíferos.....	31
1.2.3.2. Regulación intracelular de la producción de melatonina en el fotorreceptor pineal no mamífero.....	32
1.2.3.2.1. Nucleótidos cíclicos.....	32
1.2.3.2.2. Ión calcio (Ca ²⁺).....	33

1.2.4. Control de la biosíntesis pineal de indolaminas por el sistema nervioso central.....	34
1.2.5. Receptores de melatonina.....	35
1.2.6. Glándula pineal y ritmos circadianos.....	37
1.2.6.1. Glándula pineal y ritmos circadiano en aves.....	39
1.2.6.2. Las células sintetizadoras de melatonina son relojes circadianos en aves.....	42
1.2.7. Melatonina y especies reactivas de oxígeno: papel antioxidante.....	43
1.2.7.1. Acciones antioxidantes directas de la melatonina.....	44
1.2.7.2. Acciones antioxidantes indirectas de la melatonina.....	45
1.2.7.2.1. Estimulación de enzimas antioxidantes.....	45
1.2.7.2.2. Estimulación de la síntesis de glutatión.....	46
1.2.7.2.3. Acción sinérgica de la melatonina con otros antioxidantes.....	46
1.2.7.2.4. Acción de la melatonina a nivel de las mitocondrias.....	46
1.2.7.3. Antioxidantes clásicos y melatonina.....	47
1.3. INMUNIDAD INESPECÍFICA EN AVES.....	49
1.3.1. Granulocitos.....	50
1.3.2. Funciones de los granulocitos.....	53
1.3.2.1. Propiedades funcionales de los heterófilos: Proceso fagocítico.....	54
1.3.2.1.1. Fagocitosis y desgranulación.....	56
A.- Ingestión de partícula.....	56

B. – Desgranulación.....	59
1.3.3. Destrucción del material ingerido: mecanismos microbicidas.....	60
1.3.3.1. Procesos microbicidas independientes de oxígeno.....	60
1.3.3.2. Procesos microbicidas dependientes de oxígeno.....	62
1.4. CONEXIÓN BIDIRECCIONAL DE LA GLÁNDULA PINEAL Y EL SISTEMA INMUNE. ESTUDIOS EN MAMÍFEROS Y AVES.....	69
1.4.1. Ritmos circadianos y estacionales de la función inmune: correlación con melatonina.....	72
1.4.2. Pinealectomía, burssectomía y sistema inmune.....	73
1.4.3. Papel inmunomodulador de la melatonina.....	75
1.4.3.1. Efecto de la administración de melatonina <u>in vivo</u> sobre el sistema inmune.....	76
1.4.3.2. Regulación <u>in vitro</u> de la actividad celular inmune por melatonina.....	79
1.4.4. Melatonina como un antioxidante en las células fagocíticas.....	84
1.4.5. Mecanismos de acción de la melatonina en las células inmunes.....	86
1.4.5.1. Receptores de melatonina en las células inmunes.....	87
1.4.5.2. Receptores de melatonina en genes del sistema inmune.....	88
1.4.5.3. Señal de transducción en las células inmunes.....	89
1.4.6. Modulación de la función pineal por factores inmunes.....	90

1.5. EDAD, MELATONINA Y SISTEMA INMUNE.....	91
1.5.1. Envejecimiento: Concepto y teorías.....	91
1.5.1.1. Teorías sobre el envejecimiento.....	92
1.5.1.1.1. Envejecimiento genéticamente programado.....	92
1.5.1.1.2. Envejecimiento por acumulación de daño.....	93
1.5.2. Cambios en la secreción de melatonina relacionados con la edad. Posibles causas.....	97
1.5.3. Cambios en la función inmunitaria con la edad (Inmunosenescencia).....	101
1.5.3.1. Relevancia clínica de la inmunosenescencia.....	104
1.5.3.2. Modulación de la respuesta inmune en la Inmunosenescencia: vitaminas antioxidantes.....	105
1.5.4. Relaciones neuroinmunoendocrinas en el envejecimiento.....	107
1.5.5. Conexiones potenciales entre melatonina y envejecimiento.....	109
1.5.5.1. Melatonina, estrés oxidativo y edad: relación con el sistema inmune.....	111
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	101
3. MATERIAL Y MÉTODOS, RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE CADA UNO DE LOS OBJETIVOS (SE PRESENTAN LOS ARTÍCULOS PUBLICADOS CORRESPONDIENTES).....	122
RESULTADOS I: Melatonina y edad: efecto <u>in vitro</u> de concentraciones fisiológicas de melatonina de tórtolas collarizas jóvenes y maduras sobre la función fagocítica de heterófilos animales viejos.....	124

RESULTADOS II: Fagocitosis de <i>Cándida albicans</i> y niveles de anión superóxido en heterófilos de la tórtola collariza (<i>Streptopelia risoria</i>): Efecto de la melatonina.....	131
RESULTADOS III: Estudio comparativo de la función fagocítica en animales jóvenes y viejos de tórtola collariza (<i>Streptopelia risoria</i>) y su relación con los niveles de melatonina.....	137
RESULTADOS IV: Incremento de los niveles plasmáticos de melatonina y de la actividad fagocítica de los heterófilos de tórtolas collarizas viejas (<i>Streptopelia risoria</i>) tras la administración oral de melatonina.....	145
RESULTADOS V: Melatonina: un antioxidante a concentraciones fisiológicas. “Evaluación de la peroxidación lipídica en heterófilos de animales jóvenes-maduros incubados con las concentraciones plasmáticas fisiológicas de melatonina encontradas en esos animales”.....	153
RESULTADOS VI: Melatonina, peroxidación lipídica y edad en heterófilos de la tórtola collariza (<i>Streptopelia risoria</i>). “Valoración de los niveles de peroxidación lipídica en animales jóvenes y viejos.” “Valoración de los niveles de peroxidación lipídica en heterófilos de animales viejos incubados con las concentraciones fisiológicas de melatonina observadas en animales jóvenes”.....	156
4. DISCUSIÓN GENERAL.....	179
5. CONCLUSIONES.....	185
6. BIBLIOGRAFÍA.....	188

1. INTRODUCCIÓN

1.1. INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE LA GLÁNDULA PINEAL.

1.1.1. RESEÑA HISTÓRICA.

“Podemos entonces concebir aquí que el alma tiene su asiento principal en la pequeña glándula que existe en medio del cerebro, desde donde irradia a todas las partes del cuerpo por medio del espíritu animal, a través de nervios e incluso la sangre, participando el espíritu en la función de poder llevar por las arterias a todos los miembros...” (René Descartes en “De Homine”, 1640).

La glándula pineal o epífisis cerebral se conoce desde hace más de 2000 años. Los escritos más antiguos coinciden con la descripción de Galeno (130-200 DC) quien tomó referencias de Herofilus de Alejandría (325-280 AC). Herofilus aparentemente pensaba que la pineal era una válvula que regulaba el flujo del espíritu desde el tercer al cuarto ventrículo. Galeno, sin embargo consideraba que la pineal era una glándula que había que tener en consideración como un órgano que llenaba vacíos entre los vasos sanguíneos y los soportaba. Citas literarias clásicas de la India se refieren a la pineal como un órgano de clarividencia y mediación que también permite al hombre recordar su vida pasada. Hay una abundancia de representaciones del tercer ojo en las imágenes orientales (Figura 1).

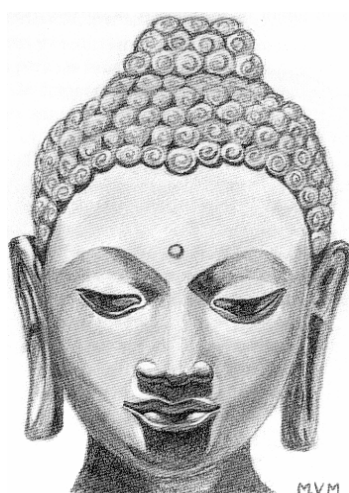


FIGURA 1: Representación de Buda. Se observa el tercer ojo correspondiente al octavo chakra (ājñā). Este tercer ojo simboliza la visión total. (Tomada de González y Valladolid, 1994).

Los estudios de autores clásicos de la medicina Greco-Romana consideran que es una estructura capaz de materializar y transportar el flujo de pensamiento desde el tercer al cuarto ventrículo (Zrenner, 1985).

La primera buena descripción de la pineal deriva originalmente del siglo XV, pero no es hasta el siglo XVI donde se da una descripción de su situación anatómica en el trabajo de Vesalius titulado *De Humanis Corporis Fabrica*. Probablemente el texto antiguo más famoso sobre la pineal es el de René Descartes (1595-1656) quien embelleció la existencia fisiológica y concepciones anatómicas en su libro *De Homine* en el que afirmaba que la pineal es un centro donde el alma recibe la información desde el cuerpo (Figura 2).



FIGURA 2: En “De Homine”, Descartes describe *la luz como imágenes transmitidas a la retina y que estimulan el espíritu animal el cual viaja a través de nervios y activa la glándula pineal.*

Descartes (1662) consideraba que la pineal controlaba el flujo del espíritu animal por los nervios motores y así influenciaba los movimientos del cuerpo. El pensaba que los estímulos de la función pineal venían desde la retina, una intuición más, que efectivamente se ha visto que es verdad hoy día. Usualmente Descartes, atribuyó el

concepto de pineal como el asiento del alma, aunque esta idea deriva probablemente desde Herofilus. Estas antiguas ideas persistieron por muchos siglos y algunas se extendieron hasta el siglo XX.

Voltaire (1694-1778) describió la epífisis como el director del cerebro, guiando la operación de los hemisferios por medio de dos bandas de nervios. Ahlborn en 1884 fue el primero en notificar la remarcada semejanza entre pineal/órgano parietal de algunos poiquiloterms y la estructura de los ojos laterales. Esta fue ciertamente una observación crucial, tanto que lideró el interés extensivo en la historia evolutiva de la pineal en este siglo y en el siglo siguiente. Arendt en 1995 afirmó que el órgano fotosensorial de poiquiloterms llegó a ser la pineal secretora de mamíferos. Esto es firmemente apoyado en la anatomía comparada moderna y se sabe de la influencia de la luz sobre este órgano secretor, la cual puede ser directa o indirecta.

Las primeras observaciones de tumores en la glándula pineal fueron dadas por Heubner y Marburg, junto con otros trabajos, encabezando la conclusión importante de la influencia de la glándula pineal sobre la función reproductiva (Heubner, 1898).

En la mitad del siglo XX, Holmgren observó las células pineales con una actividad secretora, los pinealocitos, de naturaleza similar a las células fotorreceptoras de la retina (Holmgren, 1959). En anfibios, lagartos y algunos peces, la glándula pineal es de naturaleza parietal extracraneal, con estructuras fotoreceptivas parecidas a las lentes o la retina que pueden actuar como un “tercer ojo”. Estas características anatómicas y fisiológicas enuncian a la pineal, incluida la de humanos, para ser el candidato como vestigio de algún órgano visual primitivo (Collin, 1972).

Nuestro primer conocimiento de los mecanismos de control de la glándula pineal deriva de los estudios clásicos de Ariens Kappers sobre la vía de innervación de la pineal desde el ganglio cervical superior del sistema nervioso simpático (Ariens Kappers, 1995). En toda la historia de la investigación de la pineal no hay, sin embargo, ningún descubrimiento más extraordinario o importante que el de la estructura de su principal hormona, la melatonina por Aaron Lerner y colaboradores en 1958. Ellos procesaron cromatográficamente miles de glándulas pineales bovinas e identificaron el compuesto bioactivo N-acetil-5-metoxitriptamina (Lerner y cols., 1958). Le dieron el nombre de

melatonina por sus efectos sobre la pigmentación de la piel de ranas y por su relación química con la serotonina (5-hidroxitriptamina) (Lerner y cols., 1960). Observaron que la melatonina tenía efectos potentes sobre la pigmentación de la piel de muchos animales, aunque los más importantes descubrimientos fueron los relativos a sus efectos antigonadales sobre el sistema reproductivo de mamíferos (Lerner y Nordlund, 1975). Sin embargo, a pesar de su nombre, hay que enfatizar que la melatonina no tiene efectos directos sobre los melanóforos en mamíferos. De forma indirecta, si ha de considerarse que la melatonina tiene una acción estimulante sobre la liberación de MIH (factor inhibidor de los melanocitos) y consiguientemente presenta una acción inhibitoria sobre la producción de melanina (Guyton y Hall, 1997).

1.1.2. ASPECTOS EVOLUTIVOS DEL COMPLEJO EPIFISIAL Y LA MELATONINA.

Tanto el complejo epifisial como la melatonina tienen una antigüedad filogenética extraordinaria. Signos inequívocos han mostrado la existencia del foramen parietal en cráneos de fósiles de ciertos vertebrados del Devónico y Silúrico, ancestros hoy día de peces, anfibios y reptiles, sugiriendo que el órgano pineal ya existía entonces (Roth y Roth, 1980). Sin embargo, a pesar de la pronta aparición de la pineal en vertebrados, la melatonina muestra una mayor antigüedad y un grado de conservación y ubicación muy fuerte.

La presencia de melatonina, con una estructura idéntica a la encontrada en todos los vertebrados, ha sido descrita en : (a) organismos unicelulares , incluyendo la Monera (*Rodospirillum rubrum*) (Poeggeler y cols., 1995), Protistas (*Gonyaulax poluedra*) (Poeggeler y cols., 1991; Hardeland, 1999) y levaduras (*Sacharomuces cerevisiae*) (Hardeland, 1999); (b) plantas (Dubbels y cols., 1995; Hattori y cols., 1995) y (c) en vertebrados (Vivien-Roels y Arent, 1983; Hardeland y Poeggeler, 2003) así como en la langosta migratoria (*Locusta migratoria*), el cangrejo (*Carcinus maenas*), la sepia (*Sepia officinalis*), etc. En plantas, el papel biológico de la melatonina no ha sido aun

clarificado. En otros organismos, sin embargo, su papel ha sido relacionado a la transducción de la información fotoperiódica estacional y circadiana (Haderland, 1993). La mencionada ubicación y conservación de una molécula como la melatonina atrajo la atención de algunos investigadores que trataban de arrojar algo de luz sobre como sus funciones podrían haber evolucionado en una escala evolutiva. Desde el punto de vista químico, la melatonina mostró una inestabilidad y sensibilidad extrema a la luz (Haderland, 1993).

El hecho de que la melatonina actúe como un potente antioxidante, refleja una propiedad de potencial importancia para comprender su papel como un mediador químico de la oscuridad. En el comienzo y por millones de años, la melatonina habría sido originariamente usada como parte del sistema protector antioxidante. En general todas las indolaminas podrían ser usadas para este propósito. Si se compara con otros antioxidantes a pH fisiológico, la melatonina podría ser el más eficiente con respecto a ellos. Sus concentraciones efectivas, sufren oscilaciones que coinciden con el ciclo luz-oscuridad. Esta alternancia podría ser la razón primaria por la cual la melatonina, fue adoptada como un mediador de la información en la oscuridad. También la concentración de las especies reactivas de oxígeno y algunas células expuestas a la luz se ha encontrado que están sujetas a este fuerte ritmo. Esto podría haber sido usado por los ancestros de organismos presentes hoy en día cuyas células y más especialmente su retina y fotorreceptores pineales, habrían sido protegidos de radicales libres de oxígeno. Además es posible que el papel de la melatonina en la evolución filogenética sea la base de las excepcionales propiedades y disponibilidad de la molécula. En el último periodo evolutivo, la síntesis de melatonina podría haberse acoplado a un oscilador circadiano, una conexión que tendría la ventaja de que el ritmo de melatonina sería un indicador en los niveles tanto de luz como de radicales libres de oxígeno (Haderland, 1993; Haderland y cols., 1995). Para los animales, la oscilación de los niveles de melatonina servirían para determinar con gran precisión la hora del día (el reloj de la melatonina) y la estación del año (el calendario de la melatonina), permitiendo hacer cambios fisiológicos y comportamentales necesarios para anticipar con ventaja las fluctuaciones dramáticas ambientales (Reiter, 1993).

1.1.3. PAPEL FISIOLÓGICO DE LA GLÁNDULA PINEAL.

Existen pruebas convincentes de que la glándula pineal se encuentra involucrada en la regulación de los procesos reproductivos de ciertos mamíferos, posiblemente incluso en humanos. Sin embargo, los mecanismos concretos por los cuales la pineal afecta los procesos reproductivos no están claros. Existe la creencia generalizada de que la pineal segrega una hormona que tiene propiedades antigonadotrópicas, y una gran cantidad de datos experimentales señalan a la melatonina, una indolamina, como la antigonadotropina pineal (Wurtman y Axelrod, 1968). Los niveles circulantes de melatonina por la noche se elevan en casi todos los vertebrados, como resultado de un incremento de su síntesis y liberación por la glándula pineal. Este incremento desempeña la función de “señalización hormonal de la noche” y es la base de la coordinación de los ritmos diarios y estacionales con el ciclo día/noche (Figura 3). Por tanto, la señal de melatonina es esencial para la supervivencia de muchos animales con reproducción estacional (Klein y cols., 1992).

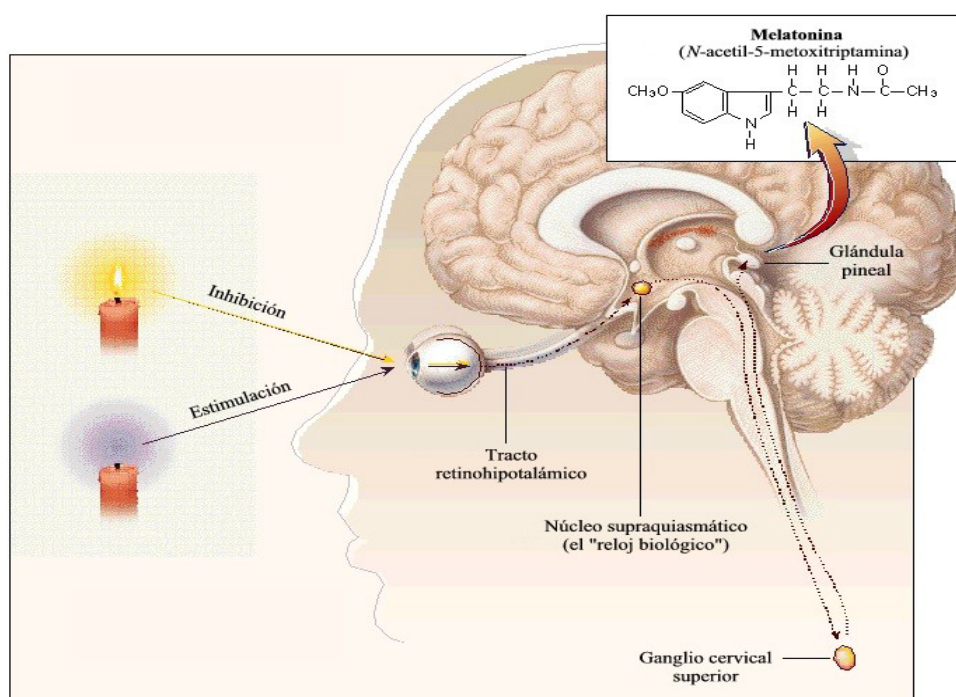


FIGURA 3: Producción y secreción de melatonina a través del sistema neuronal activado por la oscuridad y suprimido por la luz (Tomada de Brzezinski, 1997).

La glándula pineal o epífisis cerebral fue conocida desde la más remota antigüedad (llamó la atención del hombre desde el tiempo de los griegos), asignándole a esta glándula diferentes funciones todas de tipo espiritual. En el transcurso del siglo XIX, las investigaciones microscópicas en los vertebrados estuvieron acompañadas de observaciones clínicas y de estudios experimentales. A principios del siglo XX se comprobó que el órgano fotosensorial de algunos vertebrados evolucionó hasta llegar a ser la glándula pineal secretora de mamíferos (Hadley, 1997).

El posible significado fisiológico de la glándula pineal fue reconocido por primera vez a finales del siglo XIX. Kitay y Alteschule (1954) descubrieron algunas correlaciones entre hechos clínicos y disfunciones pineales, con evidencias claras de la existencia de relaciones entre la pineal y las funciones reproductivas en humanos (Hadley, 1997). Aaron Lerner y colaboradores (1958) buscaban un factor que pudiese ser responsable del vitiligo en humanos (manchas blancas en la piel). Siguiendo los estudios realizados por McCord y Allen (1917) aisló y determinó la estructura de una sustancia pineal, una indolamina a la que llamó melatonina (del griego Melas = oscuridad y tonein = supresión). Este descubrimiento marcó un punto de inflexión en la historia de las investigaciones sobre la pineal. Se observó así que la melatonina, N-acetil-5-metoxitriptamina, tenía efectos muy potentes sobre la pigmentación de la piel de muchos animales, pero no en humanos, aunque los descubrimientos más importantes fueron realizados con sus efectos antigonadales en el sistema reproductor de los mamíferos (Hadley, 1997). A lo largo de los últimos años, a pesar de que todavía se está lejos de entender el exacto papel fisiológico de la melatonina y sus posibles cambios durante la evolución, esta sustancia ha incrementado su interés público como droga contra la edad (Turek y cols., 2000; Reiter, 2000a, b), insomnio y jet lag (Caspi, 2004), estrés (Reiter, 2003), disfunciones inmunes (Guerrero y Reiter, 2002) e incluso cáncer (Skwarlo-Sonta y cols., 2003).

1.2. GLÁNDULA PINEAL Y MELATONINA: ASPECTOS GENERALES Y PARTICULARIDADES EN AVES.

1.2.1. ANATOMÍA DEL COMPLEJO EPIFISIAL EN AVES

El órgano pineal de aves (en el 20% de las aves estudiadas), así como el de peces, anfibios y reptiles, tiene una estructura bipartida: un órgano pineal primario y uno secundario, llamado también tejido pineal accesorio. Por esta razón, algunos autores hablan de un sistema pineal para aves. El órgano pineal primario puede aparecer como una estructura que se extiende desde la región intercomisural del techo del tercer ventrículo en el cerebro (Figura 4).

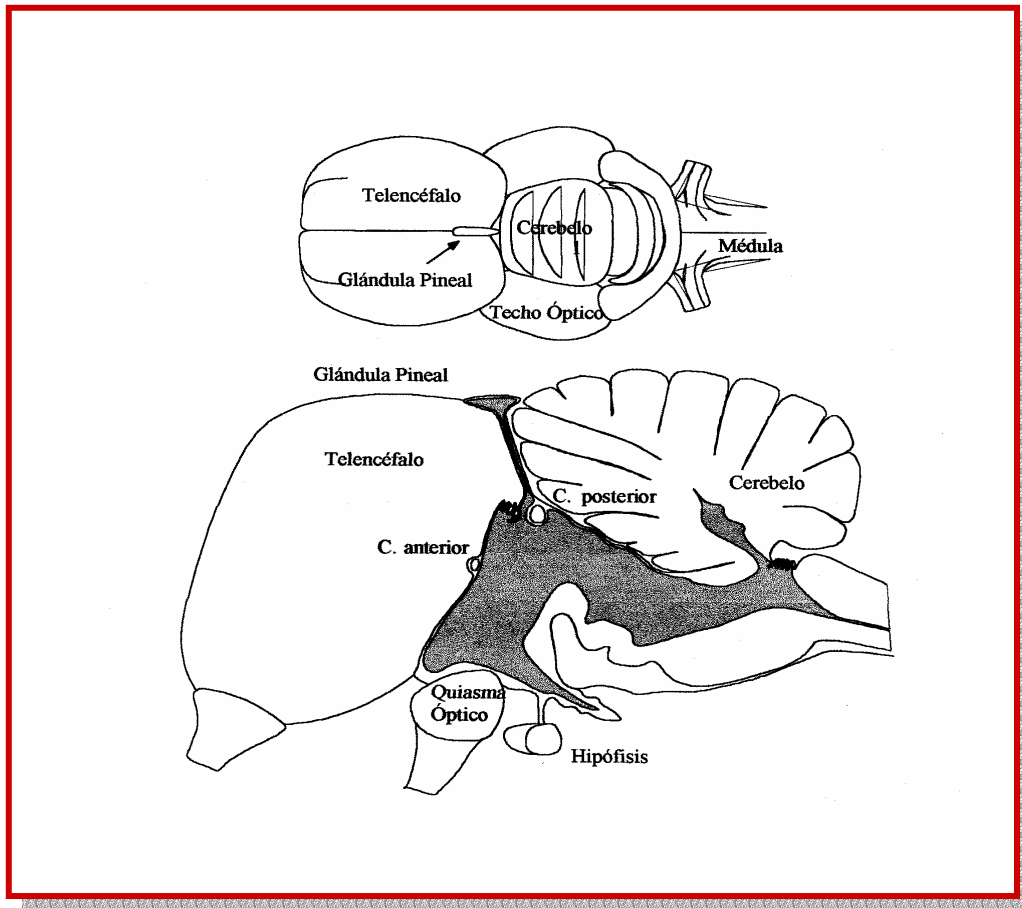


FIGURA 4: El cerebro aviar. A) Vista dorsal. B) Sección medio-sagital mostrando la posición de la glándula pineal entre las comisuras anterior y posterior (Tomada de Barriga y cols., 2004).

El parénquima del órgano pineal aviar presenta varios tipos de células, pero los más claramente definidos son los pinealocitos, los cuales constituyen un grupo de células similares a las células fotorreceptoras pineales de poiquilotermos (Figura 5).

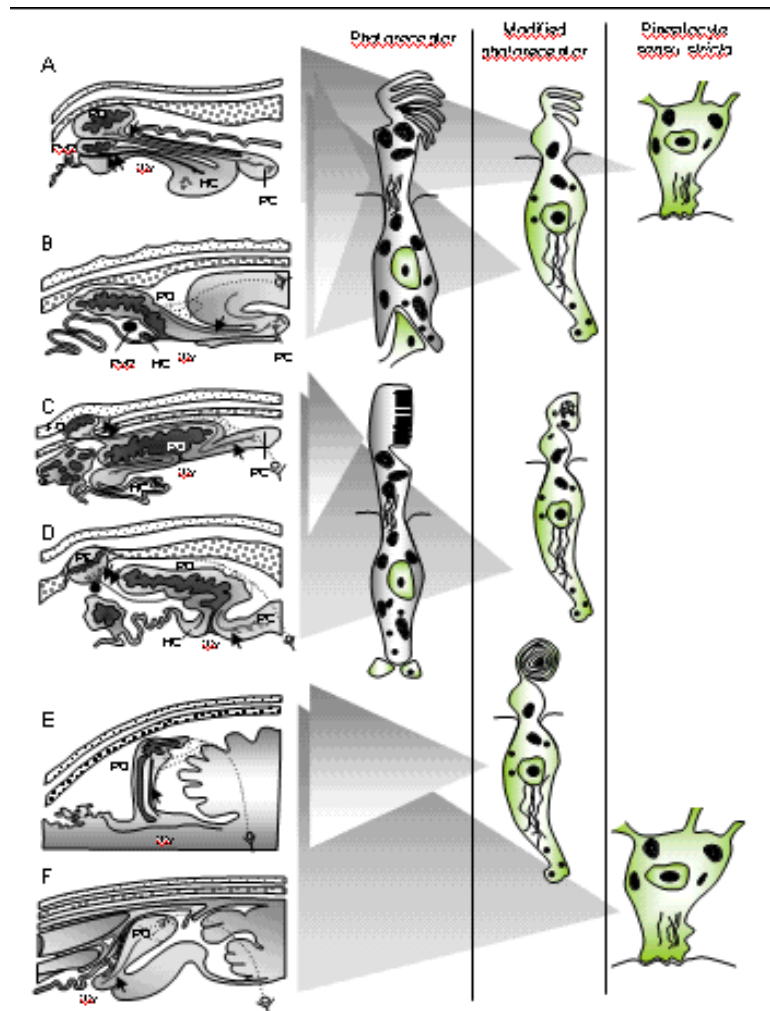


FIGURA 5: Evolución del complejo epifisial en varias clases de vertebrados (A) lampreas; (B) teleosteos; (C) anuros; (D) lagartos; (E) aves; y (F) mamíferos, correlacionado con la evolución de cambios ultraestructurales en los receptores. Excepto en mamíferos, la pineal de los diferentes grupos de vertebrados recibe la información de la luz a través de la piel y de los huesos del cráneo. El órgano pineal (PO) está situado en el techo del diencéfalo, dorsalmente al tercer ventrículo (IIIIV) y entre la comisura habenuar (HC) y la comisura posterior (PC). En poiquilotermos esta asociado con otra estructura fotosensible. El órgano parapineal en peces (PaO), el órgano frontal en anfibios (FO) y el ojo parietal de reptiles (PE). (Tomada de Barriga y cols., 2004).

La principal característica de este tipo de células fotorreceptoras que las distingue de otros tipos de células pineales es la presencia de un corto segmento externo con laminaciones concéntricas. Estas estructuras fueron descritas por primera vez por González y Valladolid (1996) en la especie *Gallus gallus*. El microscopio de transmisión electrónica mostró un equipo de estructuras rudimentarias en forma de zonas concéntricas que se correspondían con los segmentos de las células fotorreceptoras. Más estudios en el microscopio electrónico sobre *Uronlancha domestica* mostraron diferente morfología en estos segmentos externos, con forma bulbosa o alargada. Sus zonas concéntricas podrían estar desordenadas en apariencia como consecuencia de procesos degenerativos (Figura 6).

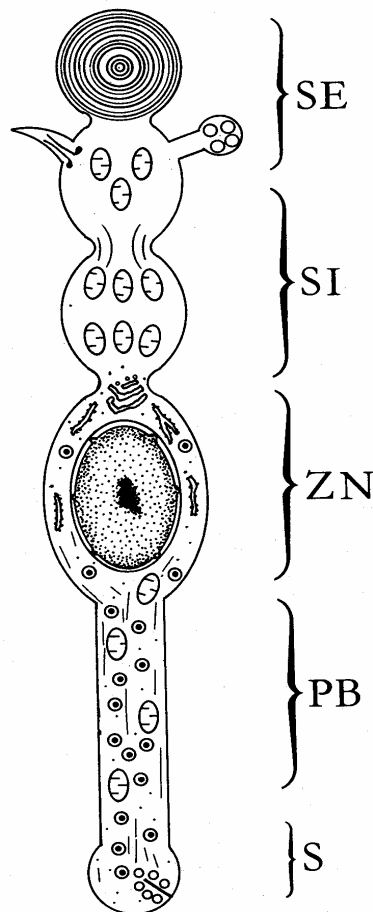


Figura 6: Representación esquemática de una célula fotorreceptora de la pineal o tercer ojo e aves. SE = segmento externo, SI = segmento interno, ZN = zona del núcleo, PB = prolongación basal, S = sinapsis (Tomada de González y Valladolid, 1994).

Hay aun algunas dudas sobre la existencia de conexiones de nervios aferentes, aunque en *Gallus gallus* Collin y colaboradores (1976) y González y Valladolid (1996) describieron a un nivel ultraestructural la presencia de una inervación aminérgica con las vesículas oscuras. La existencia y naturaleza de estas células fotorreceptoras en la glándula pineal de pollos fue confirmada en los trabajos de Binkley y colaboradores (1977) y Goto y colaboradores (1990).

La presencia de gránulos de secreción en los pinealocitos de tipo receptor de pájaros sería un signo de que existe un proceso secretor en estas células. Estos gránulos de secreción han sido descrito en los pinealocitos de *Gallus gallus* y *Columba livia*; se forman en el aparato de Golgi y se acumulan en varios sitios: en las prolongaciones basales y distales en el caso de *Gallus gallus*, *Columbia livia* y *Passer domesticus* o en la perikaria en el caso de *Melopsittacus undulatus* y *Anas platyrhynchos*. La cantidad de estos gránulos de secreción es bastante variable, aunque se han observado con abundancia en *Pica pica* y *Melopsittacus undulatus*. Posiblemente estos gránulos tengan una función serotoninérgica (González y Valladolid, 1996).

1.2.1.1. Fototransducción en el fotorreceptor modificado de aves.

El órgano pineal de aves tiene una serie de características particulares. Así y mediante electrofisiología no se ha detectado que la pineal en aves sea directamente fotosensible (Morita, 1966; Ralph y Dawson, 1968). Además, el fotoperiodo es capaz de sincronizar la producción de un ritmo de melatonina en órganos pineales de aves aislados. Se ha descubierto mediante técnicas de patch-clamp un canal catiónico dependiente de GMPc en células aisladas de la pineal de pollo, sugiriendo que un mecanismo de fototransducción similar al descrito en la retina podría tener lugar en los receptores modificados de aves (Dryer y Henderson, 1991; 1993; D'Souza y Dryer, 1995). Así fueron descritas moléculas de fotopigmentos en los fotorreceptores modificados, así como un componente similar a la opsina en la pineal de varias especies (codorniz, paloma, periquito, pollo y canario) (Vigh y Vihg-Teichmann, 1981; Araki y cols., 1992). También fue clonada una segunda molécula de fotopigmento, específica de

la glándula pineal de ave (Okano y cols., 1994; Max y cols., 1995), denominándose a esta molécula pinopsina, la cual en presencia de 11-cis-retinal, muestra sensibilidad al color azul ($\lambda_{\text{max}}=470$ nm) (Okano y cols., 1994). Un dato interesante es que el tratamiento in vivo con noradrenalina inhibe el proceso de expresión de la rodopsina en células pineales en estados embrionarios tempranos. Se ha propuesto que la inervación simpática de la pineal contribuye a la inhibición de la expresión de caracteres sensibles (Araki y cols., 1992).

El cromóforo 11-cis-retinal fue descubierto en glándulas de pollo (Sun y cols., 1993), presentando altos niveles durante la noche y bajos durante el día, induciendo isomerización a todo-trans-retinal (Sun y cols., 1991; 1993). Finalmente en la pineal de aves hay otros componentes de la fototransducción, como la subunidad α de la transducina (Okano y cols., 1997), el antígeno S y la recoverina (Mirshahi y cols., 1984; Korf y cols., 1992; Bastianelli y Pochet, 1994).

1.2.2. SÍNTESIS Y METABOLISMO DE LA MELATONINA.

Aunque en la glándula pineal de diversas especies se han detectado sustancias de naturaleza química muy variada, incluyendo diferentes neuropéptidos, las únicas cuya producción y secreción por parte de las células pineales han sido concluyentemente demostrada son indolaminas sintetizadas a partir del triptófano circulante, de las cuales la melatonina es el principal producto de secreción (Alonso, 1999). Además de ser sintetizada en los pinealocitos, la melatonina también es sintetizada en otras muchas células, tales como células enterocromafines del intestino (Huether y cols., 1992), plaquetas sanguíneas (Launay y cols., 1982), células mononucleares de sangre periférica (Finocchiaro y cols., 1988; 1991; 1995), células de medula ósea (Tan y cols., 1999; Conti y cols., 2000), así como en tejido ovárico de rata (Itoh y cols., 1997) y humano (Itoh y cols., 1999). En un estudio reciente realizado por Stefulj y colaboradores (2001) se ha demostrado que diversos tejidos como el fundus del estómago, intestino, testículos, medula espinal, corteza cerebral, núcleo del rafe y núcleo estriado, cuentan con cantidades suficientes de ARNm de las enzimas N-

acetiltransferasa (NAT) e hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT), estando así equipados con las herramientas necesarias para la síntesis de melatonina.

La biosíntesis pineal de indolaminas comienza con la captación del triptófano a través de un mecanismo de transporte activo que está bajo control adrenérgico (Alonso, 1999). Dentro de la célula el triptófano se convierte en 5-hidroxitriptófano por la enzima triptófano hidrolasa. La enzima 5-hidroxitriptófano descarboxilasa actúa sobre el 5-hidroxitriptófano para formar 5-hidroxitriptamina (5-HT) o serotonina (Hadley, 1997). La concentración de serotonina en la pineal es muy elevada en todas las especies (niveles elevados durante las horas de luz y reducidos durante las horas de oscuridad). A partir de este momento, la vía más importante en el metabolismo pineal de la serotonina implica su transformación en N-acetilserotonina por acción de la NAT, enzima que constituye el paso limitante en la síntesis de melatonina y presenta un marcado ritmo circadiano en todas las especies estudiadas, con niveles máximos durante las horas de oscuridad. Finalmente, la N-acetilserotonina es convertida mediante la O-metilación por medio de la HIOMT en melatonina (Wurman y Axelrod, 1968) (Figura 7).

Aunque el paso de la acetilación a N-acetilserotonina es necesario en la biosíntesis de la melatonina, también puede producirse una desaminación de la serotonina por las monoaminooxidasas en la misma pineal. El producto desaminado resultante puede continuar su oxidación a ácido 5-hidroxiindolacético o puede reducirse a 5-hidroxitriptofol. Estos últimos productos son susceptibles de transformación por la HIOMT para dar ácido 5-metoxindolacético y 5-metoxitriptofol.

La melatonina circulante es transportada en el plasma en parte unida a albúmina (70%) y en parte en forma libre (30%). La mayor parte de la melatonina circulante es inactivada mediante conservación hepática en 6-hidroxi melatonina y es secretada en orina en forma de sulfatos (75%) o glucurónicos (5%). Otra fracción es transformada en el cerebro en compuestos derivados de la quinurenamina (15%) y una pequeña fracción es excretada en forma libre (0,5%) (Alonso, 1999).

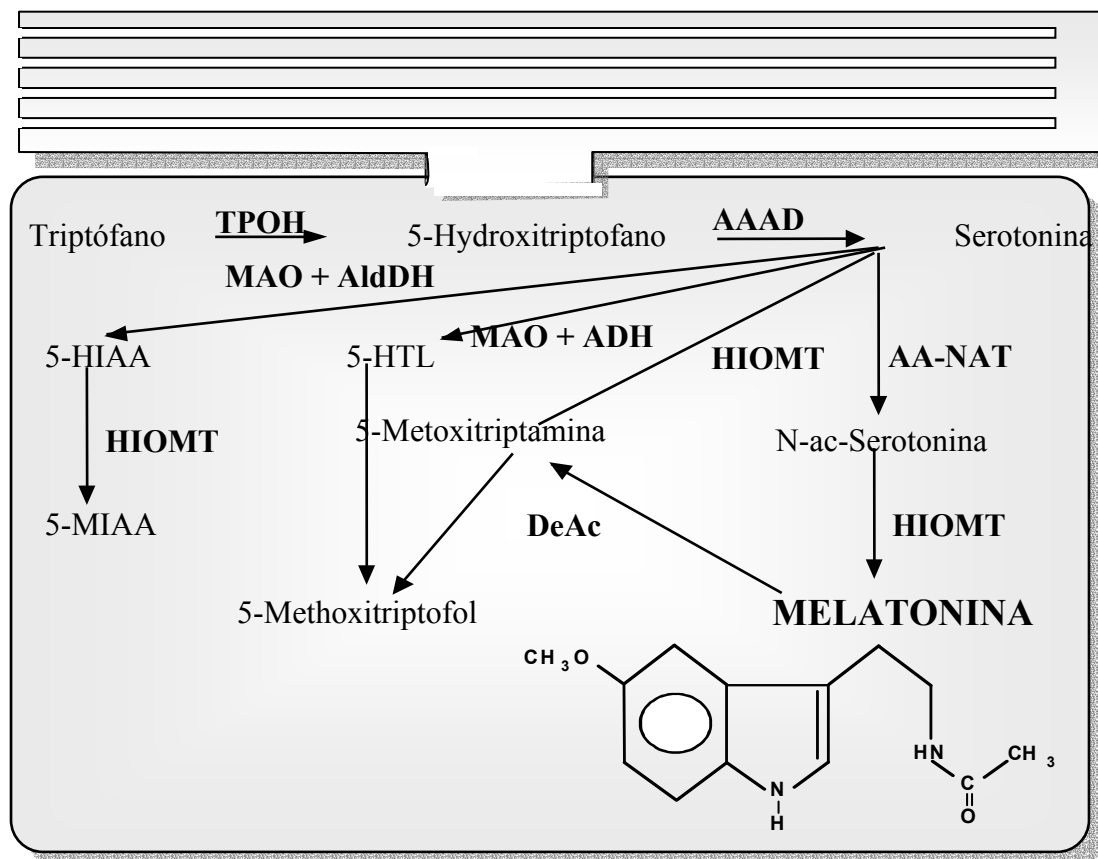


FIGURA 7: Vías del metabolismo de los indoles en las células fotosensibles pineales. Enzimas: AAAD, descarboxilasa de aminoácidos aromáticos; AA-NAT, arilalquilamina N-acetiltransferasa; DeAc, deacetilasa; HIOMT, hidroxindol-O-metiltransferasa; MAO, monoamino oxidasa; TOPH, triptófano hidrolasa. Indoles: N-Ac-serotonina, N-acetilserotonina; 5-HIAA, ácido 5-hidroxitriptofol; 5-MIAA, ácido 5-metoxitriptofol. La estructura química de la melatonina se muestra en la parte de debajo de la figura. (Tomada de Barriga y cols., 2004).

1.2.2.1. Efecto de la luz sobre la biosíntesis pineal de melatonina.

La síntesis y liberación pineal de la melatonina a la circulación está bajo influencia del ciclo luz/oscuridad (Liebmann y cols., 1997). La síntesis de melatonina en la pineal de rata se ve muy afectada por las señales luminosas recibidas de los ojos. Durante la noche se produce un incremento de la actividad de la N-acetiltransferasa que presenta valores de 10 a 100 veces mayores que los que presenta durante el día. Como

consecuencia se incrementa la concentración de N-acetilserotonina a valores de 10 a 30 veces mayores que los que existen durante el día. La actividad de la HIOMT también se incrementa y con ella los niveles pineales de melatonina. La luz deprime rápidamente la actividad de los enzimas pineales. Las concentraciones intrapineales de serotonina sufren cambios diurnos muy marcados, alcanzándose los niveles más altos durante las horas del día, y los más bajos durante la noche, probablemente porque la serotonina es el sustrato de la N-acetiltransferasa, y es convertida a N-acetilserotonina durante el periodo de máxima actividad del enzima (Klein y Weller, 1970).

Si se invierten las condiciones de luz exterior, se invierten de modo paralelo las actividades enzimáticas y la biosíntesis pineal de indolaminas. Por lo tanto, se da un ritmo diario de actividad pineal que está controlado por los cambios naturales diarios en la duración de la iluminación. Este ritmo se pierde si se dan condiciones de iluminación continua, mientras que se mantiene, aunque disminuido, si los animales se mantienen en la oscuridad. Algún lugar concreto del sistema nervioso central (SNC) puede ser el responsable de la producción de una señal cíclica que a su vez mantenga el ritmo de la actividad pineal. En el figura 8 se representa el ritmo de biosíntesis de indolamina pineal en el pollo (Binkley, 1979; Binkley, 1988).

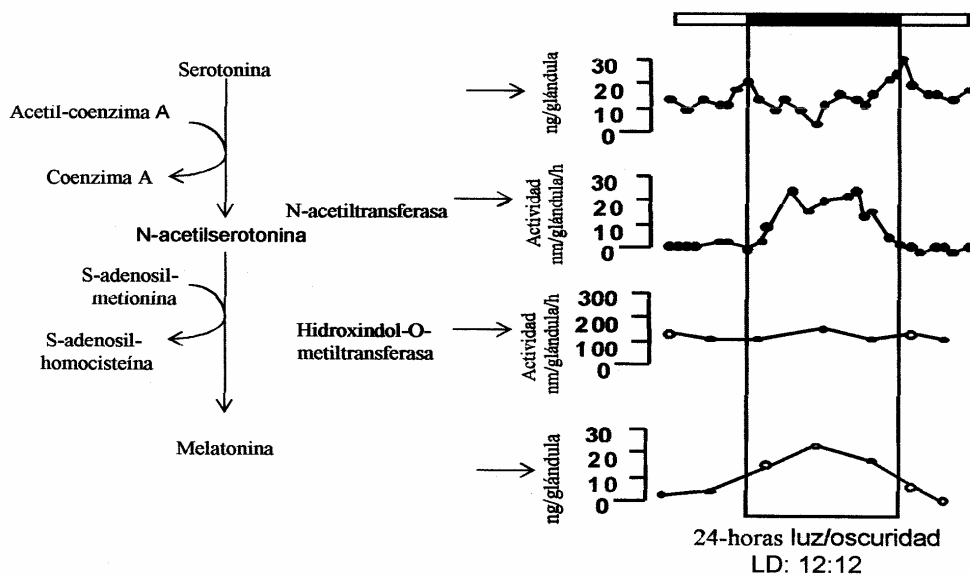


FIGURA 8: Medidas diarias de la actividad de la NAT y de la HIOMT así como del contenido de serotonina y de melatonina en la glándula pineal de pollo (Tomada de Hadley, 1997).

1.2.2.2. Metabolismo y farmacocinética de la melatonina.

La degradación de la melatonina se produce en primer lugar en el hígado y secundariamente en el riñón. En el hígado sufre una 6-hidroxilación, siendo excretada fundamentalmente en la orina en forma de compuestos sulfatados o glucuronados (Kopin y cols., 1961). En humanos, no obstante, el 90% de la melatonina suele estar en forma de 6-sulfatoximelatonina en plasma y/u orina. La ruta del metabolismo que aparezca depende de la vía de administración. Pero la melatonina alternativamente también es diacetilada a 5-metoxitriptamina, la cual es diaminada a ácido 5-metoxiindolacético y a 5-metoxitriptofol (Cahill y Besharse, 1989). Esto se produce principalmente en la retina, aunque también en hígado. En el cerebro y en la glándula pineal, la melatonina es metabolizada por la indolamina 2,3-dioxigenasa, eliminando el anillo indol (Fujiwara y cols., 1978). Estos metabolitos que se forman en el cerebro pueden tener actividad fisiológica y actuar como la melatonina en los ciclos circadianos,

además de ser inhibidores de la síntesis de prostaglandinas. La melatonina exógena es desmetilada a N-acetilserotonina y más tarde es hidroxilada y conjugada, pero aun no se sabe con certeza si esta vía es de importancia endógena. La N-acetilserotonina puede tener funciones por sí misma además de ser el precursor de la melatonina (Arendt, 1995).

La vida media de la melatonina en circulación es de aproximadamente 10 minutos (Illnerova y cols., 1978; Yellon, 1996). La melatonina oral muestra picos en humanos después de 60 minutos y fase de eliminación de 3 a 45 minutos, sin embargo se observan grandes variaciones individuales en la concentración plasmática de melatonina que son atribuidas a las diferencias en la absorción (Aldhous y cols., 1985). Tras alcanzar un pico máximo, la concentración en plasma de melatonina permanece por encima de los valores normales de 3 a 7 horas después de la administración de dosis orales en un rango de 2 a 5 mg. La infusión intravenosa en humanos, que evita el problema de la variación en absorción de los individuos, ha confirmado que la sulfatación es la mayor vía metabólica en humanos (Arendt, 1995).

1.2.3. REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE MELATONINA.

En vertebrados, la glándula pineal es un órgano neuroendocrino que convierte la información externa (fotoperíodo) en un mensaje interno (hormonal) para la regulación de los sitios diana periféricos, a través del torrente sanguíneo (Reiter, 1989).

La melatonina es la hormona producida por la glándula pineal y su síntesis se caracteriza por incrementarse nocturnamente o durante la oscuridad. La magnitud y duración en el incremento nocturno en la síntesis de melatonina es dependiente de la longitud de la fase de oscuridad del ciclo fotoperiódico, y actúa como “reloj” y “calendario” para la regulación de otras actividades biológicas. Esto ocurre en todas las especies de vertebrados, indiferente a su actividad locomotora nocturna o diurna, siendo de este modo un mensaje de la oscuridad y no del descanso o periodo de sueño (Illnerova y cols., 2000).

En mamíferos, la síntesis pineal de melatonina es conducida por un oscilador circadiano en el núcleo supraquiasmático hipotalámico (SCN) a través de una vía neural multisináptica que incluye terminales nerviosos simpáticas que se proyectan desde el ganglio cervical superior a la glándula pineal. Las elevaciones nocturnas en la estimulación noradrenérgica (NA) vía receptores β y α_1 -adrenérgicos sobre los pinealocitos, incrementa la concentración intracelular de adenosin monofosfato cíclico (AMPC), el cual activa la arylalkilamina N-acetil-transferasa (AA-NAT) (Vacas y cols., 1985), la penúltima y enzima llave en la síntesis de melatonina desde el triptófano (Takahashi y cols., 1989). Las concentraciones de melatonina en la pineal y en sangre además reflejan el ritmo circadiano en la actividad pineal AA.-NAT (Figura 9), los cuales están también positivamente correlacionados con los niveles de AMPC en los pinealocitos (Falcon y Begay, 1998).

Un ritmo circadiano similar al de mamíferos en la producción de melatonina está también presente en aves, aunque los pinealocitos aviares tienen una fotosensibilidad directa (Collin y cols., 1989; Cassone y Natesan, 1997). Los pinealocitos aviares, además, tienen receptores α_2 -adrenérgicos además de receptores β y α_1 y su activación ocurre en la fase de luz, causando un descenso en el contenido de AMPC, una inhibición de la actividad AA-NAT y una disminución en la liberación de melatonina (Zatz y Mullen, 1988) (Figura 10).

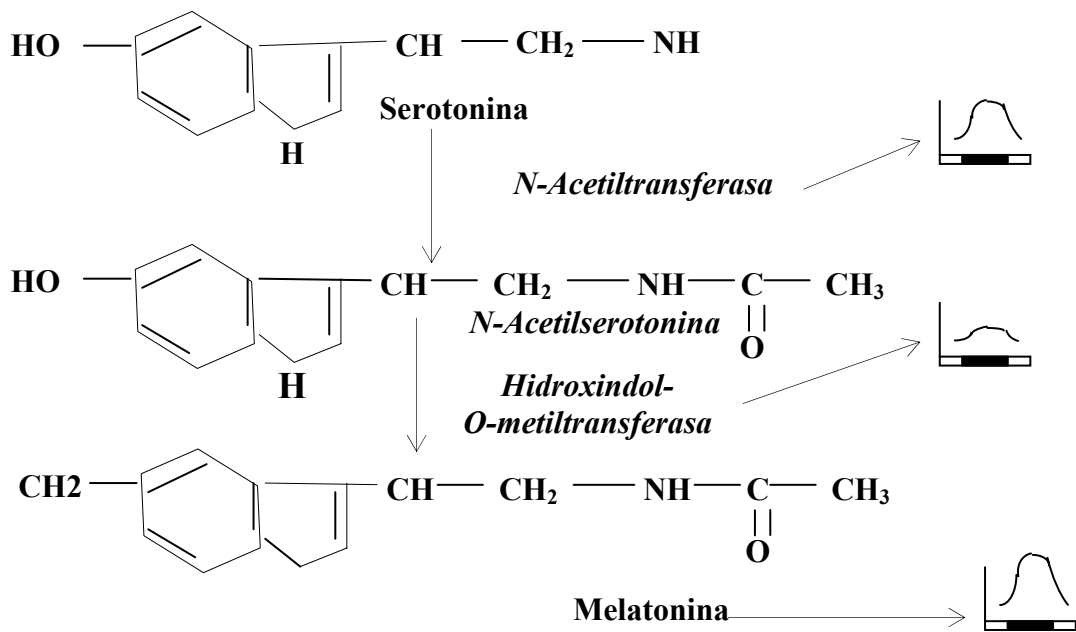


FIGURA 9: Vía de biosíntesis de melatonina. Los gráficos a la derecha muestran la relación típica entre las enzimas respectivas, condiciones de luz y niveles de melatonina en la glándula pineal (De acuerdo con Reiter ,1993; Bernard y cols., 1999).

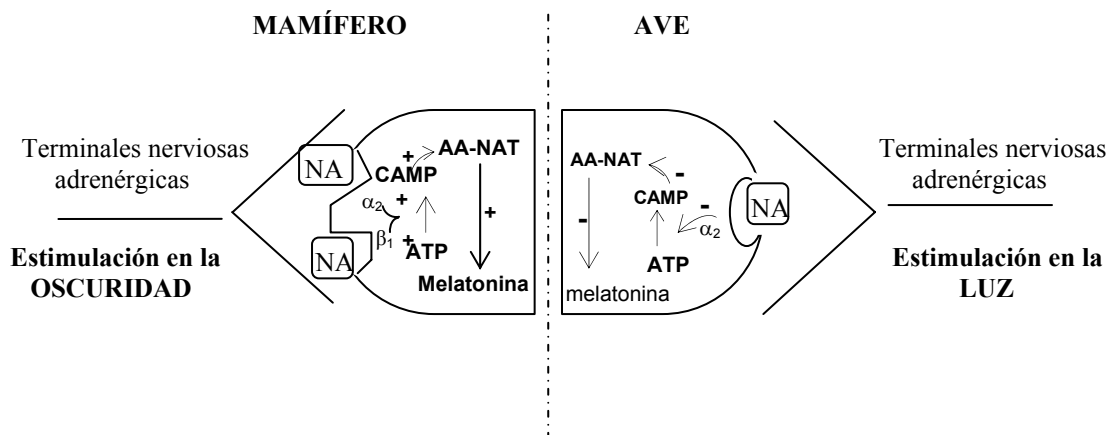


FIGURA 10: Regulación adrenérgica de la síntesis de melatonina en pinealocitos de mamíferos y aviares. En mamíferos, la NA liberada desde los nervios terminales simpáticos ocurre en la oscuridad. La unión de la NA a receptores β y α_1 -adrenérgicos sobre los pinealocitos, estimula la formación de AMPc, la cual activa AA-NAT, incrementando los niveles de melatonina (Vacas y cols., 1985). En pájaros, la liberación de NA ocurre en la luz. La unión de NA a receptores α_2 -adrenérgicos sobre los pinealocitos inhibe la formación de AMPc, bloqueando la actividad AA-NAT y descendiendo los niveles de melatonina (Zatz y Mullen, 1988; Collin y cols., 1989).

1.2.3.1. Control intracelular de la biosíntesis pineal de indolaminas en mamíferos.

En los mamíferos, la pineal ya no es directamente sensible a la luz, y la información fotoperiódica es transmitida exclusivamente a través de la retina, el oscilador extrapineal situado en el NSQ y mediante la liberación de NA de las fibras simpáticas. La NA liberada por las neuronas postganglionares del ganglio cervical superior interacciona con los receptores β -adrenérgicos de los pinealocitos, lo que produce un incremento en la producción de AMPc (Hadley, 1997). Usando agonistas α y β -adrenérgicos Sugden y colaboradores (1984) mostraron que agonistas α -adrenérgicos incrementaban entre 10 y 20 veces la estimulación del AMPc y de la NAT inducida por β -adrenérgicos específicos. Estos receptores al parecer están sobre los pinealocitos más que sobre las terminales presinápticas. Mientras que la inducción total puede ocurrir con menos de la máxima activación adrenérgica, existen evidencias que indican que la potenciación del sistema es importante *in vivo*, donde la estimulación α -adrenérgica incrementa la β -estimulación de la NAT y la síntesis de melatonina, y un bloqueo de los receptores α reduce la producción de melatonina significativamente.

La elevación de los niveles intracelulares de AMPc produce la conversión del triptófano en serotonina y, posteriormente, de la serotonina en N-acetilserotonina. Esta respuesta puede mimetizarse con $(\text{Bu})_2\text{AMPc}$ o con teofilina, inhibidores de las fosfodiesterasas, que también producen elevaciones del AMPc pineal. Sin embargo, la NA incrementa la captación del triptófano por los pinealocitos, hecho que no puede ser reproducido por el $(\text{Bu})_2\text{AMPc}$. El neurotransmisor presenta entonces un doble efecto: por un lado incrementa la concentración intracelular del sustrato, el triptófano, a la vez que la del segundo mensajero, AMPc, cuya acción es estimular la utilización enzimática del primero para la biosíntesis de melatonina (Hadley, 1997).

1.2.3.2 Regulación intracelular de la producción de melatonina en el fotorreceptor pineal no mamífero.

1.2.3.2.1. Nucleótidos cíclicos

Diversas pruebas in vitro han demostrado que una alta concentración de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) conlleva un aumento en la actividad de la AA-NAT y esto una mayor producción de melatonina, observándose que el GMPc intracelular no parece estar implicado en este proceso.

La inhibición inducida por la luz de la actividad de la AA-NAT y de la secreción de melatonina es parcialmente impedida en la presencia de análogos de AMPc, o de agentes que incrementan los niveles intracelulares de AMPc (Takahashi y cols., 1989; Falcón y cols., 1992). Un pulso de luz en medio de la noche induce una reducción del 40% en el contenido de AMPc en fotorreceptores aislados. Tal reducción también se observa con forskolin (activador de la adenil ciclasa) o con isobutil-metilxantina (inhibidor de la fosfodiesterasa). Esto sugiere que la luz podría inhibir la adenil ciclasa y estimular la fosfodiesterasa de AMPc. Así, se supone que hay una fuerte interacción entre la fototransducción, la modulación de la adenil ciclasa y la actividad de la fosfodiesterasa de AMPc, donde parece estar implicado el Ca^{2+} . La luz también reduce los niveles de GMPc, por lo que la observación de que análogos estables de AMPc nunca reducen completamente los efectos inhibidores de la luz, sugiere que el AMPc no es el único mensajero intracelular implicado en el control de la producción de melatonina.

En la pineal de pollo, la noradrenalina por un lado y el péptido intestinal vasoactivo por otro actúan en los receptores de superficie celular para, respectivamente, inhibir o estimular la biosíntesis de melatonina (Voisin y Collin, 1986; Pratt y Takahashi, 1989; Zatz y cols., 1990), estando estas respuestas mediada por AMPc.

La adenosina también modula la actividad de AA-NAT y/o la producción de melatonina en el pollo, la trucha y en el órgano pineal del lucio (Falcón y cols., 1988; Falcón y cols., 1991; Falcón y cols., 1995). Los efectos inhibidores son observados a bajas concentraciones, mediados por la activación de receptores de adenosina $\alpha 1$, acoplados negativamente a la adenil ciclasa, así como los estimuladores se ven a altas concentraciones, debidos éstos a la activación de receptores de adenosina $\alpha 2$, positivamente unidos a la adenil-ciclasa.

1.2.3.2.2. Ión calcio (Ca^{2+})

Una baja $[\text{Ca}^{2+}]_E$ (concentración extracelular de calcio) disminuye la secreción de melatonina, mientras que una alta $[\text{Ca}^{2+}]_E$ incrementa la producción de la misma (Bégay y cols., 1994a; Meissl y cols., 1996). Agentes que incrementan las entradas de Ca^{2+} mediante canales sensibles a voltaje de Ca^{2+} tipo L (como Bay K 8644 o alta $[\text{K}^+]_0$) también incrementa la producción de melatonina, mientras que antagonistas de estos canales (verapimil, nifedipina) contrarrestan estos efectos. El estado despolarizado, observado en la oscuridad, favorece la entrada de $[\text{Ca}^{2+}]_0$, mediante la activación de canales voltaje-dependientes tipo L. Una reducción en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (concentración intracelular de calcio) podría participar en la reducción de la secreción de melatonina inducida por la luz como consecuencia de hiperpolarización de la célula y cierre de los canales. Estudios en células de pineal de pollo y de trucha sugieren que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ actúa mediante la modulación de AMPc (Zatz, 1992; Bégay y cols., 1994b). De todos modos, esta podría no ser la única ruta. De hecho, inhibidores de proteínas que unen Ca^{2+} son capaces de reducir los niveles de AMPc a concentraciones mayores que las necesarias para reducir la secreción de melatonina (Bégay y cols., 1994).

1.2.4. CONTROL DE LA BIOSÍNTESIS PINEAL DE INDOLAMINAS POR EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

En los mamíferos, se conoce que la melatonina se sintetiza en respuesta a la noradrenalina (NA) liberada por las terminales postganglionares procedentes del ganglio cervical superior (GCS), por lo que se considera que la pineal es un transductor neuroendocrino, como el tejido adrenal cromafín, ya que la llegada de un estímulo nervioso a uno de esos órganos se convierte en una respuesta endocrina (Wurtman y Axelrod, 1968). La estimulación postganglionar de los pinealocitos depende de la ausencia de estimulación luminosa en las retinas oculares. La información de las señales de luz/oscuridad procedente de la retina es transmitida vía núcleo supraquiasmático (NSQ) y núcleo periventricular (NPV) hasta la parte superior de la médula espinal torácica, y de allí hasta el ganglio cervical superior (GCS) y vía fibras simpáticas hasta el pinealocito, donde modulan vía receptores β -adrenérgicos la N-acetiltransferasa, que como comentamos anteriormente es la enzima llave de la síntesis de melatonina (Figura 11). La glándula pineal es, esencialmente, el intermediario entre el fotoperiodo externo y el medio interno, el lugar en el que la información acerca de la luz y la oscuridad se traduce en un mensajero químico (Reiter, 1991a; Reiter, 1991c; Reiter, 1999b). Diversos datos experimentales sugieren que el NSQ puede ser el lugar del SNC responsable de la generación de la actividad nocturna de la síntesis de indolaminas en mamíferos. La actividad oscilatoria circadiana de las células del NSQ puede estar ligado al fotoperiodo (Hadley, 1997).

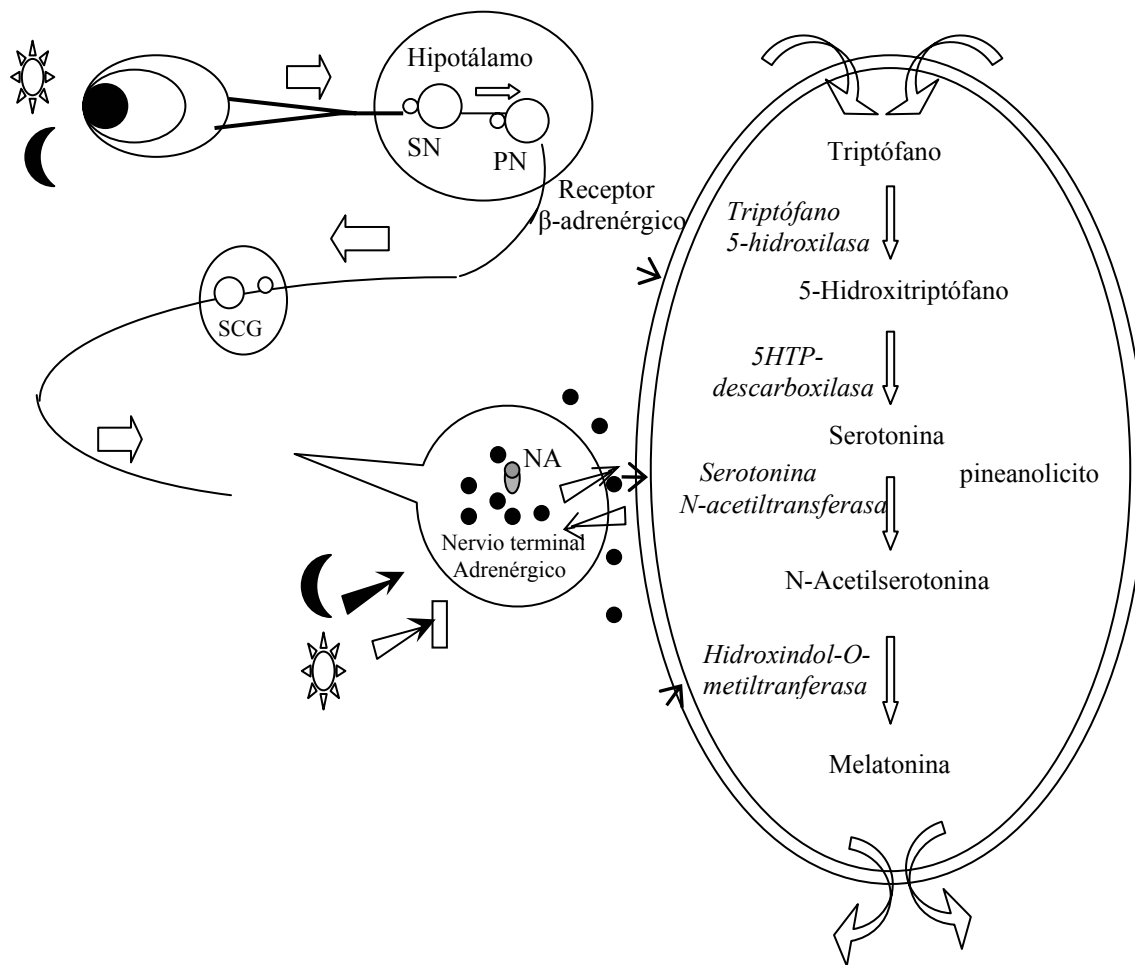


FIGURA 11: Las señales de luz/oscuridad desde la retina son transmitidas vía núcleo supraquiasmático (SCN) y núcleo periventricular (PVN) al ganglio cervical superior (SCG), y vía fibras simpáticas al pinealocito, donde modulan vía receptores adrenérgicos la serotonina N-acetiltransferasa, enzima llave en la síntesis de melatonina (Tomada de Liebmann y cols., 1997).

1.2.5. RECEPTORES DE MELATONINA.

Los efectos de la melatonina están mediados por receptores de alta afinidad que se han identificado mediante técnicas de autorradiografía en membranas celulares tanto de regiones neurales como no neurales. Estos receptores se han identificado y caracterizado en diversos tejidos, posibles dianas sobre las que la melatonina ejercería alguna de sus acciones fisiológicas, aunque con una distribución muy diferente dependiendo de la especie de que se trate. En mamíferos, se ha visto una discreta distribución de estos receptores, mientras que en vertebrados no mamíferos, los

receptores de melatonina son mucho más abundantes (Rivkees y cols., 1989; Ekstrom y Vanecek, 1992). Los receptores neuronales de alta afinidad, en la mayor parte de los mamíferos, se localizan en el NSQ, hipotálamo mediobasal y área preóptica, capa plexiforme externa de la retina, corteza cerebral y tálamo. Los receptores no neuronales de alta afinidad se localizan en la porción tuberal de la hipófisis, en algunas arterias cerebrales así como en células del sistema inmune. En base a su análisis estructural, los receptores de melatonina se han dividido en tres subtipos: Mel 1A, expresado en el cerebro de mamíferos y aves, Mel 1B, expresado principalmente en la retina de mamíferos (Reppert y Weaver, 1995) y Mel 1C, encontrado en melanóforos, cerebro y retina de anfibios y en el cerebro de aves y peces (Reppert y cols., 1996). El receptor 1B, al encontrarse en la retina de mamíferos, se cree que media los efectos de la melatonina sobre la sensibilidad fotorreceptora a la luz. Por otro lado, debido a que la forma Mel 1A se encuentra en el cerebro de los mamíferos, incluyendo la pars tuberalis y el NSQ, podría mediar los efectos estacionales y circadianos de la melatonina (Vanecek, 1998).

Se ha visto una ritmicidad diaria en la densidad de los receptores de melatonina. Así, en la tarde-noche, antes de la desaparición de la luz, la densidad de los sitios de unión fue de un 50-70% mayor que en la mañana (Vanecek y cols., 1990; Gauer y cols., 1994). Este descenso durante la mañana puede ser debido a una “down-regulation” inducida por la melatonina endógena sintetizada durante la noche. De acuerdo con esta hipótesis, se ha comprobado que el descenso por la mañana de la densidad de los receptores es abolido en animales pinealectomizados (Gauer y cols., 1994). Este descenso en la densidad del receptor puede ser también debido a un efecto inhibitorio de la melatonina sobre la expresión de su propio receptor (Barrett y cols., 1996). Sin embargo, en esta investigación también se puso de manifiesto que la regulación en la densidad del receptor no era igual en todos los lugares. Pero en contraste con estas observaciones, se descubrió en el NSQ de la rata una alta concentración del receptor durante la mañana y una baja concentración en la transición luz-oscuridad (Laitinen y cols., 1989).

Los datos disponibles indican que el receptor de melatonina está acoplado a proteína G en la membrana (Morgan y cols., 1989; Laitinen y cols., 1990; Reppert, 1997). La constante de disociación (Kd) de estos receptores para la 2-(I¹²⁵)iodomelatonina está en el rango de 20-200 pM. En los receptores no acoplados a proteína G, la afinidad disminuye entre 1-10 veces sobre este valor (Dubocovich, 1991; Sugden y Chong, 1991). Debido a que estos receptores están localizados en la membrana plasmática, la melatonina regula la función celular a través de segundos mensajeros intracelulares. Por ejemplo, en muchos tejidos se ha encontrado que la melatonina disminuye la concentración intracelular de AMPc (Carlson y cols., 1989; Rafii-El Idrissi y cols., 1995) y también se han observado efectos sobre otros segundos mensajeros como (Ca²⁺), GMPc, diacilglicerol, proteína kinasa y ácido araquidónico (Vanecek y Vollrath, 1989, 1990; Vanecek y Klein, 1992; McArthur y cols., 1997).

Por otro lado, la melatonina, por ser una molécula pequeña y de naturaleza lipofílica, también es capaz de atravesar la membrana celular y de unirse a sitios intracelulares, citosólicos y nucleares, sin dejar de mencionar también su acción sobre tejidos, incluyendo el sistema inmune (Reiter y Maestroni, 1999).

1.2.6. GLÁNDULA PINEAL Y RITMOS CIRCADIANOS.

En todas las especies estudiadas, la pineal posee la capacidad para transformar las oscilaciones de la duración e intensidad de iluminación ambiental en variaciones en la tasa de síntesis y secreción de determinadas moléculas. Como consecuencia de ello, su actividad presenta un ritmo circadiano. En todas las especies, el incremento de melatonina ocurre durante la noche, independientemente de si los animales son activos durante el día o durante la noche. Esto hace que la melatonina sea un marcador endocrino de la noche. Así pues, la síntesis y secreción de la melatonina por los pinealocitos está influenciada por los ciclos luz/oscuridad. El patrón distinto de secreción circadiana de la melatonina sugiere que una de las funciones de la glándula pineal puede ser el reloj biológico aumentando la producción de melatonina unas 10 veces por la noche (Liebmann y cols., 1997). Con la edad, el pico máximo es sólo la

mitad que el de los adultos jóvenes (Waldhauser y cols., 1988; Pierpaoli, 1991; Cavallo y Ritschel, 1996). Además, el alargamiento de la noche debido a la estación va acompañado de un alargamiento en la fase de secreción de la melatonina (Illnerova y cols., 1986), lo que en algunas especies, como roedores y rumiantes, constituye parte de un mecanismo regulador de la reproducción.

En humanos los estudios son insuficientes, pero también se ha descrito un ritmo circanual en los niveles plasmáticos de melatonina, con valores más elevados durante los meses de otoño e invierno y más reducidos durante primavera y verano (Arendt, 1995; Alonso, 1999). A lo largo de la vida, los niveles de melatonina van a sufrir variaciones. Los niveles nocturnos de melatonina disminuyen para alcanzar valores mínimos en torno a la etapa prepubertad, estabilizándose durante la vida adulta y disminuyendo hasta casi la desaparición del ritmo día-noche durante la vejez. Se ha especulado que las 2 fases de descenso están relacionadas con la pubertad y el envejecimiento respectivamente (Cavallo y Ritschel, 1996; Alonso, 1999).

Se conocen otros factores que también influyen en la síntesis y secreción de la melatonina, como pueden ser los hormonales. Así, son conocidas las relaciones funcionales entre la pineal y la hipófisis, el tiroides, el páncreas endocrino y la corteza adrenal. Existen secreciones endocrinas, especialmente relacionadas con la función reproductora, que afectan la síntesis y secreción de la melatonina. En diferentes mamíferos se han descrito efectos antiovulatorios de la melatonina en animales experimentales. En humanos se ha sugerido que la reducción en los niveles nocturnos de melatonina antes de la aparición de la pubertad constituye un elemento permisivo de la misma, al disminuir una hipotética acción inhibitoria sobre varios niveles del eje reproductor. Otra opción es que la reducción de la secreción nocturna de melatonina podría ser el resultado, y no la causa, de la elevación en los niveles circulantes de gonadotropinas y hormonas gonadales (Alonso y cols., 1993). Por otro lado, también se ha observado una reducción en los niveles circulantes de melatonina nocturna en mujeres antes de la ovulación (Reiter, 1973), como consecuencia de la elevación de los niveles plasmáticos de hormonas ováricas.

1.2.6.1. Glándula pineal y ritmo circadiano en aves.

En las aves, el comportamiento y las evidencias bioquímicas sugieren, que la glándula pineal juega un papel importante en la organización temporal de los animales (Cassone y Menaker, 1984). En pájaros paseriformes, la pinealectomía derrumba el ritmo circadiano de la actividad locomotora en un buen número de especies (Ebihara y cols., 1987). En el gorrión, *Passer domesticus*, la glándula pineal resulta esencial para el mantenimiento de los ritmos circadianos locomotores en condiciones de oscuridad constante. La ablación de la pineal provoca una actividad locomotora arrítmica aunque los gorriones pinealectomizados todavía se ajustan a ciclos de luz/oscuridad y presentan otros signos parcialmente indicativos del mantenimiento de un sistema circadiano. El ritmo libre de actividad locomotora no queda abolido por la alteración de la aferencias neuronales a la pineal ni por la interrupción de sus eferencias. Resulta interesante constatar que la ritmicidad de pájaros pinealectomizados puede restaurarse mediante la implantación de una pineal en la cámara anterior del ojo, y que la pineal transplantada transfiere la fase del ritmo del pájaro donante al pájaro receptor. Parece, por tanto, que la pineal de las aves se encuentra acoplada a los otros componentes del sistema circadiano mediante mecanismos endocrinos en lugar de nerviosos (Binkley, 1988).

Aparte del papel de la pineal en el control del ritmo de comportamiento, también la bioquímica de la glándula aviar es rítmica considerándose que la biosíntesis de melatonina es fuertemente rítmica in vivo (Binkley y cols., 1973). Los niveles de melatonina son bastante mayores durante la noche que durante el día en aves (Binkley, 1988). Tanto la duración como la amplitud del ritmo de melatonina depende del fotoperiodo prevalente (Vivien-Roels y cols., 1997). Diversos laboratorios han estudiado cultivos de pineal de pollo para determinar si los ritmos de NAT persisten in vitro (Binkley y cols., 1978; Kasal y cols., 1979). Demostrar una oscilación de la actividad de la NAT en condiciones cíclicas de luz, fue más difícil de medir que en condiciones de iluminación constantes (Takahashi y cols., 1980). Deguchi (1979a) demostró que células aisladas de cultivos de glándula pineal de pollo expresan ritmos circadianos de actividad NAT distintos para dos ciclos de oscuridad

constante. El análisis del ritmo circadiano en pineal de pollo ha sido estudiado a través de la medida de la melatonina liberada por cada célula individual en largos periodos de tiempo usando un sistema de flujo continuo (Robertson y Takahashi, 1988). También se demostraron resultados similares cuando se usó un sistema de cultivo estático. Se determinó el efecto de un cambio en el ciclo de luz / oscuridad sobre la oscilación de melatonina y se vio que el cambio de ciclo luz / oscuridad produce un avance correspondiente en el ritmo de melatonina el cual persiste después de liberarse en continua oscuridad. Estos resultados demostraron que la regulación de las oscilaciones circadianas del ritmo de melatonina en cultivos de células pineales dispersas pueden ser entrenadas por ciclos de luz in vitro.

Investigaciones en el pollo (Binkley y cols., 1978) demostraron que el ritmo en la síntesis de melatonina es debido a un ritmo en la actividad de la enzima AA-NAT, no pudiendo ser detectado ritmo de AA-NAT en las especies carentes de ritmo de melatonina pineal (Serino y cols., 1993). La exposición de animales a la luz en mitad de la noche decrece rápidamente la AA-NAT, resultando una reducción en la secreción de melatonina en el pollo (Binkley, 1988). La clonación de la AA-NAT ha permitido un rápido progreso en el entendimiento de la regulación de esta enzima (Klein y cols., 1997), observándose que la abundancia de transcritos varía en 24h de una manera paralela a como lo hace la actividad enzimática. La abundancia de ARNm de TOPH (triptófano hidrolasa) varía durante 24 horas en la pineal de pollo y otros animales (Bégay y cols., 1998). La actividad de la HIOMT, la última enzima en la ruta de biosíntesis de la melatonina, presentó una baja amplitud de ritmo en vertebrados, mostrando un aumento de un 10/ 20% durante el día en el pollo (Axelrod y cols., 1965; Binkley, 1983; Quay, 1995). (Figura 12).

Se ha sugerido que la pineal de las aves contiene un oscilador propio que produce una liberación hormonal rítmica. Se han detectado en la sangre de aves fluctuaciones en los contenidos de melatonina (Foá y Menaker, 1988; Gwinner y cols., 1997). Es más, se cree que las fluctuaciones circadianas de la hormona se ajustan a un oscilador amortiguador situado en alguna parte del cuerpo, que a su vez, dirige la

actividad locomotora. En este modelo, cada oscilador tendría un acceso a las señales luminosas cíclicas del ambiente. Tanto el comportamiento locomotor como los demás comportamientos de las aves pinealectomizadas quedarían determinados exclusivamente por el oscilador amortiguador, que sería incapaz de correr libremente, en ausencia de señales luminosas, por falta del oscilador propio. La producción hormonal cíclica de una pineal transplantada sería capaz de volver al oscilador amortiguado a su estado inicial normal (Binkley, 1988).

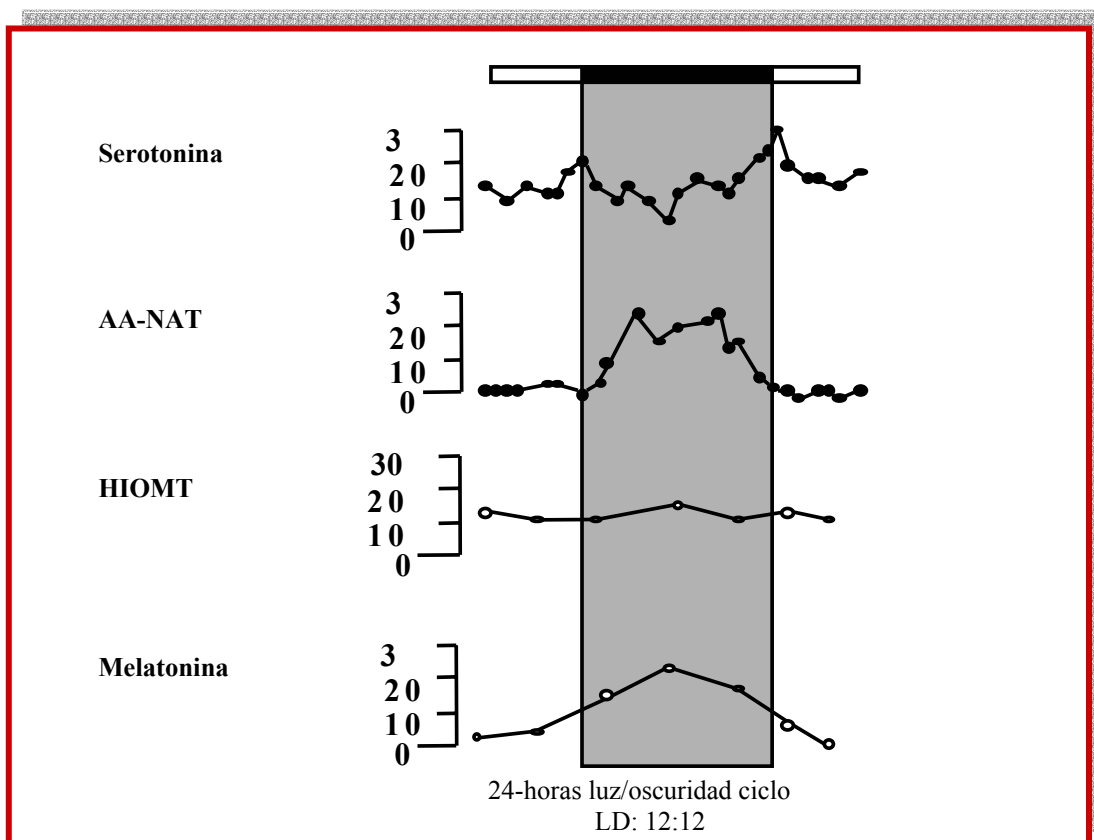


Figura 12: Ritmo circadiano de la actividad enzimática de arilalkilamin-N-acetiltransferasa (AA-NAT) e hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT), serotonina y melatonina, en la glándula pineal de pollo. Las medidas fueron expresadas como: serotonina y melatonina (ng/ml); AA-NAT y HIOMT (actividad/ng/glándula/h) (Modificada de Hadley (1997)).

La pineal mediante su hormona puede desempeñar un papel sobre la cantidad y temporalidad de la actividad que se expresa a lo largo de los ciclos de descanso / actividad de las aves. La pinealectomía elimina el ritmo circadiano normal de

temperatura corporal si los animales se mantienen en oscuridad constante, y también altera de modo significativo la amplitud de los ritmos de temperatura corporal acoplados a los ciclos de iluminación. En algunas aves, la actividad reproductora se encuentra claramente ligada a eventos fotoperiódicos, pero ni la glándula pineal ni la melatonina han sido totalmente implicadas como responsables en el control de dichas actividades (Hadley, 1997).

1.2.6.2. Las células sintetizadoras de melatonina son relojes circadianos en aves.

Ya que los conos y las células que son fotorreceptores modificados contienen la ruta de entrada al reloj (la unidad de fototransducción) y producen la señal de salida del reloj (melatonina) se ha supuesto que estas células contengan la maquinaria para que funcione el reloj. En otras palabras, cada una de estas células sería un sistema circadiano (Collin y cols., 1986a; Collin y cols., 1986b; Collin y cols., 1989; Falcón y cols., 1989; Takahashi y cols., 1989). En un estudio llevado a cabo usando células disociadas de órgano pineal de pollo (Deguchi, 1979b) se puso de manifiesto que la actividad de la AA-NAT exhibía un ritmo circadiano similar al que tenía el órgano en cultivo. Esta fue la primera indicación fuerte de que el ritmo es generado a nivel celular. Numerosos estudios han confirmado y ampliado estas investigaciones (Takahashi y cols., 1989, en el pollo; Bolliet y cols., 1994, en el lucio, Murakamy y cols., 1994 en la codorniz japonesa, la paloma y el gorrión), estudios que han sido realizados usando preparaciones de células completas conteniendo células productoras de melatonina así como otros tipos celulares (células intersticiales, neuronas, etc.). El uso de una placa de ensayo hemolítica reversa (Pickard y Tang, 1994) proporcionó la primera evidencia inequívoca de que las células fotorreceptoras individuales de la pineal exhibían tanto un ritmo diario como circadiano en la secreción de melatonina.

Por todo lo expuesto, se puede indicar que las células que son fotorreceptores sencillos contienen un reloj circadiano, una capacidad fotorreceptiva y la capacidad de secretar melatonina (Bolliet y cols., 1997; Pickard y Tang, 1993 y Pickard y Tang, 1994).

1.2.7. MELATONINA Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO: PAPEL ANTIOXIDANTE.

La molécula N-acetil-5-metoxitriptamina, comúnmente conocida como melatonina, es un producto sintetizado en la glándula pineal de todos los vertebrados, también como en diferentes órganos. Esta indolamina fue inicialmente conocida por su función como un mediador de los ritmos reproductivos circanuales (Reiter, 1980) así como de ciclos circadianos (Kennaway y Wright, 2002). Seguidamente, se mostró que sin embargo, la melatonina tenía efectos oncostáticos (Blask y cols., 2002), estimulación del sistema inmune (Guerrero y Reiter, 2002) y funciones anti-inflamatorias (Cuzzocrea y Reiter, 2002). Así, más recientemente la melatonina fue identificada como un potente secuestrador de radicales libres (Tan y cols., 2002) y antioxidante indirecto (Reiter y cols., 2000c; Rodríguez y cols., 2004). Además cabe citar la alta eficacia de la melatonina como un protector contra especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS).

Este campo de investigación ha sido testigo de una expansión explosiva en las últimas décadas y mientras que todos los mecanismos de los efectos de la melatonina como un secuestrador de radicales libres y productos afines no han sido identificados aún, no hay duda sobre su habilidad para moderar el daño molecular producido por el oxígeno tóxico y especies reactivas de nitrógeno (Acuña-Castroviejo y cols., 2002; Reiter y cols., 2002b).

Las funciones de la melatonina como un antioxidante incluye: a) secuestrador directo de radicales libres, b) estimulación de enzimas antioxidante, c) incremento de la eficiencia de la fosforilación oxidativa mitocondrial y reducción de los electrones y d) aumento de la eficacia de otros antioxidantes. Además habría otras funciones de la melatonina aún no descubiertas las cuales aumentarían su habilidad para proteger contra el daño molecular por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* han documentado la habilidad tanto de concentraciones fisiológicas como farmacológicas de melatonina de proteger contra la destrucción de radicales libres (Reiter y cols., 2003).

Así, se ha visto que la melatonina funciona a través de numerosas vías para reducir el estrés oxidativo. Las evidencias experimentales apoyan sus acciones como secuestrador directo de radicales libres (Hardeland y cols., 1993; 1995; Allegra y cols., 2003), como un antioxidante indirecto cuando estimula las enzimas antioxidantes (Reiter y cols., 2000c; Rodríguez y cols., 2004), su estimulación de la síntesis de glutathion (un antioxidante intracelular esencial) (Urata y cols., 1999), su habilidad para aumentar la actividad de otros antioxidantes (o viceversa) (Gitto y cols., 2001), su protección de enzimas antioxidante del daño oxidativo (Mayo y cols., 2002, 2003) y su habilidad para incrementar la eficacia en la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Acuña-Castroviejo y cols., 2002; Okatani y cols., 2003a).

1.2.7.1. Acciones antioxidantes directas de la melatonina.

Hay bastante literatura documentada sobre la interacción de la melatonina tanto con ROS como RNS (Reiter y cols., 2001; Poeggeler y cols., 2002; Tan y cols., 2002; Allegra y cols., 2003). Las evidencias iniciales ilustran la habilidad de la melatonina para neutralizar la alta toxicidad del radical hidroxilo (OH^\cdot) (Tan y cols., 1993). Desde entonces numerosos artículos parecen confirmar esta acción de la melatonina (Poeggeler y cols., 1994; Hardeland y cols., 1995; Matuszak y cols., 1997; Li y cols., 2002) e identificar además un producto potencial de la interacción entre la melatonina y el OH^\cdot , la 3-hidroximelatonina cíclica (Tan y cols., 1998). Este subproducto es excretado en la orina (humanos y ratas) y la cantidad de éste es proporcional a la cantidad de melatonina administrada a un animal y el grado de estrés oxidativo que el animal ha experimentado.

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es generado in vivo por varios sistemas enzimáticos y adicionalmente, es producido intracelularmente por la dismutación del radical anión superóxido (O_2^\cdot). La capacidad de la melatonina para secuestrar H_2O_2 fue demostrado inicialmente por Tan y cols., (2000a). Un trabajo reciente cuestiona además la interacción directa de la melatonina con H_2O_2 (Fowler y cols., 2003).

El O_2^- es generado durante la respiración mitocondrial y durante el estallido respiratorio de las células fagocíticas. Tanto OH^- como O_2^- tienen baja toxicidad pero éstos rápidamente se acoplan con el óxido nítrico (NO) para producir el anión peroxinitrito ($ONOO^-$); este producto es considerado por ser casi tan dañino como el OH^- . La eficacia de la melatonina en neutralizar el O_2^- está pobremente definida. Poeggeler y colaboradores (1996) fueron los primeros en mostrar que la melatonina neutralizaba 1O_2 . Esta habilidad quelante de la melatonina fue confirmada por Zang y colaboradores (1998) y por Roberts y colaboradores (2000). También ha sido confirmado recientemente que el AFMK (N-acetil-N-formil-5-metoxikinuramina) es el producto formado cuando la melatonina es oxidada por 1O_2 (De Almeida y cols., 2003).

1.2.7.2. Acciones antioxidantes indirectas de la melatonina.

1.2.7.2.1. Estimulación de enzimas antioxidantes

Las enzimas antioxidantes proporcionan un gran mecanismo de defensa contra el daño de radicales libres por metabolización de las especies reactivas a biproductos no tóxicos. La importancia de las enzimas antioxidantes que han sido investigadas relacionadas con la melatonina son la superóxido dismutasa (SOD), tanto Mn SOD como CuZnSOD, catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GRd) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) (Reiter y cols., 2000c; Mayo y cols., 2002; Rodríguez y cols., 2004).

Así los estudios iniciales datan de hace casi 10 años y muestran que el efecto estimulador de la melatonina sobre GPx cuando se administraron dosis farmacológicas de melatonina dadas a ratas (Barlow-Walden y cols., 1995) y pollos (Pablos y cols., 1997) *in vivo*, resultaban en un marcado aumento en la actividad de esta enzima.

1.2.7.2.2. Estimulación de la síntesis de glutatión.

El glutatión (GSH) es un secuestrador de radicales libres y antioxidante, muy abundante. Un único trabajo ha mostrado que la melatonina estimula la proporción limitante de la enzima γ -glutamylcisteina sintasa, incrementando la concentración de GSH (Urata y cols., 1999). Esta acción de la melatonina, a diferencia de la función directa de secuestrador de radicales libres, es medida por receptores específicos. La estimulación de la síntesis de GSH por la melatonina podría ser una de las mayores acciones antioxidativas de la melatonina.

1.2.7.2.3. Acción sinérgica de la melatonina con otros antioxidantes.

De acuerdo con Gitto y colaboradores (2001) bajo condiciones in vitro y usando los productos finales de la peroxidación lipídica como un índice del daño oxidativo inducido por los radicales libres, la melatonina aumenta la acción protectora de la vitamina E, vitamina C y GSH contra la oxidación de las grasas poliinsaturadas mediada por radicales libres. La clara implicación y la investigación concluyente de estos autores, que la combinación de la melatonina con otros antioxidantes incrementa claramente su eficacia. Cuando se comparan bajo condiciones de alto estrés oxidativo in vivo, la melatonina resulta superior a las vitaminas C y E en la reducción del daño oxidativo (Tan y cols., 2002).

1.2.7.2.4. Acciones de la melatonina a nivel de las mitocondrias.

Las mitocondrias son la mayor fuente de radicales libres y como consecuencia estos orgánulos subcelulares están expuestos a un daño oxidativo extensivo. La membrana mitocondrial es el sitio donde reside la cadena de transferencia de electrones (ETC), un sistema complejo proteínico oxido-reductor (complejos I, II, III y IV). En células aeróbicas la fosforilación oxidativa mitocondrial es responsable de la estimulación del 95% del total del ATP generado por las células. Deficiencias en ETC pueden liderar la pérdida con la edad de electrones los cuales después de formar

radicales libres y otros reactivos tóxicos, producen daño molecular en las mitocondrias (Acuña-Castroviejo y cols., 2002). El hecho de que la melatonina tenga importantes acciones a nivel mitocondrial es sugerido por numerosas observaciones: a) la melatonina, es un eficiente secuestrador de ROS/RNS los cuales se producen abundantemente en las mitocondrias; b) aunque las mitocondrias son incapaces de sintetizar GSH (lo toman desde el citosol) poseen GPx y GRd (glutación peroxidasa/glutación reductasa), enzimas estimuladas ambas por la melatonina; y c) la melatonina puede estar en mayor concentración en la mitocondria que en otra parte de la célula y ser mayor que la concentración sérica (Acuña-Castroviejo y cols., 2002).

En largos periodos de administración de melatonina se ha comprobado que se incrementa el número de mitocondrias en las células (Deker y Quay, 1982) mientras que experimentos con melatonina radioactiva sugiere la existencia de sitios de unión para esta indolamina en las mitocondrias (Poon y Pang, 1992). Adicionalmente, se ha visto como la melatonina protege el cerebro fetal de ratas contra el daño mitocondrial mediado por oxidantes (Wakatsuki y cols., 2001) y estimula la respiración mitocondrial en el cerebro e hígado de ratones con senescencia acelerada (Okatani y cols, 2002 a, b; 2003 a, b).

1.2.7.3. Antioxidantes clásicos y melatonina.

Los antioxidantes más importantes *in vivo* son probablemente la vitamina C, vitamina E y el glutati6n (GSH). Estos representan los antioxidantes clásicos. Sin embargo la melatonina también representa un papel antioxidante aunque sus mecanismos de acci6n son totalmente diferentes al de los otros antioxidantes mencionados. Todos los antioxidantes clásicos son donadores potenciales de electrones. Así ellos se encuentran tanto en forma reducida como oxidada. Cuando uno de ellos dona un electr6n (o átomo de hidrógeno) para neutralizar un radical libre, se transforma del estado reducido al estado oxidado. A menudo la forma oxidada es regenerada a la reducida mediante una reacci6n redox o de reciclaje. Teóricamente este reciclaje es considerado beneficioso porque previene el agotamiento del antioxidante (Winkler y cols., 1994). La melatonina, por su parte, muestra diferentes propiedades químicas a los

otros antioxidantes. Posee un anillo indol rico en electrones con un grupo metoxi en posición 5. Este grupo metoxi es importante para las propiedades fisicoquímicas de la melatonina como un secuestrador de radicales libres. Una ventaja de la melatonina con respecto a los otros antioxidantes es su origen dual. Los organismos obtienen la melatonina desde diferentes fuentes incluyendo su generación endógena y exógena por la vía alimenticia. Esta estrategia, desarrollada durante la evolución, mantiene los niveles de melatonina lo cual permite a los organismos resistir la agresión oxidativa. Inversamente, los vertebrados no tienen la habilidad de generar vitamina C o vitamina E, éstos solo se obtienen exógenamente.

En resumen, la melatonina y los antioxidantes clásicos muestran diferentes mecanismos en términos de reacción con los radicales libres. Los antioxidantes clásicos donan electrones para neutralizar los radicales libres y la melatonina puede capturar radicales libres a través de una reacción aditiva (Tan y cols., 1998; Stasica y cols., 2000; Marshall y cols., 1996) o en ciertas circunstancias puede donar o capturar electrones para detoxificar radicales libres.

Finalmente, como ya se ha comentado, la melatonina aumenta la acción protectora de la vitamina E, C y glutatión contra la oxidación mediada por radicales libres o grasas polinsaturadas. Así, la melatonina incrementa claramente la eficacia de otros antioxidantes frente a la peroxidación lipídica tanto in vivo como in vitro, presentando ella por sí misma un poder superior que el resto de los antioxidantes clásicos, frente al estrés oxidativo (Gitto y cols., 2001; Tan y cols., 2002).

1.3. INMUNIDAD INESPECÍFICA EN AVES.

En el medio ambiente hay gran cantidad de agentes infecciosos con diversidad de formas, composición, tamaños, virulencia, etc., que afectan a la homeostasis de los vertebrados, y frente a los que luchamos gracias al sistema inmune (Delves y Roitt, 2000a,b). Esta palabra deriva el latín “inmunitas”, que significa libre, exento, por lo que sería un sistema por el que los organismos están libres de contraer enfermedades. Tal definición se ha completado para abarcar al conjunto de reacciones encaminadas a la eliminación de los agentes infecciosos, células extrañas al organismo, células carcinogénicas, etc., las cuales son llevadas a cabo por factores humorales y celulares.

Se considera que hay dos tipos de inmunidad; una innata o inespecífica, y constitutiva, que actúa sin necesidad de ser activado, como puede ser; 1) barreras mecánicas (piel y mucosas); 2) factores químicos (pH ácido en distintas cavidades, ácidos grasos no saturados de la piel, lisozimas, espermitas, secreciones mucosas, etc.; 3) defensas fagocíticas (monocitos o mononucleares, los macrófagos del sistema retículo endotelial, los polimorfonucleares o granulocitos, como los heterófilos (neutrófilos en humanos), eosinófilos y basófilos); 4) el proceso inflamatorio, con aumento de la permeabilidad capilar y dilatación de los vasos sanguíneos, facilitando por tanto la llegada de fagocitos y otros recursos para combatir la infección; 5) el antagonismo de la flora bacteriana corporal; 6) las células NK (natural killer) y 7) las factores solubles proteínicos como el complemento.

Por otro lado tenemos la inmunidad adquirida o específica, que tiene que ser desencadenada en presencia del antígeno y que está mucho más evolucionada que la inespecífica. Las aves poseen ciertas particularidades que hacen su sistema inmune único, pues poseen la bolsa de Fabricio, que es un órgano específico para la diferenciación de los linfocitos B y posee además antígenos de histocompatibilidad en la superficie de los glóbulos rojos.

La forma más simple de impedir la infección es evitar el paso del microorganismo al interior del cuerpo. La principal barrera es la piel. Si se produce una ruptura de la piel, los organismos penetran en el cuerpo, entrando en juego los factores químicos solubles, como el sistema del complemento, o el mecanismo de la fagocitosis.

1.3.1 GRANULOCITOS.

Los granulocitos son un tipo celular que se encuadra dentro del grupo de leucocitos o glóbulos blancos. Hay tres tipos de leucocitos granulares aviares: heterófilos, eosinófilos y basófilos. Los más numerosos son los heterófilos. El término heterófilo indica el hecho de que, entre los vertebrados, células homólogas de este linaje contienen gránulos con varias afinidades de tinción. A microscopía óptica (Olson, 1937), se observa que los heterófilos, en aves y conejos, se tiñen con eosina y por esta razón son algunas veces designados como granulocitos polimorfonucleares pseudoeosinófilos, pero por motivos de brevedad se designan normalmente como heterófilos. Son probablemente equivalentes a los neutrófilos humanos que no manifiestan gránulos a microscopía óptica, ya que son gránulos de tinción neutra. A microscopía electrónica, la mayoría de los investigadores han identificado los diferentes tipos de granulocitos aviares mediante las características principales de los granulocitos de mamíferos.

-Heterófilos. En frotis de sangre teñida, los heterófilos aparecen como células redondas, con un diámetro aproximado de 10-15 μm . La principal característica de estas células es la presencia de algunos cuerpos cristalinos acidófilos, los gránulos, fusiformes o espirilizados. Estos gránulos se tiñen de un rosa brillante, debido a su afinidad por la eosina, frente al fondo incoloro del citoplasma. Normalmente no hay duda en la identificación de un heterófilo; sin embargo, los gránulos, algunas veces porque son atípicos, otras porque han sido disueltos durante la fijación o tinción, o porque son inmaduros, pueden ser confundidos con los gránulos de eosinófilos, que tienen la misma afinidad de tinción pero que son esféricos. Los gránulos de los heterófilos inmaduros son también esféricos y se tiñen de un rojizo-púrpura. A microscopía electrónica, el

núcleo de los heterófilos aparece polimórfico, consistiendo en varios lóbulos, de uno a tres o más, asociados mediante estrechos puentes. La cromatina está organizada dentro de unas masas teñidas de oscuro asociada con la membrana nuclear. La lobulación del núcleo se incrementa con la edad de la célula.

Varios investigadores han distinguido diferentes tipos de gránulos en los heterófilos (Maxwell, 1984a). El tipo de gránulo más observado tiene una forma alargada. Tiene aproximadamente 1,5 μm de longitud y 0,5 μm de ancho y el contenido es homogéneo y densoelectrónico. El segundo tipo de gránulos posee un diámetro más pequeño, 0,5 μm , y su contenido es translúcido al microscopio electrónico. El tercer tipo es mucho más pequeño, 0,1 μm de diámetro, y tiene el centro separado por una envoltura membranosa mediante un área transparente al microscopio electrónico.

Se ha investigado la presencia de enzimas lisosomales en estos gránulos, y se ha observado que la actividad fosfatasa ácida está presente solamente en los gránulos grandes del pollo (Daimon y Caxton-Martins, 1977), así como la arilsulfatasa (Osculati, 1970). Por tanto, sólo esos gránulos podrían considerarse como lisosomas. Por otro lado, Maxwell (1984b) detectó la actividad de una fosfatasa ácida con un sustrato específico, trimetafosfato, no sólo en los gránulos grandes con forma de espiral, sino también en los gránulos de tamaño medio, redondos. De acuerdo con este autor, los dos tipos de gránulos representan diferentes estados de maduración del mismo orgánulo. Los heterófilos de pollo tienen una característica excepcional que los sitúa separadamente de los de otras especies estudiadas, están exentos de actividad peroxidasa (Maxwell, 1984a) y no producen peróxido de hidrógeno durante la fagocitosis, aunque tienen actividad destructiva contra una variedad de microorganismos.

-Eosinófilos. Los granulocitos eosinofílicos tienen un diámetro medio de 7,3 μm ; sin embargo, pueden variar ampliamente entre 4-11 μm . El citoplasma, teñido de azul pálido, es difícilmente visible porque la célula está llena de gránulos eosinofílicos redondos y grandes. Su color es de un rojo oscuro en comparación al rojo brillante de los heterófilos. El núcleo es a menudo bilobulado y es de un azul más oscuro que el de

los heterófilos. Se han diferenciado dos tipos de gránulos a nivel ultraestructural en algunas especies aviares (Maxwell, 1984a). Los gránulos grandes homogéneos esféricos, conocidos como gránulos primarios, corresponden con un estadio primario de maduración, mientras que los gránulos maduros contienen un cristal. Estos gránulos que contienen un cristal se denominan gránulos específicos. Los gránulos primarios se supone que se transforman en específicos como producto de la maduración. En especies como la paloma, sus eosinófilos no tienen el cuerpo cristalino en sus gránulos específicos.

La eosinofilia de los gránulos es debida a una alta concentración del aminoácido arginina, que porta un grupo guanidilo terminal fuertemente catiónico. En estos gránulos se encuentran presentes varias enzimas, una de las más importantes es la peroxidasa. La actividad enzimática de los gránulos se incrementa durante la maduración celular. La actividad de la fosfatasa ácida está limitada a los gránulos cuando éstos se convierten tan densos como los gránulos maduros. La arilsulfatasa presenta una actividad enzimática muy débil, siendo positiva solamente en los polos de los gránulos eosinofílicos de células maduras.

-Basófilos. Son los menos estudiados de los granulocitos aviares. Presentan un diámetro medio de 8,2 μm son, por término medio, ligeramente más pequeños que los heterófilos y circulares. Su citoplasma es abundante e incoloro, donde aparecen gránulos esféricos de un morado intenso. El núcleo es débilmente basófilo y con una forma redonda u oval, siendo normalmente unilobular. A microscopía electrónica se observa que los gránulos de los basófilos son variables en tamaño y fibrilares al natural, pudiéndose distinguir tres tipos de gránulos.

El más común es redondo y denso electrónico. El segundo tipo tiene una estructura interna punteada. Finalmente, el tercer tipo fue descrito como poseedor de una disposición en “panal” reticulado. Daimon y Caxton-Martins (1977) sólo encontraron la actividad fosfatasa ácida y en pequeña proporción, en los grandes gránulos punteados.

Características	Heterófilos	Eosinófilos	Basófilos
% en sangre *	26	2,25	2,8
Diámetro medio *	8,7 μm	7,4 μm (rango 4-11)	8,2 μm
Función	Bactericida	Modulador de la respuesta inflamatoria en la hipersensibilidad de tipo IV	Liberación de histamina

Gránulos:

1.- Propiedades

de tinción. Eosinofílicos Eosinofílicos Basofílicos

2.- Forma de las extensiones. Esféricos Esféricos Esféricos
Alargados

3.- Actividad enzimática. Arilsulfatasa Peroxidasa Fosfatasa
Fosfatasa ácida ácida

* Datos obtenidos de la especie *Gallus domesticus* (Hodges, 1974).

1.3.2. FUNCIONES DE LOS GRANULOCITOS.

Los heterófilos aviares probablemente funcionan de una forma similar a sus homólogos de mamíferos. De varios estudios se desprende la participación de los heterófilos en reacciones inflamatorias (Maxwell, 1984b), y su capacidad fagocítica. Los gránulos de este tipo celular han sido aislados, encontrándose que poseen actividad

bactericida, siendo las proteínas catiónicas y la lisozima las responsables de esta actividad.

Una característica de los eosinófilos de mamíferos es su incremento en número y eosinofilia durante reacciones alérgicas tales como anafilaxis e infecciones parasitarias. Algunos autores afirman que la eosifilia es un proceso que se da en algunas aves durante la inflamación (Fox y Solomon, 1981), pero estos estudios no han realizado observaciones sobre casos semejantes en respuestas a infecciones de helmintos o protozoos. Maxwell (1984b) concluyó que las eosinofilias aviares eran, a diferencia de sus homólogas en mamíferos, partículas activas en las reacciones de hipersensibilidad tipo IV (retardada).

Los basófilos aviares, como sus equivalentes en mamíferos, producen histamina. Además pueden jugar un papel en la inflamación aguda y en las reacciones de hipersensibilidad del tipo I (inmediata) (Fox y Solomon, 1981).

1.3.2.1. Propiedades funcionales de los heterófilos: proceso fagocítico.

Los heterófilos reciben junto a monocitos y macrófagos, la denominación general de “fagocitos”, precisamente por presentar una gran capacidad de ingerir. Son células capaces de buscar, reconocer, ingerir y destruir intracelularmente partículas o gérmenes extraños por la acción de enzimas liberadas en el proceso de degranulación. Por tanto, para poder realizar su función más característica, las células fagocíticas poseen la capacidad de adherirse al endotelio vascular o sustratos tisulares, la capacidad de movimiento (tanto espontáneo como dirigido hacia el foco de infección por un gradiente químico y que se denomina, en este caso, quimiotaxis), la capacidad de unir las células extrañas, así como la de ingerirlas y destruirlas (Figura 13)

El proceso fagocítico se desencadena cuando un agente agresor sobrepasa las barreras naturales del organismo tales como el tegumento, las mucosas y las secreciones. Es un proceso de reconocimiento y englobamiento de microorganismos o tejidos de deshecho que se acumulan durante la infección, inflamación o reparación de

una herida (Brown, 1995). Para poder realizar la función de fagocitar al agente invasor, el fagocito necesita salir del capilar sanguíneo, mediante su capacidad de adherirse al endotelio vascular, liberándose del vaso sanguíneo por un proceso denominado diapédesis.

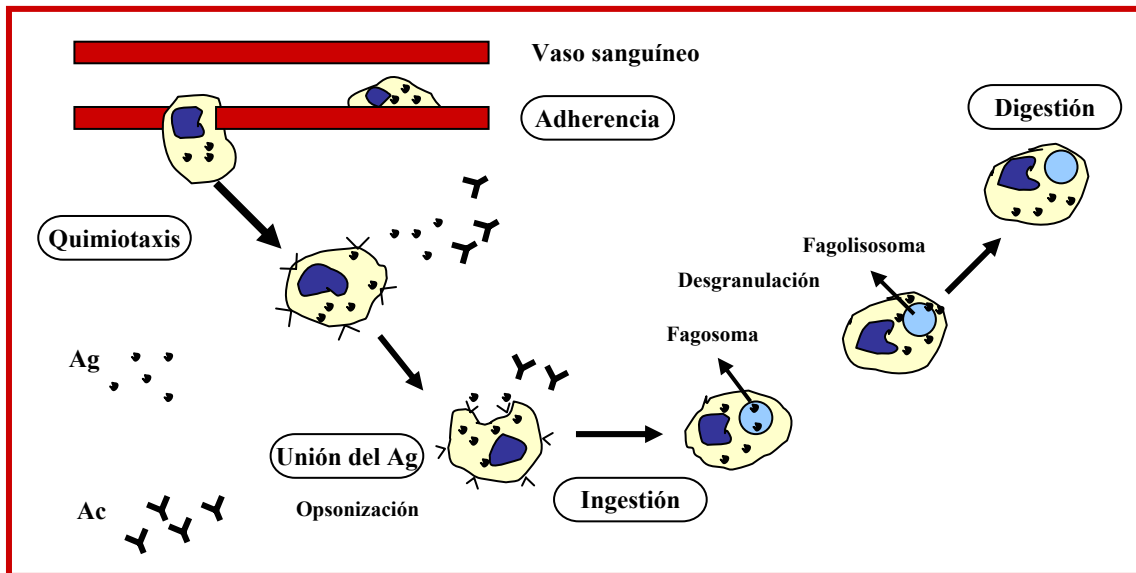


Figura 13: Proceso Fagocítico (Tomada de Ortega, 1994).

Una vez fuera del capilar, se adhiere a sustratos tisulares migrando mediante movimientos espontáneos o atraídos por sustancias quimiotácticas hacia el lugar de la infección o daño, proceso llamado quimiotaxis. La célula fagocítica se mueve por pseudópodos que son prolongaciones citoplasmáticas transitorias que permiten el movimiento orientado de la célula. Cuando llegan al lugar de la infección son capaces de unir las partículas o células antigénicas a su membrana para posteriormente ingerirlas y destruirlas intracelularmente. Esta ingestión es esencial para la defensa del huésped. La ingestión aparece cuando un microorganismo invasor es reconocido por receptores específicos sobre la superficie del fagocito y requiere múltiples y sucesivas interacciones entre el fagocito y el mismo. Cada una de estas interacciones da como resultado una señal de transducción, que se confina a la membrana y citoesqueleto que

se encuentra ligado al receptor, y el cual se requiere para el suceso de la fagocitosis (Smith, 1994; Brown, 1988, 1997).

1.3.2.1.1 Fagocitosis y desgranulación.

A. INGESTIÓN DE LA PARTÍCULA

Una vez que la célula fagocítica, gracias a sus receptores de membrana, ha establecido contacto con la membrana del germen que debe de ser fagocitado o con moléculas de anticuerpos o de fragmentos de factor C3b del complemento que se encuentran adheridos a ella, el fagocito emite unas prolongaciones citoplasmáticas a modo de pseudópodos, en la zona de unión con el germen, que rodean al mismo. Receptores de estos pseudópodos se unen a ligandos específicos de la partícula a fagocitar provocándose señales fagocíticas que producen un mayor desarrollo de los pseudópodos. Todo este proceso debe ser repetido muchas veces para que el neutrófilo englobe totalmente la partícula, dándose un fenómeno que se denomina “en cremallera” (Murphy, 1990). El fagosoma o vacuola digestiva así formado se separa entonces de la membrana celular y se mueve centrípetamente, dirigiéndose al interior de la célula. La membrana celular del heterófilo está en continuo proceso de renovación, sintetizándose permanentemente nuevas porciones que reemplazan a las que se han internalizado.

El mecanismo móvil para el movimiento de los pseudópodos viene dado por la concentración de microfilamentos y de su sistema de proteínas contráctiles, actina y miosina, así como de las proteínas que unen actina (Root y Cohen, 1981). Stendahl y colaboradores (1980) observaron a microscopio electrónico filamentos de actina y miosina en el citoplasma de células fagocíticas que estaban en mayor concentración en los lugares implicados en la ingestión de partículas. Como cabría esperar, la citocalasina B, inhibidor de la formación de microfilamentos, provoca una inhibición del proceso de ingestión.

Stossel y Hartwing (1976) aislaron del citosol de células fagocíticas actina y miosina y una proteína que une actina (ABP). La ABP producía la gelificación de la actina, y la adición de miosina, causaba la contracción de este gel. La longitud de las fibras de actina es controlada por una proteína dependiente de calcio, la gelsolina y por otra independiente del mismo, la acumentina, que disminuye la longitud de los filamentos de actina. Estos investigadores propusieron que la unión de una partícula a moléculas apropiadas de la membrana plasmática de la célula fagocítica hace que la ABP abandone la membrana de ésta y se une a la actina en la región que rodea a la partícula, promoviéndose el ensamblaje de G-actina, dando F-actina y finalmente, formándose una red de filamentos que dan lugar a un gel a la vez que la miosina contrae los filamentos. Debe existir por otra parte, un mecanismo que haga desaparecer el gel formado para que los filamentos retornen a su estado de reposo.

Yin y Stossel (1979) aislaron otra proteína del citoplasma de células fagocíticas. Cuando las tres proteínas fueron incubadas juntas en presencia de cantidades micromoleculares de Ca^{2+} la gelsolina impide la gelificación de la actina por la ABP. Cuando el Ca^{2+} está ausente la gelsolina no tiene efecto sobre la interacción de actina con ABP. Estos investigadores establecieron posteriormente que las transformaciones solución-gel podrían ser reversibles alterando el contenido de Ca^{2+} en el medio de incubación y que la gelsolina podría causar las transformaciones gel-solución en una relación de una molécula de gelsolina a 166 moléculas de actina. Propusieron también, que el estado físico del conjunto de filamentos es regulado por la relación del polímero actina y del formador de la red bidimensional (ABP), rompiendo la gelsolina a la actina, sólo en determinados sitios de la red de filamentos. Así, se produce un pequeño pero significativo incremento en la relación anterior, solubilizándose el gel de esta manera.

El proceso de ingestión de partículas previamente opsonizadas o no opsonizadas es diferente. Cuando existe opsonización previa los procesos de activación celular son más rápidos que en ausencia de la misma (Murphy, 1990). Se ha encontrado, por otro lado, que la velocidad media de ingestión de partículas simples es de 1 minuto

aproximadamente y la difusión en la membrana del receptor Fc de 2 a 3×10^{-9} cm^2/sg (Michl y cols., 1983).

Las interacciones ligando-receptor no sólo determinan la unión de las partículas y generan la señal de transmisión, sino que también juegan un papel importante en el proceso de ingestión. Es posible que la interacción inicial ligando-receptor sea la responsable de activar la maquinaria intracelular, a través de interacciones repetidas que provocan señales fagocíticas, produciéndose de este modo la extensión de los pseudópodos. Estos, generados de forma continua, darían lugar a la ingestión de la partícula unida, mientras que en el resto de los ligandos situados sobre la partícula actuarían tan sólo como sitios de unión “pasivos” a los receptores de la membrana, permitiendo así el avance de los pseudópodos que completa la ingestión (Silverstein y cols., 1989).

La ingestión es un proceso dependiente de cationes divalentes como Ca^{2+} y Mg^{2+} así como de los nucleótidos cíclicos. Chakravarti (1988) ha encontrado que la ingestión de eritrocitos de conejo por monocitos humanos puede hacerse de forma independiente a la presencia de suero, no siendo inhibida por bloqueo de receptores CR1, CR3, Fc y OKM1, entre otros, y que sólo depende de una concentración óptima de magnesio. Al igual que ocurría en la quimiotaxis, los factores que incrementan el guanosin monofosfato cíclico (GMPc) intracelular estimulan la ingestión mientras que los factores que aumentan el AMPc intracelular la inhiben (Amnon, 1997).

Es éste también un proceso que consume energía no pudiendo además ocurrir a bajas temperaturas o en presencia de inhibidores de la glucólisis anaerobia (Karnousky y cols., 1975). Mientras que en granulocitos y monocitos la energía es producida por la glucólisis, en macrófagos alveolares parece ser obtenida a partir de la fosforilación oxidativa (Cline, 1965). A pesar de que la glucólisis proporciona toda o casi toda la energía necesaria para la fagocitosis, no es la única ruta metabólica que aumenta durante la misma; ya que se observa aumento en el consumo de oxígeno y del metabolismo del mismo, así como la ruta de las pentosas monofosfatos (Densen y Manden, 1978). Esta

última, aunque no es requerida para la ingestión propiamente dicha, sí será necesaria posteriormente para la digestión intracelular del germen ingerido.

Producida la ingestión e iniciada la fagocitosis, tiene lugar una serie de acontecimientos morfológicos y bioquímicos. Así una enzima presente en la membrana del fagocito, una piridín-nucleótido oxidorreductasa NADP(H) que en polimorfonucleares (PMNs) parece ser una flavoproteína oxidorreductasa puesto que requiere flavín adenín dinucleótido (FAD) para su actividad óptima, es activada y arrastrada al interior de la vacuola fagocítica donde reduce el oxígeno, en parte o totalmente, a ion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) para promover el proceso de destrucción del germen (Babior, 1984).

B. DESGRANULACIÓN

Tan pronto como se forma la vacuola fagocítica o fagosoma, los movimientos dentro del citoplasma se activan y, como consecuencia de ello, los gránulos azurófilos y los específicos se aproximan a la membrana común y vierten su contenido enzimático al interior del fagosoma. Queda así constituido el fagolisosoma donde se inician los procesos encaminados a la destrucción y digestión del germen o partícula fagocitada; este proceso recibe el nombre de desgranulación. El movimiento de los gránulos hacia el fagosoma implica también la interacción de microtúbulos y microfilamentos (Williams, 1982).

Para la desgranulación es necesaria la presencia de Ca^{2+} intracelular (Styrt y cols., 1988), el metabolismo de fosfolípidos y la proteína quinasa C (Tauber, 1987), así como el ATP generado a partir de la glucólisis, no existiendo desgranulación en presencia de inhibidores de la misma (Goldstein, 1985).

No todo proceso de fagocitosis va acompañado de desgranulación. Algunos gérmenes como *Toxoplasma gondii* y las brucelas, por ejemplo, son fagocitadas pero

por alguna razón todavía no establecida no inducen desgranulación y pueden permanecer vivos dentro del fagosoma.

Una vez llevada a cabo la desgranulación interna, se van a producir una serie de acontecimientos o procesos químicos que van a provocar la muerte y digestión del material ingerido.

1.3.3. DESTRUCCIÓN DEL MATERIAL INGERIDO: MECANISMOS MICROBICIDAS.

Una vez ingerido el microorganismo se disparan una serie de eventos en el fagocito que conducen a la muerte y digestión del mismo. En primer lugar se produce la fusión de la membrana fagocítica con la membrana del gránulo lisosomal, formando un fagolisosoma y liberándose el contenido de los gránulos a la vacuola fagocítica (Kaufmann, 1989).

Los procesos químicos que constituyen el mecanismo microbicida y que conllevan la destrucción del material ingerido pueden ser categorizados en dos grandes grupos: sistema independiente de oxígeno y sistema dependiente de oxígeno. El primero es un conjunto de compuestos que actúan en ausencia de oxígeno, mientras que el segundo está constituido por una serie de reacciones de oxidorreducción que conducen al denominado “estallido respiratorio” que acompaña a la fagocitosis y en el que se produce un gran consumo de oxígeno.

1.3.3.1. Procesos microbicidas independientes de oxígeno.

Son debidos a diversas sustancias procedentes de los heterófilos con actividad antimicrobiana y tienen lugar en medio anaerobio y en fagocitos en los que es deficiente o está ausente la capacidad oxidativa (Weiss y cols., 1982), tales como:

Cambio de pH.

El metabolismo anaerobio dentro del fagosoma lleva a la rápida producción de ácido láctico y ácido ascórbico, disminuyendo el pH hasta cifras que fluctúan entre 6 y 4. Este pH por sí sólo es suficiente para matar a una serie de microorganismos y/o detener el crecimiento de otros.

Liberación de lisozima.

Este enzima procedente de los gránulos azurófilos y específicos de los neutrófilos, puede lisar bacterias rompiendo la unión entre el ácido murámico y la N-acetil-glucosamina presentes en la membrana celular de muchas bacterias Gram-positivas.

Lactoferrina.

Esta proteína procedente de los gránulos secundarios o específicos de los neutrófilos tiene la capacidad de ligar ávidamente Fe^{2+} . Así, al privar a las bacterias de este microelemento necesario para su normal metabolismo tiene un efecto bacteriostático sobre las mismas.

Proteínas catiónicas.

Se denominan así a un conjunto de 9 proteínas de bajo peso molecular y con grupos ácidos que interfieren en el metabolismo de muchas bacterias, presentando de este modo actividad bacteriostática y/o bactericida. Entre ellas se encuentran la fagocítica y la leucina, entre otras (Shafer y cols., 1984). El efecto de cada una de estas proteínas puede ser diferente sobre distintos gérmenes y en consecuencia la carencia genética de una o varias de ellas puede asociarse con procesos infecciosos crónicos debidos a determinados microorganismos (Rojas, 1982).

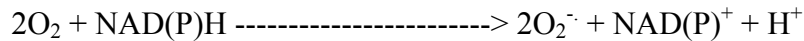
1.3.3.2. Procesos microbicidas dependientes de oxígeno.

Una importante fuente de radicales libres endógenos está constituida por el metabolismo de los fagocitos. Para que puedan cumplir su misión destructiva están dotados de diversos enzimas líticos (proteasas, lipasas, nucleasas, mieloperoxidasa, etc), y vías metabólicas que generan diversas especies químicamente agresivas, como son el peróxido de hidrógeno, radicales superóxido e hidroxilo y, probablemente singlete de oxígeno, que tienen como fin lesionar y destruir elementos extraños. En condiciones normales, estas especies reactivas de oxígeno son producidas y utilizadas en compartimentos como los lisosomas que, aunque situados en el interior de los fagocitos, no tienen porqué dañar a la célula, suponiendo que los mecanismos antioxidantes funcionen bien. Como es lógico suponer, los estados inflamatorios son causa de una producción aumentada de radicales libres que puede terminar desarbolando la defensa antioxidante celular y afectar su función o incluso lesionarla de forma irreversible.

Los procesos microbicidas constan de mieloperoxidasas y cofactores (halidas, tiocianato, tiroxina, triyodotiroxina), peróxido de hidrógeno, aniones superóxidos, radicales hidroxilos y singletes de oxígeno. Estos sistemas, mediante reacciones de oxidación-reducción, se encargan de la destrucción y digestión de las partículas fagocitadas. Tras la activación, las células fagocíticas aumentan el consumo de oxígeno, proceso conocido como “estallido respiratorio”. Este acontece en las células fagocíticas tras su exposición a un estímulo determinado que se lleva a cabo mediante la activación de una enzima, una oxidasa la NADPH que en algunas especies está asociada a la membrana (Cohen y cols., 1980) que constituye, realmente, una cadena de transporte electrónico en la que participan NADPH deshidrogenasa, Flavín adenín dinucleótido (FAD), ubiquinona y citocromo b; que formarían parte de gránulos terciarios que se unirían a la membrana celular durante la formación del endosoma y serían necesarios para la activación de la oxidasa (Mollinedo y Schneider, 1987).

Formación de anión superóxido.

La gran mayoría del oxígeno consumido durante la fagocitosis se transforma en anión superóxido, intermediario para la formación de agua oxigenada, con la intervención de una oxidasa, según la reacción:

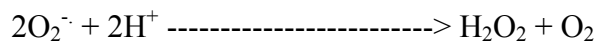


El O_2 recibe un electrón adicional. El anión superóxido tiene gran poder bactericida cuando alcanza determinadas concentraciones (Prince y Gunson, 1987). Debido a que este superóxido se presenta como altamente tóxico, es rápidamente eliminado por la acción de la superóxido dismutasa (SOD) (Makino y cols., 1986), dando lugar a la formación de agua oxigenada que posteriormente será eliminada por diversos mecanismos que a continuación serán comentados.

Formación de peróxido de hidrógeno.

La reacción mediante la cual se forma el peróxido de hidrógeno o agua oxigena, de potente actividad bactericida es:

SOD

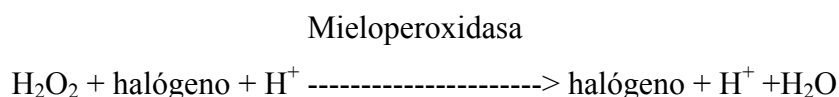


En esta reacción el oxígeno acepta dos electrones y se puede realizar de manera espontánea o bien por la enzima superóxido dismutasa.

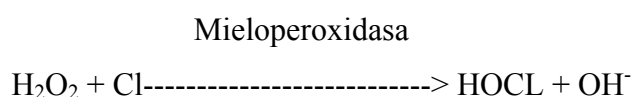
Como este peróxido de hidrógeno difunde al citoplasma, donde puede ser tóxico para las células fagocíticas, es degradado por el sistema glutatión peroxidasa-glutatión reductasa. A través de ellos se produce H_2O evitándose que el citoplasma de estas células sufra algún daño nocivo.

Activación de halógenos.

La actividad germicida del peróxido de hidrógeno puede ser incrementada considerablemente en presencia de halógenos y de una peroxidasa. Los distintos iones halógenos intracelulares como Br⁻, Cl⁻, y I⁻, especialmente los dos últimos, son activados por la presencia de agua oxigenada y de la mieloperoxidasa (MPO). La enzima se une al agua oxigenada formando un complejo enzima-sustrato que oxida al haluro transformándolo en un haluro activado que representa en sí un agente tóxico y que además puede convertirse en otros compuestos que también poseen gran actividad destructiva. La reacción es:

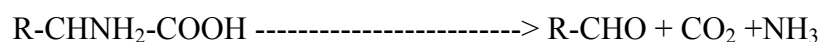


Se ha encontrado iodación, bromación y cloración de microorganismo con pérdida de la integridad de la superficie bacteriana. En el caso del ion cloruro parece ser que el principal producto formado por el sistema de la mieloperoxidasa es el ion hipoclorito, caracterizado por una gran toxicidad.



Descarboxilación de aminoácidos.

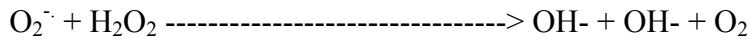
La reacción básica es:



Esta reacción está controlada en parte por la mieloperoxidasa. Se degradan muchos de los aminoácidos de la membrana bacteriana, lo cual da lugar a la muerte del germen.

Formación de radicales hidroxilos.

No está suficientemente claro como se forman estos radicales hidroxilos dentro del proceso de la fagocitosis, pero se sabe que son muy inestables y que reaccionan rápidamente con cualquier material orgánico. En consecuencia cumplen un papel bactericida importante (Cohen, 1980). La reacción en este caso es:

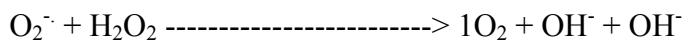
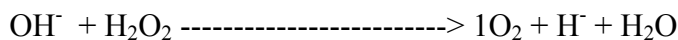
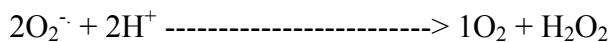


Formación de singletes de oxígeno.

Como consecuencia del consumo de oxígeno durante la fagocitosis, además de la producción de radicales hidroxílicos también se forman los singletes de oxígeno ($^1\text{O}_2$). Se denomina así una forma del oxígeno, electrónicamente excitado, que al formarse emite luz y es muy inestable, tratando constantemente de revertir a la forma de triplete o estado normal del oxígeno atmosférico. La diferencia entre triplete y singlete de oxígeno está en la distribución de los electrones alrededor de los dos núcleos de oxígeno. La alteración electrónica en la molécula del singlete de oxígeno le confiere una gran actividad química, especialmente sobre aquellos compuestos que tienen un doble enlace. En consecuencia, tienen la capacidad de interferir y alterar muchos de los sistemas biológicos (Klebanoff, 1980).

Las reacciones quimioluminiscentes son:

SOD



Parece, por otro lado, que factores liberados por plaquetas así como el lipopolisacárido bacteriano amplifican la secreción de enzimas digestivas y radicales de oxígeno (Haslett y cols., 1989). Además, ha de existir el balance entre la producción de radicales libres de oxígeno, proteasas y antioxidantes que mantengan el equilibrio para que no se produzca el daño tisular (Haslett y cols., 1989).

Factores que afectan al “estallido respiratorio”.

La activación de la respiración y producción de metabolitos tóxicos del oxígeno, “estallido respiratorio”, es una respuesta producida no sólo por el proceso fagocítico, sino también por la interacción de los fagocitos con un gran número de factores estimulantes solubles. Estos son, por ejemplo, componentes del complemento, lectinas, péptidos quimiotácticos, ionóforos de Ca^{2+} , leucotrienos, factores de activación de plaquetas (Rossi y cols., 1982) y factor estimulador de colonias (FSC) producido por macrófagos y granulocitos (Nathan, 1988).

Tras la estimulación de receptores de fagocitos con anticuerpos frente al factor C3, se ha encontrado un incremento dosis-dependiente de Ca^{2+} libre intracelular no dependiente de los niveles extracelulares de este ión. En estudios posteriores Hartiala y colaboradores (1987) observaron una relación entre movilización de Ca^{2+} y estallido respiratorio, aunque sugirieron que la movilización era insuficiente para estimularla.

Otro aspecto considerado, es la posible modulación β -adrenérgica del estallido respiratorio en fagocitos. Nielson (1987) observó que bajas concentraciones de prostaglandina 2 e isopropanolol inhibían el estallido respiratorio inducido por péptidos formilados o ionóforos de Ca^{2+} (A23187), posiblemente al aumentar los niveles de AMPc.

La unión de diferentes moléculas (anticuerpos monoclonales específicos) a los receptores para la fracción Fc de las inmunoglobulina G (IgG) en fagocitos, provocan

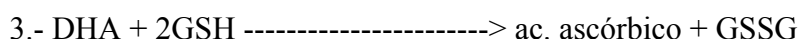
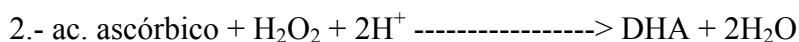
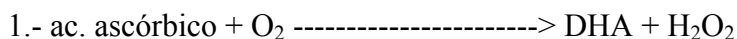
no sólo un aumento en la desgranulación y liberación de enzimas, sino que también va acompañada de un incremento en la producción de superóxido (Willis y cols., 1988).

Mecanismo microbicida asociado al ácido ascórbico.

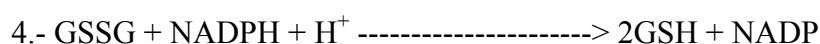
Todos los tipos celulares sanguíneos, excepto los eritrocitos, contienen más ácido ascórbico (vitamina C) que el plasma (Moser y Weber, 1984). Esta vitamina parece desempeñar un papel importante en la función de estas células inmunes (Bendich, 1988), siendo reconocida como inmunoestimulador (Anderson, 1982). Concretamente participa en la función fagocítica (Goldschmidt y cols., 1988), aunque el mecanismo exacto de actuación no está aún muy claro.

En el plasma la vitamina C se encuentra en su forma reducida, ácido ascórbico, de donde es tomada por los fagocitos. Al parecer la captación de este ácido por los neutrófilos se produce sólo cuando éstos están activados. Probablemente el ácido ascórbico podría actuar estimulando sistemas independientes de la mieloperoxidasa (McCall y cols., 1971). El ácido ascórbico, por sí sólo, no afecta a la viabilidad bacteriana (Mc Call y cols., 1971) pero potencia la actividad bactericida de neutrófilos, posiblemente por un mecanismo de interacción entre el ácido ascórbico y la lisozima.

De Chatelet y colaboradores (1972) propusieron un conjunto de reacciones para explicar el posible mecanismo por el que actuaría el ácido ascórbico.



glutación-reductasa



DHA = dehidroascórbico.

GSH = glutatión reducido.

GSSG = glutatión oxidado.

De este modo se postularon unos mecanismos bactericidas que requieren H_2O_2 pero que son independientes de la mieloperoxidasa. El NADP producido en la cuarta reacción podría reaccionar con la glucosa-6P, explicándose así el aumento de la ruta de las hexosas monofosfato. En la estimulación de esta vía metabólica podrían intervenir el DHA, 2GSH y NADPH, ya que la falta de algunos de ellos no permite la estimulación de la ruta de las hexosas monofosfato, hecho que sucede de forma posterior a la producción de H_2O_2 y es dependiente de la misma.

Contrariamente, Stankova y colaboradores (1975), indicaron que el ácido ascórbico no producía ninguna variación en la producción de agua oxigenada, ni en la actividad bactericida de las células fagocíticas. Ello sugirió que el ácido ascórbico no interviene ni en la formación de agua oxigenada ni en los mecanismos microbicidas.

Se ha observado que el ácido ascórbico actúa preservando la integridad celular por inactivación de los radicales libres y oxidantes (O_2^- y H_2O_2) que disminuirían la funcionalidad de los neutrófilos (Englard y Seifter, 1986). Quizás el ácido ascórbico sea más importante para proteger los daños oxidativos que como activador del proceso microbicida (Levine, 1986).

1.4. CONEXIÓN BIDIRECCIONAL DE LA GLÁNDULA PINEAL Y EL SISTEMA INMUNE: ESTUDIOS EN MAMÍFEROS Y AVES.

Anatómicamente, evidencias tanto fisiológicas como farmacológicas apoyan el concepto de la interacción de los sistemas nervioso y endocrino con el sistema inmune. Hoy día no hay ninguna duda sobre la interacción entre los sistemas inmune, nervioso y endocrino (Homo-Delarche y Dardenne, 1993; Fabris, 1994; Skwarlo-Sonta, 1996) (Figura 14).

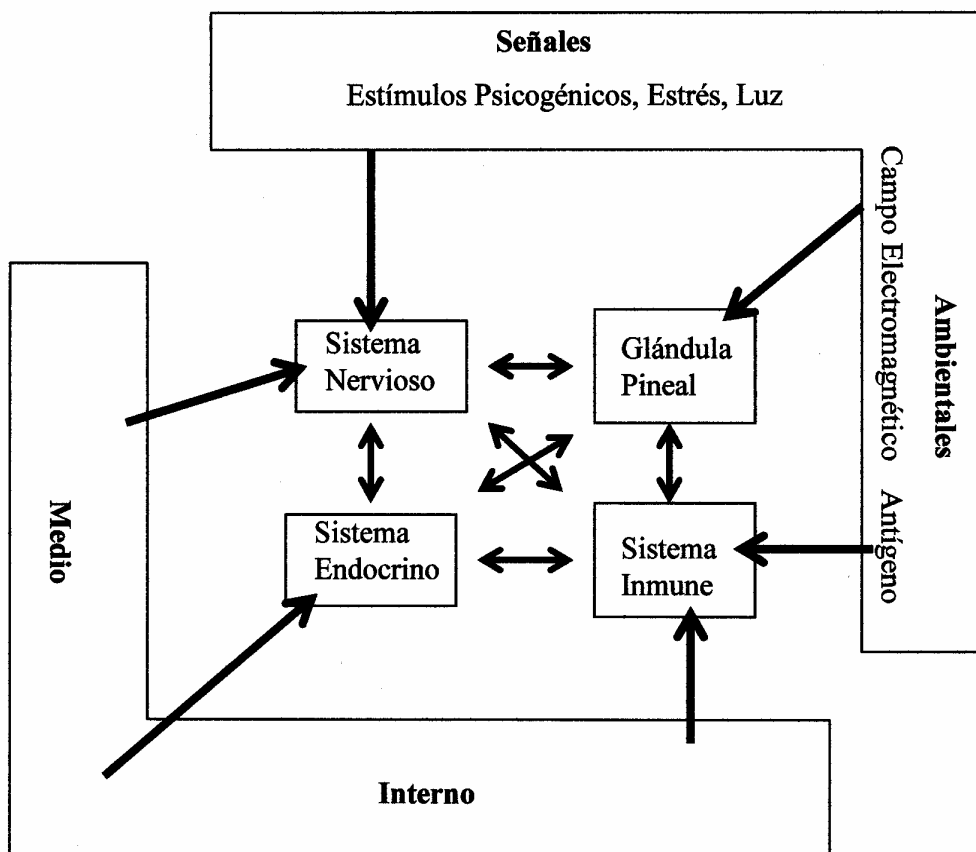


FIGURA 14: La glándula pineal envuelta en la señal de traducción entre la influencia medioambiental y los sistemas inmune, nervioso y endocrino (Tomada de Skwarlo-Sonta, 1996, modificada).

La respuesta inmune altera la función neuronal y endocrina, así como, la actividad neuronal y endocrina modifican la función inmunológica (Blalock, 1984). Esta relación no ha sido solo identificada en neuroinmunología, que es la ciencia que estudia las reacciones inmunes que envuelven al sistema nervioso central, sino que también ha dado lugar a la formulación de nuevas y diversas disciplinas. Así, la neuroinmunomodulación se refiere a la influencia del sistema nervioso sobre la respuesta inmune, la psiconeuroinmunología es el estudio de las influencias neuroendocrinas sobre la función de las células inmunocompetentes y la manera en la cual estas células también influyen la función neural y la actividad endocrina. En este contexto, la melatonina como el mayor componente sintetizado en la glándula pineal, es considerada como un nuevo miembro de la red neuroinmunoendocrina. (Guerrero y Reiter, 2002; Skwarlo-Sonta, 2003).

Si la glándula pineal participa en la transmisión de información entre el medio externo e interno y juega un papel en la modulación de la función del sistema inmune, es esencial que el sistema inmune envíe su propia información a la glándula y estas señales tengan que ser adecuadamente transformadas para mantener la homeostasis. Diversas investigaciones indican que la glándula pineal es capaz de recibir esta clase de información y parece ser que las citoquinas son los mejores mediadores para efectuar esta importante función.

La interpretación del mensaje de la melatonina dentro del cuerpo es esencial para las funciones fisiológicas de un animal para adaptarse a las necesidades y condiciones ambientales, una adaptación que incrementaría la probabilidad de supervivencia. La actividad del sistema inmune es una de las capacidades fisiológicas responsables de la supervivencia de un individuo animal y la función del sistema reproductor garantiza la supervivencia de las especies. La eficiencia de la función inmune contra microorganismos extraños, moléculas extrañas o células tumorales, requiere ser coordinado en periodos de 24 horas. Como ocurre con otras funciones del cuerpo, la actividad del sistema inmune está en sincronía recíproca con los cambios circadianos lo cual es de gran importancia para la homeostasis. Las enfermedades sin

embargo, pueden alterar estos ritmos y modificar su coordinación temporal (Levi y cols., 1992).

Durante los últimos 30 años, numerosos artículos han documentado la existencia de una relación entre melatonina/pineal y el sistema inmune en aves y mamíferos, incluido humanos. Datos tanto in vivo como in vitro confirman esta relación, basándose en lo siguiente: a) la correlación entre la producción de melatonina y las variaciones circadianas y estacionales en el sistema inmune, b) el efecto de la pinealectomía sobre el sistema inmune, c) el efecto de la administración in vivo de melatonina sobre el sistema inmune, d) la regulación in vitro de la actividad de las células inmunes por la melatonina y e) la presencia de receptores de melatonina en el sistema inmune (Guerrero y Reiter, 2002).

Los corticoides fueron los primeros factores humorales reconocidos como reguladores del ritmo diario del sistema inmune (Skwarlo-Sonta, 1996). Existe una clara evidencia, sin embargo, que ciertos parámetros y algunas células inmunes fluctúan diferencialmente bajo un periodo de 24 horas y exhiben diferentes fases relacionadas con los niveles circulatorios de corticosteroides (Levi y cols., 1992). Hay uno o más factores involucrados en la regulación del ritmo circadiano de la función inmune y uno de los principales candidatos sería la glándula pineal y su secreción de melatonina. Hay tres razones que argumentan esta afirmación: 1) la periodicidad estacional y circadiana de la función de la glándula pineal; 2) la fuerte dependencia de la síntesis del ritmo circadiano de melatonina con las condiciones de luz; y 3) la participación de la melatonina en el control de diferentes ritmos biológicos, incluyendo los asociados con el envejecimiento y con desórdenes psicósomáticos, los cuales están asociados con un incremento en la incidencia de infecciones, desórdenes autoinmunes y cáncer (Skwarlo-Sonta, 1996).

En mamíferos y pájaros, el desarrollo y los cambios relacionados con la edad en la función de la pineal parecen estar menos relacionados con la eficiencia del sistema inmune. Los mecanismos por los cuales la melatonina influencia la función del sistema

inmune son complejos, pero son conocidos por su participación de mediadores como opioides endógenos, citoquinas, hormonas, etc. Como la melatonina es un compuesto altamente lipofílico, podría penetrar fácilmente en las células inmunes sin la mediación de receptores específicos, actuando dentro de la célula como un potente secuestrador de radicales libres, como un factor anti-edad y oncostático. El sistema inmune podría, vía la síntesis y secreción de factores solubles, como por ejemplo citoquinas, influenciar la función de la glándula pineal; de este modo almacenaría la información necesaria para mantener la homeostasis de cara al ambiente perjudicial (Skwarlo-Sonta, 1996).

1.4.1 RITMOS CIRCADIANOS Y ESTACIONALES DE LA FUNCIÓN INMUNE: CORRELACIÓN CON MELATONINA.

Muchas respuestas neuroendocrinas exhiben una ritmicidad circadiana y circanual. Dada la estrecha relación entre los sistemas neuroendocrino e inmune, no es sorprendente que algunos parámetros inmunes también muestren ambos tipos de ritmicidad. Un ejemplo son los ritmos diurnos y estacionales de la proliferación celular en la médula espinal en mamíferos y el sistema linfoide (Haus y cols., 1983), linfocitos (Paglieroni y cols., 1994), actividad de las células natural killer (Fernández y cols., 1979) y producción de citoquinas (Petrovsky y Harris, 1977). Sin embargo, la primera indicación de una relación entre el fotoperiodo y el sistema inmune fue publicado por Vaughan y colaboradores (1987) cuando demostraron que los días cortos incrementaban el peso del timo en jóvenes roedores (campañol). Similares resultados fueron obtenidos por Brainard y colaboradores en hámsteres (Brainard y cols., 1987). En 1988, Kuci y colaboradores exploraron el papel inmunomodulador de la glándula pineal en ratones C57BL/6JHAN y observaron que el pico nocturno de melatonina estaba estrechamente sincronizado con el pico de proliferación de células progenitoras para granulocitos y macrófagos (CFU-GM). Desde entonces, varias investigaciones han confirmado la correlación entre días cortos y/o picos en los niveles de melatonina por la noche, con el número de linfocitos sanguíneos; estos estudios fueron llevados a cabo en ratones (Demas y Nelson, 1996, 1998a; Nelson y cols., 1998) y humanos (Depres-Brummer y cols., 1997). Sin embargo, los resultados no fueron reproducidos en ratas, donde está

ausente una correlación entre el ritmo circadiano de melatonina y el ritmo en la circulación de linfocitos, sugiriendo un oscilador autónomo inmunológico en esta especie (Akbulut y cols., 1999).

Se ha evaluado también otro aspecto de la función inmune para determinar su correlación con el ritmo de melatonina en la inmunidad no específica, la acción de fagocitar. La fagocitosis, ingestión y digestión del antígeno, es probablemente el mecanismo de defensa más extendido en el reino animal. En pájaros, los heterófilos son considerados por ser los fagocitos primarios, representando el mayor porcentaje de leucocitos periféricos. Estudiando estas células, Rodríguez y colaboradores (1999a) mostraron en la tórtola collariza que los picos nocturnos séricos de melatonina se correlacionaban con un incremento en la actividad fagocítica de los heterófilos; esto sugirió una íntima relación entre la melatonina y la inmunidad no específica. Mientras, muchos estudios no demuestran inequívocamente, que la melatonina sea 100% responsable de las variaciones circadianas y circanuales en la inmunidad específica y no específica, empieza a estar claro que la melatonina de algún modo participa en la regulación de estas variaciones estacionales y circadianas (Nelson y cols., 1999).

1.4.2. PINEALECTOMÍA, BURSECTOMÍA Y SISTEMA INMUNE.

Se ha investigado con profundidad el papel de la glándula pineal en la regulación del sistema inmune en roedores y pájaros, pinealectomizados o tras ganglionectomía cervical superior (SCGx), la cual funcionalmente denerva la pineal.

El embrión aviar ofrece un excelente modelo para el estudio de la interdependencia recíproca entre la glándula pineal y el sistema inmune, especialmente porque el timo y la pineal empiezan su desarrollo al mismo tiempo (Skwarlo-Sonta, 1996, 1999, 2002). En embriones de pollos pinealectomizados de 96 horas de incubación, Jankovic y colaboradores (1994) observaron un retraso en el desarrollo de los órganos linfoides primarios (timo y bolsa de Fabricio) y un descenso en la respuesta inmune humoral y en las actividades de los diferentes tipos la inmunidad mediada por

células. Estos resultados indican claramente la necesidad de una glándula pineal intacta para el normal desarrollo del sistema inmune y sugiere que la glándula pineal podría influenciar los órganos linfoides directamente y/o indirectamente vía otras secreciones neuroendocrinas (Skwarlo-Sonta, 2002). No obstante, se puede no reflejar la posibilidad de que la síntesis extrapineal de melatonina ejerza un efecto compensatorio a lo largo del estado de desarrollo.

Una relación estratégica entre el sistema inmune y la glándula pineal también se demostró en experimentos con la bolsa de Fabricio, una glándula linfóide primaria que se encuentra exclusivamente en especies aviares y es responsable de la maduración de las células B. Se demostró que la bursectomía embrionaria no solo disminuía la respuesta inmune de pollos sino que también influenciaba el ritmo circadiano de la función de la glándula pineal reduciendo los picos nocturnos de la actividad de la NAT pineal y los niveles de melatonina séricos (Youbicier-Simo y cols., 1996). También, la pinealectomía en pollos abolía el ritmo circadiano y los parámetros de la inmunidad no específica, los cuales se restauraban con un tratamiento prolongado con dosis fisiológicas de melatonina (Rosolowska-Huszcz y cols., 1991).

Con respecto a la inmunidad específica, la pinealectomía en la tórtola collariza incrementa el número de células blancas y el nivel de proteínas totales y alteró la fagocitosis de los heterófilos (Rodríguez y Lea, 1994), presentando estos heterófilos un aumento en el metabolismo oxidativo. Este efecto fue relacionado a una reducción en la circulación de melatonina (Rodríguez y cols., 1999a).

En pájaros, la pinealectomía además daña gran número de parámetros inmunes. Al igual que Jankovic y colaboradores (1994) quienes observaron que la pinealectomía en embriones de pollo causaba una reducción en la tasa de supervivencia, retardaba el desarrollo del timo, bazo y bolsa de Fabricio, además de inducir una reducción de los linfocitos en el timo, bolsa y bazo, otros investigadores han observado que una temprana pinealectomía disminuyó la producción de anticuerpo en el embrión en desarrollo de pollo. La ausencia de pineal también afecta a la inmunidad no específica

de pollos (Rosolowska-Huszcz y cols., 1991), tórtola (Rodríguez y Lea., 1994) y en gallinas jóvenes (Maxwell, 1981). En el caso de la tórtola y el de gallinas jóvenes, la pinealectomía produjo un incremento significativo del número total de leucocitos, con un descenso en el porcentaje de linfocitos y un incremento en el porcentaje de heterófilos (Maxwell, 1981; Rodríguez y Lea., 1994).

1.4.3. PAPEL INMUNOMODULADOR DE LA MELATONINA.

Observaciones generales sugieren que los efectos ejercidos por la melatonina sobre aspectos de la función del sistema inmune no solo depende de la especie, edad y sexo, sino que también depende del protocolo experimental (incluyendo la estación del año), la dosis de melatonina utilizada y la ruta de administración empleada (Maestroni y cols., 1987; Skwarlo-Sonta, 2002). Una de las más interesantes relaciones entre la melatonina y el sistema inmune esta representada por los cambios dependientes de la estación observados en la inmunidad en animales de vida salvaje tanto en condiciones naturales como bajo condiciones de laboratorio, donde los animales fueron mantenidos bajo diferentes regimenes de iluminación (Markowska y cols., 2000).

En aves, se ha visto que la melatonina podría ser moduladora de varias funciones inmunes, como por ejemplo, producción de anticuerpos, proliferación de linfocitos, actividad ADCC, citotoxicidad de las células NK, síntesis y liberación de citoquinas, etc. (Skwarlo-Sonta, 1996). Se conoce que la melatonina intensifica la mitogénesis inducida de los linfocitos T sanguíneos y la proliferación de células T y células B en pollos machos (Kliger y cols., 2000). También se ha sugerido que la melatonina inhibe la proliferación *in vitro* de linfocitos de pollos PHA estimulados (Markowska y cols., 2001). En el pollo, se encontró que el ritmo circadiano de diferentes parámetros dependían fuertemente de la presencia de una glándula pineal intacta (Rosolowska-Huszcz y cols., 1991). En pollos de 7 semanas inmunizados a intervalos de 9 días con antígenos de cerdo T-dependientes (Youbicier-Simo y cols., 1996), se observó como la concentración de melatonina sérica diurna se incrementó después de la inmunización de estos animales. Estos datos apoyan el papel de la melatonina como una hormona

inmunomoduladora en aves y establece la glándula pineal como la primera fuente de esta regulación inmune mediada por la melatonina.

La supresión de la inmunidad y la atrofia del timo fueron efectos que desencadenó la pinealectomía postnatal en roedores (Csaba y Barath, 1975; Maestroni y cols., 1986). Del mismo modo en embriones de pollos pinealectomizados se observó una reducción en el número de células inmunes en el bazo y en la bolsa de Fabricio. En contraste, se comprobó que la melatonina exógena incrementaba el crecimiento de tejidos inmunes y sus poblaciones de células (Haldar y cols., 2001).

1.4.3.1. Efecto de la administración de la melatonina in vivo sobre el sistema inmune.

La administración de melatonina en mamíferos incluidos humanos y aves tiene influencias sobre el sistema inmune. Usando estos datos experimentales, muchos autores han demostrado las propiedades inmuno-intensificadoras de la melatonina en términos de una variedad de parámetros inmunes. Así, la inyección diaria por la tarde de melatonina indujo un incremento del peso del timo en el jerbo (mamífero roedor norteafricano del tamaño de una rata) (Vaughan y cols., 1979) e hipertrofia del bazo en el hámster sirio (Vaughan y cols., 1987). La administración de melatonina también incrementa la respuesta mitogénica de esplenocitos de ratón (Sze y cols., 1993; Demas y Nelson, 1998b) y la proliferación de linfocitos en tumores de ratas Walker-256 (Liebman y cols., 1996). Sin embargo, el efecto de la melatonina sobre la inmunidad humoral en animales no inmunodeprimidos está menos clara. Un par de artículos muestran, en ratones, que los extractos de pineal de bajo peso molecular, incrementan el número de anticuerpos generados en el bazo y nivel de hemaglutininas en respuesta a SRBC (Belokrylov y cols., 1976; Anisimov y cols., 1982). Sin embargo otros autores han informado que la melatonina no tiene efectos sobre la inmunidad humoral en ratones (Demas y Nelson, 1998b) o hámster sirio (Champney y cols., 1998).

Muchos son los parámetros inmunes que se han medido en mamíferos, incluidos humanos, demostrando el efecto inmunoestimulador de la melatonina. Diversos autores (Lissoni y cols., 1986; Angeli y cols., 1987) demostraron que la administración de melatonina incrementaba la actividad de las células NK en mamíferos. En ratones Balb/c la melatonina también indujo un incremento de ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos), un mecanismo lítico en el cual un anticuerpo específico actúa cooperativamente con células leucocitarias efectoras que inducen lisis celular (Giordano y Palermo., 1991; Giordano y cols., 1993) e incrementa los niveles plasmáticos de IL-2 (Mocchegiani y cols., 1993). En el hámster sirio, la melatonina incrementa el gamma-interferón (IFN- γ) pero solo cuando la melatonina es inyectada por la tarde (Champney y cols., 1998).

Finalmente, un artículo de Pioli y colaboradores (1993) mostró que en ratones C57BL/10 la melatonina aumenta la presentación de antígeno por macrófagos del bazo a células T y sus efectos ocurren concretamente con un incremento en la expresión de moléculas de la clase II MHC y la producción de IL-1 y el factor de necrosis tumoral (TNF α).

Una función adicional de la melatonina en el sistema inmune es su participación en la regulación de la expresión génica de inmunomoduladores de citoquinas y otros reguladores inmunes en el bazo, timo, nódulos linfáticos y medula ósea. En ratones C57, la melatonina regula el nivel de expresión génica de M-CSF, TNF α , TGF β , en macrófagos peritoneales, y los niveles de IL-1b, IFN α , M-CSF, TNF α y SCF en esplenocitos (Liu y cols., 2001). La melatonina también incrementa la producción de péptidos tímicos así como timosín α 1 y timulina (Molinero y cols., 2000).

De forma interesante, la melatonina también participa en la regulación de la apoptosis de células B y T. La apoptosis extensiva normal ocurre en la medula espinal y en el timo, los cuales están provistos de un mecanismo de eliminación de las células T y B anormales en concordancia con la estimulación proliferativa, lo cual ayuda al control de los niveles de la producción de nuevas células T y B. La activación anti-apoptósica mediante el tratamiento con melatonina es similar para las células B en la medula

espinal y las células T precursoras en el timo (Yu y cols., 2000). Quizás la situación en la cual los efectos estimuladores de la melatonina sobre el sistema inmune están mejor demostrados, son aquellos en los cuales el sistema inmune está deprimido. Hay muchos modelos de inmunosupresión incluyendo la edad, estrés físico, enfermedades infecciosas y tratamiento con corticoides, drogas antitumorales y drogas adrenérgicas. Aoyama y colaboradores (Mori y cols., 1984; Aoyama y cols., 1987), mostraron que la administración de melatonina a ratas en crecimiento, proporcionaba una protección significativa contra los efectos perjudiciales (descenso del peso corporal, atrofia del timo y adrenales) causados por la dexametasona. Resultados similares fueron obtenidos por Maestroni y colaboradores (Maestroni y cols., 1986; Pierpaoli y Maestroni, 1987) en ratones. Estos autores mostraron que el tratamiento de ratas con propanolol y corticosterona resulta en una depresión significativa de la respuesta primaria de anticuerpos. Dando inyecciones de melatonina por la noche, las ratas revierten completamente la supresión de la respuesta humoral. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Caroleo y colaboradores (Caroleo y cols. 1990; 1992) en ratones viejos o ratones tratados con ciclofosfamida. La melatonina, cuando se inyectó cronológicamente en ratones inmunodeprimidos por la edad o por ciclofosfamida, aumentó la respuesta de los anticuerpos a un antígeno T-dependiente. Este aumento estuvo asociado con un incremento inductor de la actividad de las células T helper y la producción de IL-2. Todos estos efectos, concuerdan con los obtenidos por Maestroni y colaboradores (Maestroni y cols., 1987) quienes indicaron que podían estar mediados por una familia de péptidos opioides, como la naltrexona, un opioide antagonista específico, que previene las propiedades inmunoestimuladoras de la melatonina.

Las enfermedades infecciosas son también situaciones que cambian la respuesta inmune. Maestroni y colaboradores (1988) demostraron que la administración de melatonina por la tarde prevenía la parálisis y muerte de ratones infectados con dosis letales del virus de la encefalomiocarditis (EMCV) después de un acusado estrés. La actividad antiestrés de la melatonina se presenta en ratones inyectados con antígeno T-dependiente y fue abolida por naltrexona. Ben-Nathan y colaboradores (1995) también examinaron el efecto de la melatonina con el virus letal Semliki Forest y la atenuada no-

invasiva del virus West Nile. En ambos casos, la melatonina redujo la viremia y pospuso significativamente el comienzo de la enfermedad y muerte. En todos los animales supervivientes, se encontraron anticuerpos 22 días después de la inoculación del virus (Ben-Nathan y cols., 1995). Resultados similares fueron encontrados en ratones infectados con el virus Venezolano Equino (Bonilla y cols., 1997; 2001). La melatonina también retrasó el comienzo de la enfermedad y redujo la mortalidad de un 100% a un 16%. De nuevo, se encontraron altas concentraciones de anticuerpos específicos IgM, 7 semanas después de la inoculación del virus. Finalmente, la inmunodepresión siguió a un tramo hemorrágico en ratones C3H/HeM. Los resultados indican que la administración de melatonina después del tramo hemorrágico, restablece significativamente el descenso que se produce en las funciones inmunes; como evidencia están el aumento de los monocitos, IL1 y/e IL6, tan bien como de la producción de esplenocitos.

1.4.3.2. Regulación in vitro de la actividad de las células inmunes por melatonina.

La mayoría de los autores están de acuerdo en que la pinealectomía y modelos in vivo de administración de melatonina muestran claramente las propiedades inmunoestimuladoras de la indolamina. Muchos test de la función inmune dejan una pequeña duda de que en medio de muchas otras funciones, la melatonina podría ser considerada como un compuesto fisiológico inmunomodulador. Sin embargo, cuando la melatonina es usada in vitro, en otras palabras, añadiendo melatonina a diferentes cultivos de células inmunes, los resultados se muestran contradictorios.

En linfocitos aislados de humanos, la melatonina en el rango de 1nM incrementa la proporción de células portadoras de receptores IL-2 en la presencia de fitohemoaglutinina (PHA). A la misma concentración, la melatonina marcadamente incrementa la proporción de células portadoras de receptores T citotóxicos. Finalmente, López-González y colaboradores (1998) estudiaron el efecto de la melatonina sobre linfocitos aislados de amígdalas de niños con amigdalitis recurrente. Después del cultivo, los linfocitos del tipo B sufrieron un descenso en su proliferación, que fue

restaurado por adición de 1nM de melatonina. Los efectos fueron específicos para las células B, mientras que no afectaron a las células T o células NK.

Muchos autores sin embargo han reivindicado que la melatonina no afecta a los restantes linfocitos o linfocitos activados con PHA. Así, la melatonina a baja o altas concentraciones suspendió la actividad proliferativa de células linfoides en humanos (Artz y cols., 1988; Persengiev y Kyurkchiev 1993; Wölfler y cols. 1998; Konakchieva y cols., 1995) ratas (Palavani y Harris., 1997) o pollos (Markowska y cols., 2001). En algunos casos, un efecto inhibitor de la melatonina sobre la proliferación de linfocitos fue descrita inhibiendo tanto la actividad NK como la producción IFN γ y TNF α (Di Stefano y Paulesu, 1994). Estos resultados están en desacuerdo con los obtenidos en los modelos in vivo en los cuales la melatonina se comporta como un modulador positivo de la proliferación de linfocitos y producción de citoquinas.

Las razones para las aparentes contradicciones no están claras pero existen varias posibilidades:

- a) El efecto de la melatonina sobre las células inmunes está mediado vía otros tejidos, células, hormonas y/o citoquinas que no están presentes en el medio de cultivo. Además no hay duda de que la melatonina afecta a muchos sistemas los cuales, modulan el sistema inmune en presencia de receptores de melatonina en las células inmunes, apoyando la hipótesis de un efecto directo de la indolamina sobre estas células (Calvo, 1995).
- b) La eficacia de la melatonina en los cultivos ha sido testado primariamente en células activadas con PHA. Bajo estas condiciones, inmunomoduladoras, la inclusión de melatonina activa las células inmunes.
- c) La presencia de melatonina en el medio de cultivo liberada por las células inmunes podría enmascarar el efecto de la melatonina

exógena. Así la melatonina generada endógenamente podría interferir con la melatonina exógena añadida en los estudios in vitro.

Colombo y colaboradores (1992) mostraron que la melatonina incrementa la producción de IFN γ por esplenocitos en ratón, siendo esta estimulación significativamente mayor en células aisladas por la noche que en células aisladas por el día. García-Mauriño y colaboradores (2002) han mostrado también que la melatonina 1nM activa las células T humanas in vitro (tipo Th1) por incremento de la producción de IL-2 y IFN γ . En este estudio se observó el efecto de la melatonina en células que no fueron activadas o fueron levemente activadas con PHA; además, el efecto se obtuvo solamente cuando las células fueron aisladas al comienzo de la tarde y lavadas un número de veces con solución salina. Esta observación indica que algo en las células, posiblemente la melatonina endógena, altera los resultados de estos experimentos.

La respuesta de monocitos tanto en humanos como en ratones es modulada por la melatonina. Monrrey y colaboradores (1994) mostraron que 0.1 nM de melatonina, en combinación con lipopolisacarido (LPS) induce citotoxicidad de monocitos humanos, incrementa la producción de IL-1 y la producción de intermediarios del oxígeno reactivo (ROI). García-Mauriño y colaboradores (1999) también mostraron que 0.1 nM de melatonina activaba la producción de IL-6 y IL-12 en linfocitos humanos (García-Mauriño y cols., 1999; 1997). En humanos, el incremento en la producción de IL-12 por la melatonina podría en este sentido actuar sobre las células T humanas causando una respuesta tipo Th1. Además, un efecto directo de la melatonina sobre las células T, activa la producción de IL-12 por transporte de la indolamina a las células T que se diferencian al fenotipo Th (García-Mauriño y cols., 1999). La melatonina también incrementa la producción TNF y desciende la liberación del factor tisular (TF) (Fjaerli y cols., 1999). Finalmente, la melatonina a concentraciones en un rango de 1 mM reduce la producción de óxido nítrico en macrófagos inmunoestimulados (Gilad y cols., 1998). Esto es debido a una inhibición de la enzima óxido nítrico sintetasa, asociado con la inhibición del factor de transcripción nuclear, factor kappa 3. Los resultados sugieren que la melatonina podría modular muchas funciones en el linaje monocito/macrófago. La

figura 15 resume los efectos in vitro de la melatonina sobre las células T y los monocitos.

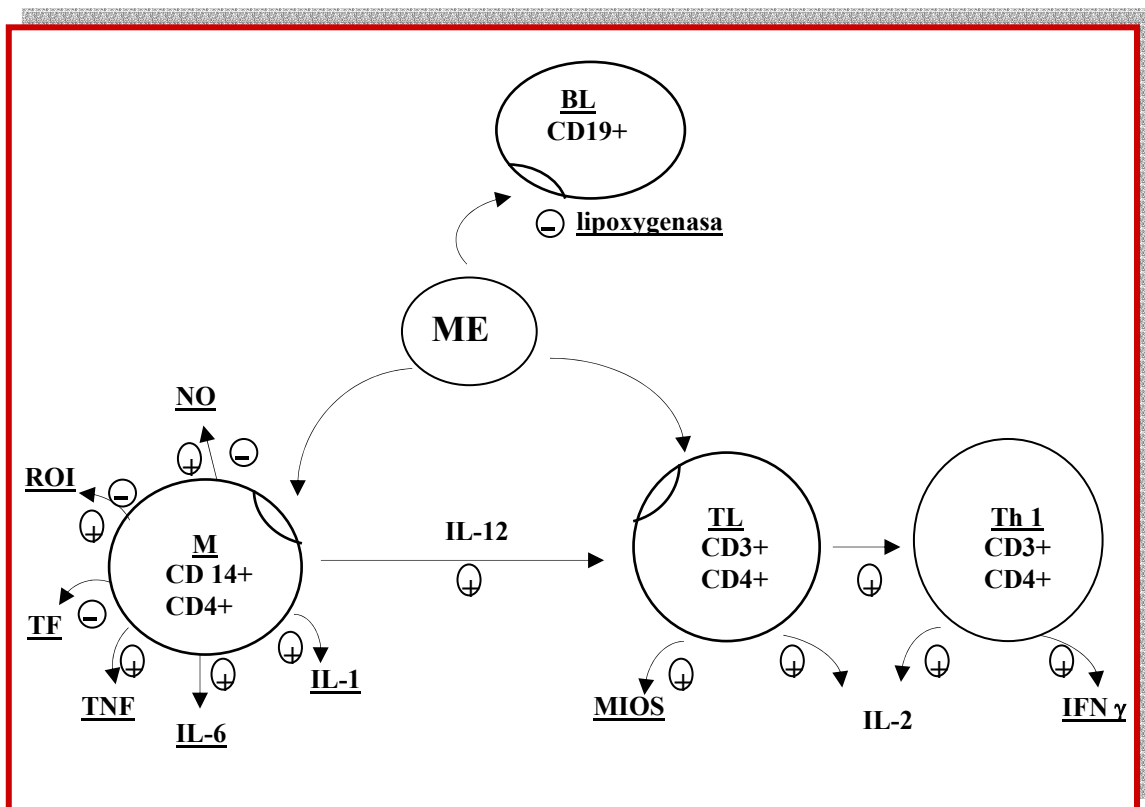
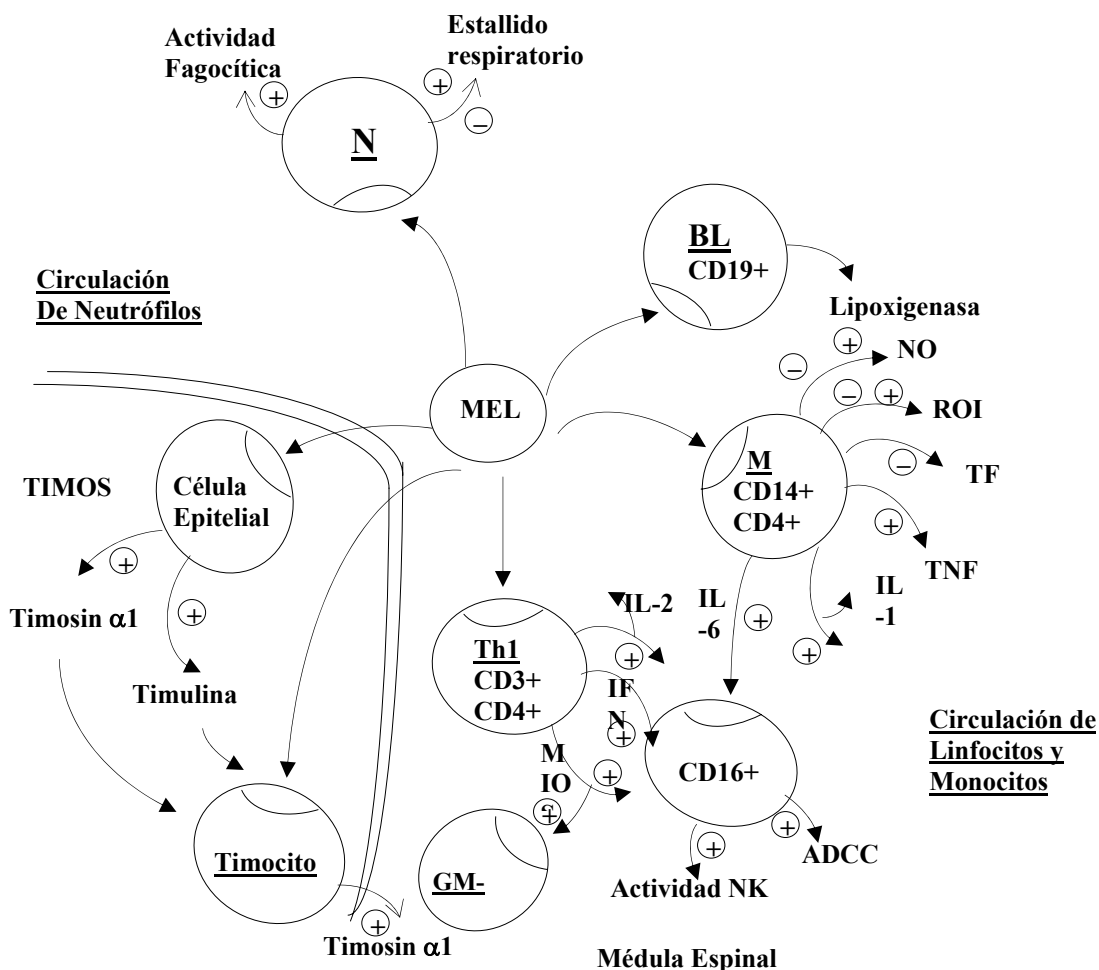


FIGURA 15: Esquema hipotético de la regulación de la producción de citoquinas por la melatonina. La melatonina modula la actividad de los monocitos (células CD14+/CD4+) por incremento en la producción de IL-1, IL-6 y TNF. Independientemente, la melatonina activa las células T-helper (CD3+/CD4+) e incrementa la producción de IL-2. MEL: melatonina; M: monocitos; TL: linfocitos T; Th1: células T-helper tipo 1; TF: factor tisular; NO: óxido nítrico; ROI: reactivos de oxígeno intermediarios; MIOS: sistema opioide inducido por melatonina. (Tomada de Guerreo y Reiter, 2002).

El efecto in vitro de la melatonina no está restringido a la circulación de linfocitos y monocitos. La melatonina también actúa sobre las células de la médula espinal. Maestroni y colaboradores (1994; 1996) demostraron que la melatonina podía influenciar el sistema de formación de sangre en ratones vía la inducción o estimulación de las citoquinas T-helper, incluidas en el sistema MIOS. Estas citoquinas ejercen una

actividad estimulante de colonias significativa. Este efecto hematopoyético de la melatonina parece estar mediado por el receptores k-opioides tipo 1 sobre la médula espinal, macrófagos y por IL-1 (Maestroni y cols., 1999).

Finalmente, y como se comentará en el siguiente apartado, también se ha evaluado el efecto in vitro de la melatonina sobre células de la inmunidad no específica. Así, en neutrófilos humanos, bajas dosis de melatonina (rango de 10nM) resultan en un incremento del estallido respiratorio en respuesta a PMA (Pieri y cols., 1998). Sin embargo 2mM de melatonina inhibe el estallido respiratorio. Aparentemente, la melatonina modula esta función en una manera dosis-dependiente. La figura 16 resume los efectos de la melatonina sobre el sistema inmune.



ESQUEMA 16: Esquema hipotético de la regulación del sistema inmune por la melatonina. La melatonina modula la actividad de los monocitos (células CD14+/CD4+) y células T resultando en un incremento de la actividad de las células NK, actividad ADCC e incrementa la producción de GM-CFU. Independientemente, reprime la expresión de la 5-lipoxigenasa por las células B y regula la actividad de los neutrófilos. La melatonina también actúa sobre el timo para incrementar tanto la timosín $\alpha 1$ como la timulina por las células epiteliales tímicas y/o timocitos. (Tomada de Guerrero y Reiter, 2002).

1.4.4. MELATONINA COMO UN ANTIOXIDANTE EN LAS CÉLULAS FAGOCÍTICAS.

La fagocitosis es un elemento importante de la respuesta inmune no específica y representa un mecanismo fundamental para la defensa contra agentes infecciosos. Las células fagocíticas ingieren su objetivo (antígeno) y entonces lo destruyen por la acción de enzimas las cuales forman radicales libres derivados del oxígeno por medio de una serie de reacciones de óxido-reducción las cuales se han dado en llamar “estallido respiratorio”. En este proceso se forman varias especies químicas agresivas, como el anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo o hipoclorito. Su función es la de destruir los microorganismos invasivos. La presencia de radicales libres en los fagocitos es beneficioso para el organismo, y gracias a su formación dentro de las células, los microorganismos patógenos pueden ser destruidos. Es claramente una defensa sólida adoptada por el organismo en su hábitat natural. Esto sería realmente una ventaja si los radicales una vez hecha su función, fueran entonces secuestrados y/o eliminados por los fagocitos, lo que tendría el efecto de garantizar la integridad de estas células.

El efecto de la melatonina sobre la fagocitosis ha sido también estudiada en la tórtola collariza (*Streptopelia risoria*) usando heterófilos aislados (Rodríguez y cols., 2001). La melatonina, a concentraciones farmacológicas, aumenta tanto la capacidad quimioatrayente de estas células como su capacidad para fagocitar partículas antigénicas y reduce la intensidad del estallido respiratorio (Rodríguez y cols., 1997). Así, en esta misma especie, (Rodríguez y cols., 1998) se encontró que la incubación con dosis

farmacológicas de melatonina aumentaba la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), una metaloenzima la cual cataliza la dismutación del anión superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno, al mismo tiempo que incrementaba la concentración de mieloperoxidasa, una enzima utilizada como indicador de la capacidad bactericida de los heterófilos (Barriga y cols., 1998). Estos resultados fueron confirmados cuando se encontró una correlación positiva entre los cambios en los niveles plasmáticos de melatonina y la fagocitosis, y una correlación negativa con el metabolismo oxidativo (Rodríguez y cols., 1999a). También Moore y colaboradores (2002), mostraron que la melatonina exógena podía reconstituir una deficiencia celular y humoral en la respuesta inmune de codornices japonesas pinealectomizadas.

En los últimos años, muchos trabajos han mostrado que la melatonina es un antioxidante de ancho espectro debido a su habilidad para secuestrar radicales libres y para estimular enzimas antioxidantes (Tan y cols., 2000b). También se ha mostrado que la melatonina es un secuestrador efectivo in vitro tanto de radicales libres como de especies reactivas de oxígeno y que tanto a concentraciones fisiológicas como farmacológicas, reduce el estrés oxidativo in vivo (Reiter y cols., 2000a).

La melatonina administrada a niveles fisiológicos tiene importantes efectos inmunoreconstitutivos sobre los fagocitos (Barriga y cols., 1998) y un descenso en la producción de malonaldehído (MAD), un indicador del daño oxidativo inducido a las membranas lipídicas (Rodríguez y cols., 1999b). Todos estos datos confirman la existencia de una correlación negativa entre los niveles de melatonina séricos en un periodo de 24 horas y los niveles de anión superóxido en heterófilos, con mínimos y máximos niveles que coinciden con las oscilaciones diurnas de melatonina (Rodríguez y cols., 1999a).

En resumen, podría decirse que la melatonina es un potente antioxidante endógeno en heterófilos de aves, a concentraciones fisiológicas, y es un efectivo secuestrador de radicales libres, protegiendo a las células del estrés oxidativo que acompaña a la fagocitosis.

1.4.5. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA MELATONINA EN CÉLULAS INMUNES.

Se tiene conocimiento de que la melatonina actúa sobre las células inmunes a varios niveles, tanto por vías directas como indirectas. En la actualidad hay suficientes evidencias acerca de los sitios de unión específicos de la melatonina sobre las células inmunes en vertebrados superiores, lo que permite asumir efectos directos de la melatonina sobre el sistema inmune (Calvo y cols., 1995).

Además de actuar vía receptores específicos, la melatonina puede influenciar la actividad de proteínas intracelulares implicadas en la activación de células inmunes. La melatonina podría influenciar la actividad fosfodiesterasa intracelular dependiente de calmodulina.

Considerando la influencia de los radicales libres sobre la transducción de señales intracelulares en los linfocitos (Flescher y cols., 1994), otra posible vía por la que la melatonina puede afectar las funciones de las células inmunes es desde su propiedad secuestradora de radicales libres (Reiter, 1995). Así, en linfocitos que fueron pretratados con melatonina, se produjo un significativo descenso, dependiendo de la concentración, en la frecuencia del daño inducido por radiación cuando se los compara con células sin el pretratamiento con melatonina. Además de los efectos directos de la melatonina sobre las células inmunes, existen efectos inmunomoduladores indirectos, influenciando la síntesis y liberación de otras hormonas como ya se ha indicado. Algunos autores apoyan la idea de que la melatonina eleva los niveles en plasma de prolactina (Kramer y Ben-David, 1978), siendo además esta hormona un conocido estimulador de la inmunidad dependiente de células T (Goetzl y Sreedharan, 1992; Gagnerault y cols., 1993). Otros estudios, sin embargo, han encontrado una disminución en los niveles de prolactina con la melatonina (Tamarkin y cols., 1981; Blask, 1993).

Finalmente, la capacidad de la melatonina para estimular la linfopoyesis de las células B y la producción de monocitos y células NK (Currier y cols., 2000), se puede

añadir a sus efectos inmunoestimuladores como procedimiento preventivo para reforzar la reactividad inmune. En vista de la variedad de posibles efectos directos como señal intracelular, la existencia de diferentes tipos de receptores de melatonina y el hecho de que los propios linfocitos produzcan melatonina en respuesta a ciertos estímulos (Conti y cols., 2000), apunta hacia un papel fisiológico de la melatonina, como un modulador dentro del sistema inmune paracrino, autocrino o incluso intracelular.

1.4.5.1. Receptores de la melatonina en células inmunes.

En humanos, López-González y colaboradores (1992) caracterizaron sitios de unión de alta afinidad para la melatonina en la membrana de linfocitos de sangre periférica. La unión de 2-(I¹²⁵) iodomelatonina a células T de sangre periférica, fue 10 veces mayor que la encontrada en linfocitos B (González-Haba y cols., 1995). Los valores de constante de disociación (Kd) de estos receptores están en el rango de 1nm, lo cual es de 5-50 veces menor que los que se encuentran en las áreas cerebrales de humanos y ratón (Laitinen y Saavedra, 1990). Partiendo de la elevada Kd, la relevancia de estos receptores para unir melatonina circulante es cuestionable. De todas formas, considerando la capacidad de los linfocitos humanos y de diversos tejidos neurales para producir melatonina, se podría pensar en un microambiente linfocitario con valores de melatonina mucho mayores que los referidos como fisiológicos, donde la hormona podría tener un papel autocrino o paracrino en la regulación linfocítica (Liebmann y cols., 1997; Stefulj y cols., 2001).

Maestroni y Conti (1990) indicaron que la melatonina se une a células linfoides humanas modulando su respuesta proliferativa. Las células activadas parecen tener una mayor respuesta a la melatonina, por lo que la activación de las células T incrementa significativamente la unión de melatonina (Konakchieva y cols., 1995). Los monocitos humanos expresan receptores de melatonina dependiendo de su estado de maduración, y parece que la diferenciación de monocitos *in vitro* afecta negativamente la expresión del receptor (Barjavel y cols., 1998).

Como ya hemos comentado, debido a su naturaleza lipofílica, la melatonina es capaz de atravesar la membrana celular y de unirse a lugares intracelulares. Se han descrito receptores nucleares en células inmunocompetentes humanas y murinas. Parece que son estos receptores nucleares los que están principalmente implicados en el efecto de la melatonina sobre la producción de citoquinas en células mononucleares de sangre periférica humana (García-Mauriño y cols., 1998), aunque no se conoce si la acción de la hormona es sobre la expresión de los genes de las citoquinas o es solo a nivel postranscripcional (Maestroni y cols, 1999). Los RZR β los encontramos en el cerebro mientras que los RZR α se encuentran en tejidos periféricos, incluyendo los leucocitos sanguíneos. En linfocitos B, los cuales expresan el RZR α , la melatonina “down-regulates” a través de estos receptores la expresión de la enzima 5-lipoxigenasa implicada en la biosíntesis de leucotrienos (Steinhilber y cols., 1995). Pero el valor de la Kd para este receptor nuclear está en el rango nanomolar, lo cual de nuevo puede cuestionar la relevancia fisiológica de estos receptores para la melatonina, aunque a su vez puede sugerir que la melatonina actúa incluso como un modulador intracelular de funciones linfocitarias. No obstante, aun no se conoce mucho acerca de los niveles intracelulares de melatonina.

1.4.5.2. Receptores de melatonina en genes del sistema inmune.

Los receptores de melatonina de genes fueron clonados por primera vez en líneas celulares inmortalizadas de melanóforos de *Xenopus laevis* (Ebisawa y cols., 1994), y desde entonces se han clonado numerosos receptores y fragmentos de receptores (Kokkola y Laitinen, 1998, review). En vertebrados no mamíferos, los receptores de melatonina se pueden dividir en 3 subtipos: Mel 1a, Mel 1b y Mel 1c basándose en su DNA y secuencia de aminoácidos. Las secuencias de RNAm de Mel 1a y Mel 1b están presentes en todos los vertebrados, mientras que el RNAm de Mel 1c solo están presentes en vertebrados no mamíferos (Kokkola y Laitinen, 1998).

Se han encontrado sitios de unión de alta afinidad para la melatonina en timo, bolsa de Fabricio y bazo de diversas aves y mamíferos (Poon y cols., 1994), así como en

células Th de medula ósea (Maestroni, 1995). La expresión del RNAm del receptor de membrana de melatonina se ha detectado en linfocitos de timo y de bazo de ratas, lo cual hace pensar que el mismo receptor encontrado en zonas del cerebro es también el responsable de la unión específica de la 2-(I¹²⁵) iodomelatonina en linfocitos (Pozo y cols., 1997). Los sitios de unión se encuentran principalmente en células Th (Guerrero y cols., 1996; García-Mauriño y cols., 1997). No está aun claro si la melatonina actúa sobre células Th1 o Th2 o sobre ambas, aunque diversos estudios (Del Petre y cols., 1994; Hiddinga y cols., 1994) apuntan a las células Th1 como las principales dianas.

1.4.5.3. Señal de transducción en las células inmunes.

Por otro lado se ha sugerido que los receptores de melatonina están acoplados en linfocitos a una proteína G como sistema para la liberación de segundos mensajeros (Guerrero y cols., 1994). Esta noción ha sido corroborada por Rafii-El-Idrissi y colaboradores (1995) quienes han observado un descenso en la producción de AMPc tras el tratamiento con melatonina de esplenocitos de rata, lo que apoya la idea de la implicación de una proteína G inhibidora en las señales de transducción de los receptores de melatonina linfocitarios. No obstante López-González y colaboradores (1992) indicaron que la melatonina sola no afecta la concentración de AMPc intracelular de linfocitos humanos. Aunque todavía queda mucho por saber sobre la conexión entre la activación de los sitios de unión de la melatonina en los linfocitos y los efectos de la misma sobre funciones linfocitarias, parece ser que la vía de transducción es mediante la misma proteína G acoplada a los receptores de membrana de distintas regiones del cerebro (Reppert y Weaver, 1995).

1.4.6. MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN PINEAL POR FACTORES INMUNES.

La comunicación entre la glándula pineal y el sistema inmune es bidireccional, desde la circulación de mensajeros de las células inmunes activadas (por ejemplo citoquinas), mediadores inflamatorios (incluyendo histamina) y hormonas que actúan recíprocamente sobre la glándula pineal (Fabris, 1994). El efecto feedback de estos mensajes sobre la glándula pineal está sin embargo, pobremente entendido.

La función de la glándula pineal (medida como actividad AA-NAT o concentración de melatonina) se ha comprobado que es modificada por opioides (Govitrapong y cols, 1992), prostaglandinas (Voisin y cols., 1993), tratamiento con citoquinas (Mucha y cols., 1994), histamina (Zawilska y cols., 1997), estimulación antigénica (Markowska y cols., 2000) e inflamación (Skwarlo-Sonta, 2002). En adicción, bursin (el único tripéptido producido por la bolsa de Fabricio), restaura los niveles nocturnos de melatonina en pollos en los cuales el ritmo de melatonina es suprimido mediante bursectomía embrionaria (Youbicier-Simo y cols., 1996).

Aunque la glándula pineal es parte del cerebro, la circulación de factores inmunes (ej. citoquinas) producidas por las células inmunes tiene un fácil acceso a ésta. La expresión de receptores de citoquinas en los pinealocitos, sin embargo, tiene aun que ser demostrada, pero su presencia puede ser deducida mediante estudios *in vivo* con receptores ligandos de citoquina (Mucha y cols., 1994). La expresión constitutiva de interleukina 1 β (IL-1 β) en la glándula pineal de rata ha sido también demostrada para correlacionarla con el ritmo diurno de melatonina, desde el punto que el ARNm de IL-1 β es mayor durante el día que durante la oscuridad (Tsai y McNulty, 1999). El número de células IL-1 β positivas en la pineal se ve también incrementado por el interferón (IFN) o lipopolisacaridos (LPS), sugiriendo un importante papel de IL-1 β en el eje sistema inmune-pineal. Además, la inflamación sistemática inducida por una inyección de LPS induce la expresión génica de IL-1 β en la glándula pineal. En adicción la acción directa sobre los pinealocitos, las citoquinas y otros factores inmunes podrían regular la función pineal por acciones indirectas en las células gliales del SNC (Brzezinski, 1997).

Además, en estudios recientes, Tsai y colaboradores (Tsai y McNulty, 1997, 1999; Tsai y cols., 2001) han encontrado que la acción de algunas citoquinas (IFN- γ e IL-1 β) sobre la funcionalidad pineal *in vitro*, son mediadas por la microglía, mientras que otros mediadores inflamatorios ejercen sus efectos directamente sobre los pinelaocitos.

1.5. EDAD, MELATONINA Y SISTEMA INMUNE.

1.5.1. ENVEJECIMIENTO: CONCEPTO Y TEORÍAS.

Se podría definir el proceso de envejecimiento como una acumulación de cambios y alteraciones producidas con el paso de los años y que se asocia a un descenso lineal y constante en la capacidad máxima de las funciones biológicas, produciéndose la muerte una vez que la capacidad de mantener un equilibrio orgánico adecuado es superada por la intensidad de los procesos y mecanismos desestabilizadores (Cutter, 1984).

Actualmente, el aumento de la esperanza de vida media en los países desarrollados ha despertado el interés por los temas gerontológicos, y es cada vez mayor el número de científicos que centran sus esfuerzos en investigar las causas y los efectos del envejecimiento. En nuestra sociedad es aceptado que el envejecimiento forma parte de una secuencia de acontecimientos que se dan en la vida de todo ser, como son nacer, envejecer y morir.

No hay que olvidar la heterogeneidad poblacional existente, puesto que no todos los individuos envejecen de igual forma. Por consiguiente, animales y personas que presentan la misma edad cronológica pueden diferir en el grado de conservación de sus funciones biológicas. De esta forma, la edad cronológica no sería un parámetro fiable, introduciéndose así el concepto de “edad biológica” como un criterio funcional más adecuado (Bourhere, 1970; Shock, 1979). La edad biológica dependería de un extenso número de variables fisiológicas, bioquímicas y psicológicas, condicionadas por la herencia y el medio ambiente (McFarland, 1953).

1.5.1.1. Teorías sobre el envejecimiento.

En el sistema tan complejo e integrado del que forman parte las células vivas, no es tarea fácil la diferencia entre causa y efecto del envejecimiento, por ello aun se desconoce si el envejecimiento deriva de una única causa o de varias (Miquel, 1990). Cada descubrimiento importante en la biología celular y molecular ha conducido a la aparición de nuevas teorías sobre el envejecimiento o nuevas versiones de las teorías anteriores. De hecho, varias teorías pueden coexistir si no se contradicen entre si o tratan de explicar de forma diferente e independiente el envejecimiento. Así, Medvedev (1990), describió más de 300 teorías que intentaban explicar como se producía este proceso. Dichas teorías se pueden agrupar bajo dos encabezamientos principales: teorías de envejecimiento genéticamente programado en el desarrollo y teorías de envejecimiento por acumulación de daño celular.

1.5.1.1.1. Envejecimiento genéticamente programado

Toda una serie de teorías se basan en la idea de que el envejecimiento se encuentra programado genéticamente. Las diferencias que existen en el modo de envejecer y morir de ciertas células y de alcanzar la “inmortalidad” de otras, ha hecho que surgieran diversos comentarios como los de Weissman en 1891, en los que se apuntó la pérdida de inmortalidad como consecuencia de la división del trabajo celular, surgiendo así el desgaste en las células somáticas y el poder regenerador en las células sexuales, capaces de reproducir el organismo entero. En 1907, Minot enuncia una estrecha relación entre el envejecimiento y la diferenciación celular.

Hayflick en 1980, propone que la pérdida de capacidad de división era idéntica al envejecimiento celular. Así se establece la existencia de una programación celular, basándose en la observación de las divisiones que se producían en los fibroblastos en cultivo, los cuales parecen poseer un número limitado de duplicaciones. Sin embargo, Strehler en 1977 indicó su desacuerdo con que el envejecimiento y la muerte celular surgirían cuando la programación llegara a su fin. Si el envejecimiento tiene origen en

las alteraciones del genoma nuclear, éstas serían cuantitativas (agotamiento) y no cualitativas (mutación). Así, la lesión iniciadora molecular del envejecimiento sería una disminución de las reservas del ADN redundante o metabólico que dificultaría el proceso de replicación de organelas y de las moléculas que integran los organismos envejecidos (Medvedev, 1990).

En 1990 Harley y colaboradores, proponen una teoría basada en el acortamiento de los telómeros, en la cual se postula la pérdida de una determinada cantidad de ADN telomérico según surge cada división celular. Cutler en 1991, indica que el envejecimiento es el resultado de la inestabilidad en la expresión génica en células altamente diferenciadas.

1.5.1.1.2. Envejecimiento por acumulación de daño.

Las teorías englobadas bajo este encabezamiento asumen una acumulación progresiva de daño debida a una menor eficacia en los sistemas de mantenimiento y reparación. El daño puede establecerse en cualquier macromolécula que no cumpla su función con eficacia máxima, así como en cualquier nivel de organización superior (genes, células, orgánulos celulares, procesos fisiológicos). En este grupo de teorías se incluye la propuesta por Orgel en 1963, así, este autor sugiere que en el envejecimiento se encuentran implicados errores debidos a la transcripción del ARN y a su trasducción a proteínas, lo cual llevaría a una acumulación de proteínas alteradas no funcionales. Posteriormente, Rothstein (1981) y Fleming y colaboradores (1986), indican que los cambios en las proteínas son efectos posteriores y no reflejan una pérdida de actividad en los mecanismos biosintéticos.

La glicosilación de proteínas y ácidos nucleicos tendría consecuencias nocivas como alteraciones en las actividades enzimáticas, expresión génica, etc., y esto es lo propuesto por Cerami en 1985 como base de muchos aspectos del envejecimiento. Por otra parte, las uniones covalentes o por puentes de hidrogeno de dos o más moléculas,

también se propusieron como causantes de los cambios que acontecen con la edad (Bjorkstein, 1974; Kohn, 1978).

Zs-Nagy en 1974 dio especial importancia al hecho de la desorganización de las membranas celulares y subcelulares. Así, la peroxidación lipídica sería una de las causas que dan lugar a esta desorganización y los consiguientes cambios en las propiedades y función de la membrana como son la permeabilidad, el transporte activo y la homeostasis celular.

Una de las teorías actuales que recibe gran atención por parte de muchos gerontólogos es la teoría del envejecimiento por la participación de radicales libres. Ya en 1954, Gerschaman y colaboradores, propusieron que la toxicidad del oxígeno en los sistemas biológicos era debido a la generación de radicales libres y que el envejecimiento es una consecuencia de esa toxicidad. Poco después Harman (1956) propuso la teoría de los radicales libres de oxígeno para explicar el envejecimiento celular. Algunos de los hechos que apoyan esta teoría han sido propuestos posteriormente:

- Relación inversa entre longevidad y tasa metabólica.
- Acumulación de lipofuscina (producto terminal de la peroxidación lipídica).
- Aparición de enfermedades donde se encuentran implicados los radicales libres (Alzheimer, Parkinson, aterosclerosis).
- Beneficio de restricción calórica sobre la longevidad.

Por tanto, puesto que las células poseen compuestos antioxidantes para controlar los efectos nocivos de esos radicales, el envejecimiento podría ser debido a las modificaciones en el balance entre prooxidantes y antioxidantes en las células.

Posteriormente, el papel central de las mitocondrias como generadores de radicales libres, ha llevado a proponer la teoría mitocondrial del envejecimiento (Miquel y cols., 1980; Fleming y cols., 1982) basada en el ataque que los radicales libres llevan

a cabo sobre el genoma mitocondrial (Harman, 1956; Miquel y cols., 1980; Miquel y Fleming, 1983). El envejecimiento derivaría de una alteración y pérdida progresiva de los orgánulos productores de energía (mitocondrias) de las células irreversiblemente diferenciadas, con la consiguiente disminución en el rendimiento biológico (Miquel, 1990).

Entre otras alteraciones mitocondriales vistas en el envejecimiento, se han podido observar: a) disminución en el número de mitocondrias, b) disminución en la actividad de distintos complejos enzimáticos, c) aumento de la producción de radical superóxido y peróxido de hidrógeno y d) acumulación de compuestos tipo lipofuscina.

Otros autores centran las causas del envejecimiento en las lesiones acontecidas en el ADN nuclear. Así Confort en 1979, propuso la teoría de que el envejecimiento proviene de una acumulación de lesiones a nivel de DNA nuclear, después matizada por otros autores, los cuales apuntaron a que las lesiones serían fundamentalmente a nivel mitocondrial. Así, se ha postulado una mayor susceptibilidad al daño oxidativo en el ADN mitocondrial respecto al nuclear, entre otras razones por carecer de la protección de poliaminas o histonas y su capacidad de reparación por debajo de la del ADN nuclear (Yakes y Van Houten, 1997).

Por otra parte, dada la importancia que tienen los sistemas neuroendocrino e inmunitario en la regulación de todos los procesos fisiológicos, no es sorprendente que ambos sistemas sean uno de los focos de atención en lo referente a formular conceptos teóricos sobre el envejecimiento (Strehler, 2000). Las teorías neuroendocrinas (Everitt y Burgess, 1976; Frolkis, 1982; Meites y cols., 1986) se basan principalmente en tres suposiciones:

- a) La gran mayoría de las funciones del organismo, están regulados por el sistema neuroendocrino.

- b) Esta compleja red sufre un deterioro progresivo con el envejecimiento, reflejado en las alteraciones sufridas en la sensibilidad de los tejidos a factores neurohormonales y la incidencia incrementada de tumores.
- c) El deterioro intrínseco en este sistema y cualquier fallo del mismo es perjudicial y crítico para la longevidad, debido a la alta importancia del sistema neuroendocrino respecto de otras funciones del organismo.

Existe también una teoría inmune (Walford, 1969; Burnet, 1970) que fue sugerida en base a las siguientes afirmaciones:

- a) El sistema inmunitario mantiene la integridad del organismo a través de su control sobre las células transformadas.
- b) Este sistema experimenta un deterioro progresivo, por su cuantitativamente menor respuesta al avanzar la edad.
- c) Este deterioro es un hecho primario como lo sugiere la involución tímica, órgano crucial del sistema inmunitario.

Así, se propuso la disminución de respuesta en las células T, principalmente la mostrada por subpoblaciones con marcadores de células memoria, como un modelo de envejecimiento celular in vivo. La existencia de defectos en respuesta a la activación de estas células, que se acumulan con la edad, representaría un elemento determinante del envejecimiento biológico (O'Leary y Haligren, 1991).

También se ha propuesto en base a las interacciones existentes entre el sistema nervioso, endocrino e inmunitario, las alteraciones de esta comunión con la edad como responsables de la mayoría de disfunciones asociadas con el envejecimiento (Fabris, 1991).

El envejecimiento no puede ser explicado por una causa simple. Existen numerosos factores que generan alteraciones, errores y mutaciones. Posiblemente, ninguna teoría basada en un solo mecanismo pueda dar explicación a nivel molecular,

celular y fisiológico de la degeneración de los organismos que tiene lugar con el paso del tiempo. La complejidad del proceso de envejecimiento solo se puede entender con teorías integradoras que armonicen los conceptos fisiológicos y moleculares de los sistemas. En este sentido las propuestas de Miquel, el cual mantiene que el envejecimiento en humanos y animales deriva de una mutación o inactivación del genoma mitocondrial de células diferenciadas (Miquel, 1990; 1991; 1992; 2001), permiten un acercamiento lógico de este proceso.

1.5.2. CAMBIOS EN LA SECRECIÓN DE MELATONINA RELACIONADOS CON LA EDAD. POSIBLES CAUSAS.

La concentración de melatonina en la sangre, la cual en mamíferos es consecuencia primaria de la secreción por la glándula pineal, muestra un claro ritmo circadiano con bajos valores durante el día y se incrementa de 10-15 veces durante la noche (Arendt, 1995; Karasek, 1999). Este ritmo se desarrolla alrededor del 6º mes de vida y los mayores niveles se alcanzan entre los 4 y 7 años de edad. En torno a la madurez podría haber una caída en las concentraciones de melatonina y a partir de aquí sus niveles disminuyen gradualmente (Karasek y cols., 2001). En muchos individuos de más de 65 años, el ritmo día-noche está prácticamente ausente (Figura 17) (Karasek, 1999; Karasek y cols., 2001). La amplitud de la secreción de la melatonina nocturna se cree que está genéticamente determinada y muestra grandes diferencias entre los individuos (Bergiannaki y cols., 1995). De este modo, algunos individuos producen significativamente menos melatonina durante su vida que otros, lo cual puede tener significación en términos de envejecimiento. (Karasek y Reiter, 2002).

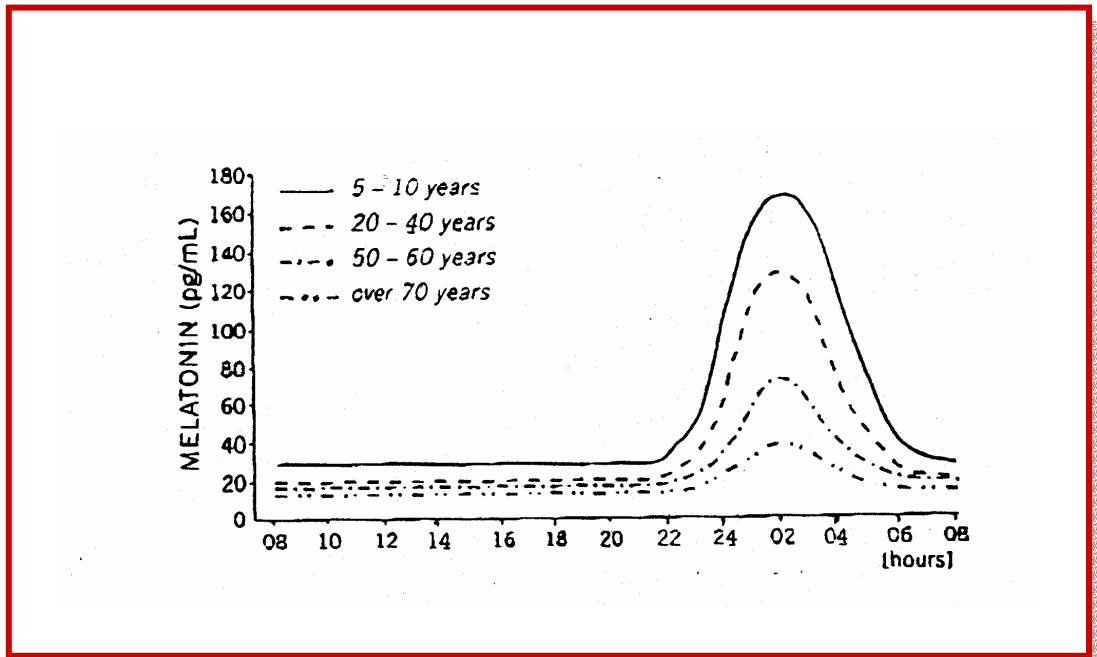


Figura 17: Perfiles diurnos de las concentraciones séricas de melatonina a varias edades. (Tomada de Karasek y Reiter, 2002).

Está bien establecido que en humanos y en otras especies, la melatonina es secretada en un patrón circadiano con bajos niveles durante el día y altas concentraciones por la noche. Sin embargo, la cantidad de melatonina secretada y consecuentemente la amplitud de estos patrones circadianos, puede variar considerablemente en adultos. Aproximadamente entre el 1-5% de la población tiene muy bajos niveles de melatonina, sin evidencias de liberación circadiana (Waldhauser y Dietzel 1985; Arent, 1988). El porqué de que algunos adultos no produzcan melatonina no está claro. La hipersecreción de melatonina en adultos normales parece un hecho poco común y fue visto por Meyer y colaboradores (1990) aunque se requiere mayor confirmación. A pesar de estas diferencias individuales, la amplitud de la melatonina exhibe un alto grado de consistencia de un día a otro (Waldhauser y Dietzel 1985; Arent, 1988). Sin embargo, no hay datos disponibles sobre la producción intrauterina de melatonina en la glándula pineal del feto (Yellow y Longo, 1988; McMillen y Nowac, 1989). Hay evidencias de que el transporte libre de melatonina entre el compartimento materno y fetal probablemente exponga al feto a similares variaciones circadianas de melatonina que su madre (Zemdegs y cols., 1988).

Varios grupos han estudiado los niveles de melatonina en suero tanto nocturnos como diurnos en niños (Hartman y cols., 1982, Waldhauser y Waldhauser, 1988). De estos datos parece que la melatonina diurna es baja y no tiene cambios apreciables en el primer año de vida. Similares niveles a los diurnos son apreciados por la noche, es decir, estos son bajos e indetectables durante los dos o tres meses de edad. Los niveles de melatonina se incrementan gradualmente durante los siguientes meses. Esto indica una ausencia del ritmo circadiano de melatonina después del nacimiento; el comienzo de los patrones de secreción empieza aproximadamente a los 3 meses de edad y subsecuentemente aumenta la amplitud de la melatonina. Estos estudios son corroborados por estudios sobre la excreción de 6-hidroximelatonina, principal metabolito de la melatonina (Hartman y cols., 1982; Kennaway y cols., 1992). Kennaway y colaboradores han demostrado muy baja y arítmica excreción de la 6-hidroxi-melatonina (6-OH-MLT) en niños de 9 a 12 semanas de edad. Además el comienzo del ritmo circadiano de melatonina corresponde al desarrollo de otras variables circadianas así como el ritmo sueño-vigilia, temperatura corporal, la secreción de cortisol y TSH.

En estudios sobre las muestras individuales de suero tanto nocturna como diurna en sujetos normales (Waldhauser y cols.1984; Waldhauser y Waldhauser, 1988) se han observado los mayores niveles de melatonina durante la noche en niños de 1-3 años de edad. Los niveles medios de melatonina descienden progresivamente un 80% desde la niñez hasta la adolescencia. El descenso de melatonina durante la niñez puede ser explicado por alteraciones en el peso corporal durante el desarrollo. El incremento del cuerpo humano en talla desde la niñez a la adolescencia es de un 500 a 800 %, pero datos sobre el tamaño de la pineal (Schmidt y cols., 1995), contenido de HIOMT en la pineal (Wurtman y cols., 1964) y producción de melatonina (Young y cols., 1988) indican solamente pequeñas alteraciones desde la infancia. Así, el descenso de melatonina durante la niñez parece ser el resultado de un rango constante de la producción de la hormona contra el incremento del volumen de distribución de la hormona durante el desarrollo. Este concepto es también apoyado en diferentes modelos animales (Waldhauser y cols., 1988).

Las concentraciones séricas de melatonina nocturna también descienden significativamente durante la edad adulta (grupos de edad 20-35 años con respecto a grupos de edad de 70-90 años) (Waldhauser y cols.,1984; 1988). Sin embargo la diferencia en los valores medios fue solamente del 10% con respecto a los valores máximos medidos en muchos jóvenes. La mayor parte de este descenso adicional ocurre durante la senescencia (Figura 18). Esto podría explicar porque algunos autores, los cuales examinaron adultos desde un estrecho rango de edad (Arendt y cols., 1982; Claustrat y cols., 1984) no fueron capaces de detectar una dependencia entre la edad y las concentraciones de melatonina, mientras que otros, los cuales compararon sujetos jóvenes con personas mayores (Iguchi y cols., 1982) encontraron los menores niveles de melatonina en el último grupo. Así, el descenso dependiente de la edad en los niveles séricos nocturnos de melatonina después de la infancia, va seguido de un escarpado descenso desde temprano en la niñez a la adolescencia y un moderado decremento en la edad adulta (Turek y cols., 2000; Karasek y Reiter, 2002).

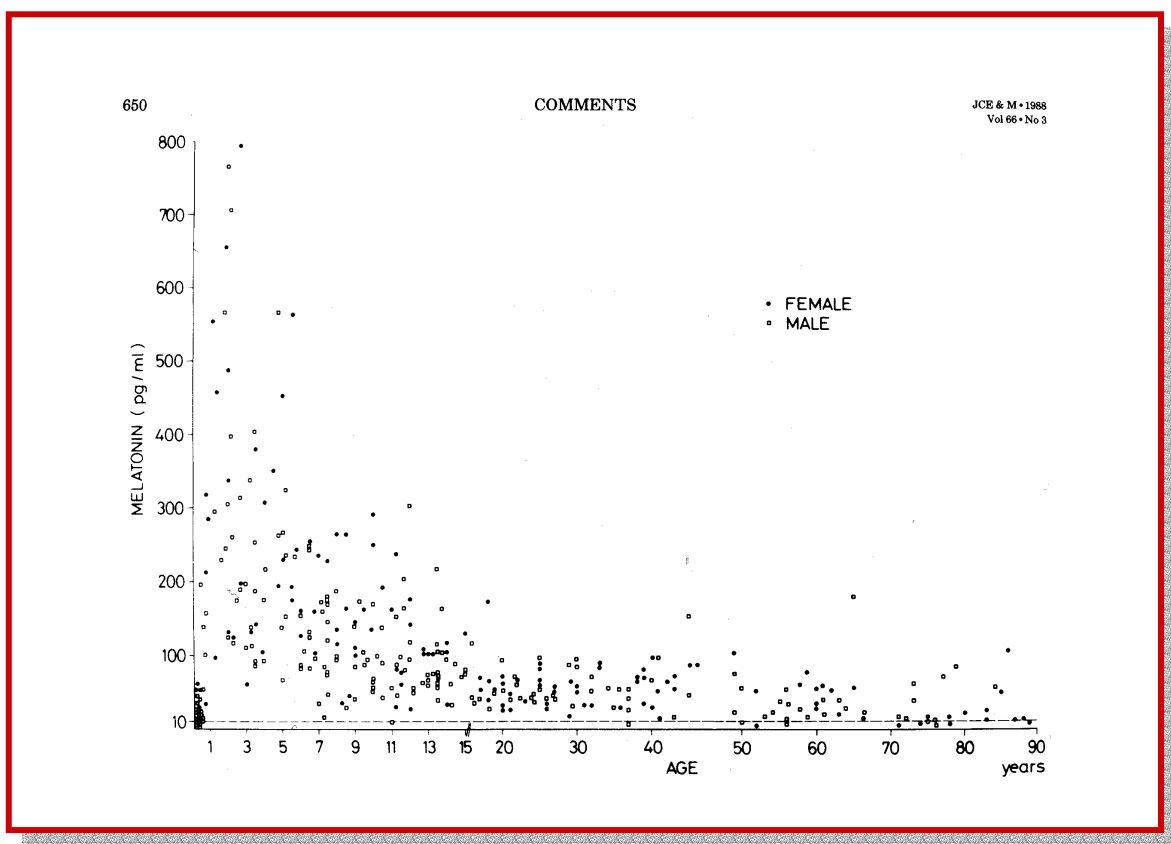


FIGURA 18: Concentraciones séricas nocturnas de melatonina en 367 sujetos de edades comprendidas entre los 3 días y los 90 años (Tomada de Waldhauser y cols., 1998).

Un pequeño descenso adicional en la melatonina en sujetos viejos puede ser el resultado de la degeneración del cuerpo pineal con la edad, una característica frecuente encontrada en otras glándulas endocrinas. Sin embargo, se han propuesto otras posibles causas para las alteraciones dependientes de la edad en la melatonina sérica, incluyendo la reducción en la población o metabolismo de los pinealocitos (Waldhauser y Waldhauser, 1988).

1.5.3. CAMBIOS EN LA FUNCIÓN INMUNITARIA CON LA EDAD (INMUNOSENESCENCIA).

Definimos como inmunosenescencia, el conjunto de cambios inmunológicos asociados a la edad y que conllevan un deterioro en la capacidad funcional del sistema inmunológico.

El sistema inmunitario, a pesar de su trascendencia fisiológica, es uno más de los sistemas que experimentan los efectos del paso del tiempo. El sistema inmunitario envejece y por tanto su efectividad también. Como consecuencia existe una mayor incidencia de infecciones, enfermedades autoinmunes y cáncer (Ginaldi y cols., 1999a). Con el envejecimiento se pierden tejidos linfoides del timo, bazo, ganglios y médula ósea. El timo tiene un papel central en los cambios del sistema inmunitario, que ha llegado incluso a clasificarse como el reloj biológico del envejecimiento. Los mayores cambios se observan en las células T que requieren la actividad tímica para su desarrollo y diferenciación. Los cambios en las células B son pequeños y generalmente secundarios a los de las células T. Se han observado múltiples modificaciones en las células del sistema inmunitario de individuos envejecidos, tanto a nivel molecular como de estructura y función celular. Así, entre otras se puede destacar la involución del timo, la disminución en el número y función de los linfocitos T, el descenso de la actividad de la interleuquina 2, el aumento de apoptosis, la disminución en el cociente celular

CD4/CD8, y la alteración en la proporción entre células vírgenes y memoria (Miller, 1996). Dado que el estado funcional del sistema inmunitario es un protector no sólo de salud, sino también de longevidad (Wayne, 1990), se ha propuesto la valoración de dicho estado como un excelente marcador de edad biológica. No obstante, conviene indicar que considerar un único parámetro de medida, no permite determinar una buena o mala función inmunitaria.

Linfocitos T. Son varios los estudios realizados hasta el momento cuyo objetivo ha sido esclarecer la situación de esta población celular con el envejecimiento. Las células T son, de todas las del sistema inmunitario, las que experimentan los mayores cambios con el envejecimiento (Solana y Pawelec, 1998; Pawelec, 1999). El número absoluto de linfocitos T (CD3+ CD2+) disminuye ligeramente (5-10%) (Rea y cols., 1996). Además, la proporción de las subpoblaciones de este tipo celular varía con la edad.

En relación a la actividad funcional de los linfocitos T, su capacidad proliferativa en respuesta a la estimulación por mitógenos se muestra reducida al envejecer (Ginaldi y cols., 1999b). En algunos estudios se ha demostrado en las células T de individuos viejos, comparándose con las de jóvenes, un aumento de apoptosis (McLeoc, 2000). Por otra parte, la producción de ciertas citoquinas, como la IL-2, de considerable importancia en la respuesta proliferativa de las células T, disminuye con el envejecimiento, hecho observado tanto en humanos como en animales de experimentación (Wakikawa y cols., 1999).

Linfocitos B. Las células B tienen un importante papel en el desarrollo de anomalías a nivel humoral que aparecen con el envejecimiento, y en manifestaciones típicas de la edad como son la producción de anticuerpo, enfermedades autoinmunes y alteraciones linfoproliferativas.

Los estudios realizados sobre los cambios funcionales de estos linfocitos con la edad son más limitados que los existentes para las células T. El hecho de que la funcionalidad de los linfocitos B se encuentre regulada estrechamente por los T, y dados los cambios sufridos por estos últimos con el envejecimiento, hace que no resulte sorprendente el que la inmunidad humoral se encuentre alterada al aumentar la edad del individuo. No

obstante, mientras que, en general, la respuesta inmunitaria celular se encuentra disminuida al envejecer, la autoinmunidad parece incrementarse (Zhao y cols., 1995). Los cambios cualitativos y cuantitativos vistos en la producción de anticuerpos, reflejan una alteración de las células B, generalmente asociado a una deficiente ayuda por parte de las células T (Ginaldi y cols., 1999c).

Con el envejecimiento se observa, en general, un incremento en el nivel sérico de inmunoglobulinas (Cossarizza y cols., 1997). Parece que uno de los cambios más notables vistos en sujetos ancianos, es la disminución en la habilidad de respuesta de los anticuerpos en la inmunización contra agentes infecciosos (Song y cols., 1997). Además, parece que la síntesis y secreción *in vitro* de inmunoglobulinas por las células B de sujetos viejos está retardada en comparación con células de individuos jóvenes, lo que parece ser debido a una falta de niveles apropiados de citoquinas con la edad (Richter y Jodauin, 1993).

Células accesorias fagocíticas y presentadoras de antígeno. Las principales células fagocíticas son los macrófagos tisulares, los monocitos y neutrófilos polimorfonucleares circulantes en la sangre. Estos tipos celulares llevan a cabo una función de defensa no específica, que comienza desde la adherencia a tejido endotelial, o de otra clase, para moverse hacia el foco infeccioso, hasta la destrucción del patógeno, llevando a cabo una serie de funciones secuenciales, adherencia, quimiotaxis, ingestión y digestión del material fagocitado, que constituyen lo que se conoce como proceso fagocítico. Tras el procesamiento del material extraño, los fagocitos pueden presentar los determinantes antigénicos a los linfocitos, y además producir una gran cantidad de factores y citoquinas que regulan el resto de la respuesta inmunitaria. Así, estas células juegan un papel importante, tanto en la iniciación como en la afectividad de la respuesta inmunitaria.

Dada la gran importancia de las células presentadoras de antígeno para regular la respuesta de las células T, los cambios en la funcionalidad al envejecer resultan relevantes para entender aquellas que acontecen en los linfocitos T.

Algunos autores han indicado que la capacidad de ingesta y la producción de radical superóxido aumentan con la edad, asociándose dichos resultados con un intento de evitar los procesos infecciosos en situaciones de envejecimiento, donde la respuesta específica de los linfocitos se encuentra disminuida (Ortega y cols., 2000). Una elevada función fagocítica también se ha observado en determinadas situaciones de estrés tanto emocional como oxidativo, y de hecho, el envejecimiento se caracteriza por una disminuida habilidad para adaptarse al estrés ambiental y por un aumento del estado oxidativo (McArthur, 1998).

1.5.3.1. Relevancia clínica de la inmunosenescencia.

La incidencia y severidad de las enfermedades infecciosas se incrementan con la edad. Así los ancianos tienen mayor incidencia de infecciones tales como neumonías, meningitis, sepsis, infecciones del tracto urinario, etc. (Sprenger y cols., 1993). Los rangos de mortalidad de las enfermedades infecciosas en el anciano son el doble que en el joven y en el caso de algunas infecciones del tracto urinario, ese rango aumenta en diez veces (Yoshikawa, 1997).

Algunos estudios demuestran que la primera causa de muerte por encima de los 80 años son las enfermedades infecciosas y de acuerdo con estos datos el mejor parámetro predictor de la mortalidad en el anciano sería la función pulmonar (Ljungquist y cols., 1996). La inmunosenescencia a este nivel puede tener un importante papel desde el punto de vista de la defensa contra patógenos a nivel de esa puerta de entrada. De acuerdo con ese concepto Meyer y colaboradores (1996) evidencian la existencia de una desregulación inmune en el pulmón humano con la edad, con una presencia de numerosos neutrófilos y más IL8 en el anciano comparado con el joven, sugiriendo que el grado de inflamación es común en muchos pulmones de ancianos clínicamente normales (Meyer y cols., 1998).

El despistaje de estos hallazgos es discutible, y discutir de forma precisa la relevancia de la células T en la inmunosenescencia es arduo. No obstante hay estudios

que sugieren que el estado de las células NK de los sujetos puede ser tan o más importante que las mismas células T. Así Ogata y colaboradores (1997) indican que no es el número sino la actividad funcional de las células NK el único parámetro que se correlaciona con la muerte, por infección, en un seguimiento de 44 ancianos. Quizás no solo el número de células T sino su funcionalidad haga que las células T no puedan ser excluidas sobre todo después de estudios que correlacionan la ancianidad con una alta actividad de células NK y una alta capacidad proliferativa de células T. Así la inclusión de parámetros funcionales de células T muestra una predicción de la mortalidad en un estudio nuevo prospectivo (Ferguson y cols., 1995).

1.5.3.2. Modulación de la respuesta inmune en la inmunosenescencia: vitaminas antioxidantes.

Los parámetros inmunogerontológicos se pueden ver afectados por muchas y variadas influencias externas, más que por la edad propiamente dicha, particularmente si los individuos no han sido seleccionados por su perfecta salud usando estrictos criterios clínicos.

Últimamente por ejemplo se ha dado mucha importancia a los efectos del ejercicio sobre la función inmune en la persona mayor. De hecho el ejercicio moderado puede ser considerado como una función potenciadora del sistema inmune, teniendo una función beneficiosa sobre la secreción de citocinas, sobre la función de las células T o sobre la actividad de las células NK (Shinkai y cols., 1998). Igualmente el estado nutricional parece contribuir de manera significativa en el sistema inmune y puede llegar a ser relativamente sensible a la corrección mediante suplementos dietéticos. Si bien parece lógico que la corrección de las alteraciones nutricionales debería conllevar un efecto beneficioso en la resistencia a las enfermedades infecciosas, lo que ha sido demostrado en algunos estudios (Chandra, 1992), existen otros que no corroboran esta hipótesis (Cahvance y cols., 1993).

En este sentido existen numerosos datos que indican que el suplemento de vitamina C aumenta las respuestas mitogénicas de los linfocitos en la población anciana y además se constata un descenso en el acortamiento del telómero asociado a la división celular (Furomoto y cols., 1998).

Asimismo también existen datos que indican que el suplemento de vitamina E da lugar a un aumento en la proliferación de linfocitos y la producción de IL2 in vitro (Meydani y cols., 1990). Un estudio concluye que un suplemento de vitamina E durante 4 meses proporciona una mejora en los índices numéricos de relevancia clínica en las células mediadoras de la inmunidad en el anciano centenario incluyendo respuestas de anticuerpos contra la hepatitis B y vacuna del tétanos pero sin incremento en el título de anticuerpos (Meydani y cols., 1997).

Un estado nutricional pobre de vitamina D se encuentra frecuentemente en los ancianos (Ravaglia y cols., 1994), la significativa asociación entre el número de células NK, su actividad y el almacenaje de vitamina D es de gran importancia con las observaciones in vitro que evidencian que los déficit de vitamina D en animales y humanos se asocia con un descenso de la inmunidad innata. Otros suplementos se creen igualmente relacionados con el incremento de la inmunidad como sucede con los beta carotenos.

La importancia general de los antioxidantes viene dado por el hecho de que los esplenocitos de ratas jóvenes y ancianas no difieren en el contenido del importante antioxidante glutatión reducido, si bien el incremento de glutatión reducido en la proliferación celular en animales viejos se encuentra disminuido. Esto se correlaciona con un aumento en la disfunción mitocondrial, con alteraciones en los procesos de despolarización de membrana así como con una disminución de la masa mitocondrial. Estas alteraciones pueden ser evitadas mediante la adición de glutatión reducido al medio (Pieri y cols., 1993). In vivo la relevancia de esos hallazgos esta apoyada en el hecho de que los niveles de glutatión reducido están descendidos en el plasma de ancianos pero no en el de jóvenes (Yang y cols., 1995). Igualmente el descenso en los

procesos de reducción se ve acompañado de un descenso en el plasma de los niveles de GSH en el individuo anciano (Samiec y cols., 1998). La determinación de las concentraciones de glutatión en linfocitos de humanos da como resultado el hallazgo de una disminución con la edad, con niveles de GSH en los linfocitos significativamente más bajos que los grupos de 20 a 40 años y de 40 a 60 años (Van Lieshout y Peters, 1998).

1.5.4. RELACIONES NEUROINMUNOENDOCRINAS EN EL ENVEJECIMIENTO.

La pineal, tiene una influencia sobre la función del sistema neuroendocrino y sobre la habilidad del sistema inmune para reconocer y reaccionar contra cualquier factor endógeno o exógeno (Pierpaoli y Lesnikov, 1997). Así, se sugiere que el envejecimiento es un resultado del deterioro de este papel central de la glándula pineal.

Uno de los requisitos esenciales para la supervivencia de los organismos es el mantenimiento de la homeostasis corporal. Para conseguir este hecho, varios sistemas coordinan entre sí sus actividades, por lo que en respuesta a retos homeostáticos, se producen cambios rápidos y apropiados. Los sistemas inmunitario, nervioso y endocrino, interaccionan entre sí para mantener un adecuado equilibrio en el medio interno y en la relación de éste con el externo. Estas interacciones juegan un papel importante en estados fisiológicos y patofisiológicos de los animales. Estos sistemas, contienen y usan el mismo equipo de señales en forma de hormonas y citoquinas, entre otras, para la regulación y comunicación tanto intersistema como intrasistema. De esta forma, tales sistemas fisiológicos forman parte de una red íntimamente unida y comunicada a través de mecanismos bidireccionales. El hecho de que exista una conexión estructural y funcional entre esos tres sistemas hace que algunas teorías de envejecimiento se centren en la alteración de la red neuroinmunoendocrina como punto clave en el proceso de envejecimiento (Fabris, 1991).

No son muchos los trabajos que se han realizado en este sentido, pero los existentes apoyan una cierta alteración en esta gran red de comunicación entre los tres sistemas reguladores. Con el envejecimiento disminuye la liberación de distintos factores hipotalámicos que intervienen en la diferenciación de células T (Esquivel y cols., 1992). Asimismo, la pérdida del control neuroendocrino asociado al mantenimiento de la función inmunitaria, dan lugar a una serie de patologías frecuentes en la vejez. Existe también una fuerte relación entre distintas enfermedades neurológicas típicas de la vejez (Alzheimer y demencia senil, entre otras) y la inmunosenescencia.

Las alteraciones causadas en el sistema neuroendocrino (SNE) por la extirpación de órganos linfoides relevantes, como es el timo, es otro de los ejemplos que contribuyen a corroborar la importancia de una correcta comunicación en esta red con el envejecimiento, y que el SNE se ve afectado por distintos productos liberados por el sistema inmunitario (Besedovsky y cols., 1985). Datos clínicos y experimentales apoyan la relación de la función neuroendocrina y la senescencia del sistema inmunitario; así, muchos fármacos que modulan el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, logran mejorar la función inmunitaria al envejecer. Centrándonos en la relación entre el sistema nervioso y el sistema inmunitario, se ha podido comprobar como el envejecimiento se muestra asociado con cambios marcados en las uniones anatómicas entre el sistema nervioso simpático y el sistema inmunitario. Se ha visto una pérdida de las neuronas mientéricas del intestino de ratas envejecidas, así como una pérdida de la inervación noradrenérgica (Gabella, 1989). En el ratón se ha analizado, histológicamente y neuroquímicamente, la inervación noradrenérgica del bazo y del timo (Madden y cols., 1997). No cabe duda de que la inervación noradrenérgica y peptidérgica de los órganos linfoides primarios y secundarios suministra una de las mayores rutas eferentes de comunicación entre el sistema nervioso y el sistema inmunitario. La inervación noradrenérgica está presente en el desarrollo temprano y su llegada precede al desarrollo celular de los componentes del sistema inmunitario (Bellinger y cols., 1992).

La regulación simpática de la función inmunitaria en bazo y nódulos linfáticos podría encontrarse disminuida al envejecer, contribuyendo así a los cambios asociados a la inmunosenescencia (Bellinger y cols., 1987). Por el contrario, en varios estudios realizados en seres humanos se ha comprobado que la actividad simpática y los niveles plasmáticos de catecolaminas están aumentados con el envejecimiento (Rowe y Troen, 1980; Krall y cols., 1981; Iwase y cols., 1991). Parece que existe discordancia en los datos existentes en cuanto a las concentraciones de neurohormonas simpáticas en los tejidos linfoides y en la sangre de los individuos viejos. Tanto la cascada de interacciones inmunitarias como neuroendocrinas, se ven afectadas con el paso del tiempo. La existencia de interacciones entre ambos sistemas nos hace cuestionar si las alteraciones vistas con la edad son intrínsecas a cada uno de los mismos o por el contrario dependientes de las modificaciones que ocurren a nivel de otros sistemas con los que se comunica. Las consecuencias inmunológicas de estos cambios fisiológicos relacionados con la edad no están del todo claras. La función inmunitaria se encuentra alterada con el envejecimiento y muestra una mayor vulnerabilidad a los efectos inmunosupresores del estrés. Parece que los niveles circulantes de factores inmunosupresores, como son los glucocorticoides, se encuentran aumentados en individuos viejos (Vancauter y cols., 1996), mientras que los de factores inmunoestimuladores, como la hormona de crecimiento o la melatonina están disminuidos (Bonello y cols., 1996; Ferrini y Barreto-Connor, 1998).

1.5.5. CONEXIONES POTENCIALES ENTRE LA MELATONINA Y EL ENVEJECIMIENTO.

Numerosas teorías han propuesto que la melatonina modifica algunos procesos del envejecimiento (Reiter, 1995a). Algunas de estas ideas se desarrollaron porque la producción de melatonina endógena disminuye con el avance de la edad en todas las especies estudiadas, incluido en humanos (Reiter, 1992). Aunque la degradación de funciones durante el envejecimiento se correlaciona con el descenso de la melatonina, no hay pruebas de que ambos estén relacionados. Sin embargo hay datos que sugieren que podría ser así (Reiter y cols., 1996; Reiter, 1997) y hay varias razones que postulan

un posible papel de la melatonina en este proceso: 1) la melatonina participa en muchos procesos vitales y su secreción disminuye gradualmente con la edad, 2) la disminución de la secreción de melatonina en edades avanzadas podría estar relacionado con el deterioro de muchos ritmos circadianos, como una consecuencia de la reducción de la función del núcleo supraquiasmático y 3) de echo las atribuciones para una presunta relación entre la melatonina y la senescencia deriva, en parte, de la habilidad de la neurohormona de actuar como antioxidante y secuestrador de radicales libres. Hay ciertamente una variedad de enfermedades asociadas con la edad, particularmente enfermedades del cerebro donde los radicales libres se cree que están involucrados en los procesos patológicos, por lo que los antioxidantes se consideran de potencial interés en ciertas condiciones degenerativas. En este sentido, se ha examinado la melatonina por su habilidad para contrarrestar algunos signos del envejecimiento en el cerebro (Reiter, 1995b; Reiter, 1998). Así, enfermedades de particular interés son la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson. En la mayor parte de los estudios donde se ha probado la melatonina en modelos experimentales de estas enfermedades, su eficacia en la reducción de la degradación neuronal ha sido atribuida a su habilidad para funcionar como un secuestrador de radicales libres y antioxidante con múltiples facetas. Sin embargo no han sido totalmente concluyentes las pruebas de la habilidad de la melatonina para alterar la longevidad (Reiter, 2000a). Así Pierpaoli y Regelson (1991), dieron melatonina en el agua de beber a ratones por la noche, prolongando la duración de la vida media. En cambio, cuando la melatonina fue dada por el día ésta no fue efectiva. Y finalmente, la melatonina actúa como un agente endógeno inductor del sueño, y su reducida concentración podría resultar en una disminución de la eficacia del sueño muchas veces asociado con la avanzada edad.

La pinealectomía, la cual priva al animal de su ritmo endógeno de melatonina, se ha visto que acelera el daño oxidativo en una variedad de órganos, aunque en estos estudios no hay evidencias de que la pérdida de la glándula pineal acorte la vida media, ya que los animales fueron sacrificados antes de su muerte (Reiter y cols., 1999). Lo que el estudio mostró es que una pronta pinealectomía (a los 2 meses de edad) causa acumulaciones substanciales de productos de peroxidación lipídica, oxidación DNA y

daño a las proteínas de muchos órganos cuando los animales alcanzaron 25 meses de edad, con respecto a aquellas ratas las cuales tenían la pineal intacta. Además los animales que no tenían glándula pineal, tenían menos fluidez en la membrana celular (usualmente asociado con un incremento de los productos de la peroxidación lipídica) que las ratas intactas.

Conocimientos concernientes a la habilidad de dosis fisiológicas y especialmente farmacológica de melatonina para prevenir y/o aplazar lo que se refiere al estrés oxidativo, ha tenido un avance rápido en las ultimas décadas (Reiter, 1995b; Reiter y cols., 1997; Reiter, 2000a,b,c). Se han definido muchos de los mecanismos por los cuales la melatonina detoxifica el oxígeno y las bases reactivas de nitrógeno (Hardeland y cols., 1993; Tan y cols., 2000a; Acuña-Castroviejo y cols., 2001; Reiter y cols., 2001). Adicionalmente, se ha documentado la acción protectora de la melatonina contra una variedad extraordinaria de procesos y toxinas que generan agentes oxidantes (Reiter y cols., 2000b; Reiter y cols., 2002a,b). Sin embargo hay muchas cuestiones sin contestar, relacionadas con la relación precisa entre el descenso de la melatonina con la vejez, lo cual se cree que puede ser, en parte, un resultado del persistente ataque de las macromoléculas por los radicales libres.

1.5.5.1. Melatonina, estrés oxidativo y edad: relación con el sistema inmune.

Como ya hemos indicado, hay varias teorías sobre los acontecimientos que se producen en el envejecimiento celular. Una de estas teorías está relacionada con la acumulación de radicales libres a lo largo de la vida como causa de los procesos degenerativos. Los radicales libres (RI) son átomos o moléculas que tienen un electrón desapareado (O_2^- , HO^\cdot , H_2O_2) con una vida corta por ser altamente reactivos. Pueden producir daños a las células, capaces de provocar cánceres y mutaciones. Hay muchos sistemas (enzimáticos o no) en las células, que nos protegen de los efectos dañinos de los radicales libres. Estos sistemas de defensa consisten en la eliminación o descenso en la producción de radicales libres, los cuales son utilizados normalmente en prevención o retraso del envejecimiento y de las enfermedades relacionadas con la edad (Harman,

1992). Los más conocidos secuestradores de radicales libres son el tocoferol (vitamina E), ascorbato (vitamina C), glutatión y en los últimos años se ha propuesto el papel antioxidante de la melatonina. La melatonina parece actuar como un potente secuestrador de radicales hidroxilos con resultados semejantes a los inducidos por el glutatión o el manitol (Reiter, 2000 a,b).

Los radicales libres de oxígeno juegan un importante papel en la respuesta inmune desarrollada por los fagocitos para la destrucción de bacterias tóxicas o células modificadas patológicamente. Se ha demostrado que la activación de macrófagos sintetiza otro tipo de radical libre, el óxido nítrico, el cual, cuando termina la destrucción de las bacterias, activa la generación de nuevos radicales hidroxilos activos. Los radicales libres son utilizados por las células inmunes para la destrucción de gérmenes patógenos, pero desafortunadamente también atacan a los linfocitos y fagocitos. El nivel de radicales libres depende de la presencia de agentes antioxidantes, incluso de niveles intracelulares de zinc, observándose que la melatonina puede modular el volumen de zinc (Rosen y cols., 1995). También se ha visto que la melatonina posee una acción antioxidante directa en las células fagocíticas (revisado en Barriga y cols., 2004).

En particular, el daño al ácido desoxirribonucleico (DNA) puede ser altamente significativo en organismos viejos (Rao y Loeb, 1992). Tan y colaboradores (1994) mostraron claramente que la melatonina protegía potentemente al DNA del daño oxidativo. La hormona melatonina, cuya síntesis y secreción disminuyen drásticamente con la edad (Reiter, 1992), puede estar correlacionada con la neutralización de radicales libres (Reiter y cols., 1994a).

Además del envejecimiento, una variedad de enfermedades relacionadas con la edad, han sido vinculadas con el daño causado por los radicales libres (Harman, 1993; Oberley y Oberley, 1993; Strong y cols., 1993). En particular el cáncer, provocado en sus inicios por un daño en el DNA, podría ser reducido en parte si la melatonina se mantuviera siempre a lo largo de la vida (Reiter y cols., 1994b). Desórdenes

neurodegenerativos están generalmente asociados al daño producido por los radicales libres, al menos en áreas determinadas del cerebro (Strong y cols., 1993), por lo que el beneficio potencial de la melatonina sobre los cambios neurodegenerativos parece obvio (Reiter, 1994). La melatonina es tomada por el cerebro (Menéndez-Peláez y cols., 1993) y rápidamente actúa estimulando la actividad neuronal glutathionperoxidasa, una enzima esencialmente importante en el sistema de defensa del sistema nervioso central.

Una de las más importantes observaciones sobre la glándula pineal ha sido la investigación del descenso de la amplitud del ritmo de melatonina y la bajada de la función inmune en la vejez (Karasek y Reiter, 2002; Turek y cols., 2000). Los defectos en la síntesis de melatonina con la edad pueden existir a varios niveles. Así, los sensores medioambientales pierden agudeza a lo largo del proceso de envejecimiento cortando la señal de entrada. La pineal por sí misma puede perder algo de actividad para sintetizar la melatonina en la vejez, existiendo evidencias de que el primer defecto con la edad se encuentra a nivel del sistema nervioso central, ya que trasplantes del sistema nervioso central de fetos a hámsteres viejos restaura dicha capacidad (Arendt, 1995). Los efectos de la melatonina sobre los opiáceos endógenos (β -endorfina, metionina-enkefalina, leucina-enkefalina y dinorfina) provocan la estimulación del sistema inmune (Skwarlo-Sonta y cols., 2003).

Grad y Rozecwaig en 1993, propusieron la hipótesis de que el envejecimiento es una consecuencia del fallo pineal. Así, el envejecimiento sería un síndrome de la deficiencia relativa de melatonina acompañada de una disminución de la proporción de melatonina/5HT, lo que perjudicaría diferentes aspectos de la neurofisiología del individuo, y causaría el proceso de envejecimiento.

Armstrong y Redman (1991) observaron que la melatonina tenía propiedades anti-edad. A medida que se envejece baja la producción de melatonina y la existencia de receptores de melatonina. La pinealectomía en ratones sugiere una aceleración en el proceso de envejecimiento además de estados de hipertensión y diabetes, inducción del movimiento rápido de ojos en el sueño, colesterol en sangre y actividad fosfatasa

alcalina elevadas, y síntesis de prostaglandinas modificada. Algunos de estos hechos pueden ser contrarrestados por la administración de melatonina (Arendt, 1995).

Como se ha comentado, la melatonina puede ser un potente antioxidante endógeno, y al ser un compuesto altamente lipofílico puede pasar fácilmente a través de las barreras morfo-fisiológicas y proteger todas las porciones de las células de los radicales libres. A medida que se envejece se van acumulando radicales libres, al mismo tiempo que disminuye el ritmo de producción de melatonina provocando, además de otros factores, la senescencia de la eficiencia del sistema inmune (Skwarlo-Sonta y cols., 2003).

Trabajos de Amstrong y Redman en 1991, informaron que la pinealectomía acorta la vida en ratas y que los extractos de pineal inhiben los procesos dependientes de la edad. Investigaciones llevadas a cabo en ratones Swiss (Pierpaoli y Maestroni, 1987) ponían de manifiesto una prolongación de la vida del 20% en ratones a los que se les administró de forma nocturna melatonina, apuntando la posibilidad de que dichos resultados eran debidos a la estimulación del sistema inmune y a la acción anti-estrés de la melatonina. Ratones que percibieron melatonina en el agua de la bebida vivieron notablemente más, es decir, de una media de 752 ± 80 días en los animales no tratados hasta una media de 931 ± 80 días en los que recibieron melatonina cada noche. Por otro lado, los animales pinealectomizados, que presentaron una deficiencia notable de melatonina, morían mucho antes que los animales con su pineal intacta.

Finalmente, de forma general se puede indicar que la glándula pineal, a través de su hormona melatonina, puede directa o indirectamente, retrasar el envejecimiento o inhibir algunas enfermedades relacionadas con la edad. Algunos estudios han demostrado que la melatonina presenta efectos potencialmente beneficiosos sobre ciertos desórdenes neurodegenerativos como el Parkinson (Acuña-Castroviejo y cols., 1997) o la enfermedad de Alzheimer (Papolla y cols., 1997). Como consecuencia de estos resultados se ha considerado a la melatonina como una hormona anti-envejecimiento y como una hormona juvenilizante. Si estas predicciones, con su

apoyo experimental, pudiesen ser verificadas con el tiempo, podría considerarse a la glándula pineal como la auténtica “fuente de la juventud”. Los datos que se han venido acumulando hasta la fecha, justifican la hipótesis de que un tratamiento suplementario de melatonina podría ser beneficioso durante el envejecimiento (Reiter y cols., 2002a,b).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La principal hormona de la glándula pineal, la melatonina, participa en importantes funciones fisiológicas, conociéndose en la actualidad la existencia de una interrelación funcional y bidireccional con el sistema inmune. En las aves, la melatonina se considera íntimamente asociada con los ritmos circadianos, siendo además la glándula pineal un órgano linfoide (Skwarlo-Sonta y cols., 2003). Por otro lado, también en aves se observa que la administración de melatonina exógena (Currier y cols, 2000) o la incubación in vitro con diferentes dosis farmacológicas de la hormona, puede influenciar la respuesta inmune específica e inespecífica (Rodríguez y cols., 1997).

La función inmune, que consiste en la defensa contra microorganismos dañinos, moléculas extrañas o células tumorales, tiene que ser coordinada en periodos de duración cercana a las 24 horas para conseguir la eficacia máxima y su sincronización es de gran importancia para la homeostasis. Varios factores son los responsables de la regulación del ritmo circadiano de la función del sistema inmune, siendo la melatonina uno de ellos. Al ser una molécula altamente lipofílica, la melatonina puede penetrar en las células inmunes sin necesidad de receptores específicos y actuar dentro como secuestrador de radicales libres (Reiter y cols., 2003). Esto puede llevar a la melatonina a actuar como factor inmunoestimulante en los estados de inmunodepresión asociados con la edad (Karasek y Reiter, 2002).

La fagocitosis, ingestión y digestión de antígenos, es probablemente el mecanismo de defensa más extendido en todo el reino animal. Los granulocitos sanguíneos son células circulantes que participan en los mecanismos inespecíficos de defensa, migrando al lugar de la infección, fagocitando y destruyendo organismos patógenos (Schiffmann, 1982). En aves, los heterófilos por su habilidad de ingerir y destruir antígenos se consideran las células fagocíticas por excelencia, representando el mayor porcentaje de leucocitos periféricos (Sturkie, 1986). En estudios preliminares en la tórtola collariza (*Streptopelia risoria*), observamos que la pinealectomía inducía diversos cambios tanto en el número como en la función de las células fagocíticas (Rodríguez y Lea, 1994). Además, en ensayos in vitro encontramos que la incubación

de células fagocíticas con concentraciones farmacológicas de melatonina provocaba un incremento en el proceso de ingestión de partículas inertes, al mismo tiempo que reducían los niveles de radicales libres de oxígeno tales como el anión superóxido (Rodríguez y cols., 1997). Con posterioridad, se comprobó el efecto de la melatonina sobre algunos de los procesos bioquímicos y la formación de especies reactivas de oxígeno que acompañan al estallido respiratorio durante la fagocitosis (actividad superóxido dismutasa, actividad mieloperoxidasa y peroxidación lipídica) (Rodríguez y cols., 1998; Rodríguez y cols., 1999a). A continuación, se analizó el ritmo circadiano de melatonina y se encontró una correlación positiva fiable entre las fluctuaciones circadianas de la hormona pineal y la fagocitosis, y una correlación negativa con respecto al metabolismo oxidativo de las células fagocíticas (Rodríguez y cols., 1999b). Considerando muy escasos los trabajos científicos que abordaban el efecto de concentraciones fisiológicas de melatonina sobre la función inmune, se analizó el efecto in vitro de concentraciones fisiológicas de melatonina sobre la función fagocítica y metabolismo oxidativo de heterófilos de *Streptopelia risoria* de animales jóvenes-maduros. Así, se pudo comprobar que la melatonina, también a dosis fisiológicas, incrementaba la fagocitosis de partículas inertes (bolas de látex) siendo este aumento dosis dependiente, al mismo tiempo que inducía un descenso de los niveles de anión superóxido (Rodríguez y cols., 2001).

Está bien establecido, que la melatonina en todas las especies estudiadas, incluido en humanos, es secretada en un patrón circadiano con bajos niveles durante el día y altas concentraciones por la noche (Karasek y Reiter, 2002), y que las concentraciones séricas de esta neurohormona descienden significativamente durante la edad adulta (Waldhauser, 1988). Es conocido que la pineal tiene una influencia sobre la función del sistema neuroendocrino y sobre la habilidad del sistema inmune para reconocer y reaccionar contra cualquier factor endógeno o exógeno (Pierpaoli y Lesnikov, 1997; Skwarlo-Sonta y cols., 2003). Además, numerosas teorías han propuesto que la melatonina modifica algunos procesos del envejecimiento (Guerrero y Reiter, 2002). Así, se sugiere que el envejecimiento es un resultado del deterioro del papel central de la glándula pineal y de su hormona melatonina. Hay varias razones que

postulan el posible papel de la melatonina en este proceso, entre ellas está la habilidad de la neurohormona para actuar como antioxidante y secuestrador de radicales libres. Hay ciertamente una variedad de enfermedades asociadas con la edad, particularmente enfermedades del cerebro, donde se cree que los radicales libres están involucrados en los procesos patológicos. En este sentido, se ha examinado la melatonina por su habilidad para contrarrestar algunos signos del envejecimiento (Reiter y cols., 2003).

En vista a estos antecedentes, el propósito de la presente tesis ha sido evaluar la conexión funcional entre la melatonina y la respuesta inmune inespecífica atendiendo a la función fagocítica y al metabolismo oxidativo, tanto en heterófilos de animales jóvenes como de viejos (*Streptopelia risoria*). Este objetivo general ha sido desglosado a su vez en cuatro subobjetivos.

1.- En primer lugar, nos propusimos valorar los ritmos circadianos de melatonina en animales de diferentes grupos de edad. Para ello, se cuantificaron los ritmos de secreción de esta hormona en un fotoperiodo natural en animales jóvenes, maduros y viejos.

2.- En segundo lugar, nos planteamos evaluar la acción in vitro de concentraciones fisiológicas de melatonina sobre la función fagocítica y metabolismo oxidativo de heterófilos de *Streptopelia risoria*, al mismo tiempo que se evaluó su efecto antioxidante para eliminar o secuestrar los radicales libres derivados de la destrucción del material extraño. Paralelamente, se estableció un estudio comparativo con dosis farmacológicas de la hormona. Estos estudios se llevaron a cabo en heterófilos procedentes de animales de diferentes grupos de edad. Se trataba de corroborar el efecto antioxidante de la melatonina, paralelo a la ingestión y destrucción del antígeno, a diferentes tiempos de incubación.

2.1. Para este fin analizamos el efecto in vitro de las concentraciones fisiológicas encontradas en animales jóvenes y maduros, sobre heterófilos procedentes de animales viejos, evaluando la capacidad de ingestión y destrucción de *Candida albicans*

(partícula viva), y el metabolismo oxidativo asociado a la fagocitosis, mediante la determinación de los niveles de anión superóxido.

2.2. Se evaluó la ingestión y destrucción de *Cándida albicans* por heterófilos de *Streptopelia risoria* procedentes de animales maduros, después de diferentes tiempos de incubación (30 y 60 minutos), con las concentraciones diurna y nocturna de melatonina (50 pg/ml y 300 pg/ml respectivamente) así como con la concentración farmacológica de 100µM (23x10⁶ pg/ml). En paralelo, usando los mismos tiempos de incubación, evaluamos el metabolismo oxidativo.

2.3. Estudiar comparativamente la capacidad funcional de los heterófilos de la tórtola collariza (*Streptopelia risoria*) en animales jóvenes y viejos a diferentes horas del día (0:00, 10:00 y 16:00, horas a las que se observaron los niveles de melatonina máximos, mínimos y medios respectivamente, en animales jóvenes). Para ello se evaluó la capacidad fagocítica de los heterófilos para ingerir tanto bolas de látex (partícula inerte) como *Cándida albicans* (partícula viva) y el metabolismo oxidativo que acompaña a la fagocitosis.

3.- En el tercer objetivo, nos propusimos analizar el efecto de la administración oral de melatonina (23µg/0.1ml/animal/día) en animales viejos, sobre los niveles plasmáticos de la hormona y el proceso fagocítico. Por ello se valoraron (antes, durante y después del tratamiento) niveles plasmáticos diurnos y nocturnos de melatonina; el índice, porcentaje, y la eficiencia de la fagocitosis, así como los niveles de anión superóxido en heterófilos incubados en presencia de partículas de látex. Se estableció la correlación de la melatonina con los diferentes parámetros inmunes analizados.

4.- En el cuarto objetivo, se profundizó en el estudio de la posible actividad antioxidante de la melatonina a través de la cuantificación de productos resultantes del estrés oxidativo como son los peróxidos lipídicos. Para ello se cuantificaron los niveles de malonaldehído (MDA) en heterófilos de animales de diferentes grupos de edad.

4.1. Determinación de los niveles de MDA en heterófilos de animales maduros de *Streptopelia risoria* incubados con concentraciones fisiológicas de la hormona observados en animales jóvenes (50 pg/ml y 300 pg/ml, concentraciones diurna y nocturna respectivamente). El estudio se realizó a diferentes tiempos de incubación (15 minutos y 60 minutos).

4.2. Evaluación de los niveles de MDA (tanto en estado basal como inducido con un antígeno) en animales jóvenes y viejos (*Streptopelia risoria*) a diferentes horas del día y a dos tiempos de incubación (15 y 60 minutos). La peroxidación lipídica fue también medida en heterófilos de animales viejos incubados con las concentraciones fisiológicas observadas en animales jóvenes (50 y 300 pg/ml, diurna y nocturna, respectivamente)

3. MATERIAL Y MÉTODOS, RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE CADA UNO DE LOS OBJETIVOS (SE PRESENTAN LOS ARTÍCULOS PUBLICADOS CORRESPONDIENTES).

PREÁMBULO

Los resultados obtenidos durante el desarrollo experimental de esta tesis doctoral se exponen a continuación en el formato de las publicaciones a las que han dado lugar o, en su caso, en la forma preliminar en la que se ha enviado dicho artículo a la revista correspondiente para su publicación. Con esta forma de exponer los resultados se pretende ofrecer una mayor concisión y fidelidad al trabajo experimental desarrollado. Además de la discusión que contiene cada artículo, la cual favorece la interpretación de cada objetivo de investigación planteado, hemos incluido una discusión final conjunta que engloba el significado de nuestra investigación.

RESULTADOS I:

Melatonina y edad: efecto in vitro de concentraciones fisiológicas de melatonina de tórtolas collarizas jóvenes y maduras sobre la función fagocítica de heterófilos animales viejos.

Melatonin and aging: in vitro effect of young and mature ring dove physiological concentrations of melatonin on the phagocytic function of heterophils from old ring dove

M.P. Terron*, J. Cubero, J.M. Marchena, C. Barriga, A.B. Rodriguez

Department of Animal Physiology, Faculty of Science, University of Extremadura, Avda. Elvas s/n 06071 Badajoz, Spain

Received 1 July 2001; received in revised form 20 September 2001; accepted 26 September 2001

Abstract

We have studied the circadian rhythm of melatonin in the ring dove (*Streptopelia risoria*) for different age groups: young (1–1.5 years), mature (3–4 years) and old animals (>8 years). Melatonin levels were determined by radioimmunoassay. Results showed a significant decline in plasma melatonin levels in old animals when compared with the concentrations observed in the other two age groups, in which maximum (nocturnal) concentrations were 300 pg/ml and minimum (diurnal) concentrations were 50 pg/ml. We analyzed the in vitro effect of the physiological concentrations found in young and mature animals on the heterophils obtained from old animals, evaluating the capacity for ingestion and destruction of *Candida albicans*, and the oxidative metabolism associate to phagocytosis by determining the superoxide anion levels. Melatonin induced an increase in both the phagocytosis index and the candidicide capacity. This effect was dose-dependent. In relation with the oxidative metabolism, a decline in superoxide anion levels after incubation with both concentrations of the hormone was observed. Thus our results corroborate in this avian species the decline in plasma melatonin levels with advanced age, as well as the enhancing effect of physiological concentrations of melatonin on the phagocytic function. © 2002 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

Keywords: Melatonin; Aging; Heterophils; Phagocytosis; Oxidative metabolism

1. Introduction

Melatonin, the main hormone of the pineal gland, is produced and secreted into the blood in a circadian manner with maximal production occurring during the dark phase of the light/dark cycle. Whereas the 24 h rhythm of melatonin production is very clear in young animals, including humans, this cycle deteriorates with aging (Reiter, 1992). Thus, aging is associated with a number of changes in the morphology, physiology and biochemistry of the pineal gland resulting in a

significant reduction of the nocturnal melatonin levels (Schmid, 1993). It has been shown that the decreased nocturnal levels of melatonin during aging affects the integrity of circadian time structures and is a precursor of disease state (Reiter, 1995).

The fact that the reduction in melatonin levels with age may contribute to aging and the onset of age-related diseases is based on the recent observation that melatonin is the most potent scavenger of damaging free radicals. Melatonin also promotes the activity of anti-oxidative enzymes thereby further reducing oxidative damage (Reiter, 1995; Reiter et al., 2000).

In addition, melatonin has been shown to have immunomodulatory and oncostatic properties

* Corresponding author. Tel./fax: +349-24-289388.

E-mail address: pilarts@unex.es (M.P. Terron).

(Anisimov et al., 2000). Hence, melatonin may have both direct and indirect beneficial effects in delaying aging processes or retarding the development of processes (e.g. age-associated immunodeficiency or tumour growth), which contribute to reduced life span (Turek et al., 2000).

The aim of this work is to analyze the circadian oscillations of melatonin over the course of the day, and the serum concentrations of this neurohormone over the course of the life in *Streptopelia risoria*, together with the in vitro effect of the physiological concentrations reached in young and mature animals upon the phagocytic function of heterophils from old animals.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male and female ring dove (*S. risoria*) of different groups of age were used in the study. The animals were divided into young (age: 1–1.5 years), mature (age: 3–4 years) and old (age: >8 years). Birds were housed isolated in cages measuring 40 × 40 × 45 cm³, and fed ad libitum in a room with an outside window, natural lighting, and indirect ventilation. The study was conducted during April/June when the daily lighting pattern was approximately 14 h light and 10 h dark (dark period from 21:30 h ± 30 min to 07:30 h ± 30 min). The temperature was maintained at 22 ± 2°C. Birds were chosen at random and a sample of blood was taken from each bird.

2.2. Measurement of melatonin in serum

Melatonin levels were determined in the different age groups by using a commercial radioimmunoassay kit (DDV Diagnostika) that consisted of ¹²⁵I-melatonin (0.54 µCi/ml), rabbit anti-melatonin antiserum, melatonin standards, delipidizing agent, assay buffer, precipitating agent, and controls (isophilized plasma samples), according to the manufacturers instructions. Results were expressed in pg/ml.

2.3. *Candida albicans* culture

C. albicans inocula were cultured on Sabourand Maltose Agar in Petri dishes sowing a zig-zag using

an inoculating loop, with incubation at room temperature for 24–48 h. Before each determination, the candidae were resuspended in Hank's medium and the concentration adjusted, depending on the trial protocol, in a Neubauer haemocytometer with a phase-contrast microscope.

2.4. Isolation of heterophil leukocytes

Heterophil leukocytes were obtained from 1 ml, of blood drawn from the brachial vein. 0.5 ml of phosphate buffered saline solution (PBS) and 0.5 ml of lithium heparin were added, followed by centrifugation at 600 × g for 15 min in a gradient using Histo-paque (1 ml of 1119, 1 ml of 1077; Sigma, St Louis, MO). The heterophils were then washed in PBS and concentration adjusted depending on each trial.

2.5. Serum collection

No heparinized blood drawn from the brachial vein was transferred to a pre-prepared tube containing serum-separating gel, and centrifuged at room temperature for 15 min at 300 × g. The serum was then divided into aliquots in Eppendorf vials, and kept frozen at –30°C until use.

2.6. Melatonin

N-Acetyl-5-methoxytryptamine (Sigma) was prepared in PBS solution, starting from a base solution of 1 g/100 ml which was dissolved by heating and stirring, and used at the physiological concentrations that this hormone attains in the serum of young and mature ring dove (*S. risoria*) at different times of day, choosing 50 pg/ml as the minimum diurnal value and 300 pg/ml as the maximum nocturnal value. All studies included a hormone-free control.

2.7. Phagocytosis of *C. albicans* and candidicidal capacity

The method described by Rodriguez et al. (1990) was used with minor modifications. This assay was carried out by incubating 0.5 ml of heterophil suspension (10⁶ cells/ml) with 0.5 ml of *C. albicans* and 0.1 ml of the hormone prepared to the desired concentrations in the final assay volume. After 50 min of incubation 3 ml of 0.01% methylene blue was added. The tubes were centrifuged for 5 min at

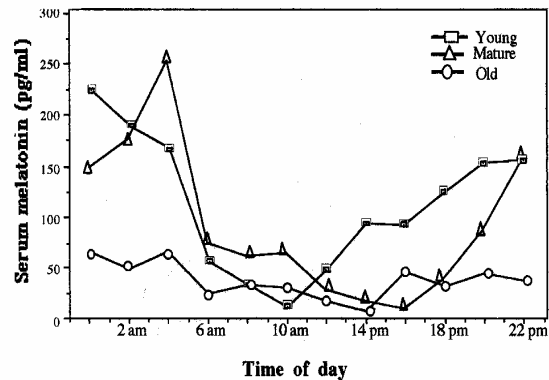


Fig. 1. Plot of the circadian rhythm of melatonin in serum from animals, ring dove (*S. risoria*), of different age groups.

300 × g, and 2/3 of the supernatant was withdrawn. The rest was shaken, and a sample taken for counting in the Neubauer haemocytometer with a phase-contrast microscope using a 40-power objective lens. The results of phagocytosis were expressed as the total number of *C. albicans* phagocytized by 100 heterophils (Phagocytic Index) and the candidicidal capacity as the number of *C. albicans* which were not only phagocytosed but also destroyed by 100 heterophils (Candidicidal capacity).

2.8. Quantitative nitroblue tetrazolium (NBT) test.

The method described by Rodriguez et al. (1990) was used with minor modifications. An aliquot of 0.25 ml of heterophils suspension (10^6 cells/ml)

was incubated for 60 min with a similar volume of NBT (Sigma, 1 mg/ml in PBS solution) in the presence of the hormone and 0.025 ml of *C. albicans* (5×10^6 cells/ml). Aliquots of heterophils suspension incubated in the absence of *C. albicans* were used as non-stimulated samples. In all cases the reaction was stopped after 60 min of incubation with 2.5 ml of 0.5N hydrochloric acid. Tubes were centrifuged for 30 min at 600 × g and 4°C, the supernatant was discarded and the reduced NBT (blue formazan) extracted from the cell pellet with 1 ml of dioxan. The tubes were then centrifuged for 30 min at 600 × g and the absorbance of the supernatant was determined in a spectrophotometer at 525 nm using dioxan as the blank control.

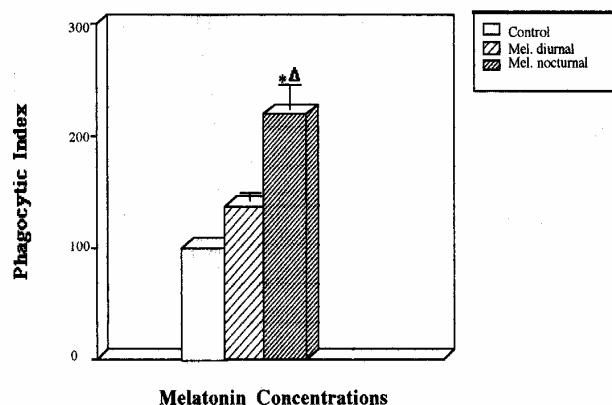


Fig. 2. In vitro effect of physiological concentrations of melatonin found in young and mature animals on the phagocytosis of *C. albicans* by heterophils from old animals (*S. risoria*). Each value represents the mean \pm S.E of 8 determinations in duplicate. (*) $p < 0.05$ when compared with control group. (∇) $p < 0.05$ when compared with the minimal (diurnal) melatonin value.

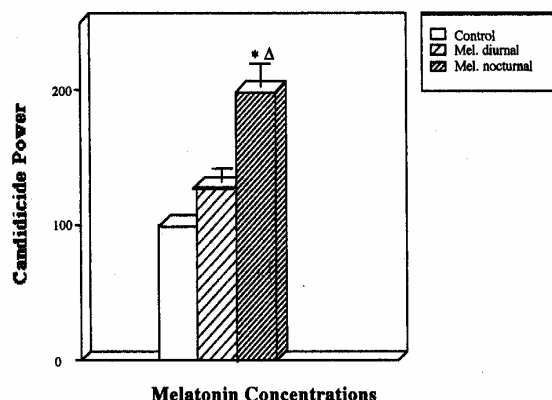


Fig. 3. In vitro effect of physiological concentrations of melatonin found in young and mature animals on the candidicide capacity of heterophils from old animals (*S. risoria*). Each value represents the mean \pm S.E of 8 determinations in duplicate. (*) $p < 0.05$ when compared with control group. (∇) $p < 0.05$ when compared with the minimal (diurnal) melatonin value.

2.9. Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm standard error (SE) of the number of determination carried out in duplicate. The variables were tested for normality and then the different groups were compared using the Scheffe ANOVA parametric F-test, with $p < 0.05$ taken as the level of significance in differences between groups.

3. Results

The circadian rhythms of melatonin in the different groups of animals are shown in Fig. 1. In young and mature animals there was a clear increase ($p < 0.05$) of the hormone's serum levels during the dark phase, with the maximum levels reached at 04:00 h (mature animals) or 02:00 h (young animals). During the first hours of daylight melatonin levels fell in both groups. The lowest levels ($p < 0.05$) were observed at 10:00 and 16:00 h for the young and mature animals, respectively. The values subsequently rise steadily towards their nocturnal maxima. On the contrary old animals (>8 years old) presented constant serum melatonin levels (50 ± 10 pg/ml), so that there is an absence of circadian rhythm in this group.

The capacity of the heterophils from old animals to ingest *C. albicans* quantified by the Phagocytosis Index (number of candidae phagocytosed by 100

heterophils) is shown in Fig. 2. There was a significant increase ($p < 0.05$) in the Phagocytosis Index when heterophils from old animals were incubated in the presence of the physiological concentrations (nocturnal and diurnal) of melatonin found in young and mature animals. The values obtained with the maximum (nocturnal) concentration were significantly greater ($p < 0.05$) than the control values, and than the values obtained with the minimum (diurnal) concentration of melatonin ($p < 0.05$).

The effect of melatonin on the candidicide capacity of old animals is shown in Fig. 3. A significant increase in the capacity of heterophils from old animals to kill *C. albicans* was observed after incubation with the maximum (nocturnal) concentration of melatonin found in young and mature animals. This increase was statistically significant when compared with untreated control values ($p < 0.05$) or with values obtained in the presence of the minimum (diurnal) concentration of the neurohormone ($p < 0.05$).

The NBT reduction capacity (levels of superoxide anion) during phagocytosis by heterophils from old ring dove is shown in Fig. 4. There was a significant decline ($p < 0.05$) with respect to the control after incubation with the maximum (nocturnal) concentration of melatonin found in young and mature animals. This decline is also significant ($p < 0.05$) with respect to the values obtained in the presence of the minimum (diurnal) concentration of the hormone.

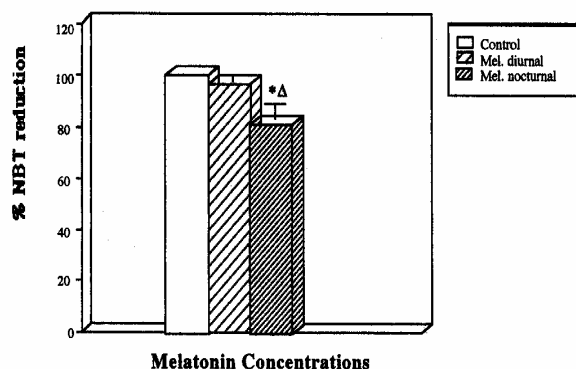


Fig. 4. In vitro effect of physiological concentrations of melatonin found in young and mature animals on the oxidative metabolism (% NBT reduction) by heterophils from old animals (*S. risoria*). Each value represents the mean \pm S.E of 8 determinations in duplicate. (*) $p < 0.05$ when compared with control group. (∇) $p < 0.05$ when compared with the minimal (diurnal) melatonin value.

4. Discussion

The results show a significant decline in plasma melatonin levels in old the ring dove (>8 years) with respect to the concentrations observed in the other two age groups (1–1.5 and 3–4 years), in which maximal (nocturnal) concentrations were 300 pg/ml and minimal (diurnal) concentrations were 50 pg/ml. These results corroborate previous reports demonstrating that melatonin is synthesized and secreted during the dark period of the light/dark cycle, as well as the decline in plasma concentrations of this neurohormone over the course of the life in several species (Turek et al., 2000).

We have also studied the in vitro effects of physiological concentrations of melatonin found in young and mature animals on the phagocytic function of heterophils from old animals. The results indicate that melatonin induces an increase in both the ingestion and digestion of *C. albicans*, the effect being dose dependent. Thus, the greatest stimulation of *C. albicans* phagocytosis by heterophils of old animals occurred after incubation with the nocturnal concentrations of melatonin. In previous studies by our group, we also found a positive correlation between the circadian variations of melatonin and the capacity of heterophils to phagocytose inert particles, with both parameters presenting maximum values during the night (Rodriguez et al., 1999a). Likewise, we have observed an enhanced phagocytic function of avian heterophils from middle-aged animals after incubation with both pharmacological concentrations

(Rodriguez et al., 1998) and physiological concentrations (diurnal and nocturnal) (Rodriguez et al., 2000) of the neurohormone, with the effect always being dose-dependent.

There was a decline in superoxide anion levels.

In relation with the analysis of the oxidative metabolism in heterophils from old animals after incubation with the nocturnal and diurnal concentrations of melatonin we found a decline in superoxide anion levels. We have previously demonstrated a negative correlation between the plasma levels of the hormone and the superoxide anion production in phagocytes from these animals (Rodriguez et al., 1999a). In a similar way we have observed a decline in superoxide anion levels in the heterophils after phagocytosis of inert particles (Rodriguez et al., 1998), together with a modulation of the superoxide dismutase activity after incubation with pharmacological concentrations of melatonin (Rodriguez et al., 1998), and a clear decrease in lipid peroxidation (Rodriguez et al., 1999b). Thus, melatonin enhances phagocytic function without a concomitant increase in superoxide anion levels, but on the contrary, the production of superoxide anion decreases. Hence, melatonin might protect phagocytes from oxidative damage derived from the 'respiratory burst' during the ingestion and digestion of antigen.

Cardinali et al. (1998) found that in vivo treatment with melatonin not only restores circadian immune rhythms in aging but also that pharmacological levels of the hormone can overstimulate the immune system and cause exacerbation of autoimmune processes.

Melatonin, in addition to its direct effect on immune cells, augments the amplitude, and perhaps delays or advances the phase of the underlying central oscillator, thus indirectly affecting the immune response (Cardinali et al., 1999).

In summary, on incubating the heterophils from old ring dove with the melatonin concentrations found in young and mature animals (50 pg/ml diurnal, and 300 pg/ml nocturnal) there was an increase in phagocytosis and a protection of the heterophils against oxidative stress. These results are of particular interest in aging, a stage of life associated with a marked increase in free radicals (Turek et al., 2000). These findings are probably related with the ability of melatonin to scavenge free radicals and its function as an antioxidant and/or with the ability of the indole to stabilize cellular membranes which could make their intrinsic lipids more resistant to the peroxidative processes (Reiter, 1995; Rodriguez et al., 1999b; Reiter et al., 2000).

Acknowledgements

This investigation was supported in part by a research grant from Junta de Extremadura Consejería de Sanidad y Consumo (Ref.: 00/37).

References

- Anisimov, V.N., Zavarzina, N.I., Zabezhinskii, M.A., Popovich, I.G., Anikin, I.V., Zimina, O.A., Solovev, M.V., Arutiunian, A.V., Oparina, T.I., Prokopenko, V.M., Khavinson, V.K., 2000. The effect of melatonin on the indices of biological age, on longevity and on the development of spontaneous tumors in mice. *Vopr. Onkol.* 46 (3), 311–319.
- Cardinali, D.P., Brusco, L.I., Garcia Bonacho, M., Esquifino, A.I., 1998. Effect of melatonin on 24 h rhythms of ornithine decarboxylase activity and norepinephrine and acetylcholine synthesis in submaxillary lymph nodes and spleen of young and aged rats. *Neuroendocrinology* 67, 349–362.
- Cardinali, D.P., Brusco, L.I., Cutrera, A., Castrillon, P., Esquifino, A.I., 1999. Melatonin as a time-meaningful signal in circadian organization of immune response. *Biol. Signals Recept.* 8, 41–48.
- Reiter, R.J., 1992. The aging gland and its physiological consequences. *Bioessays* 14, 169–175.
- Reiter, R.J., 1995. The pineal gland and melatonin in relation to aging: a summary of the theories and the data. *Exp. Gerontol.* 30, 199–212.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Qi, W., Manchester, L.C., Karbownik, M., Calvo, J.R., 2000. Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. *Biol. Signals Recept.* 9, 160–171.
- Rodriguez, A.B., Barriga, C., De la Fuente, M., 1990. Phagocytic function and antibody dependent cellular cytotoxicity of human neutrophils in the presence of *N*-formimidoyl thienamycin. *Agents Actions* 31, 1–2.
- Rodriguez, A.B., Nogales, G., Ortega, E., Barriga, C., 1998. Melatonin controls of superoxide anion level: modulation of superoxide dismutase activity in ring dove heterophils. *J. Pineal Res.* 24 (1), 9–14.
- Rodriguez, A.B., Marchena, J.M., Nogales, G., Duran, J., Barriga, C., 1999a. Correlation between the circadian rhythm of melatonin, phagocytosis, and superoxide anion levels in ring dove heterophils. *J. Pineal Res.* 26, 35–42.
- Rodriguez, A.B., Nogales, G., Marchena, J.M., Ortega, E., Barriga, C., 1999b. Suppression of both basal and antigen-induced lipid peroxidation in ring dove heterophils by melatonin. *Biochem. Pharmacol.* 58, 1301–1306.
- Rodriguez, A.B., Terron, M.P., Duran, J., Ortega, E., Barriga, C., 2000. Physiological concentrations of melatonin and corticosterone affect phagocytosis and oxidative metabolism of ring dove heterophils. *J. Pineal Res.* in press.
- Schmid, H.A., 1993. Decreased melatonin biosynthesis, calcium flux, pineal gland calcification and aging: a hypothetical framework. *Gerontology* 39, 189–199.
- Turek, F.W., Zee, P., Reeth, V.O., 2000. *Melatonin and Aging. Melatonin After Four Decades.* Kluwer Academic Publishers, New York pp. 435–440.

RESULTADOS II:

Fagocitosis de *Cándida albicans* y niveles de anión superóxido en heterófilos de la tórtola collariza (*Streptopelia risoria*): Efecto de la melatonina.

Phagocytosis of *Candida albicans* and Superoxide Anion Levels in Ring Dove (*Streptopelia risoria*) Heterophils: Effect of Melatonin

M. P. Terrón, J. Cubero, C. Barriga, E. Ortega and A. B. Rodríguez.

Department of Animal Physiology, Faculty of Science, University of Extremadura, Badajoz, Spain.

Key words: melatonin, phagocytosis, oxidative metabolism, heterophils, bird.

Abstract

We observed in previous studies on avian heterophils that incubation with either physiological or pharmacological concentrations of the neurohormone melatonin increased the phagocytosis of inert particles (latex beads), and also provoked a decline in superoxide anion levels of those phagocytes. In the present study, we wanted to corroborate whether melatonin acts on the oxidative metabolism that accompanies the respiratory burst during phagocytosis by inducing a more effective phagocytic activity at the same time as exerting an antioxidant effect to eliminate and/or scavenge the free radicals left over after the destruction of the foreign material. To this end, we evaluated the ingestion and destruction of *Candida albicans* (live particles) by ring dove (*Streptopelia risoria*) heterophils after different times of incubation (30 and 60 min) with physiological concentrations of melatonin (50 pg/ml diurnal and 300 pg/ml nocturnal), as well as with a pharmacological concentration 23×10^6 pg/ml (100 μ M) of the hormone. In parallel, using the same times of incubation, we evaluated the oxidative metabolism by determining the superoxide anion levels ($O_2^{\cdot-}$). The results show that melatonin, at all the times and concentrations studied, increases both the phagocytosis index (number of *C. albicans* phagocytosed by 100 heterophils) and the candidicide power (percentage of *C. albicans* killed of those ingested by 100 heterophils). The effect was dose-dependent. With respect to the oxidative metabolism accompanying the digestion and destruction, there was a decline in superoxide anion levels after incubation with all of the concentrations of the hormone studied. The effect was dose-dependent and most pronounced at 60 min. These results thus corroborate the proposal that melatonin enhances the phagocytic function at the same time as neutralizing the oxidative stress derived from this immune function.

Introduction

There is evidence that the pineal gland exerts an immunoregulatory effect via the circadian secretion of melatonin. Different experiments suggest a functional connection between the pineal gland and the immune system, in both mammals and birds (1–3). Studies performed both *in vivo* and *in vitro* indicate that the neurohormone melatonin might modulate certain immune functions and attenuate oxidation reactions (4–9). In the ring dove (*Streptopelia risoria*), our research group has found a positive correlation between the circadian rhythm of melatonin and the capacity of blood heterophils to phagocytose inert particles (latex beads), as well as a negative correlation between the neurohormone and superoxide anion levels during the respiratory burst (8). We have also observed an increase in the capacity to ingest inert

particles on incubating avian heterophils with both pharmacological concentrations (10) and physiological concentrations (11–13) of melatonin, together with a decline in superoxide anion levels, a modulation of the superoxide dismutase (SOD) activity (5), and a clear decline in lipid peroxidation (14). Thus, the phagocytic function is enhanced without a concomitant increase in superoxide anion levels; indeed quite the contrary. Hence, melatonin seems to protect these phagocytic cells from the oxidative damage deriving from the respiratory burst during the ingestion and digestion of the antigen. Our findings suggest that the effect of melatonin on the immune system could be by a direct action on phagocytosis and the accompanying biochemical processes. To check whether melatonin stimulates the phagocytic function as well as modulating the oxidative metabolism of the phagocytes, we evaluated the *in vitro* effect of physiological

Correspondence to: Dr M^a del Pilar Terrón Sánchez, Department of Physiology, Faculty of Science, University of Extremadura, Avda Elvas s/n, 06071-Badajoz, Spain (e-mail: pilarts@unex.es).

© 2003 Blackwell Publishing Ltd

concentrations of melatonin (50 pg/ml and 300 pg/ml, the diurnal and nocturnal concentrations, respectively) (8) and a pharmacological concentration (23×10^6 pg/ml) on the ingestion and destruction of *Candida albicans*. In parallel, we evaluated at different incubation times the oxidative metabolism (via the superoxide anion levels) during the ingestion and killing of the candidae by the ring dove heterophils.

Reiter *et al.* (15) have shown that melatonin is a good free radical scavenger and an excellent antioxidant at both physiological and pharmacological concentrations, reducing oxidative stress *in vitro*. We therefore set out to determine the *in vitro* effect of physiological concentrations of the hormone relative to a pharmacological concentration, evaluating the same parameters as for the first objective, and finally to compare the effects of melatonin at different incubation times to determine whether phagocytosis might be enhanced at the same time as the free radicals in the heterophils were neutralized.

Materials and methods

Animals

Fifteen male and female mature ring dove (*S. risoria*), aged 3–5 years, were used in the study. Birds were housed isolated in cages measuring $40 \times 40 \times 45$ cm, and fed *ad libitum* in a room with an outside window, natural lighting, and indirect ventilation. The study was conducted during April/June when the daily lighting pattern was an approximately 14:10 h light/dark cycle (dark period from 21.30 h \pm 30 min to 07.30 h \pm 30 min). The temperature was maintained at 22 ± 2 °C. Birds were chosen at random and a sample of blood was taken from each bird. Each sample point in the figures corresponds to a different bird. All extractions were performed at 09.00 h.

Culture of *C. albicans*

The *C. albicans* inocula were cultured on sabourand maltose agar in Petri dishes, sowing in zig-zag using an inoculating loop, with incubation at room temperature for 24–48 h. Before each determination, to form the desired cell suspension, the candidae were resuspended in Hank's medium and the concentration adjusted, depending on the trial protocol, in a Neubauer haemocytometer under a phase-contrast microscope.

Isolation of heterophil leucocytes

Heterophil leucocytes were obtained from 1 ml of blood drawn from the brachial vein to which 0.5 ml of phosphate buffered saline solution (PBS) and 0.5 ml of lithium heparin were added, followed by centrifugation at 600 g for 15 min in a gradient using histopaque (1 ml of 1119, 1 ml of 1077; Sigma, St Louis, MO, USA). The heterophils were then washed in PBS and adjusted according to each trial.

Melatonin

N-acetyl-5-methoxytryptamine (Sigma) was prepared in PBS solution, starting from a base solution of 1 g per 100 ml which was dissolved by heating and stirring, and used at the physiological concentrations that this hormone attains in the serum of young and mature ring dove (*S. risoria*) at different times of day, choosing 50 pg/ml as the minimum diurnal value and 300 pg/ml as the maximum nocturnal value. All determinations were accompanied by a hormone-free control.

Phagocytosis of *C. albicans* and candidicidal power

The method described by Rodríguez *et al.* (16) was used with minor modifications. The trials were carried out by incubation with shaking of 500 μ l of heterophil suspension (1×10^6 cells per ml) with 500 μ l of *C. albicans* and 100 μ l of the hormone prepared to reach the desired concentrations in the final trial volume. After 50 min of incubation, 3 ml of 0.01% methylene blue (vital colouring) was added. The tubes were centrifuged for 5 min at 300 g, and two-thirds of the supernatant was withdrawn. The rest was shaken, and a sample taken for counting in the Neubauer haemocytometer under a phase-contrast microscope using a $\times 40$ power objective lens.

The results of phagocytosis were expressed as the total number of *C. albicans* phagocytosed by 100 heterophils (phagocytic index) and the candidicidal power as the number of *C. albicans* which were not only phagocytosed, but also destroyed by 100 heterophils (dead candidae were stained blue) (candidicidal power).

Quantitative nitroblue tetrazolium (NBT) test

The method described by Rodríguez *et al.* (16) was used with minor modifications. An aliquot of 250 μ l of heterophil suspension (1×10^6 cells per ml) was incubated for 60 min with an equal volume of NBT (Sigma, 1 mg/ml in PBS solution) in the presence of the hormone and 25 μ l of *C. albicans* (5×10^6 cells per ml). Aliquots of heterophil suspension incubated in the absence of *C. albicans* were used as nonstimulated samples. In all cases after 60 min of incubation the reaction was stopped with 2.5 ml of 0.5 N hydrochloric acid. The tubes were centrifuged for 30 min at 600 g and 4 °C, the supernatant fluid was discarded and the reduced NBT (blue formazan) extracted from the cell pellet with 1 ml of dioxan. The tubes were then centrifuged for 30 min at 600 g and the absorbance of the supernatant was determined in a spectrophotometer at 525 nm using dioxan as the blank control.

Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm SE of the number of determinations carried out in duplicate. Variables were tested for normality and then the different groups were compared using the Scheffe ANOVA parametric F-test, where $P < 0.05$ was considered as statistically significance between groups.

Results

The capacity of ring dove heterophils to ingest *C. albicans* was quantified by the phagocytosis index which represents the number of candidae phagocytosed by 100 heterophils. The results are expressed relative to the (hormone free) control.

As shown in Fig. 1, the statistical analysis of the results revealed a clear increase in *C. albicans* phagocytosis when the heterophils were incubated with the nocturnal concentration (300 pg/ml) and pharmacological concentration (100 μ M) of melatonin. This increase was significant ($P < 0.05$) with respect to the control values, and there was also a significant ($P < 0.05$) rise in the presence of the nocturnal concentration of melatonin relative to the diurnal concentration after the 30-min incubation.

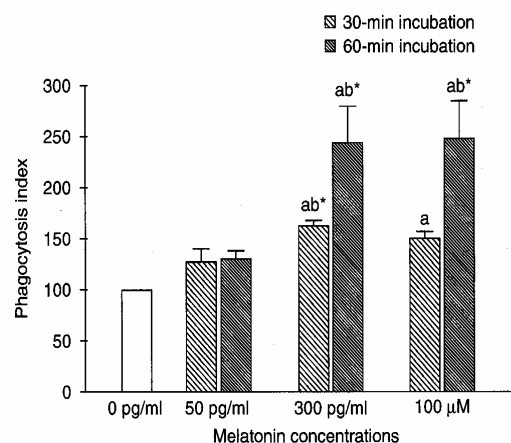


Fig. 1. *In vitro* effect of the melatonin on the *Candida albicans* phagocytosis index in ring dove heterophils, at incubation times of 30 and 60 min. Each column represents the mean \pm SEM of seven determinations performed in duplicate. (a) $P < 0.05$ with respect to the control. (b) $P < 0.05$ with respect to the values obtained in the presence of the diurnal melatonin concentration. * $P < 0.05$ with respect to its corresponding value at 30 min.

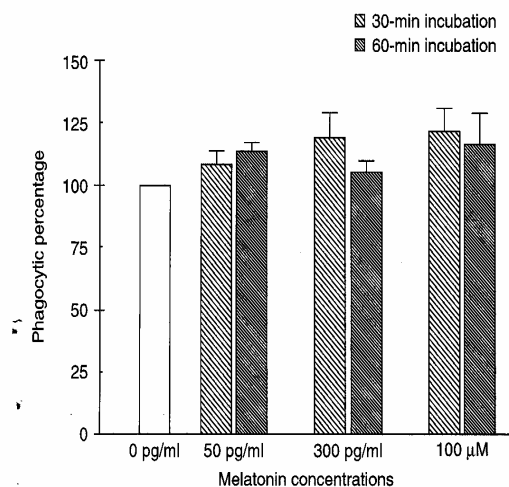


Fig. 2. Comparative study of the *in vitro* effect of melatonin on the phagocytic percentage in ring dove heterophils, at different incubation times. Each column represents the mean \pm SEM of seven determinations performed in duplicate.

When the heterophils were incubated for 60 min, there was a significant ($P < 0.05$) increase in *C. albicans* phagocytosis by heterophils incubated with the nocturnal concentration and pharmacological concentration of melatonin relative to the control and diurnal concentration values.

In comparing the two incubation times, there was a significant ($P < 0.05$) rise in the phagocytosis index when the heterophils were incubated for 60 min with melatonin at the nocturnal concentration or pharmacological concentration relative to the corresponding values after incubation of only 30 min.

Figure 2 illustrates the phagocytic percentage. When the incubation was performed for 30 and 60 min, no significant variations were observed between the different concentrations of melatonin, whether relative to the control or to either of the incubation times.

Defined as the phagocytosis index/phagocytosis percentage, the phagocytic efficiency represents the mean number of candidae phagocytosed per neutrophil that has phagocytosed at least one candida. The results are shown in Fig. 3. At 30-min incubation, a significant ($P < 0.05$) increase with respect to the control in this efficiency was only observed at the maximum (nocturnal) physiological concentration. When the incubation was prolonged to 60 min, there was a significant ($P < 0.05$) increase in the phagocytic efficiency with the nocturnal physiological concentration and the pharmacological concentration of melatonin with respect to the control and to the diurnal concentration of the hormone. In a comparison of the two incubation times, for both the pharmacological concentration and the nocturnal physiological concentration, at 60-min incubation, there was a significant ($P < 0.05$) increase with respect to the corresponding value at 30-min incubation.

Defined as the percentage of *C. albicans* killed amongst the total phagocytosed, the candidicide power (Fig. 4) rose significantly ($P < 0.05$) when the heterophils were incubated for 30 min in the presence of the nocturnal concentration or pharmacological concentration of melatonin with respect to the control and the diurnal concentration values.

At 60-min incubation, the candidicide power was higher in heterophils that were incubated with the nocturnal concentration

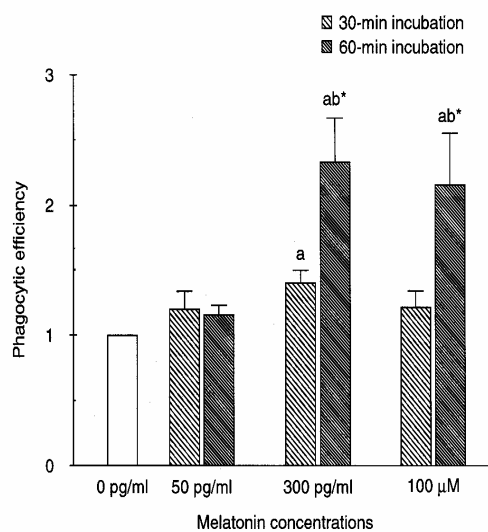


Fig. 3. Comparative study of the *in vitro* effect of melatonin on the phagocytic efficiency in ring dove heterophils, at incubation times of 30 and 60 min. Each column represents the mean \pm SEM of seven determinations performed in duplicate. (a) $P < 0.05$ with respect to the control. (b) $P < 0.05$ with respect to the values obtained in the presence of the diurnal melatonin concentration. * $P < 0.05$ with respect to its corresponding value at 30 min.

or the pharmacological concentration of melatonin ($P < 0.05$) with respect to the control. Also, the values obtained with the nocturnal concentration were significantly greater ($P < 0.05$) than those with the diurnal concentration of the hormone.

In a comparison of the two incubation times, there was a significant ($P < 0.05$) increase at 60 min with respect to the

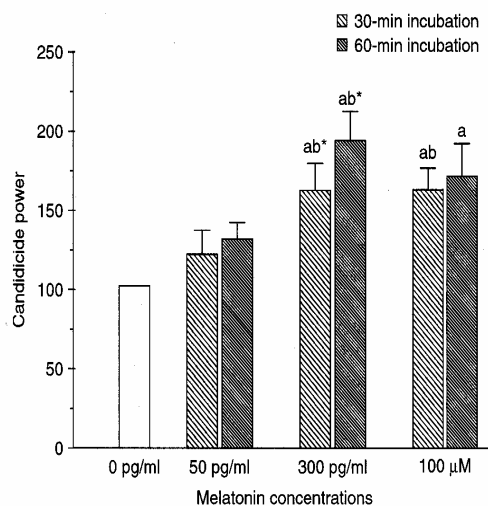


Fig. 4. Comparative study of the *in vitro* effect of melatonin on the candidicide power in ring dove heterophils, at incubation times of 30 and 60 min. Each column represents the mean \pm SEM of seven determinations performed in duplicate. (a) $P < 0.05$ with respect to the control. (b) $P < 0.05$ with respect to the values obtained in the presence of the diurnal melatonin concentration. * $P < 0.05$ with respect to its corresponding value at 30 min.

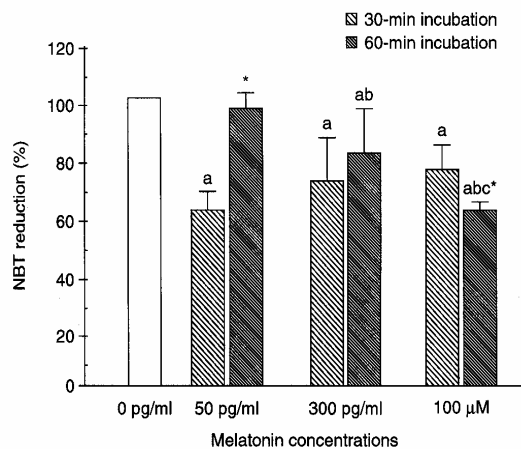


Fig. 5. Comparative study of the *in vitro* effect of melatonin on the oxidative metabolism [% nitroblue tetrazolium (NBT) reduction] in ring dove heterophils, at incubation times of 30 and 60 min. Each column represents the mean \pm SEM of seven determinations performed in duplicate. (a) $P < 0.05$ with respect to the control. (b) $P < 0.05$ with respect to the values obtained in the presence of the diurnal melatonin concentration. * $P < 0.05$ with respect to its corresponding value at 30 min.

corresponding value at 30 min in the presence of the nocturnal concentration of the hormone.

The NBT reduction by blood heterophils of the ring dove was taken as a measure of the oxidative metabolism accompanying the phagocytic process, indicating the superoxide anion levels. These determinations were carried out both in the presence of *C. albicans* (stimulated samples) and in their absence (unstimulated samples). The results are expressed as a percentage of NBT reduction (i.e. the quotient $E/NE \times 100$).

Figure 5 shows the results of the statistical analysis of the NBT reduction. It can be seen that, at 30-min incubation, whichever melatonin concentration was used, the NBT reduction was significantly less ($P < 0.05$) than that observed in the control samples.

The results for the NBT reduction after 60-min incubation showed a significant ($P < 0.05$) decrease using the nocturnal and pharmacological concentrations of melatonin with respect to the control. In the presence of the pharmacological concentration, the NBT reduction decreased significantly ($P < 0.05$) with respect to that obtained in the presence of the diurnal concentration.

With the pharmacological concentration of melatonin, there was a significant ($P < 0.05$) decline with respect to the values found after incubating with the nocturnal concentration. There were lower ($P < 0.05$) values in the superoxide anion levels with the pharmacological concentration of melatonin at 60-min incubation with respect to the corresponding value at 30 min. Finally, the reduction of NBT with the diurnal concentration of the hormone, and after 60-min incubation, was significantly ($P < 0.05$) greater than the corresponding value after 30-min incubation.

Discussion

Our results point to a clear enhancement of the capacity heterophil to ingest *C. albicans* (phagocytosis index) when the cells were

incubated with the maximum (nocturnal) and minimum (diurnal) physiological concentrations of melatonin. This enhancement was accompanied by an increase in candidicide power (i.e. the percentage of candidae killed amongst those that had been phagocytosed). However, that there were no differences in the results for the phagocytic efficiency indicates that the increased phagocytic activity of heterophils in the presence of melatonin was because the hormone stimulated each heterophil's efficiency in capturing antigens rather than because of the number of phagocytes entering into action. Indeed, the phagocytosis percentage study revealed no change in the number of heterophils activated to ingest candidae either at any of the melatonin concentrations tested or at the different incubation times used.

Comparison of the phagocytosis indices at 30 and 60-min incubation, and at the different concentrations tested, showed the effect of melatonin to be dose-dependent at physiological concentrations. When the nocturnal physiological concentration (maximum physiological) was used, the effect was also time-dependent. Similarly, the effect of melatonin on the candidicide power was also dose-dependent. At the concentration greater than the maximum physiological concentration, there was no further increase in the death of *C. albicans*.

After ingesting the antigen, the phagocytes destroy it. This destruction is due to the action of enzymes which form oxygen-derived free radicals by means of a series of oxidation-reduction reactions which lead to what is known as the respiratory burst. One of these free radicals is the superoxide anion (O_2^-), which plays an important role in the microbicidal activity of phagocytosis. However, these same free radicals may also cause tissue damage if there is insufficient degradation and/or the antioxidant mechanisms fail to function properly. An advantage would be provided by radicals being sequestered and/or removed from the phagocytes once they had fulfilled their goal. The reduction of NBT to a coloured formazan is the consequence of the increase in superoxide anion levels caused by the ingestion of the antigen during phagocytosis (17). This test is therefore the most directly related to the beginning of the respiratory burst stage in phagocytes, and constitutes a straightforward way to measure the metabolic activity of these immune cells. The NBT reduction test was evaluated in the avian blood heterophils after the ingestion of *C. albicans* at different incubation times (30 and 60 min).

The results (i.e. the superoxide anion levels) showed a clear decline on incubating the heterophils in the presence of the maximum (nocturnal) physiological concentration and the pharmacological concentration of melatonin after 30-min incubation and in the presence of *C. albicans*. After 60-min incubation with these two concentrations, there was also a significant decline in superoxide anion levels with respect to the control and also with respect to the diurnal concentration.

The effect of melatonin on the oxidative metabolism appears to be both dose- and time-dependent at physiological concentrations. However, at the far greater pharmacological concentrations, melatonin had no effect, which would be explained by the trade-off between the positive and negative effects of the oxidative burst. The greater effect of the longer incubation times of melatonin might be explained by the hormone probably acting almost individually at short times when the other antioxidant mechanisms of the phagocytes are only partially activated. At longer times, melatonin acts to assist in the action of other enzymatic systems and antioxidant cell components (catalase, superoxide dismutase,

vitamins C and E, glutathione, etc.) by, for example, providing protection from the harmful effect of the respiratory burst.

In view of the present results, we can conclude that melatonin, at least *in vitro*, favours ring dove heterophil phagocytic activity. At the same time, it is neutralizing oxidative stress when it acts at the greatest physiological concentration studied (which is attained during the hours of darkness) or at pharmacological concentrations, with its effectiveness increasing with greater incubation time.

Acknowledgements

- This investigation was supported by a research grant from Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica (MEC PM 98-0032) and by the Consejería de Educación, Ciencia y Tecnología – Fondo Social Europeo (Junta de Extremadura, 2003). The authors would like to express their thanks to Ms Elena Circujano Vadillo for her technical assistance.

Accepted 11 September 2003

References

- 1 Maestroni GJM. The immunoendocrine role of melatonin. *J Pineal Res* 1993; **14**: 121–126.
- 2 Rodríguez AB, Lea RW. Effect of pinealectomy upon the nonspecific immune response of the ring-dove (*Streptopelia risoria*). *J Pineal Res* 1994; **16**: 159–166.
- 3 Skwarlo-Sonta K. Functional connections between the pineal gland and immune system. *Acta Neurobiol Exp* 1996; **56**: 341–357.
- 4 Poeggeler B, Reiter RJ, Tan DZ, Chen LD, Manchester LC. Melatonin, hydroxyl radical mediated oxidative damage, and again: a hypothesis. *J Pineal Res* 1993; **14**: 151–168.
- 5 Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J* 1993; **1**: 57–60.
- 6 Reiter RJ. Antioxidant actions of melatonin. *Adv Pharmacol* 1997; **38**: 103–117.
- 7 Rodríguez AB, Nogales G, Ortega E, Barriga C. Melatonin controls of superoxide anion level: modulation of superoxido dismutase activity in ring dove heterophils. *J Pineal Res* 1998; **24**: 9–14.
- 8 Rodríguez AB, Marchena JM, Nogales G, Ortega E, Durán J, Barriga C. Correlation between circadian rhythm of melatonin and the phagocytosis and superoxide anion levels in ring dove heterophils. *J Pineal Res* 1999; **26**: 35–42.
- 9 Nelson RJ, Demas GE. Role of melatonin in mediating seasonal energetic and immunologic adaptations. *Brain Res Bull* 1997; **44**: 423–430.
- 10 Rodríguez AB, Ortega E, Lea RW, Barriga C. Melatonin and the phagocytic process of heterophils from the ring dove (*Streptopelia risoria*). *Mol Cell Biochem* 1997; **168**: 185–190.
- 11 Rodríguez AB, Terrón MP, Durán J, Ortega E, Barriga C. Physiological concentrations of melatonin and corticosterone affect phagocytosis and oxidative metabolism of ring dove heterophils. *J Pineal Res* 2001; **31**: 31–38.
- 12 Terrón MP, Marchena JM, Shai F, Harley H, Barriga C, Rodríguez AB. Melatonin: an antioxidant at physiological concentrations. *J Pineal Res* 2001; **31**: 95–96.
- 13 Terrón MP, Cubero J, Marchena JM, Barriga C, Rodríguez AB. Melatonin and aging: in vitro effect of young and mature ring dove physiological concentrations of melatonin on the phagocytic function of heterophils from old ring dove. *Exp Gerontol* 2002; **37**: 421–426.
- 14 Rodríguez AB, Nogales G, Marchena JM, Barriga C. Suppression of both basal and antigen-induced lipid peroxidation in ring dove heterophils by melatonin. *Biochem Pharmacol* 1999; **58**: 1301–1306.
- 15 Reiter RJ, Tan DX, Qi W, Manchester LC, Karbownik M, Calvo JR. Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. *Biol Signals Recept* 2000; **9**: 160–171.
- 16 Rodríguez AB, Barriga C, De la Fuente M. Phagocytic function and antibody dependent cellular cytotoxicity of human neutrophils in the presence of *N*-formimidoyl thienamycin. *Agents Actions* 1990; **31**: 1–2.
- 17 Basgara O, Howeedy A, Kajdacsy-Balla A. Macrophage function in chronic experimental alcoholism. Modulation of surface receptors and phagocytosis. *Immunology* 1998; **65**: 405–409.

RESULTADOS III:

Estudio comparativo de la función fagocítica en animales jóvenes y viejos de tórtola collariza (*Streptopelia risoria*) y su relación con los niveles de melatonina.

M. P. Terrón · S. D. Paredes · Carmen Barriga
Eduardo Ortega · Ana B. Rodríguez

Comparative study of the heterophil phagocytic function in young and old ring doves (*Streptopelia risoria*) and its relationship with melatonin levels

Accepted: 1 April 2004 / Published online: 18 May 2004
© Springer-Verlag 2004

Abstract A functional connection between the pineal gland (via the hormone melatonin) and the immune system has been suggested. In our previous results in the ring dove, we observed diurnal oscillations in the levels of this neurohormone in young animals and a decline in its plasma levels with advancing age (which is accompanied by the absence of diurnal rhythm). We also noted enhanced phagocytic activity of heterophils from old animals after in vitro incubation with both physiological and pharmacological doses of melatonin. Here, we evaluate the functional capacity of ring dove (*Streptopelia risoria*) heterophils in young (2 years of age) and old (8 years and more) animals at different times of day (0:00, 10:00 and 16:00, the times when the maximum, minimum, and mean values, respectively, of melatonin levels are observed in young animals). The phagocytic capacities for the ingestion of latex beads and *Candida albicans* were evaluated, as well as the oxidative metabolism which accompanies phagocytosis. At all three times of day studied, the heterophil phagocytic function with both latex and *C. albicans* was significantly greater in the young than in the old animals, and in the young animal cells it was significantly higher at 0:00. In addition, in the presence of latex beads, there was a significant decline at 10:00 and 0:00 of superoxide anion levels in the young animals relative to the old. In the young animals, there was a decline at 0:00 in comparison with both 10:00 and 16:00, and in the old animals there was a decline at both 0:00 and 16:00 compared with 10:00. These results could be due, at least in part, to the absence of a diurnal rhythm of melatonin in old animals, and to an enhancing effect of that

hormone on young animals' heterophil phagocytic function, which would also neutralize the oxidative stress deriving from this immune function.

Keywords Melatonin · Heterophil · Phagocytic process · Age · Bird

Abbreviations PBS: phosphate-buffered saline · MIF: macrophage migration-inhibition factor · PI: phagocytosis index · PP: phagocytosis percentage · PE: phagocytosis efficiency

Introduction

The immune system has long been considered as functioning autonomously, but good experimental evidence now exists for two-way interactions with the nervous and endocrine systems (Skwarlo-Sonta 1996). The immune system's mechanism of defending the organism against harmful microorganisms and foreign molecules may be coordinated with the environment's 24-h period in order to achieve optimal efficacy. It is therefore not surprising that, as with other body functions, immune-system activity undergoes circadian changes (Skwarlo-Sonta 1996). There is substantial evidence that particular subtypes of immune cells, as well as other immune parameters, fluctuate differentially over a 24-h period and exhibit different phase relationships with circulating corticosteroid levels (Skwarlo-Sonta 2002). This implies the existence of some other factors responsible for the regulation of the diurnal rhythm of immune-system function, and the pineal gland, in particular its principal hormone, melatonin, may be a prime candidate.

There are several reasons for this, but the most important are as follows: (1) pineal gland function shows a diurnal and seasonal periodicity in most species and declines with age. (2) The diurnal rhythm of melatonin synthesis strongly depends on lighting conditions. Thus, one of the most interesting relationships between melatonin and the immune system is the seasonally

Communicated by G. Heldmaier

M. P. Terrón (✉) · S. D. Paredes · C. Barriga · E. Ortega
A. B. Rodríguez
Department of Physiology, Faculty of Science,
University of Extremadura, Avda. Elvas s/n,
06071 Badajoz, Spain
E-mail: pilarts@unex.es
Fax: +34-924-289388

dependent variation in immunity observed in wild animals both in the natural state and under laboratory conditions, when the animals are kept under different lighting regimens (Markowska et al. 2000). (3) Melatonin participates in the control of several biological rhythms, including those associated with aging and with affective and psychosomatic diseases, which, in turn, are related to an increased incidence of infections, autoimmune disorders, and cancer (Pierpaoli et al. 1987).

Experimental evidence for the role of melatonin as a synchronizer of the diurnal rhythm of various immune parameters has been provided in only a few studies: in humans (Angeli et al. 1990), rats (McNulty et al. 1990), chickens (Rosolowska et al. 1991; Swarlo-Sonta et al. 1991, 1992), and ring doves (Rodriguez et al. 1999a). Several *in vivo* and *in vitro* studies have suggested that melatonin modulates certain immune functions and attenuates oxidative reactions (Skwarlo-Sonta 1996; Skwarlo-Sonta et al. 1991; Rosolowska et al. 1991; Poggeler et al. 1990; Tan et al. 1993; Reiter 1997). Thus, in our previous work with the ring dove (*Streptopelia risoria*), we determined that both extirpation of the pineal gland, as well as *in vitro* incubation of ring dove heterophils with pharmacological concentrations of melatonin, modified phagocytic activity and the oxidative metabolism of the cells responsible for the non-specific immune response (Rodriguez et al. 1997). In a similar way, we observed a decline in superoxide anion levels in heterophils after phagocytosis of inert particles (Rodriguez et al. 1998), together with a modulation of the superoxide dismutase activity after incubation with pharmacological concentrations of melatonin (Rodriguez et al. 1998) and a clear decrease in lipid peroxidation (Rodriguez et al. 1999b).

Thus, melatonin enhances the phagocytic function at the same time as neutralizing the oxidative stress derived from this immune function (Terrón et al. 2003). In addition, our research group found a positive correlation in the ring dove between the diurnal rhythm of melatonin and the capacity of blood heterophils to phagocytose inert particles (latex beads), as well as a negative correlation between the neurohormone and superoxide anion levels during the respiratory burst (Rodriguez et al. 1999a). Likewise, we observed an increase in the capacity of incubated avian heterophils to ingest inert particles as physiological concentrations of melatonin are raised (Rodriguez et al. 2001).

In a recent publication, we noted a significant decline in plasma melatonin levels in old ring doves compared with the concentrations observed in both mature and young animals (Terrón et al. 2002). We have also reported on an absence of diurnal rhythm, with more or less constant concentrations during a 24-h period (Terrón et al. 2002) and an enhancement of phagocyte activity of heterophils from old animals after *in vitro* incubation with physiological concentrations of melatonin. These results corroborated previous reports that melatonin is synthesized and secreted during the dark period of the light/dark cycle, and that plasma

concentrations of this neurohormone decline over the course of life in several species (Turek et al. 2000).

The aim of this present work was to evaluate the functional capacity of ring dove heterophils from young and old animals at different times of day (0:00, 10:00, 16:00); we previously observed (Terrón et al. 2002) significant differences in the diurnal rhythm of melatonin in young ring doves. These animals present maximum values of melatonin at night, with minimum levels in the morning and medium levels in the afternoon/early evening. This study also tackles the possible relationship between the levels of the hormone (observed at these times) and the phagocytic activity (ingestion capacity and oxidative metabolism), and how they change with age.

Materials and methods

Animals

Male and female ring doves at 2–3 years of age (young) and 8–10 years of age (old) were used in the study. The animals used in this investigation were bred in our department, housed in separate cages measuring 40×40×45 cm (with an outside window, natural lighting, and indirect ventilation), and fed *ad libitum* (food and water). No substantial differences between young and old animals were observed in the amount of food and water ingested. The study was conducted during April/June when the daily lighting pattern was approximately 14 h light and 10 h dark (dark period from 21:30 ± 30 min to 07:30 ± 30 min). The temperature was maintained at 22 °C (± 2 °C). The trials were conducted under dim red light which is perceived as darkness.

This study was approved by the Ethical Committee of the University of Extremadura (Badajoz, Spain) in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Isolation of heterophil leukocytes

Heterophil leukocytes were obtained immediately after the extraction of 1 ml of blood (at 0:00, 10:00 and 16:00) drawn from the brachial vein to which 0.5 ml of phosphate-buffered saline solution (PBS) and 0.5 ml of lithium heparin were added, followed by centrifugation at 600 g for 15 min in a gradient using Histopaque (1 ml of 1119, 1 ml of 1077; Sigma, St. Louis, MO, USA). The heterophils were then washed in PBS and adjusted according to each trial.

Levels of melatonin in plasma

Melatonin levels were determined in the different age groups by using a commercial radioimmunoassay kit (DDV Diasnógtika) that consisted of ¹²⁵I-melatonin

(0.54 $\mu\text{Ci/ml}$), rabbit anti-melatonin antiserum, melatonin standards, delipidizing agent, assay buffer, precipitating agent, and controls (isophilized plasma samples), according to the manufacturer's instructions. Our findings indicated that melatonin plasma levels in young and old animals coincided with those previously obtained in Terrón et al. 2002 (results not shown).

Culture of *Candida albicans*

The *Candida albicans* inocula were cultured on Sabouraud Glucose Agar in Petri dishes, sown in zig-zag using an inoculating loop, with incubation at room temperature for 24–48 h. Before each determination, to form the desired cell suspension, the Candidae were resuspended in Hank's medium and the concentration adjusted, depending on the trial protocol, in a Neubauer haemocytometer under a phase-contrast microscope.

Phagocytosis of *Candida albicans* and candidicide power

The method described by Rodríguez et al. (1990) was used with minor modifications. The trials were carried out by incubation with shaking of 500 μl of heterophil suspension (1×10^6 cells/ml) with 500 μl of *C. albicans* (3×10^6 cells/ml) and 100 μl of PBS, with an incubation time of 60 min. After 50 min of incubation, 3 ml of 0.01% methylene blue (vital colouring) was added, then leaving it to act for 10 min. The tubes were centrifuged for 10 min at 300 g, and two thirds of the supernatant was withdrawn. The rest was shaken, and a sample taken for counting in the Neubauer haemocytometer under a phase-contrast microscope using a 40-power objective lens.

The results of phagocytosis were expressed as the total number of *C. albicans* phagocytosed by 100 heterophils (candidicide index); candidicide power was expressed as the percentage of *C. albicans* which were not only phagocytosed, but also destroyed, by 100 heterophils (dead Candidae were stained blue).

Phagocytosis of latex beads

The trials of the phagocytosis of inert particles (latex beads) were performed according to the technique described in Rodríguez and Lea (1994). Aliquots of 200 μl of the suspension of phagocytes were put into the wells of plastic macrophage migration-inhibition factor (MIF) type plates and, after 30 min of incubation at 37 °C in an oven with 5% CO_2 atmosphere, the adhered monolayer was washed with PBS at 37 °C. Then 20 μl of latex beads (1.09-mm diameter particle size, diluted to 1% in PBS; Sigma, St. Louis, MO, USA) and 200 μl PBS were added, followed by another 30-min incubation under the same conditions as before. Finally, the samples were fixed and stained with Diff-Quick containing methanol

(5 min), eosin (five passes) and haematoxylin (five passes). The plates were washed with tap water and dried, followed by counting under oil-immersion phase-contrast microscopy at a magnification of 100 \times . The number of particles ingested per 100 heterophils expressed the latex-bead phagocytosis index (PI). The percentage of cells that had phagocytosed at least one latex bead expressed the phagocytosis percentage (PP). The ratio PI:PP gave the phagocytosis efficiency (PE).

Quantitative nitroblue tetrazolium (NBT) test

The method used was that described by Terrón et al. (2002) for *C. albicans* and by Rodríguez et al. (2001) for latex beads. An aliquot of 250 μl of heterophil suspension (1×10^6 cells/ml) was incubated for 60 min with an equal volume of NBT (Sigma, 1 mg/ml in PBS solution) in the presence of 50 μl of *C. albicans* (5×10^6 cells/ml) or 50 μl of latex beads (1.09-mm diameter particle size, diluted to 1% in PBS; Sigma, St. Louis, MO, USA) (stimulated samples). Aliquots of heterophil suspension incubated in the absence of *C. albicans* or latex beads were used as non-stimulated samples. In all cases, after shaken incubation (60 min) at 37 °C, the reaction was stopped with 2.5 ml of 0.5 N hydrochloric acid.

The tubes were centrifuged for 30 min at 600 g and 4 °C, the supernatant was discarded, and the reduced NBT (blue formazan) extracted from the cell pellet with 1 ml of dioxan. The tubes were then centrifuged for 30 min at 600 g, and the absorbance of the supernatant was determined in a spectrophotometer at 525 nm using dioxan as the blank control.

The percentage stimulation of the NBT reduction was then determined, 100 being the value given to the absorbance obtained in the tubes without latex beads or *C. albicans*.

Statistical analysis

All data are expressed as mean (\bar{x}) \pm standard error (SE) of the number of determinations ($n=8$) carried out in duplicate. The variables were tested for normality, and then the different groups were compared using the Scheffé ANOVA (analysis of variance) parametric F-test, with $P < 0.05$ taken as the level of significance in differences between groups. The different times of day were compared within a given age group, and the two age groups were compared for each time of day.

Results

Study of diurnal rhythms of melatonin

Experiments carried out on the diurnal rhythms in young and old ring doves (*Streptopelia risoria*) (results not shown), which corroborated the results previously

obtained in Terrón et al. (2002), showed a significant decline in plasma melatonin levels in old animals when compared with the concentrations observed in young animals; maximum (nocturnal) concentrations in young animals were around 300 pg/ml, and minimum (diurnal) concentrations were around 50 pg/ml.

Study with latex beads

Figure 1A, shows the variations in phagocytic index in young and old animals at the three times of day studied. The results reveal an increment ($P < 0.05$) in the capacity of the young animals' heterophils to ingest latex beads at 0:00 compared with their corresponding value at the other times (10:00 and 16:00). An increase ($P < 0.05$) was observed in the phagocytic index of young animals at 10:00 compared with their corresponding value at 16:00. The value was significantly greater ($P < 0.05$) in young animals at 0:00 and at 10:00 in comparison with the corresponding values in the old animals. The phagocytic percentage results are summarized in Fig. 1B. A significant increase ($P < 0.05$) was observed in phagocytic percentage in the young animals at 0:00 compared with their corresponding values at 10:00 and 16:00, and the phagocytic percentage values were higher in the young animals at 10:00 and 0:00 in comparison with the corresponding values in the old animals. Figure 1C shows the results of investigations into variations in phagocytic efficiency. A significant increase ($P < 0.05$) can be observed in the young animals at 0:00 compared with their value at 16:00. The values were higher in the young animals at 10:00 and 0:00 compared with the corresponding values in the old animals.

The percentage variations in NBT reduction (levels of superoxide anion) are shown in Fig. 2. There was a clear decline in NBT reduction in the young animals at 0:00 compared with their corresponding value at 10:00 and 16:00, and in the old animals at 0:00 and 16:00 compared with their value at 10:00. The NBT reduction was lower in the young at 10:00 and 0:00 than in the old animals at the same times.

Study with *C. albicans*

The capacity of the heterophils to ingest *C. albicans* as quantified by the candidicide index (number of *Candidae* phagocytosed by 100 heterophils) is shown in Fig. 3A. There was a significant increase ($P < 0.05$) in the candidicide index in the heterophils of both young and old animals at 0:00 in comparison with their corresponding values at 10:00 and 16:00. The candidicide power (percentage of dead *C. albicans* of those phagocytosed in 100 heterophils) is shown in Fig. 3B. There was a significant increase in the capacity of heterophils to kill *C. albicans* in the young animals at 0:00 compared with their corresponding values at 10:00 and 16:00. In addition, the

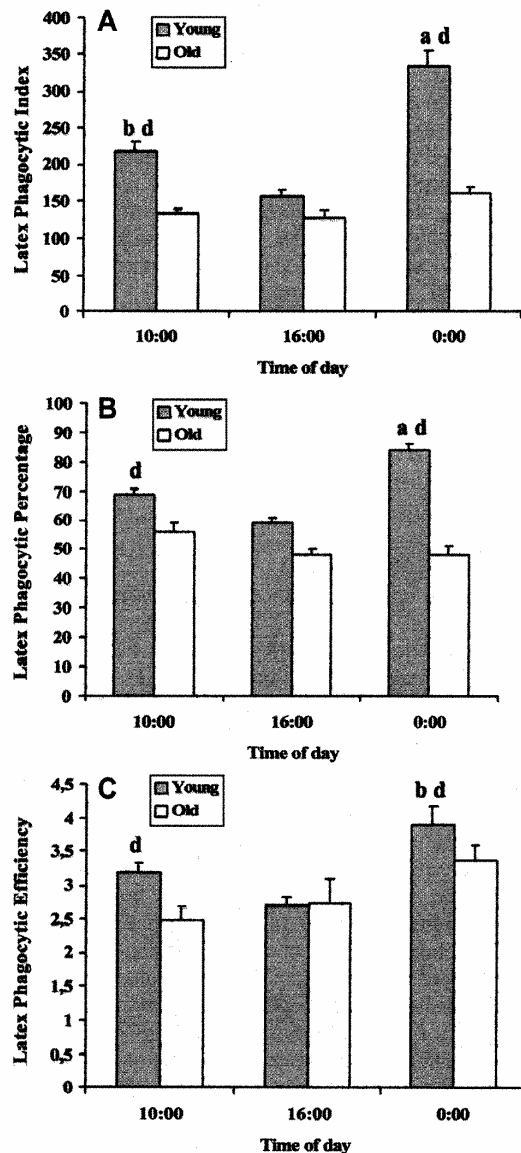


Fig. 1 A Chart of the phagocytosis index (number of latex beads phagocytosed per 100 heterophils) in young and old individuals of *Streptopelia risoria*; B chart of the phagocytosis percentage (percentage of cells that have phagocytosed at least one latex bead) in young and old individuals of *Streptopelia risoria*; C chart of the phagocytosis efficiency (phagocytosis index/phagocytosis percentage) in young and old individuals of *Streptopelia risoria*. Each value represents the $\bar{x} \pm SE$ of eight determinations performed in duplicate. a $P < 0.05$ in comparison with their corresponding value at 10:00 and 16:00; b $P < 0.05$ in comparison with their value at 16:00; d $P < 0.05$ in comparison with the corresponding value at the same time in old animals

values were higher in the young animals than in the old animals ($P < 0.05$) at 0:00.

No significant differences were observed in NBT reduction after *C. albicans* ingestion between the two ages or between times of day.

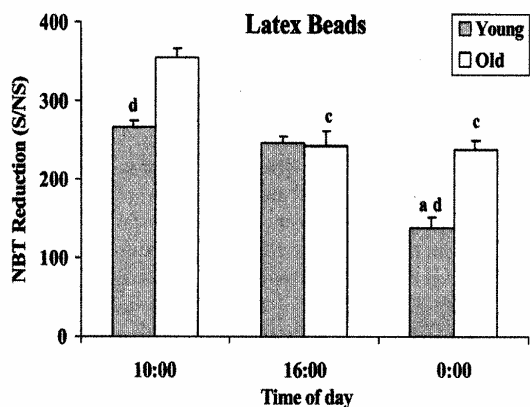


Fig. 2 Chart of the percentage stimulation of the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) in heterophils incubated in the presence of latex beads in young and old individuals of *Streptopelia risoria*. S Stimulated samples, NS non-stimulated samples. Each value represents the mean (\bar{x}) \pm SE of eight determinations performed in duplicate. a $P < 0.05$ in comparison with their corresponding value at 10:00 and 16:00; c $P < 0.05$ in comparison with their corresponding value at 10:00; d $P < 0.05$ compared with the corresponding value at the same time in old animals

Discussion

Interpretation of melatonin's message within the body is essential to adapt an animal's physiological functions to environmental conditions, and such adaptation would increase its probability of survival. Immune-system activity is one of the physiological capabilities most responsible for the survival of an animal (Skwarlo-Sonta 1996). Melatonin appears to act as a synchronizer of the circadian clock, giving a time-related signal to a number of body functions, one of which is the circadian organization of the organism's defence (Cardinali et al. 1999).

Phagocytosis is an important element in non-specific immunity and is fundamental for the host's defence against infection (Curnette et al. 1985; Gallin 1989). In birds, heterophils, because of their ability to ingest and kill different antigens, play a central role in host defence mechanisms. These cells account for the greater part of peripheral leukocytes and represent the first line of defence against invading agents (Levi et al. 1992). It is known that the avian pineal gland, a vertebrate model system of the circadian oscillator, and its hormone melatonin, also affect the immune system (Skwarlo-Sonta 1996). The function of the immune system in its defence against harmful microorganisms, foreign molecules, or tumour cells must be coordinated into periods of about 24 h to achieve the maximum efficacy (Hardeland et al. 1992).

Experimental findings in the past few years have supported a functional connection between the pineal gland and the immune system in both mammals and birds (Swarlo-Sonta 2002). General observations suggest that the effects of melatonin on different aspects of the

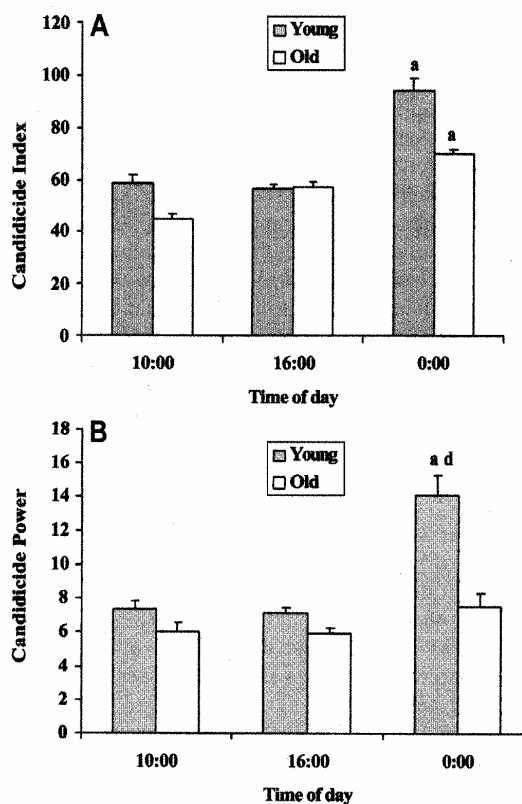


Fig. 3 A Chart of the candidicide index (phagocytosis of *Candida albicans*: number of *Candidae* ingested by 100 heterophils) in young and old individuals of *Streptopelia risoria*; B chart of the candidicide power (percentage of dead candidae of the total of those phagocytosed) in young and old individuals of *Streptopelia risoria*. Each value represents the mean (\bar{x}) \pm SE of eight determinations performed in duplicate. a $P < 0.05$ in comparison with their corresponding value at 10:00 and 16:00. d $P < 0.05$ in comparison with the corresponding value at the same time in old animals

immune function depend on the species being studied, the age and gender of the individuals, the experimental protocol, the season of the year, melatonin dose, and administration route (Conti et al. 1994). The results under discussion in the present work were obtained during April/June, when the daily lighting pattern was approximately 14 h light and 10 h dark (dark period from 21:30 \pm 30 min to 07:30 \pm 30 min) in young animals (1–1.5 years) and old (> 8 years).

Developmental and age-related changes in pineal function appear to be related, at least partially, to immune-system efficiency (Cardinali et al. 1999). It is known that aging is accompanied by alteration of the circadian structure of the immune response. Thus, senescence is characterized by a decrease in the amplitude of diurnal rhythms, as well as by alterations in entrainment to changes in the light-dark cycle of non-photic stimuli and in the circadian organization of the immune responses (Cardinali et al. 1998). In this sense, we previously found in the ring dove a significant decline in plasma melatonin levels in old animals compared with

the concentrations observed in either mature (5-year-old adult) or young animals. In addition, in old animals, there was an absence of diurnal rhythm (with the plasma levels remaining more or less constant over a 24-h period) and an enhancement of phagocytic activity of heterophils after incubation with physiological doses of melatonin found in young animals (Terrón et al. 2002).

The results of the present study indicate that the heterophils of young animals have a greater capacity to ingest latex beads and to ingest and destroy *C. albicans* at all three times of day studied than do the heterophils of old animals. The difference was most evident at 0:00, the time at which the melatonin levels are at a maximum in the young animals. The circulating melatonin levels could well influence heterophil activity at both 0:00 and 16:00, when significant differences are observed in the neurohormone's plasma levels in young relative to old animals (Terrón et al. 2002). Nonetheless, significant differences were also observed at 10:00 in the phagocytic capacity of young animals in comparison with old animals, with the melatonin levels being lower at this time of day in the young animals. This might be due, more than to the effect of melatonin alone, to other physiological aspects in isolation or in combination with the hormone and which are associated with day-night rhythms and/or seasonal changes in photoperiod such as growth hormone, corticosterone and gonadal steroids, and which could contribute to the effects observed in the phagocytosis in young animals.

In this way, as is suggested in Barriga et al. (2001), the decline in circulating melatonin levels during the day in young, mature animals might be because it is being used in the neutralization of reactive oxygen species during the day when they are at their highest levels, which happens in parallel with an increase in corticosterone levels. In this sense, we have observed the greatest level of corticosterone in middle-aged animals at 10:00 (Rodríguez et al. 2001).

Considering our results with respect to the phagocytic index (PI), phagocytic percentage (PP) and the phagocytic efficiency (PE) with latex beads, we can suggest that the increment in the latex ingestion capacity of heterophils is due to an increment in both number of activated cells (PP, percentage of cells that have phagocytosed at least one latex bead) and PE (number of latex beads ingested by each activated cell). In previous studies by our research group, we have found a positive correlation between the diurnal variations of melatonin and the capacity of heterophils to phagocytose inert particles, with maximum values during the night (Rodríguez et al. 1999a). Likewise, we have observed a dose-dependent increase in the phagocytic function of heterophils of mature birds (3–5 years old) after incubation with both physiological (Rodríguez et al. 2001) and pharmacological (Rodríguez et al. 1998) concentrations of melatonin. These results together confirm earlier findings that melatonin is synthesized and secreted with a light/dark cycle (with maximum levels at night), that its plasma concentrations decline

with age in various species (Turek et al. 2000), and that it has an immunostimulatory effect (Terrón et al. 2002).

Having ingested an antigen, phagocytic cells trigger a metabolic burst, giving rise to the production of such free radicals as superoxide anion (O_2^-). The reduction of NBT to a coloured formazan may be the consequence of an increase in superoxide anion produced by the ingestion of antigen, but it can also be a measure of cell metabolism in the absence of phagocytic stimuli (Babior 1987; Basgara et al. 1988). The NBT reduction test is also an indirect measure of enhanced intracellular hexose-mono-phosphate shunt activity in heterophils (Park et al. 1968). Here, the NBT reduction test was used to evaluate the respiratory burst through the levels of O_2^- in blood heterophils after phagocytosis. In the latex study, we found the lowest superoxide anion levels in young animals at 0:00, which could be related to the maximum nocturnal levels of melatonin observed, due to the antioxidant action of the hormone (Terrón et al. 2002). The highest levels of superoxide were observed in the group of old animals at 10:00. Indeed, there were greater levels of O_2^- in the old animals than in the young, and in the latter there was a decline in the levels of O_2^- at night, coinciding with the hours during which we had previously observed an increase in plasma melatonin levels (Terrón et al. 2002). In fact, we found a clear negative correlation between the melatonin serum levels and NBT reduction after latex bead phagocytosis (Rodríguez et al. 1999a). In the NBT study with *C. albicans* (living particle), although significant differences were not seen, we observed a slight decrease in O_2^- levels in heterophils from young animals in relation to the old at 0:00 (the time of day when we have previously observed greatest differences in the concentration of melatonin between both age groups). However, the fact that statistically significant differences were not observed may be due to an added effect of heterophil metabolism plus *Candida albicans* metabolism.

It is known that longevity is determined by the amount of accumulated free-radical damage that animals sustain throughout a lifetime, i.e. the more oxidative damage the higher the incidence of age-associated, free-radical-based diseases, and the shorter the lifespan. This is consistent with recent observations that the degree of oxidative damage which rats accumulate is greater in advanced age when they have a relatively melatonin-deficient state or in pinealectomized young rats (Reiter et al. 2000). Our research over the past few years indicates that in young-mature animals, melatonin increases heterophil phagocytic activity at the same time as neutralising superoxide anion levels (Terrón et al. 2003). In summary, all these results, together with those discussed in this paper, are of particular interest in relation to aging. Senescence is associated with a marked increase in free radicals (Turek et al. 2000) and a decrease in plasma melatonin levels (Reiter 1995), which appear to be intimately related to the immune system's decline as has been reported by other workers (Cardinali et al. 1999).

In conclusion, the results discussed in this paper confirm a decline in immune function with aging, which could be due, at least in part, to the absence of diurnal rhythm of melatonin in those animals, and to an enhancing effect of that hormone on the heterophil phagocytic function of young animals; this would also neutralize the oxidative stress deriving from this immune function.

Acknowledgements This investigation was supported by a research grant from the Spanish Ministry of Science and Technology (BFI2002-04583-C02-01). Research grants were awarded also to M.P. Terrón and S.D. Paredes by Consejería de Educación Ciencia y Tecnología—Fondo Social Europeo (Junta de Extremadura, FIC00B013 and FIC02A049, respectively). The authors would like to express their thanks to Elena Circujano Vadillo for her technical assistance.

References

- Angeli A, Gatti G, Masera R, Sartori ML, Carignola R (1990) Chronobiological aspects of neuroendocrine-immune interactions. *Int J Neurosci* 51(3-4):341-343
- Babior BM (1987) Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N Engl J Med* 298:659-666
- Bagasra O, Howedy A, Kajdacsy-Balla A (1988) Macrophage function in chronic experimental alcoholism. I. Modulation of surface receptors and phagocytosis. *Immunology* 65(3):405-409
- Barriga C, Martín MI, Tabla R, Ortega E, Rodríguez AB (2001) Circadian rhythm of melatonin, corticosterone and phagocytosis hormones: effect of stress. *J Pineal Res* 30(3):180-187
- Cardinali DP, Brusco LI, Selgas L, Esquifito AI (1998) Diurnal rhythms in ornithine decarboxylase activity and norepinephrine and acetylcholine synthesis in submaxillary lymph nodes and spleen of young and aged rats during Freund's adjuvant-induced arthritis. *Brain Res* 13;789(2):283-292
- Cardinali DP, Brusco LI, Cutrera A, Castrillon P, Esquifito AI (1999) Melatonin as a time-meaningful signal in circadian organization of immune response. *Biol Signals Recept* 8(1-2):41-48
- Conti A, Maestroni GJM (1994) Melatonin-induced immuno-opioids: role in lymphoproliferative and autoimmune diseases. *Adv Pineal Res* 7:83-100
- Curnette JT, Boxer LA (1985) Clinical significant phagocytic cell defect. In: Renington SS, Swartz MU, (eds). *Current topics in infectious diseases clinical*. McGraw-Hill, New York, pp 103-155
- Gallin JL (1989) *Fundamental immunology*. Raven Press, New York, pp 721-733
- Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX (1992) The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substance. *Neurosci Biobehav Rev* 17:347-357
- Levi F, Cannon C, Depres-Brummer P, Adam R, Bourin P, Pati A, Flotentin I, Misset JL, Bismuth H (1992) The rhythmic organization of the immune network: implication for the chronopharmacologic delivery of interferons, interleukins and cyclosporin. *Adv Drug Deliv Rev* 9:85-112
- Markowska M, Bialecka B, Ciecchanowska M, Koter Z, Laskowska H, Karkucinska-Wieckowska A (2000) Effect of immunization on nocturnal NAT activity in chicken pineal gland. *Neuroendocrinol Lett* 21:367-373
- McNulty JA, Relfson M, Fox LM, Fox LM, Kus L, Honda RJ, Schneider GB (1990) Circadian analysis of mononuclear cells in the rat following pinealectomy and superior cervical ganglionectomy. *Brain Behav Immun* 4(4):292-307
- Park BH, Fikring SM, Smithwick EM, (1968) Infection and nitroblue reduction by neutrophils. A diagnostic aid. *Lancet* 532
- Pierpaoli W, Maestroni GJM (1987) Melatonin: a principal neuroimmunoregulatory and anti-stress hormone: its anti-aging effects. *Immunol Lett* 16(3-4):355-362
- Poeggeler B, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC (1990) Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage and aging: a hypothesis. *J Pineal Res* 14:151
- Reiter RJ (1995) The pineal gland and melatonin in relation to aging: a summary of the theories and the data. *Exp Gerontol* 30(3-4):199-212
- Reiter RJ (1997) Antioxidant actions of melatonin. *Adv Pharmacol* 38:103-117
- Reiter RJ, Tan DX, Qi W, Manchester LC, Karbownik M, Calvo JR (2000) Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. *Biol Signals Recept* 9(3-4):160-171
- Rodríguez AB, Lea RW (1994) Effect of pinealectomy upon the nonspecific immune response of the ring-dove (*Streptopelia risoria*). *J Pineal Res* 16(3):159-166
- Rodríguez AB, Barriga C, De la Fuente M (1990) Phagocytic function and antibody-dependent cellular cytotoxicity of human neutrophils in the presence of N-formimidoylthienamycin. *Agents Actions* 31(1-2):86-95
- Rodríguez AB, Ortega E, Lea RW, Barriga C (1997) Melatonin and the phagocytic process of heterophils from ring dove (*Streptopelia risoria*). *Mol Cell Biochem* 168(1-2):185-190
- Rodríguez AB, Nogales G, Ortega E, Barriga C (1998) Melatonin controls of superoxide anion level: modulation of superoxide dismutase activity in ring dove heterophils. *J Pineal Res* 24(1):9-14
- Rodríguez AB, Marchena JM, Nogales G, Durán J, Barriga C (1999a) Correlation between the circadian rhythm of melatonin, phagocytosis and superoxide anion levels in ring dove heterophils. *J Pineal Res* 26(1):35-42
- Rodríguez AB, Nogales G, Marchena JM, Barriga C (1999b) Suppression of both basal and antigen-induced lipid peroxidation in ring dove heterophils by melatonin. *Biochem Pharmacol* 15;58(8):1301-1306
- Rodríguez AB, Terrón MP, Durán J, Ortega E, Barriga C (2001) Physiological concentrations of melatonin and corticosterone affect phagocytosis and oxidative metabolism of ring dove heterophils. *J Pineal Res* 31(1):31-38
- Rosolowska-Huszcz D, Thaela MJ, Jagura M, Stepień D, Skwarlo-Sonta K (1991) Pineal influence on the diurnal rhythm of nonspecific immunity indices in chickens. *J Pineal Res* 10(4):190-195
- Skwarlo-Sonta K, Thaela MJ, Gluchowska B, Stepień D, Jagura M (1991) Effect of dose and time of melatonin injections on the diurnal rhythm of immunity in chicken. *J Pineal Res* 10:30-35
- Skwarlo-Sonta K, Thaela MJ, Midura M, Lech B, Gluchowska B, Drela N, Kozłowska E, Kowalczyk R (1992) Exogenous melatonin modifies the circadian rhythm but does not increase the level of some immune parameters in the chickens. *J Pineal Res* 12(1):37-34
- Skwarlo-Sonta K (1996) Functional connections between the pineal gland immune system. *Acta Neurobiol Exp* 56(1):341-357
- Skwarlo-Sonta K (2002) Melatonin in immunity: comparative aspects. *Neuroendocrinol Lett* 23(1):61-66
- Tan DX, Chen LD, Poeggeler P, Manchester LC, Reiter RJ (1993) Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J* 1:57-60
- Terrón MP, Cubero J, Marchena JM, Barriga C, Rodríguez AB (2002) Melatonin and aging: in vitro effect of young and mature ring dove physiological concentrations of melatonin on the phagocytic function of heterophils from old ring dove. *Exp Gerontol* 37(2-3):421-426
- Terrón MP, Cubero J, Barriga C, Ortega E, Rodríguez A.B (2003) Phagocytosis of *Candida albicans* and superoxide anion levels in ring dove (*Streptopelia risoria*) heterophils: effect of melatonin. *J Neuroendocrinol* 15(12):1111-1115
- Turek FW, Zee P, Reeth VO (2000) *Melatonin and aging*. Melatonin after four decades. Kluwer, New York, 435

RESULTADOS IV:

“Incremento de los niveles plasmáticos de melatonina y de la actividad fagocítica de los heterófilos de tórtolas collarizas viejas (*Streptopelia risoria*) tras la administración oral de melatonina.” (En prensa)

Oral Administration of Melatonin to Old Ring Doves (*Streptopelia risoria*) Increases Plasma Levels of Melatonin and Heterophil Phagocytic Activity

M^a del Pilar Terrón, Sergio D. Paredes, Carmen Barriga, Eduardo Ortega, Russel J. Reiter, and Ana B. Rodríguez

Department of Animal Physiology, Faculty of Science, University of Extremadura, Badajoz, Spain.

We analyzed the effect of oral melatonin (23 µg/0.1 ml/animal/d; 1 h before dark on 12 consecutive days) in old birds, in natural photoperiods, on the hormone's plasma levels, and phagocytosis. Blood collections were performed daily at 2:00 AM and 4:00 PM until 5 days after the treatment. From day 1, the melatonin levels were significantly higher than basal levels at both times. Values at 2:00 AM were significantly higher than the 4:00 PM values. After treatment, the melatonin levels declined, returning from day 14 to basal values at both hours. At 2:00 AM, phagocytosis was significantly greater than that obtained at 4:00 PM and greater than basal values. The 4:00 PM values were only significantly greater than basal on days 6 and 8, parallel to a decline in superoxide anion levels, which were lowest at 2:00 AM. Melatonin administered to old ring doves increases the differences between nocturnal and diurnal plasma levels, and, in parallel, increases phagocytosis and reduces superoxide radical levels in heterophils.

DURING the last three decades, *in vivo* and *in vitro* data have confirmed the relationship between the pineal gland and the immune system in both birds and mammals (including humans) (1,2). Developmental and age-related changes in pineal function appear, at least in part, to be related to immune system efficiency (3). To close a regulatory loop between the immune system and the pineal gland function, it is necessary that the chemical message sent by the activated immune system be understood by the pineal gland, that is, it should influence pineal gland activity and hence melatonin synthesis (4).

Perhaps the condition, in which the stimulatory effects of melatonin on the immune system are best demonstrated occur in those situations in which the immune system is depressed. The many models of immunosuppression include aging, physical stress, infectious diseases, and treatment with corticoids and antitumoral or adrenergic drugs (2). There is a growing literature to indicate that there are some important links between the 24-hour rhythm of melatonin and age-related changes in physiology and behavior. Because melatonin acts by providing information to the organism about its overall temporal organization, this indolamine would seem to have the potential to be an important pharmacological agent for attenuating age-related changes in circadian organization, immune system, sleep, and other disorders that accompany aging (5). Previously, we had found a significant decline in both nocturnal and diurnal plasma melatonin levels in old ring doves (>8 years) with respect to the concentrations observed in mature (adult, aged 3–5 years) and young animals (aged 1–3 years); also, there is an absence of a circadian melatonin rhythm (the levels remaining more or less constant throughout the 24 hours) in

these birds (6). Our results thus corroborated previous reports that melatonin is synthesized and secreted during the dark period of the light/dark cycle, and that plasma concentrations decline in advanced age (7). We also reported previously an enhancing dose-dependent effect of melatonin, at both physiological and pharmacological concentrations, on phagocytic function in the dove. Likewise, melatonin limits oxidative stress, which results from the function of the immune system (6,8,9).

In the present experiments, we studied the effect in old ring doves of oral administration of melatonin at the pharmacological dose of 23 µg/animal/day on the plasma levels of melatonin during a 12-day treatment period and in the 5 subsequent days; furthermore, we examined the effect of this treatment on the phagocytic function and oxidative metabolism of blood heterophils. Plasma determinations were carried out at two specific times (2:00 AM and 4:00 PM), with the heterophil phagocytic activity being evaluated at these times on alternate days from the beginning until the end of the treatment.

METHODS

Animals

Male and female ring doves (*Streptopelia risoria*) aged 8–10 years (old for this species) were used in the study ($n=8$). The birds were housed isolated in cages measuring 40 × 40 × 45 cm, and fed *ad libitum* in a room with an outside window (natural lighting) and indirect ventilation. The study was conducted from April to June, when the natural photoperiod was approximately 14 hours light and 10 hours dark (dark period from 9:30 PM ± 30 minutes to 7:30 AM ± 30 minutes). The temperature was constant and maintained at

ORAL MELATONIN IN OLD RING DOVES

22 ± 2°C. Some birds were randomly chosen for a blood sample. The study was approved by the Ethical Committee of the University of Extremadura (Badajoz, Spain) in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Melatonin

N-acetyl-5-methoxytryptamine (melatonin; Sigma, St. Louis, MO) was prepared in phosphate-buffered saline (PBS) solution, starting from a base solution of 10 mg/ml, which was dissolved by stirring, and used at the pharmacological concentration of 230 µg/ml (a dose 10 times higher than that used in our *in vitro* experiments, considering the volume of each animal's blood to be approximately 10 ml).

Experimental Design

The birds received a single daily oral dose (23 µg/0.1 ml/animal/d) of melatonin for 12 consecutive days, 1 hour before dark (at about 8:30 PM). The administration of melatonin was carried out using a plastic Pasteur pipette. Control animals received 0.1 ml of PBS with the same schedule as the melatonin-treated animals. Basal animals are animals studied before treatment that have not been given PBS or melatonin. Blood collections were performed at 2:00 AM under dim red light and again at 4:00 PM. The extractions were continued for 5 days following the end of the treatment (until day 17). The blood collection schedule was based on the following: (i) 2:00 AM is halfway through the acrophases of both the young and mature animals; (ii) 4:00 PM is the mesor (midline estimating statistic of rhythm) of the young and mature animals; and (iii) in old animals, no significant differences had been observed in the melatonin levels at 4:00 PM and 2:00 AM (6).

Plasma Collection

Blood drawn from the brachial vein was transferred unheparinized to a preprepared tube containing EDTA, and centrifuged at room temperature for 15 minutes at 300 × g. The plasma was then divided into aliquots in Eppendorf vials, and kept frozen at -30°C until use.

Measurement of Melatonin in Plasma

Melatonin levels were determined by means of a commercial radioimmunoassay kit (IBL, Hamburg, Germany) that consisted of ¹²⁵I-melatonin (<140 kBq), assay buffer, enzyme, enzyme buffer, melatonin standards, rabbit anti-melatonin antiserum, precipitating agent, and controls (lyophilized plasma samples), according to the manufacturers instructions. Results are expressed in pg/ml.

Studies of Phagocytosis and Oxidative Metabolism

The studies of phagocytosis and oxidative metabolism (nitroblue tetrazolium test, NBT) were carried out on alternate days from the beginning until the end of the treatment (days 2, 4, 6, 8, 10, and 12).

Isolation of Heterophil Leukocytes

Heterophil leukocytes were obtained from 1 ml of blood drawn from the brachial vein to which 0.5 ml of PBS solution and 0.5 ml of lithium heparin were added; this was

followed by centrifugation at 600 × g for 15 minutes through a Histopaque gradient (1 ml of 1119, 1 ml of 1077; Sigma, St. Louis, MO). The heterophils were then washed in PBS and adjusted according to each trial (5 × 10⁵ cells/ml for phagocytosis and 1 × 10⁶ cells/ml for NBT).

Phagocytosis of Latex Beads

The phagocytosis of inert particles (latex beads) was performed according to the technique described in Rodríguez and Lea (10). Aliquots of 200 µl of the phagocyte suspension were put into the wells of plastic macrophage migration inhibition factor (MIF)-type plaques, and, after 30 minutes incubation at 37°C in an oven with a 5% CO₂ atmosphere, the adhered monolayer was washed with PBS at 37°C. Then, 20 µl of latex beads (1.09 µm, diluted to 1% in PBS) and 200 µl PBS were added, followed by another 30 minutes of incubation under the same conditions as previously. Finally, the samples were fixed and stained with Diff-Quick (Dade Behring, Liederbach, Germany) containing methanol (5 min), eosin (five passes), and hematoxylin (five passes). The plaques were rinsed with tap water and dried, followed by counting under oil-immersion phase-contrast microscopy at 100×. The number of particles ingested per 100 heterophils was expressed as the latex-bead phagocytosis index (PI). The percentage of cells that had phagocytosed at least 1 latex bead was expressed as the phagocytosis percentage (PP). The ratio PI:PP was calculated, giving the phagocytosis efficiency (PE).

Quantitative NBT Test

The method described by Terrón and colleagues (6) was used. An aliquot of 250 µl of heterophil suspension (1 × 10⁶ cells/ml) was incubated for 60 minutes with an equal volume of NBT (Sigma, St. Louis, MO, 1 mg/ml in PBS solution) in the presence of 50 µl of latex beads (S, stimulated samples) (1.09 µm, diluted to 1% in PBS). Aliquots of the heterophil suspension incubated in the absence of latex beads were used as nonstimulated samples (NS). In all cases, after shaking incubation at 37°C, the reaction was stopped with 2.5 ml of 0.5 N hydrochloric acid.

The tubes were centrifuged for 30 minutes at 600 × g and 4°C, the supernatant was discarded, and the reduced NBT (blue formazan) was extracted from the cell pellet with 1 ml of dioxan. The tubes were then centrifuged for 30 minutes at 600 × g, and the absorbance of the supernatant was determined in a spectrophotometer at 525 nm using dioxin as the blank control. The stimulation of NBT reduction was then determined as a percentage relative to the absorbance obtained in the tubes without latex beads.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean (X) ± standard error (SE) of the number of determinations carried out in duplicate. The variables were tested for normality, and the different groups were compared using the Scheffe analysis of variance (ANOVA) parametric F test, with *p* < .05 taken as the level of significance between groups.

Correlations by multiple regression of the different capacities with the melatonin values at both hours studied were taken as significant if *r*² > 0.5.

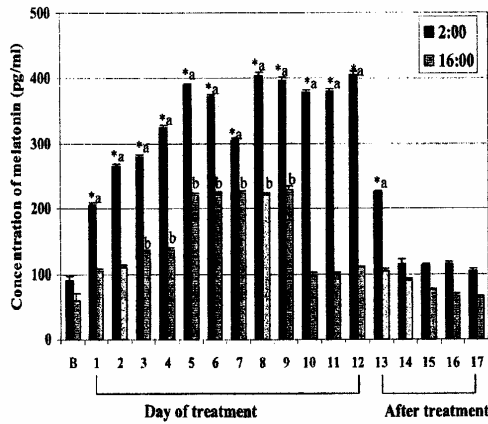


Figure 1. Changes in plasma levels of melatonin in old birds during 12 days of treatment with indolamine (23 µg/ml) and for the 5 subsequent days. Each value represents the mean ± SE (standard error) of eight determinations carried out in duplicate. a = $p < .05$ with respect to the corresponding basal value at 2:00 AM; b = $p < .05$ with respect to the corresponding basal value at 4:00 PM; * = $p < .05$ with respect to the value obtained at 4:00 PM on the same day. B = basal, animals before treatment.

RESULTS

The results shown in Figure 1 indicate that, from the first day of melatonin administration (23 µg/animal/d), plasma levels of the indolamine were generally higher than the corresponding basal levels at both 2:00 AM and 4:00 PM. Also, the values were significantly higher ($p < .05$) at 2:00 AM than at 4:00 PM. In particular, at 2:00 AM: (i) there was a significant increase ($p < .05$) over the basal values on every day studied during treatment as well as on day 13, the first day following the last treatment, and (ii) at 4:00 PM there was a significant increase ($p < .05$) over the basal values from days 3 to 9 (inclusive). At the end of treatment, the melatonin levels began to decline steadily at both times of day, reaching levels close to the basal values by day 14, 2 days following the melatonin treatment. No significant changes were observed in the control animals after the administration of PBS, the vehicle used for melatonin administration (results not shown).

Figure 2A shows the variations in the capacity of the heterophils to ingest latex beads (phagocytosis index) over the course of the experiment. During the treatment, the values at 2:00 AM were significantly higher ($p < .05$) than at 4:00 PM except on day 6, and always significantly higher ($p < .05$) than the basal values. At 4:00 PM, however, the differences with respect to the basal values were only significant ($p < .05$) on days 6 and 8 (these were the days when the highest melatonin levels were determined at that hour). Figure 2B shows the results for the phagocytosis percentage (percentage of activated heterophils). At 2:00 AM, this percentage was significantly greater than the basal values ($p < .05$) on each day. At 4:00 PM, however, there were only significant differences ($p < .05$) with respect to the basal values on days 6 and 8. Similar results to those of the phagocytosis index and phagocytosis percentage were observed in the number of latex beads ingested by each

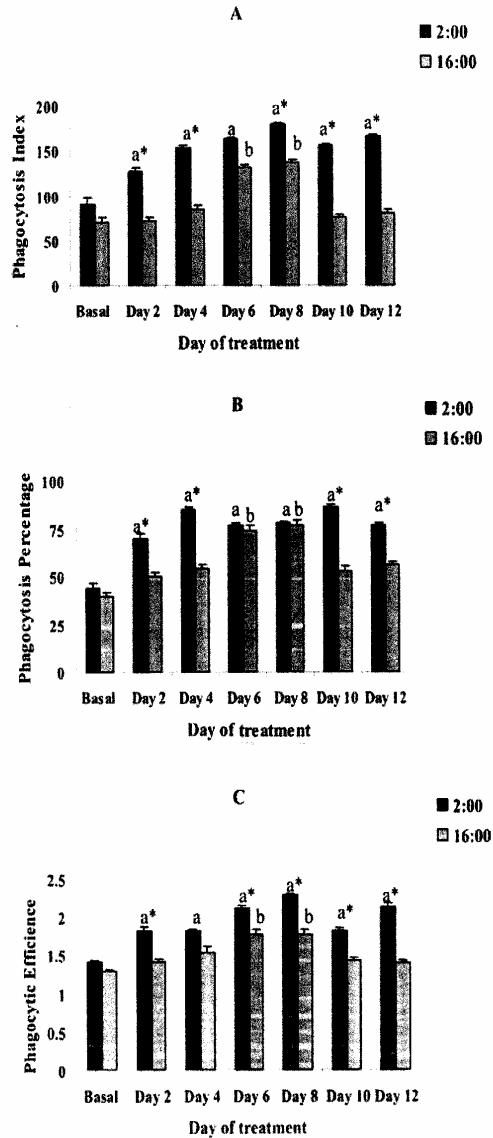


Figure 2. A: The phagocytosis index (number of latex beads phagocytosed per 100 heterophils); B: phagocytosis percentage (% of 100 cells that have phagocytosed at least 1 latex bead); and C: phagocytosis efficiency (phagocytosis index/phagocytosis percentage) in old birds given melatonin (23 µg/ml). Each value represents the mean ± SE (standard error) of eight determinations performed in duplicate. a = $p < .05$ with respect to the corresponding basal value at 2:00 AM; b = $p < .05$ with respect to the corresponding basal value at 4:00 PM; * = $p < .05$ with respect to the value obtained at 4:00 PM on the same day; Basal, animals before treatment.

activated heterophil (phagocytosis efficiency, Figure 2C). Figure 3 shows the correlation between the plasma melatonin levels (pg/ml) and the phagocytosis index at 4:00 PM (A) and 2:00 AM (B) on the different days during the treatment when this was measured (days 2, 4, 6, 8, 10, and 12). There was a clear positive correlation at both hours.

ORAL MELATONIN IN OLD RING DOVES

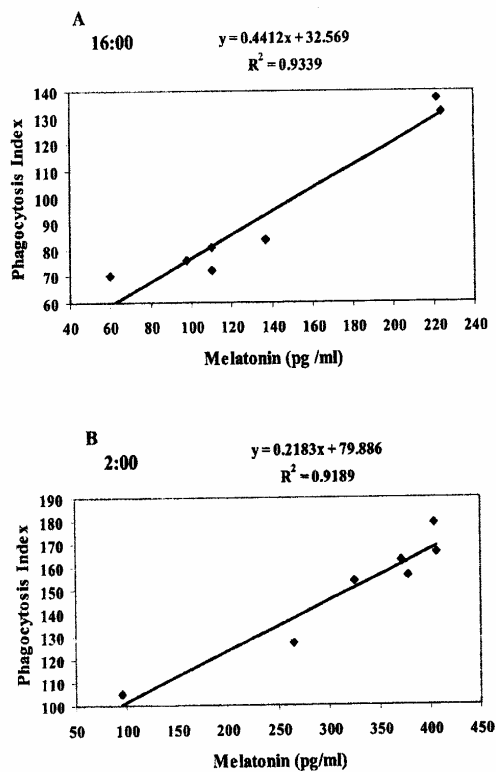


Figure 3. Results of the correlation study between the plasma levels of melatonin (pg/ml) and the values of the phagocytosis index at 4:00 PM (A) and at 2:00 AM (B) in old birds treated with melatonin (23 µg/ml).

In order to check whether the difference in the melatonin concentrations between 2:00 AM and 4:00 PM was correlated with the difference between the values of the phagocytosis indices at those hours, we calculated the relative increments (RI = value at 2:00 AM minus value at 4:00 PM, divided by the value at 4:00 PM) for the two parameters, and then tested for correlation between the RIs of the two parameters. The values are listed in Table 1 for the different days during the treatment. The plasma melatonin RIs were significantly greater ($p < .05$) than the basal value and significantly different from the remainder of the values ($p < .05$) on every day studied. The phagocytosis index RIs were significantly greater ($p < .05$) than the basal values on days 2, 4, 10, and 12, and significantly less ($p < .05$) on days 6 and 8, and also significantly different from the rest of the values ($p < .05$) on every day. There was a positive correlation between the plasma melatonin RI and the phagocytosis index RI (Figure 4). Figure 5 shows the variations in NBT reduction over the course of the treatment. All the 2:00 AM values during the treatment were significantly lower ($p < .05$) than the corresponding 4:00 PM values, and significantly lower ($p < .05$) than the 2:00 AM basal values. The only significant difference ($p < .05$) in the 4:00 AM

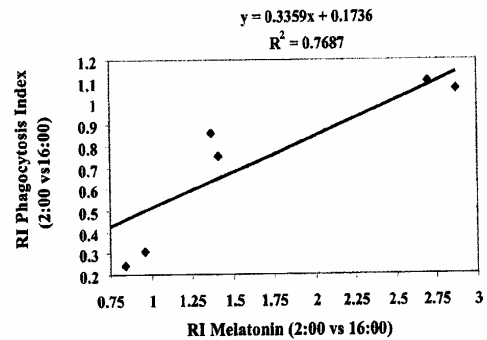


Figure 4. Results of the correlation study between the relative increment (RI) in the melatonin concentrations (2:00 AM vs 4:00 PM) and the relative increment of the phagocytosis index (2:00 AM vs 4:00 PM) in old birds treated with melatonin (23 µg/ml). (RI = value at 2:00 AM minus value at 4:00 PM, divided by the value at 4:00 PM).

value was on day 6 of treatment, when it was less than the corresponding basal value.

Figure 6 shows the results of the correlation study between the plasma melatonin levels (pg/ml) and the superoxide anion levels (percentage NBT reduction) for all of the days when these parameters were determined separately for the two times of day of the measurements. At 4:00 PM, these two parameters were not correlated (Figure 6A). At 2:00 AM (Figure 6B), however, they were clearly negatively correlated. Finally, no correlation was observed between the plasma melatonin RI and the relative decrement in NBT reduction (RD = value at 4:00 PM minus value at 2:00 AM, divided by the value at 2:00 AM) (Figure 7).

DISCUSSION

Pineal melatonin is produced and secreted into the blood in a circadian manner with maximal plasma levels occurring during the dark phase of the light/dark cycle. Whereas the 24-hour rhythm of melatonin production is clear in young animals (including humans), this cycle deteriorates with age (11). Indeed, aging is associated with a number of changes in the morphology, physiology, and biochemistry of the pineal gland, resulting in a significant reduction of the nocturnal melatonin levels (7,11,12). In previous studies on the ring dove, we have observed diurnal oscillations in the levels of this hormone in young and mature animals, and a decline in its plasma levels with advancing age accompanied by the absence of a rhythm (6). Thus, young and mature animals present an increase of melatonin levels during the dark phase, (maximum at 4:00 PM in mature and at 2:00 AM in young animals), and a decrease during the day (minimum at 10:00 AM and at 4:00 PM for young and mature animals, respectively) (6). The decreased nocturnal levels of melatonin during aging affects the integrity of circadian time structures and may contribute to a number of disease states (13). Hence, melatonin may have both direct and indirect beneficial effects in delaying aging or in retarding the development of processes (e.g., age-associated

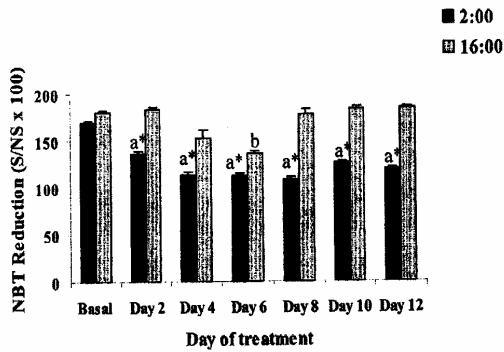


Figure 5. The percentage stimulation of the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) in heterophils incubated in the presence of latex beads in old birds treated with melatonin (23 µg/ml). S = samples stimulated with latex beads; NS = nonstimulated samples. Each value represents the mean ± SE (standard error) of eight determinations carried out in duplicate. a = $p < .05$ with respect to the corresponding basal value at 2:00 AM; b = $p < .05$ with respect to the corresponding basal value at 4:00 PM; * = $p < .05$ with respect to the value obtained at 4:00 PM on the same day. Basal, animals before treatment.

immunodeficiency or tumor growth) that contribute to reducing the life span (7).

Recently, we have confirmed that old ring doves exhibit a decline in their innate immune function, which could be due, at least in part, to the absence of the circadian rhythm of melatonin (14). Here, the focus has been on the age-related changes in melatonin levels and in the possible effect of administering the indolamine on the phagocytic activity (phagocytosis and oxidative metabolism) during aging. In general, from the first day of administration, the plasma levels were greater than the corresponding basal levels both at night and in the late afternoon, with the nocturnal values being greater than the daytime values. A progressive increase in nocturnal melatonin levels was observed until day 5 of treatment, as a consequence of exogenous melatonin administration. Similar results were obtained in diurnal plasma levels. Besides, a sharp drop in diurnal plasma melatonin levels was observed after 10 days of treatment despite the exogenous treatment of melatonin. As a whole, these results show that, in old ring doves after 10 days of treatment, the homeostasis of melatonin gives rise to similar diurnal and nocturnal values to those observed in young birds (6). After treatment, melatonin declined steadily at both time-points studied, reaching levels similar to the basal values by day 14, two days after the last administration of melatonin. It is interesting that, once melatonin administration was finished, plasma levels of the hormone decreased back to basal values, which indicates that treatment does not reduce the endogenous secretion of melatonin by negative feedback; this is greatly important in relation to the therapeutic use of melatonin. In addition, the phagocytosis indices at 2:00 AM were significantly higher than both the basal values and the 4:00 PM values throughout the treatment period. The nocturnal increased phagocytosis seemed in general to be due to both phagocytosis percentage (number of activated heterophils) and the phagocytic efficiency (amount of antigen ingested by each activated phagocyte). Phagocytosis at

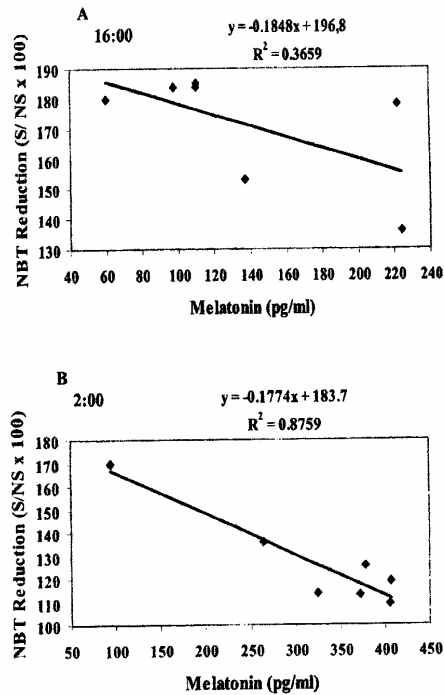


Figure 6. Results of the correlation study between the plasma levels of melatonin (pg/ml) and the values of the nitroblue tetrazolium (NBT) reduction at 4:00 PM (A) and at 2:00 AM (B) in old birds treated with melatonin (23 µg/ml).

4:00 PM was only greater than the basal level on days 6 and 8 (days with highest melatonin levels both diurnal and nocturnal, and with the same number of activated heterophils (phagocytic percentage).

Also, with the melatonin administration, there was a clear positive correlation between the levels of this agent and the phagocytosis index at both time points studied. This indicates

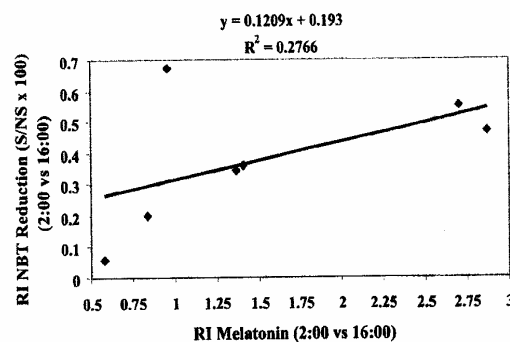


Figure 7. Results of the correlation study between the relative increment (RI) of the plasma concentration of melatonin (2:00 AM vs 4:00 PM) and the relative decrement (RD) of the nitroblue tetrazolium (NBT) reduction (2:00 AM vs 4:00 PM) in old birds treated with melatonin (23 µg/ml). RI = value at 2:00 AM minus value at 4:00 PM, divided by the value at 4:00 PM; RD = value at 4:00 PM minus value at 2:00 AM, divided by the value at 2:00 AM.

that, as the plasma melatonin levels of old birds rise, there is a concomitant increase in the capacity of their blood heterophils to phagocytose latex beads. This coincides with earlier findings of a positive melatonin–phagocytosis correlation in young ring doves (15), and with the enhancement of the phagocytic activity of heterophils from mature and old animals after *in vitro* incubation with either physiological or pharmacological concentrations of melatonin (6,9). Finally, the correlation study between the relative increments of the phagocytosis values and plasma melatonin levels (2:00 AM vs 4:00 PM) also showed that the greater the day–night difference in melatonin concentration, the greater the difference observed in phagocytosis values.

The increase in both the plasma melatonin levels and phagocytic activity of the heterophils in these old animals is of particular interest because the melatonin deficiency of old age is related to suppressed immunocompetence (16). In this sense, Cardinali and colleagues (17) found that *in vivo* treatment with melatonin not only restored circadian immune rhythms in the old animals, but also found that pharmacological levels of indolamine could hyperstimulate the immune system and exacerbate autoimmune processes. It is known that in both mammals and birds, a phase–response curve on the effect of melatonin on circadian rhythms is present (3,23). In this sense, the oral treatment with melatonin could induce a phase shift in the circadian system, which would affect the light–dark values of phagocytosis. Melatonin, in addition to its direct effect on immune cells, augments the amplitude, and perhaps delays or advances the phase, of the underlying central oscillator, thus indirectly affecting the immune response (18).

The claims for melatonin as an anti-aging agent are also based on studies indicating that it can have immunomodulatory and tumor-suppressive effects by acting as a potent free-radical scavenger. Indeed, various *in vivo* and *in vitro* studies have shown that melatonin exhibits immunoenhancing properties and might modulate certain immune functions at the same time that it attenuates oxidation reactions (3,6,8,9,19–21,23).

In contrast to phagocytosis, melatonin administration caused a decrease in superoxide anion levels at 2:00 AM, which were also lower than at 4:00 PM. Indeed, the 4:00 PM values were only lower than the basal values on day 6 (one of the days in which the melatonin levels were the highest at that hour). Also, as we observed previously in young animals that have a clear circadian rhythm of melatonin with high nocturnal levels (15), in old animals there was a clear negative correlation between the levels of superoxide anion and plasma melatonin following its administration. This indicates that increasing plasma levels of melatonin are accompanied by a clear decline in superoxide anion levels in the blood heterophils of *Streptopelia risoria*; this is consistent with a large amount of data documenting the free-radical scavenging and antioxidant activities of melatonin (24,25).

The finding that reduction in melatonin levels with age may contribute to aging and the onset of age-related diseases is supported by the recent observations that melatonin is a potent scavenger of damaging free radicals (26). Indeed, numerous *in vitro* and *in vivo* studies have documented

the capacity of both physiological and pharmacological melatonin concentrations to protect against free-radical mutilation of essential molecules (27). Melatonin also promotes the activity of antioxidative enzymes, thereby further reducing oxidative damage (25). In the ring dove, we have shown that, *in vitro*, melatonin reduces superoxide anion levels by modulating the activity of the antioxidant enzyme superoxide dismutase (23), and that it suppresses both basal and antigen-induced lipid peroxidation in heterophils at both pharmacological (28) and physiological (29) concentrations. Furthermore, clinical tests with melatonin have proven highly successful; as a result, an increase in the use of melatonin in disease states and processes where free-radical damage is involved seems reasonable (27,30).

Considering all results obtained to date, our research has confirmed in this bird species a dose-dependent enhancing effect of melatonin on the phagocytic function, while at the same time neutralizing the superoxide anion radical derived from immune function. Recently, Terron and colleagues (14), in a comparative study of heterophil phagocytic function in young and old ring doves and of its relationship with melatonin levels at different times of day, found in the young animals an enhancing effect of melatonin on the heterophils in combination with its free-radical scavenging action, but they did not find this to be the case in the old animals. As a result, it was concluded that the difference could be due, at least in part, to the fact that old birds probably lacked a circadian rhythm of melatonin.

Summary

While aging is a multifactorial process, the age-related decline in melatonin secretion seems to be a contributing factor to the functional decline. Indeed, sleep inefficiency, circadian rhythm dysregulation, reduced antioxidant protection, depressed immune function, and so forth, may be direct consequences of the loss of melatonin with age (16). The possible therapeutic and physiopathological implications of the immunoenhancing properties of melatonin have only been sparingly investigated. In general, further work is required for there to be a consensus on the “replacement therapy” use of melatonin to limit or ameliorate some of the effects of age-associated changes.

ACKNOWLEDGMENTS

This investigation was supported by a research grant from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (BFI2002-04583-C02-01). During the performance of this work, M.P.T. and S.D.P. were supported by a personal researcher training grant from the Consejería de Educación, Ciencia y Tecnología / Fondo Social Europeo (Junta de Extremadura, FIC00B013 and FIC02A049, respectively). The authors would like to express their thanks to Ms Elena Circujano Vadillo for her technical assistance.

Address reprint requests to: M^a del Pilar Terrón Sánchez, Department of Physiology, Faculty of Science, University of Extremadura, Avda Elvas s/n. 06071 - Badajoz, Spain. E-mail: pilarts@unex.es

REFERENCES

1. Maestroni GJM. The immunoenocrine role of melatonin. *J Pineal Res.* 1993;14:121–126.
2. Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin-immune system relationships. *Curr Topics Med Chem.* 2002;2:167–179.

3. Skwarlo-Sonta K. Functional connections between the pineal immune system. *Acta Neurobiol Exp.* 1996;56:341–357.
4. Skwarlo-Sonta K. Melatonin in immunity: comparative aspects. *Neuroendocrinol Lett.* 2002;23:61–66.
5. Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Lopez-Burillo S. Melatonin, longevity and health in the aged: an assessment. *Free Radic Res.* 2002;36:1323–1329.
6. Terrón MP, Cubero J, Marchena JM, Barriga C, Rodríguez AB. Melatonin and aging: in vitro effect of young and mature ring dove physiological concentrations of melatonin on the phagocytic function of heterophils from old ring dove. *Exp Gerontol.* 2002;37:421–426.
7. Turek FW, Zee P, Reeth VO. Melatonin and aging. In: *Melatonin After Four Decades*. New York: Kluwer Academic Publishers; 2000:435pp.
8. Rodríguez AB, Terron MP, Duran J, Ortega E, Barriga C. Physiological concentrations of melatonin and corticosterone affect phagocytosis and oxidative metabolism of ring dove heterophils. *J Pineal Res.* 2001;31:31–38.
9. Terrón MP, Cubero J, Barriga C, Ortega E, Rodríguez AB. Phagocytosis of candida albicans and superoxide anions levels in ring dove (*Streptopelia risoria*) heterophils: effect of melatonin. *J Neuroendocrinol.* 2003;15:1–5.
10. Rodríguez AB, Lea RW. Effect of pinealectomy upon the nonspecific immune response if ring dove (*Streptopelia risoria*). *J Pineal Res.* 1994;16:159–166.
11. Reiter RJ. The pineal gland and its physiological consequences. *Bioessays.* 1992;14:169–175.
12. Humbert W, Pevet P. The decrease of pineal melatonin production with age. *Ann NY Acad Sci.* 1994;719:43–63.
13. Reiter RJ. The pineal gland and melatonin in relation to aging: a summary of the theories and the data. *Exp Gerontol.* 1995;30:199–212.
14. Terrón MP, Paredes SD, Barriga C, Ortega E, Rodríguez AB. Comparative study of the heterophil phagocytic function in young and old ring doves (*Streptopelia risoria*) and its relationship with melatonin levels. *J Comp Physiol B.* In Press.
15. Rodríguez AB, Marchena JM, Nogales G, Durán J, Barriga C. Correlation between circadian rhythm of melatonin and the phagocytosis and superoxide anion levels in ring dove heterophils. *J Pineal Res.* 1999a;26:35–42.
16. Karasek M, Reiter RJ. Melatonin and aging. *Neuroendocrinol Lett.* 2002;23:14–16.
17. Cardinali DP, Brusco LI, García Bonacho M, Esquifino AI. Effect of melatonin on 24 h rhythms of ornithine decarboxylase activity and norepinephrine and acetylcholine synthesis in submaxillary lymph nodes and spleen of young and aged rats. *Neuroendocrinology.* 1998;67:349–362.
18. Cardinali DP, Brusco LI, Cutrera A, Castrillon P, Esquifino AI. Melatonin as time-meaningful signal in circadian organization of immune response. *Biol Signals Recept.* 1999;8:41–48.
19. Maestroni GJ, 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.* 1986;13:19–30.
20. Maestroni GJ., Conti A., Pierpaoli W. Role of the pineal gland in immunity:II. Melatonin enhances the antibody response via an opiate-ergic mechanism. *Clin Exp Immunol.* 1987;68:384–391.
21. Maestroni GJ, Conti A, Pierpaoli W. Role of the pineal gland in immunity. III. Melatonin antagonizes the immunosuppressive effect of acute stress via an opiate-ergic mechanism. *Immunology.* 1988;63:465–469.
22. Skwarlo-Sonta K. Reciprocal interdependence between pineal gland and avian immune system. *Neuroendocrinol Lett.* 1999;20:151156.
23. Rodríguez AB, Nogales G, Ortega E, Barriga C. Melatonin controls of superoxide anion level: modulation of superoxide dismutase activity in ring dove heterophils. *J Pineal Res.* 1998;24:9–14.
24. Allegra M, Reiter RJ, Tan DX, Gentile C, Tesoriere L, Livrea MA. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res.* 2003;34:1–10.
25. Rodríguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res.* 2004;36:1–9.
26. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, El-Sawi MR. Melatonin reduces oxidant damage and promotes mitochondrial respiration. Implications for aging. *Ann NY Acad Sci.* 2002;959:251–262.
27. Reiter RJ, Tan DX, Qi W, Manchester LC, Karbownic M, Calvo JR. Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vitro. *Biol Signals Recept.* 2000;9:160–171.
28. Rodríguez AB, Nogales G, Marchena JM, Barriga C. Suppression of both basal and antigen-induced lipid peroxidation in ring dove heterophils by melatonin. *Biochem Pharmacol.* 1999b;58:1301–1306.
29. Terrón MP, Marchena JM, Shadi F, Harvey S, Lea RW, Rodríguez AB. Melatonin: an antioxidant at physiological concentrations. *J Pineal Res.* 2001;31:95–96.
30. Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czamocki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochimica Polonica.* 2003;50:1129–1146.

Received May 5, 2004

Accepted August 1, 2004

Decision Editor: James R. Smith, PhD

RESULTADOS V:

**Melatonina: un antioxidante a concentraciones fisiológicas.
“Evaluación de la peroxidación lipídica en heterófilos de animales jóvenes-maduros incubados con las concentraciones plasmáticas fisiológicas de melatonina encontradas en esos animales.”**

Letter to the Editor

Melatonin: an antioxidant at physiological concentrations

To the Editor:

In recent years, numerous reports have shown that melatonin is a broad-spectrum antioxidant due to its ability to scavenge free radicals and to stimulate antioxidative enzymes [Tan et al., 2000]. In heterophils of *Streptopelia risoria* we observed that pharmacological concentrations of melatonin (100 μ M) reduce superoxide anion levels by modulating the activity of the enzyme superoxide dismutase, at the same time inducing a marked decline in lipid peroxidation. These results showed that pharmacological concentrations of melatonin influenced oxidative metabolism of phagocytes, protecting them from oxidative damage derived from the respiratory burst during phagocytosis [Rodriguez et al., 1999a,b]. On the basis of these findings, we asked the following questions: What is the physiological relevance of these observations? Would melatonin have the same properties at physiological concentrations? Recently, Reiter et al. [2000] have shown that melatonin is a significant free radical scavenger and antioxidant at both physiological and pharmacological concentrations in the reduction of oxidative stress in vivo.

The process of phagocytosis is accompanied by a series of oxygen-dependent biochemical events, leading ultimately to the production of highly reactive oxidants which play a key role in the microbicidal activity of phagocytes. Oxidative stress generated during phagocytosis provides protection against micro-organisms, but may cause tissue damage if it occurs to an excessive degree and/or the antioxidant mechanisms do not function properly. The major end-point of oxidative damage measured in this in vitro study was lipid peroxidation. Lipid peroxidation is a process that leads to the destruction of membrane lipids and production of lipid peroxides and their by-products. Herein we tested the ability of melatonin to protect against latex-bead-induced toxicity in ring dove heterophils. The concentration of malonaldehyde (MDA) as an index of induced oxidative damage to lipid membranes was determined using a colorimetric assay (LPO-586, Bioxytech). A heterophil

suspension (5×10^6 cells/ml) was co-incubated with and without inert particles (latex beads) as material to be phagocytosed, both alone and in combination with melatonin at physiological concentrations found in the serum of the ring dove (50 and 300 pg/ml, which correspond to the diurnal minimal value and the maximal nocturnal peak, respectively) [Rodriguez et al., 1999b]. Measurements were made before (0 min) and at 15 and 60 min after treatment. Protein concentrations were determined by a standardized method using bovine serum albumin as standard.

The results (Table 1) show that, in ring dove heterophils, lipid peroxidation (production of MDA) is significantly reduced by melatonin at physiological concentrations. In addition, melatonin depressed the increased levels of MDA after latex bead treatment. Thus, preventing the latex-induced enhancement of MDA production in a dose-dependent manner. In all experimental groups, there were significant changes in the lipid peroxidation with time. Maximal levels of peroxidation were observed after 15 min of incubation and the minima at 60 min in the control, latex and melatonin + latex groups. However, in the samples with melatonin alone the lowest levels of peroxidation were observed at 15 min.

These results are in agreement with those previously observed by us using pharmacological concentrations of the indole [Rodriguez et al., 1999a] and demonstrate that melatonin effectively protects against both basal and latex-bead-induced toxicity even at physiological concentrations. They are also consistent with the data previously reported on the protective effect of melatonin against both basal and stress-related lipid peroxidation in other in vitro models using bacterial lipopolysaccharide to induce toxicity [Sewerynek et al., 1995]. These findings probably relate to the ability of melatonin to scavenge free radicals and function as an antioxidant, and/or the ability of the indole to stabilize cellular membranes which could make their intrinsic lipids more resistant to the peroxidative processes [Reiter et al., 2000].

Table 1. In vitro effect of diurnal (50 pg/ml) and nocturnal (300 pg/ml) melatonin levels upon lipid peroxidation in ring dove heterochits. Concentration of MDA (nmol/mg protein)

Before treatment (0 time)	Time of incubation			
	15 min	%	60 min	%
6.22 ± 0.01 100%				
Control	8.94 ± 0.01 ^a	144*	7.16 ± 0.05 ^a	115
Latex	11.02 ± 0.03 ^b	177*	9.11 ± 0.03 ^b	147
Melatonin (50 pg/ml)	6.00 ± 0.01 ^c	96*	6.45 ± 0.05 ^c	104
Melatonin (300 pg/ml)	5.36 ± 0.01 ^{c,d}	86*	6.42 ± 0.02 ^c	103
Melatonin+latex (50 pg/ml)	10.02 ± 0.02 ^{c,d,e}	161*	8.40 ± 0.04 ^{c,d,e}	135
Melatonin+latex (300 pg/ml)	9.84 ± 0.04 ^{c,d,e}	158*	9.27 ± 0.02 ^{c,d,e,f}	149

Values represent mean ± S.D. of six determinations performed in duplicate. $P < 0.05$ with respect to: ^a0 time; ^b0 time and control groups; ^c0 time, control and latex groups; ^dmelatonin diurnal value; ^emelatonin nocturnal value; ^fmelatonin diurnal+latex groups.

* $P < 0.05$ with respect to the value at 60 min (the results are expressed as a % of the basal value at 0 time).

In summary, melatonin is a significant endogenous antioxidant for heterophils as, at physiological concentrations, it is an effective scavenger of free radicals in these cells, yielding protection from the oxidative stress of the respiratory burst that accompanies phagocytosis.

M.P. Terrón
J. Ma Marchena
F. Shadi
S. Harvey
R.W. Lea
A.B. Rodríguez

Literature cited

- REITER, R.J., D.X. TAN, W. QI, L.C. MANCHESTER, M. KARBOWNIK, J.R. CALVO (2000) Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. *Biol. Signals Recept.* 9:160–171.
- RODRÍGUEZ, A.B., G. NOGALES, J.M. MARCHENA, E. ORTEGA, C. BARRIGA (1999a) Suppression of both basal and antigen-induced lipid peroxidation in ring dove heterophils by melatonin. *Biochem. Pharmacol.* 58:1301–1306.
- RODRÍGUEZ, A.B., J.M. MARCHENA, G. NOGALES, K. DURAN, C. BARRIGA (1999b) Correlation between the circadian rhythm of melatonin, phagocytosis, and superoxide anion levels in ring dove heterophils. *J. Pineal Res.* 26:35–42.
- SEWERYNEK, E., D. MELCHIORRI, L. CHEN, R.J. REITER (1995) Melatonin reduces both basal and bacterial lipopolysaccharide-induced lipid peroxidation in vitro. *Free Radic. Biol. Med.* 19:903–909.
- TAN, D.X., L.C. MANCHESTER, R.J. REITER, W.B. QI, M. KARBOWNIK, J.R. CALVO (2000) Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Biol. Signals Recept.* 9:137–159.

RESULTADOS VI:

Melatonina, peroxidación lipídica y edad en heterófilos de la tórtola collariza (*Streptopelia risoria*).

“Valoración de los niveles de peroxidación lipídica en animales jóvenes y viejos.”

“Valoración de los niveles de peroxidación lipídica en heterófilos de animales viejos incubados con las concentraciones fisiológicas de melatonina observadas en animales jóvenes.”

Free Radical Research (Sent for publication)

MELATONIN, LIPID PEROXIDATION AND AGE IN HETEROPHILS FROM THE RING DOVE (*STREPTOPELIA RISORIA*).

M.P. Terrón, S.D. Paredes, C. Barriga, E. Ortega, R.J. Reiter and A. B. Rodríguez.

Department of Animal Physiology, Faculty of Science, University of Extremadura, Avda de Elvas s/n, 06071 Badajoz, Spain.

Running title: Age, melatonin and lipid peroxidation.

Address reprint requests to: M^a del Pilar Terrón Sánchez, Department of Physiology, Faculty of Science, University of Extremadura, Avda de Elvas s/n. 06071 Badajoz, Spain. Phone (Fax): +34 924 289388
E-mail: pilarts@unex.es

ABSTRACT

Numerous recent studies have shown the ability of physiological as well as all pharmacological concentrations of melatonin to prevent oxidative stress. We have found that incubating avian heterophils from young birds with a pharmacological concentration of 100 μM (23×10^6 pg/ml) melatonin reduced superoxide anion levels by modulating the activity of superoxide dismutase while also enhancing phagocytosis. There was also a decline in lipid peroxidation levels with both physiological and pharmacological concentrations of this indolamine.

In the present work, we evaluated malonaldehyde (MDA) levels as an indicator of lipid peroxidation (both basal and antigen-induced) in young and old animals (ring doves) at different times of day (16:00h and 00:00h) and with two incubation times (15 and 60 minutes). The lipid peroxidation was also measured in heterophils from old animals, incubated with the physiological concentrations of melatonin measured in young animals (50 and 300 pg/ml, diurnal and nocturnal, respectively). The results, expressed as nmol MDA/mg protein, show that MDA levels were higher in heterophils of old animals than in the young birds in all the experimental groups studied at both 16:00h and 00:00h (00:00h is the time at which the lowest peroxidation levels were obtained). Incubation with melatonin was found to reduce MDA levels, with the maximum reduction being after the 60 minute incubation time and the nocturnal melatonin concentration. At both concentrations (diurnal and nocturnal), melatonin also counteracted the enhancement of MDA levels caused by latex beads, with the effect being greater at the longer incubation time. In conclusion, the results are further evidence of the antioxidant effect of melatonin even at physiological concentrations, and suggest its utility as a therapeutic agent in aging.

Keywords: Melatonin, lipid peroxidation, heterophils, doves and age.

INTRODUCTION

Melatonin has been identified as a powerful direct free radical scavenger [1] and general antioxidant [2,3], reducing oxidative damage at both physiological and pharmacological concentrations [4]. What seems particularly unusual is the high efficacy of melatonin as a protector against reactive oxygen and reactive nitrogen species [4].

Surgical removal of the pineal gland, a procedure which lowers endogenous melatonin levels in the blood, exaggerates molecular damage due to free radicals during an oxidative challenge. Likewise, providing supplemental melatonin during periods of massive free radical production greatly lowers the resulting tissue damage and dysfunction. These findings are relevant to neurodegenerative diseases, cancer, ischaemia/reperfusion injury, and aging. Besides being a highly effective direct free radical scavenger and indirect antioxidant, melatonin has several features that make it of clinical interest [5]. Thus, melatonin's efficacy has been confirmed in reducing biomolecular damage under many experimental conditions where free radicals are believed to be involved. Melatonin's beneficial effects are likely related to its direct detoxification of free radicals, its indirect antioxidant actions, its ability to preserve efficient oxygen metabolism in mitochondria, and possibly other actions. These processes are assisted by the ready absorbability of the indolamine, allowing it to cross all morpho-physiological borders and to enter all compartments of all cells. What is lacking are extensive clinical trials of its potential beneficial effects, studies that are entirely feasible considering the low toxicity of this substance [5].

In 1991 Harman [6] summarized the evidence, and has since been a firm advocate of what is referred to as the free radical theory of aging. This theory suggests that longevity is determined by the amount of accumulated free radical damage that animals sustain throughout their lifetime, i.e., the more oxidative damage the higher the incidence of age-associated free radical-based diseases, and the shorter the lifespan. In addition, a number of theories have proposed that melatonin modifies some processes of

aging [7]. Some of these ideas arose because endogenous melatonin production diminishes in advanced age in all species in which it has been investigated, including humans [8].

Since melatonin production in mammals diminishes with age, interest has been generated in the possibility that the functional and morphological deterioration that accompanies aging is in part related to the loss of this antioxidant and free radical scavenger [8]. This idea is supported by several observations that the degree of oxidative damage which rats accumulate is greater in advanced age when they had to live their life in a relatively melatonin-deficient state because they had been pinealectomized [9], although some other changes induced by pinealectomy (e.g. circadian rhythm disruption) may have accounted for the reduction in survival and the augmented oxidative damage [10].

The process of phagocytosis is accompanied by a series of oxygen-dependent biochemical events, leading ultimately to the production of highly reactive oxidants which play a key role in the microbicidal activity of phagocytes. Oxidative stress generated during phagocytosis provides protection against micro-organisms, but may cause tissue damage if it occurs to an excessive degree and/or the antioxidant mechanisms do not function properly [11]. The exposure of biological membranes to oxidative stress results in a progressive degeneration of membrane structure and loss of integrity. Lipid peroxidation is a process that leads to the destruction of membrane lipids and production of lipid peroxides and their by-products, such as aldehydes [12, 13]. In the present work, we evaluated malonaldehyde (MDA) levels as an indicator of lipid peroxidation (both basal and antigen-induced) in young and old animals (ring doves), as well as in heterophils of old animals, incubated with physiological concentrations of melatonin that had been observed in the blood of young animals.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male and female ring dove at 2-3 years (young) or 8-10 years (old) of age were used in the study. The birds were housed isolated in cages measuring 40x40x45 cm, with an outside window, natural lighting and direct ventilation and fed *ad libitum* (food and water). The study was conducted during April/June when the nocturnal photoperiod was approximately 14h light and 10h dark (dark period from 21:30h \pm 30 min to 07:30 \pm 30 min). The temperature was maintained at 22 \pm 2°C. The trials were conducted under dim red light which is perceived as darkness.

The study was approved by the Ethical Committee of the University of Extremadura (Badajoz, Spain) in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Isolation of Heterophil Leukocytes

Heterophil leukocytes were obtained immediately after the extraction of 1 ml of blood (at 00:00 and 16:00) from the brachial vein, to which 0.5 ml phosphate buffered saline solution (PBS) and 0.5 ml of lithium heparin were added, followed by centrifugation at 600xg for 15 min in a gradient using Histopaque (1ml of 1119, 1 ml of 1077; Sigma, St. Louis, MO). The heterophils were then washed in PBS and adjusted to 5×10^6 cells/ml of medium.

Melatonin

N-acetyl-5-methoxytryptamine (Sigma) was prepared in PBS solution, starting from a base solution of 10 mg/ml which was dissolved by heating and stirring, followed by dilution to the working solutions (50 and 300 pg/ml). The choice of these concentrations was based on our previous studies [14], where we had found that these

doses observed in young and mature ring doves affect some phagocytic biochemical processes. All determinations were accompanied by a control sample free of melatonin.

Experimental Design

Experiment 1: Evaluation of lipid peroxidation, both basal and that induced by an inert antigen (latex beads), in heterophils from young and old animals after different incubation times (15 and 60 minutes) and at different times of day (16:00h and 00:00h). 16:00 was during the light period and 00:00h was hours after darkness meet.

Experiment 2: Evaluation of lipid peroxidation levels (basal at 0 minutes and induced by incubation with latex for 15 or 60 minutes) in heterophils from old ring doves, incubated with the physiological doses of melatonin that had been measured in young and mature animals (50 and 300 pg/ml, diurnal and nocturnal levels, respectively) [14].

Measurement of Lipid Peroxidation

Lipid peroxidation (LPO) is a well-established mechanism of cell injury in both plants and animals. The process leads to the destruction of membrane lipids and production of lipid peroxides and their by-products, such as aldehydes. MDA and 4-hydroxyalkenals, such as 4-hydroxy-2(e)-nonenal (4-HNE), are end products derived from the breakdown of polyunsaturated fatty acids and related esters. Measurements of such aldehydes provides a convenient indicator of lipid peroxidation (Esterbauer and Cheeseman, 1990). In spite of the utility of MDA and 4-HNE as markers of lipid peroxidation, no simple and reliable assay existed until a few years ago. The LPO-586 assay is based on the reaction of a chromogenic reagent, R1 (Bioxytech), with MDA and 4-hydroxyalkenals at 45°C. Both MDA and the 4-hydroxyalkenals react with 2 molecules of the R1 reagent to yield a stable chromophore with maximal absorbance at 586 nm. The wavelength and low temperature of incubation (45°C) used in the procedure avoid interference and undesirable artifacts.

The cell precipitate (5×10^6 cells/ml) was separated into aliquots of 300 μ l per tube. In experiment n° 1, one tube contained only cells (negative control) and a second tube contained cells with latex beads (1.091 μ m diameter, at 1% in PBS, Sigma), constituting the positive control. In experiment n° 2, one tube contained only cells (negative control); a second contained cells with latex beads (1.091 μ m diameter, at 1% in PBS, Sigma), constituting the positive control; a third and fourth contained cells with melatonin at diurnal and nocturnal concentrations (50 and 300 pg/ml, respectively); and the fifth and sixth contained cells with a combination of melatonin (50 or 300 pg/ml) and latex beads. All the tubes (samples from young or old animals and at 16:00 or 00:00) were incubated in a thermal bath at 37°C for different durations of time (15 or 60 minutes). The samples were subjected to ultrasound (70W, three cycles of 30 sec) and centrifuged at 15,000 x g (10 minutes, 0°C). All trials were accompanied by a basal sample (t = 0 min) which contained 300 μ l cell suspension plus PBS. Subsequently, 200 μ l sample were taken from each supernatant (200 μ l buffer for the negative control), and 650 μ l of diluted R1 (18 ml of R1 + 6 ml of Diluent, Bioxytech) was added. Then 150 μ l of HCl (37% by weight) was added to stop the reaction, followed by stirring to a vortex for 3-4 sec and incubation in a thermal bath at 45°C (60 minutes). Each sample was then transferred to a quartz cuvette, and the absorbance of the stable chromophore produced as a function of the lipid peroxidation was measured at 586 nm. All trials were carried out in triplicate for each sample and included a blank for each series of assays ([aldehyde]= 0) by replacing the sample with buffer. Blank absorbance was subtracted from sample absorbance for the calculations. The LPO-derived aldehydes are covalently trapped in the form of Schiff bases by the amino groups of proteins. Consequently, the method principally measures the free MDA in biological samples. In addition, melatonin, latex, and a combination of these substances were tested with the standard of the Bioxytech kit to evaluate any potential interference between these chemicals and the kit reagents.

Total Protein Levels

The levels of cell lysate total protein were measured using the Bradford protein assay (Bradford, 1976) (Sigma). To 100 μ l of cellular lysate in PBS was added 5 ml of Bradford reagent (Coomassie brilliant blue G-250 0.01%, ethanol 4.7%, orthophosphoric acid 8.5%, diluted in distilled water). The contents of the tubes were mixed on a rotary mixer. After 15 minutes, absorbances were read at 595 nm using a tube containing PBS plus Bradford reagent as the blank (unknown samples were assayed in duplicate). The concentration of total protein was calculated by means of a standard curve with bovine albumin (0.05-0.8 mg/ml, 2 mg/ml; Sigma) and the results expressed as mg of protein/ml.

Calculation of Concentrations

The following equation gives the concentration (M) of MDA in a sample:

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

Where a is the absorbance in the presence of sample, A_0 is the absorbance in the absence of the sample, 5 is the sample dilution factor in the cuvette (200 μ l of sample in a total volume of 1 ml), and ϵ is the apparent molar extinction coefficient obtained from the standard curve using S2 (solution of 10 mM 1,1,3,3-tetramethoxypropane in 20 mM tris-HCl buffer, pH 7.4, 0-20 μ M; Bioxytech) diluted 100 times with PBS. Results are expressed as nmol MDA/ mg prot.

Statistical Analysis

All data are expressed as means \pm standard error of the mean for the number of samples assayed. This number (N) is indicated for each case. Results were analyzed by using the non-parametric ANOVA-Scheffe F-test to compare differences between

groups, followed by a Student's t-test. Only values with $p < 0.05$ were accepted as significant.

RESULTS

Figure 1 shows the results of the comparative study of lipid peroxidation (nmol MDA/mg prot.) in ring dove heterophils in different situations (with and without latex beads), after different incubation times (15 or 60 minutes), at different times of the day (16:00 and 00:00), and in different age groups (young and old). Only in the old animals was there a significant increase ($p < 0.05$) in the MDA concentration of the control group with respect to the basal value after both incubation times and at both hours of the day. When the heterophils were incubated with latex beads, there were significant increases ($p < 0.05$) in MDA concentrations in both young and old animals with respect to the basal and the control values for both incubation times, and at both times of day (16:00 and 00:00). Also, the MDA levels in heterophils were significantly higher ($p < 0.05$) in the old animals than in the young, again for both incubation times and at both times of day, in all the experimental groups. Lipid peroxidation was greater ($p < 0.05$) following 60 minutes incubation with latex beads than the corresponding value for 15 minutes incubation at both times of day and in both old and young animals. Finally, for both the incubation times studied, the values obtained at 00:00 were less ($p < 0.05$) than at 16:00 in the latex bead group (in young and old animals) and in the control group (in young animals only). In the basal group, the values obtained at 00:00 were less ($p < 0.05$) than at 16:00 in young animals only.

Table 1 is a summary of the MDA levels found in the heterophils of old animals, for different times of incubation (15 and 60 minutes) in the presence or the absence of latex beads and of melatonin. There was an increase ($p < 0.05$) in MDA concentrations with respect to the basal and control values at both incubation times and in the presence of latex beads, and after 60 minutes incubation time in the presence of latex beads plus melatonin (both the diurnal and the nocturnal concentrations). Incubation with melatonin alone (both the diurnal and the nocturnal concentrations) reduced ($p < 0.05$)

MDA levels, reaching the basal value after 15 minutes of incubation, and declining markedly after 60 minutes of incubation. Also, incubation with melatonin (both the diurnal and the nocturnal concentrations) alone or in combination with latex led to a reduction ($p < 0.05$) with respect to the values obtained in the presence of latex beads alone for both incubation times. After 60 minutes of incubation, the values obtained with melatonin plus latex beads were greater ($p < 0.05$) than those with melatonin alone (both the diurnal and the nocturnal concentrations). The lowest values of lipid peroxidation were observed in the presence of the nocturnal concentration of melatonin after the longer of the two incubation times.

Finally, Figure 2 shows the changes with incubation time (15 and 60 minutes) in the lipid peroxidation of heterophils from old ring dove, incubated with the physiological concentrations observed in young animals (50 and 300 pg/ml, diurnal and nocturnal concentrations, respectively). In all groups except the controls, there were significant ($p < 0.05$) changes in lipid peroxidation with incubation time. Thus, in the presence of latex (either alone or in combination with diurnal or nocturnal concentrations of melatonin), the highest levels of peroxidation were observed after 60 minutes of incubation, and the values were significantly ($p < 0.05$) less after 60 minutes of incubation in the presence of melatonin alone (both the diurnal and the nocturnal concentrations).

In summary: (i) the highest values of lipid peroxidation were obtained when the heterophils were incubated in the presence of latex beads, and the lowest values after incubation with the antioxidant melatonin; (ii) heterophils from old ring doves presented higher concentrations of MDA (both basal and antigen-induced) than did those from young animals; and (iii) in heterophils from old ring doves, incubation with the physiological concentrations of melatonin found in young animals diminished the latex-induced enhancement of MDA production, an effect being dependent on the dose and on the time of incubation with melatonin.

Discussion

In the roughly last five years, numerous *in vitro* and *in vivo* studies have documented the ability of both physiological and pharmacological concentrations of melatonin to protect against free radical damage [5]. Melatonin seems to function via a number of means to reduce oxidative stress. Thus, as an antioxidant its functions include: (a) direct free radical scavenging [15], (b) stimulation of antioxidative enzymes [3], (c) protecting antioxidative enzymes from oxidative damage [16, 17], (d) increasing the efficiency of mitochondrial oxidative phosphorylation and reducing electron leakage (thereby lowering free radical generation) [18,19], and (e) augmenting the efficiency of other antioxidants [4, 20, 21]. Melatonin's protective action against a wide variety of processes and toxins that generate oxidizing agents have been extensively documented. A major unanswered question, however, relates to the precise relationship of melatonin to senescent decline, a process widely believed to be, in part, a result of the persistent bludgeoning of macromolecules by free radicals [8]. Indeed, the impetus for the proposed relationship between melatonin and senescence derives, in part, from melatonin's ability to function as an antioxidant and free radical scavenger [8]. It is known that melatonin provides benefits for increasing survival and/or reducing the severity of debilitating diseases, and that the effect seems to be related to its ability to reduce oxidative stress, to strengthen the immune system, to improve mitochondrial function, and to synchronize circadian rhythms [22].

In previous studies on ring dove heterophils, we found that 100 μ M melatonin controls superoxide anion levels and modulates superoxide dismutase activity, in both the presence and the absence of a particulate antigen, and that the effect is probably due to the action of this molecule as a scavenger of superoxide anion [23]. Later, with the same pharmacological concentration of the indolamine and in the same experimental model, we observed a suppression of both basal and antigen-induced lipid peroxidation [24], and an enhancement of the phagocytic function at the same time it neutralized oxidative stress derived from this immune function [25]. Other workers have reported similar findings concerning the protective effect of the antioxidant against both basal

and stress-related lipid peroxidation in other in vitro models using bacterial lipopolysaccharide or H₂O₂ to induce toxicity [26, 27]. Also, we have found in heterophils from young doves that physiological concentrations of melatonin also reduce lipid peroxidation [11].

Our recent observations too [28, 29] also have shown that there is higher superoxide anion levels in heterophils from old animals relative to young animals. Also, the oral administration of melatonin to old ring dove increases plasma melatonin levels, and in parallel enhances the phagocytosis of heterophils and reduces their superoxide anion levels. In view of these results, we here approached the study of the levels of MDA as an indicator of lipid peroxidation in heterophils from young and old ring doves, and in heterophils from old ring dove following incubation with the physiological concentrations of melatonin found in young animals.

The present results demonstrate that, in general, and independent of the age of the animal, the values of lipid peroxidation are highest when the heterophils are incubated in the presence of latex beads, and the lowest after incubation with melatonin. Melatonin thus effectively protects against both basal and latex-bead-induced toxicity. The heterophils from old ring dove presented higher MDA concentrations (both basal and antigen-induced) than did those from young animals, and the incubation of heterophils from old animals with the physiological concentrations of melatonin found in young animals (50 and 300 pg/ml, diurnal and nocturnal, respectively) reduced MDA levels after the longer of the two incubation times tested, with the greatest reduction being in the presence of the nocturnal concentration of melatonin. In addition, melatonin at both the diurnal and the nocturnal concentrations depressed the enhanced MDA levels caused by latex beads. This effect was time and dose dependent. The protection provided by melatonin against lipid peroxidation may be related to its capacity to act as an antioxidant, and to stabilize cell membranes thereby making their intrinsic lipids more resistant to peroxidation [24, 30, 31].

Particularly worthy of note were the results of incubating heterophils from old animals in the presence of melatonin. After the shorter of the two incubation times, the MDA levels which had been raised by latex beads returned to the control values even in the presence of the beads. After the longer of the incubation times, MDA levels in the melatonin alone groups were lower than in the controls, and in the melatonin + latex group were significantly lower than in the presence of latex alone. As we have indicated in previous work [24], this could be because with prolonged incubation times there is an additive effect of melatonin together with several enzyme systems and cell components that protect against activated forms of oxygen following the respiratory burst, such as superoxide dismutase, myeloperoxidase, catalase, glutathione peroxidase, vitamins C and E, etc.

Most *in vivo* and *in vitro* studies [24, 32] have used pharmacological doses of melatonin that exceed the low physiological concentrations that are normally found in plasma, and are much higher than the peak nocturnal concentrations in the sera of mammals (including humans) and birds [33, 34]. The present results therefore are of major relevance in view of the augmented oxidative stress observed in the old animals (with MDA levels significantly greater than in the young animals), and how melatonin, at the physiological concentrations reached in the plasma of young animals, was able to reduce the lipid peroxidation in heterophils from animals of advanced age. Furthermore, a judgement related to melatonin's efficacy (or lack thereof) as a physiological antioxidant are also often based on the low levels (10-200 pg/ml) of melatonin in the blood, and therefore the presumably low intracellular concentrations of the indolamine [5].

Age-related decline in melatonin secretion may have various consequences, including sleep inefficiency, circadian rhythm dysregulation, reduced antioxidant protection, depressed immune function, and possibly others [35]. Besides aging, there are many age-related diseases that have as their basis, at least in part, free radical damage (Alzheimer's and Parkinson's diseases are examples). Thus, in agreement with other workers [4], we suggest that melatonin's use in disease states and processes where free radical damage is involved should be increased.

ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation was supported by a research grant from de Ministerio de Ciencia y Tecnología (BFI2002-04583-C02-01). During the performance of this work, M.P. Terrón and S.D. Paredes were supported by a personal researcher training grant from the Consejería de Educación, Ciencia y Tecnología / Fondo Social Europeo (junta de Extremadura, FIC00B013 and FIC02A049, respectively). The authors would like to express their thanks to Ms Elena Circujano Vadillo for her technical assistance.

References

- [1] Tan, D.X., Reiter, R.J., Manchester, L.C., Yan, M.T., El-Sawi, M., Sainz, R.M., Mayo J.C., Kohen R., Allegra, M. and Hardeland, R. (2002). Chemical and physical properties and potential mechanisms: Melatonin as a broad-spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr. Topics Med. Chem.* 2, 181.198.
- [2] Reiter, R.J., Tan, D.X., Sainz, R.M. and Mayo, J.C.(2000). Melatonin: Reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *J. Pharm. Pharmacol.* 54, 299.321.
- [3] Rodriguez, C., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Antolin, I., Herrera, F., Martin, V. and Reiter, R.J. (2004). Regulation of antioxidant enzymes: A significant role for melatonin. *J. Pineal. Res.* 36, 1.9.
- [4] Reiter, R.J., Tan, D.X., Mayo, J.C., Sainz, R.M., León, J. and Czarnocki, Z. (2003). Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochem. Pol.* 50, 1129.1146.
- [5] Reiter, R.J., Tan, D.X., Manchester, L.C. and Qi, W. (2001). Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the literature. *Cell. Biochem. Biophys.* 34, 237.256.
- [6] Harman, D. (1991). The aging process: major risk factor for disease and death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 5360.5363.
- [7] Reiter, R.J. (1995). The pineal gland and melatonin in relation to aging: A summary of the theories and of the data. *Exp. Gerontol.* 30, 199.212.
- [8] Reiter, R.J., Tan, D.X., Manchester, L.C. and El-Sawi, M.R. (2002). Melatonin reduces oxidant damage and promotes mitochondrial respiration. *Ann. N.Y. Acad.* 959, 238.250.
- [9] Reiter, R.J., Tand, D.X., Kim, S.J., Manchester, L.C., García, J.J., Cabrera, J.C., El-Sokkary, G. and Rouvier-Garay, V. (1999). Augmentation of indices of oxidative damage in life-long melatonin-deficient rat. *Mech. Aging Dev.* 110, 157.173.
- [10] Reiter, R.J., Dun-Xian, T., Wenbo, A., Manchester, L.C., Karvownik, M. and Calvo, J.R. (2000). Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. *Biol. Signals Recept.* 9, 160.171.
- [11] Terrón, M.P., Marchena, J.M., Shadi, F., Harvey, S., Lea, R.W. and Rodríguez, A.B. (2001). Melatonin: an antioxidant at physiological concentrations. *J. Pineal Res.* 31, 95.96.

- [12] Estebauer, H. and Cheeseman, K.H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 186, 407.421.
- [13] Janero, D.R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic inducers of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic. Biol. Med.* 9, 515.540.
- [14] Terrón, M.P., Cubero, J., Marchena, J.M., Barriga, C. and Rodríguez, A.B. (2002). Melatonin and aging: in vitro effect of young and mature ring dove physiological concentrations of melatonin on the phagocytic function of heterophils from old ring dove. *Exp. Gerontol.* 37, 421.426.
- [15] Allegra, M., Reiter, R.J., Tan, D.X., Gentile, C., Tesoriere, L. and Levrea, M.A. (2003). The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J. Pineal Res.* 34, 1.10.
- [16] Mayo, J.C., Sainz, R.M., Antolin I., Herrera, F., Martin, V. and Rodríguez, C. (2002). Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1706.1713.
- [17] Mayo, J.M., Tan, D.X., Sainz, R.M., Lopez-Burillo, S. and Reiter, R.J. (2003). Oxidative damage to catalase induced by peroxy radicals: Functional protection by melatonin and other antioxidants. *Free Radic. Res.* 37, 543.553.
- [18] Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Carozo, A., Leon, J., Khaldy, H. and Reiter, R.J. (2002). Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. *Curr. Topics Med. Chem.* 2, 133.152.
- [19] Okatani, Y., Wakatsuki, A., Reiter, R.J. and Miyahara, Y. (2003). Acutely administered melatonin restores hepatic mitochondrial physiology in old mice. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 35, 367.375.
- [20] Urata, Y., Honma, S., Goto, S., Todoroki, S., Ueda, T., Cho, S., Honma, K. and Kondo, T. (1999). Melatonin induced gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 838.847.
- [21] Gitto, E., Tan, D.X., Reiter, R.J., Karbownik, M., Manchester, L.C., Cuzzocre, S., Fulin, F. and Barberi, I. (2001). Individual and synergistic actions of melatonin: Studies with vitamin E, vitamin C, glutathione and desferoxamine in liver homogenates. *J. Pharm. Pharmacol.* 53, 1393.1401.
- [22] Reiter, R.J., Tan, D.X., Mayo, J.C., Sainz, R.M. and López-Burillo, S. (2002). Melatonin, longevity and health in the aged: An assessment. *Free Radi. Res.* 36(12), 1323.1329.

- [23] Rodríguez, A.B., Nogales, G., Ortega, E. and Barriga, C. (1998). Melatonin control superoxide anion level: Modulation of superoxide dismutase activity in ring dove heterophils. *J. Pineal Res.* 24, 9.14.
- [24] Rodríguez, A.B., Nogales, G., Marchena, J.M., Ortega, E. and Barriga, C. (1999). Suppression of both basal and antigen-induced lipid peroxidation in ring dove heterophils by melatonin, *Biochem. Pharmacol.* 58, 1301.1306
- [25] Terrón, M.P., Cubero, J., Barriga, C., Ortega, E. and Rodríguez, A.B. (2003). Phagocytosis of *Candida albicans* and superoxide anions levels in ring dove (*Streptopelia risoria*) heterophils: effect of melatonin. *J. Neuroendocrinol.* 15, 1.5.
- [26] Sewerynek, E., Melchiorri, D., Chen, L. and Reiter, R.J. (1999). Melatonin reduces both basal and bacterial lipopolysaccharide-induced lipid peroxidation in vitro. *Free Radic. Biol. Med.* 19, 903.909.
- [27] Sewerynek, K., Poeggeler, B., Melchiorri, D. and Reiter, R.J. (1999). H₂O₂-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates is greatly reduced by melatonin. *Neurosci. Lett.* 195, 203.205.
- [28] Terrón, M.P., Paredes, S.D., Barriga, C., Ortega, E. and Rodríguez, A.B. (2004). Comparative study of the heterophil phagocytic function in young and old ring doves (*Streptopelia risoria*) and its relationship with melatonin levels. *J. Comp. Physiol. B.* 174, 421.427.
- [29] Terrón, M.P., Paredes, S.D., Barriga, C., Ortega, E., Reiter, R.J. and Rodríguez, A.B. (in press, 2004). Oral administration of melatonin to old ring dove (*Streptopelia risoria*) increases plasma levels of melatonin and heterophil phagocytic activity. *J. Gerontol. Biol. Sci.*
- [30] García, J.J., Reiter, R.J., Guerrero, J.M., Escames, G., Yu, B.P., Oh, C.S. and Muñoz-Hoyos, A. (1997). Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. *FEBS Lett.* 408, 297.300.
- [31] García, J.J., Reiter, R.J., Ortiz, G.G., Oh, C.S., Tang, L., Yu, B.P. and Escames, G. (1998). Melatonin enhances tamoxifen's ability to prevent the reduction in microsomal membrane fluidity induced by lipid peroxidation. *J. Membr. Biol.* 162, 59.65.
- [32] Reiter, R.J. (1995). Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: Antioxidant protection and neuroendocrine regulation. *Front. Neuroendocrinol.* 16, 383.415.
- [33] Brzezinski, A. (1997). Melatonin in humans. *N. Engl. J. Med.* 336, 186.195.

[34] Rodríguez, A.B., Marchena, J.M., Nogales, G., Durán, J. and Barriga, C. (1999). Correlation between the circadian rhythm of melatonin, phagocytosis, and superoxide anion levels in ring dove heterophils. *J. Pineal Res.* 26, 35.42.

[35] Karasek, M. and Reiter, R.J. (2002). Melatonin and aging. *Neuroendocrinol Let.* 23, 14.16.

TABLA 1: Levels of lipid peroxidation in ring dove (*Streptopelia risoria*) heterophils incubated with melatonin doses at physiological concentrations observed in young animals.

BASAL (t = 0)	INCUBATION TIME	
	15 min	60 min
5.47± 0.06	(nmol MDA/ mg prot.)	
Control	6.07±0.05 ¹	6.17±0.05 ¹
Látex	13.55±0.03 ^a	27.26±0.07 ^a
Melatonin (diurnal)	5.66±0.09 ^{2, b}	4.18±0.16 ^{a, b}
Melatonin (nocturnal)	5.47±0.03 ^{2, b}	3.88±0.03 ^{a, e, f}
Melatonin (diurnal) + Latex	7.11±0.02 ^b	11.89±0.02 ^{a, b, c}
Melatonin (nocturnal) + Latex	6.52±0.12 ^b	10.25±0.13 ^{a, b, d, e}

Each value represents the mean ± SE of eight determinations performed in duplicate.

- 1) p < 0.05 with respect to the basal.
- 2) p < 0.05 with respect to their control.
- a) p < 0.05 with respect to the basal and their control.
- b) p < 0.05 with respect to latex.
- c) p < 0.05 with respect to diurnal melatonin (50 pg/ml).
- d) p < 0.05 with respect to nocturnal melatonin (300 pg/ml).
- e) p < 0.05 with respect to their corresponding value with diurnal melatonin.
- f) p < 0.05 with respect to the rest of the groups studied.

Figure 1: Comparative study of the lipid peroxidation levels (both basal and latex induced) in ring dove heterophils from young and old animals, alter different incubation times. Each value represents the mean \pm SE of eight determinations performed in duplicate. $p < 0.05$ 1, a, b, c, *: (1) with respect to their basal value; (a) with respect to their basal and control after the same incubation time; (b) with respect to their values in young animals at the same time of day; (c) with respect to their value at 15 minutes; (*) with respect their value at 16:00.

Figure 2: Changes with incubation time in lipids peroxidation (nmol MDA/mg prot.) in heterophils from old ring dove (Streptopelia risoria) incubated with the physiological concentrations of melatonin found in young animals (50 and 300 pg/ml as diurnal and nocturnal concentrations, respectively). Each value represents the mean \pm SE of eight determinations performed in duplicate. The results are expressed as % with respect to the basal value (0 minutes). * $p < 0.05$ with respect to 15 minutes; MD: diurnal melatonin (50 pg/ml); MN: nocturnal melatonin (300 pg/ml); L: latex.

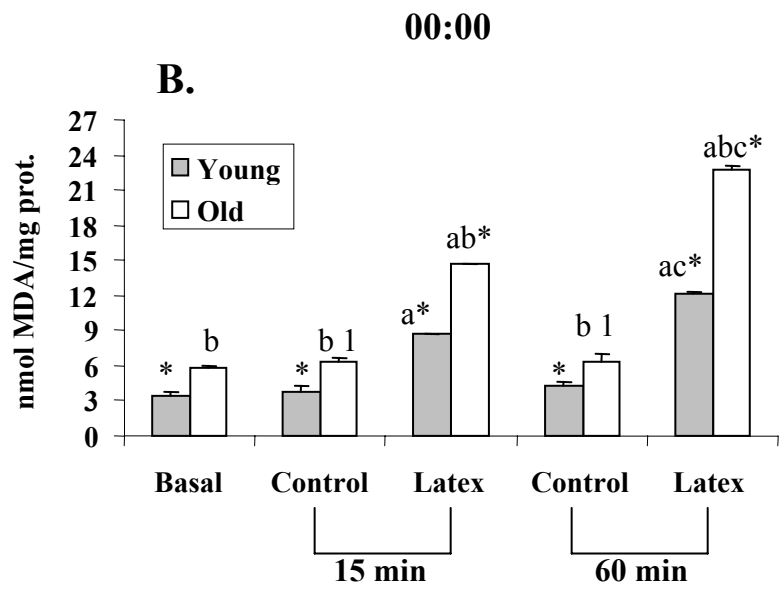
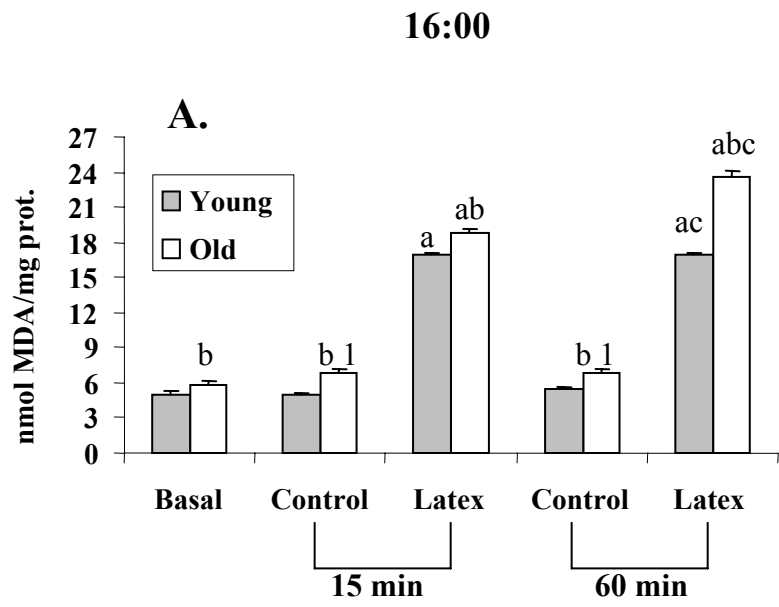


Fig. 1:
M.P. Terrón

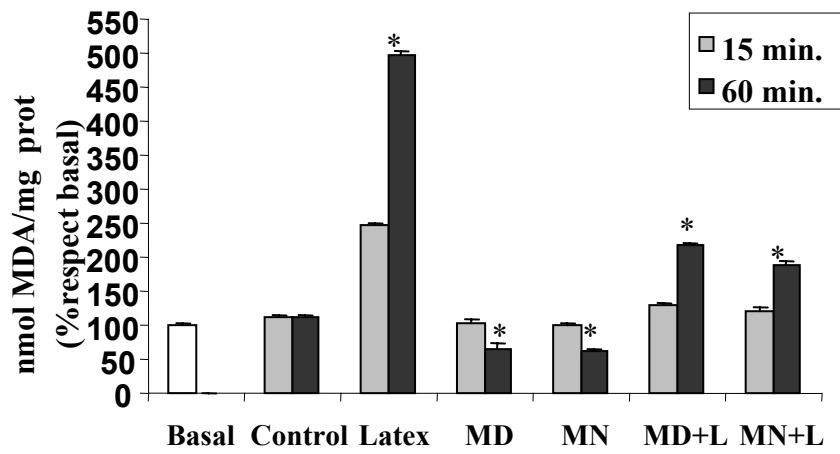


Fig. 2
M.P. Terrón

4. DISCUSIÓN GENERAL

De forma similar a otras funciones corporales, la actividad del sistema inmune sufre cambios circadianos de gran importancia para la homeostasis. Esto implica la existencia de uno o más factores involucrados en la regulación del ritmo circadiano del sistema inmune, y la glándula pineal a través de la secreción de su hormona melatonina, podría ser uno de los candidatos principales (Guerrero y Reiter, 2002; Skwarlo-Sonta, 2003). Si la glándula pineal participa en la transferencia de información entre el medio externo e interno y juega un papel importante en la modulación de la función del sistema inmune, es esencial que el sistema inmune envíe su propia información a la glándula pineal y que estas señales sean apropiadamente transferidas para mantener la homeostasis. Así, la pineal es capaz de recibir información de este tipo, y las citoquinas parecen ser los mejores mediadores en esta importante función, estando también los opioides endógenos envueltos en dicho efecto (Maestroni y cols., 1988; DiStefano y Pauler, 1994).

La melatonina es producida y secretada en la sangre de manera circadiana con una producción máxima que ocurre durante la fase de oscuridad en ciclos de luz/oscuridad. Mientras que la producción de melatonina en un ritmo de 24 horas es muy clara en animales jóvenes, incluidos humanos, este ciclo se deteriora con la edad (Reiter y cols., 2003). De esta manera, el envejecimiento está asociado con un número de cambios en la morfología, fisiología y bioquímica de la glándula pineal que resultan en una reducción significativa de los niveles nocturnos de melatonina (Turek y cols., 2000; Reiter y cols., 2003). En la tórtola collariza (*Streptopelia risoria*) hemos observado oscilaciones diarias de los niveles de esta hormona en animales jóvenes y un descenso en los niveles plasmáticos con el avance de la edad, lo cual está acompañado de una ausencia de ritmo diario, no encontrándose diferencias significativas entre los valores nocturnos y diurnos en animales viejos (*Objetivo 1*). Se ha mostrado que el descenso de los niveles nocturnos de melatonina durante el envejecimiento, afecta a la integridad de estructuras circadianas y es un precursor de estados de enfermedad. Por eso, la melatonina podría tener efectos beneficiosos tanto directos como indirectos en los procesos degenerativos del envejecimiento, o retardar el desarrollo de algunos

procesos tales como inmunodeficiencias asociadas con la edad o crecimiento tumoral, lo cual contribuye a reducir el tiempo de vida (Turek y cols, 2000).

En los estudios de esta tesis, hemos confirmado como las tórtolas viejas, presentan un descenso en la función de los heterófilos, lo cual podría ser debido, al menos en parte, a la ausencia de ritmo diario de melatonina (*Objetivo 2.1, 2.3 y Objetivo 3*). En este sentido enfocamos nuestra investigación en base a los cambios relacionados con la edad en los niveles de melatonina y en el posible papel de la administración de la hormona sobre cambios en la actividad fagocítica (fagocitosis y metabolismo oxidativo) durante el envejecimiento. La melatonina administrada a tórtolas viejas incrementó las diferencias entre los niveles plasmáticos nocturnos y diurnos de la hormona, y en paralelo incrementó la fagocitosis y redujo los niveles de radical superóxido en los heterófilos. Además, nuestros resultados muestran en animales viejos que con la administración de melatonina se establece una clara correlación positiva entre los niveles de la hormona y los valores del índice de fagocitosis observados a las dos horas estudiadas (16:00 y 02:00). Esto es indicativo de que a medida que aumentan los niveles de melatonina en el plasma de animales viejos, aumenta también la capacidad de los heterófilos sanguíneos de estos animales de fagocitar bolas de látex (*Objetivo 3*). Estos hallazgos son coincidentes con resultados previos sobre correlación positiva melatonina-fagocitosis en tórtolas jóvenes (Rodríguez y cols.,1999a), así como con el aumento de la actividad fagocítica de los heterófilos de animales maduros y viejos después de la incubación in vitro tanto con dosis fisiológicas como farmacológicas de melatonina (*Objetivo 2.1 y 2.2*).

Por tanto, nuestra investigación corrobora en esta especie aviar un efecto estimulante dosis-dependiente de la melatonina sobre la función fagocítica al mismo tiempo que neutraliza el estrés oxidativo derivado de esta función inmune, hecho revisado en esta tesis en heterófilos de animales jóvenes y que no ocurre en animales viejos, lo que podría ser debido, al menos en parte, a la ausencia de ritmo circadiano de melatonina que presentan estos últimos (*Objetivo 2.3*). El incremento observado tanto en los niveles plasmáticos de melatonina como en la actividad fagocítica en los

heterófilos de animales viejos tratados oralmente con la hormona, resulta de especial interés considerando que en la vejez la deficiencia de melatonina está relacionada con la supresión de la función inmune (Karasek y Reiter, 2002). En este sentido, Cardinali y colaboradores (1998) encontraron que el tratamiento in vivo con melatonina no solo restaura el ritmo circadiano inmune en el envejecimiento, sino que también niveles farmacológicos de la hormona podrían sobre-estimular el sistema inmune y causar un aumento de los procesos autoinmunes.

Por otro lado, la afirmación de la melatonina como una hormona anti-envejecimiento está basado también en estudios que indican que puede tener efectos inmunomoduladores y supresor de tumores, debido a los efectos de esta hormona como potente secuestrador de radicales libres (Reiter, 2002a). Hay ciertamente una variedad de enfermedades asociadas con la edad, particularmente del cerebro, donde los radicales libres se cree que están envueltos en los procesos patológicos. En estos casos los antioxidantes serían de potencial beneficio para estas condiciones degenerativas. Ciertamente, diversos estudios anteriormente han demostrado, al igual que nosotros en esta tesis (*Objetivo 2 y 3*), tanto in vivo como in vitro, que la melatonina muestra propiedades inmunoestimuladoras y podría modular ciertas funciones inmunes al mismo tiempo que atenúa las reacciones de oxidación (Maestroni y cols., 1988; Turek y cols., 2000; Rodríguez y cols., 2001 y Skwarlo-Sonta 2002, entre otros). Además, al igual que habíamos observado previamente en animales jóvenes, con un claro patrón circadiano de melatonina y con altos niveles nocturnos de la misma (Rodríguez y cols., 1999a), en esta tesis en los estudios in vivo tras la administración de melatonina a animales viejos se establece una clara correlación negativa entre los niveles de anión superóxido y los niveles plasmáticos de melatonina (*Objetivo 3*).

Continuando con el metabolismo oxidativo de los fagocitos, la melatonina también promueve la actividad de enzimas antioxidantes reduciendo además el daño oxidativo. De hecho, en la tórtola collariza, nosotros demostramos con anterioridad in vitro que la melatonina controla los niveles de anión superóxido a través de una modulación de la actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (Rodríguez

y cols., 1998), a la vez que induce una supresión tanto de la peroxidación lipídica (niveles de MDA) basal como de la inducida por un antígeno, en los heterófilos de la tórtola collariza a concentraciones farmacológicas (Rodríguez y cols., 1999b). En esta tesis, los resultados han indicado que concentraciones fisiológicas de melatonina también reducen los niveles de peroxidación en heterófilos de animales jóvenes-maduros (*Objetivo 4.1*). Así mismo, resultados presentados también en esta memoria demuestran que en general, e independientemente de la edad de los animales, los valores más bajos de MDA se obtienen tras la incubación con melatonina y que los heterófilos de tórtolas collarizas viejas presentan mayores concentraciones de MDA (tanto en estado basal como inducido por antígeno) que los heterófilos de animales jóvenes, en los que se observaron los valores más bajos de peroxidación a las 2:00h (hora en la que se encuentran los mayores niveles plasmáticos de melatonina). Además, la incubación de heterófilos de animales viejos con las concentraciones fisiológicas observadas en animales jóvenes, reduce los niveles de MDA, siendo el efecto dependiente de la concentración de la hormona y del tiempo de incubación (*Objetivo 4.2*).

En resumen, aunque el envejecimiento es un proceso multifactorial, el descenso de la secreción de melatonina relacionado con la edad, parece ser uno de los factores más relevantes, reconociéndose a esta hormona como una sustancia contra el envejecimiento debido a que su acción podría ser potencialmente beneficiosa durante dicho proceso. De esta manera, las consecuencias directas de su pérdida con la edad se relacionan con problemas en la capacidad de conciliar el sueño, desregulaciones en el ritmo circadiano, reducción de la protección antioxidante, depresión de la función inmune y otros trastornos (Karasek y Reiter, 2002). Hay una bibliografía cada vez más creciente que indica que existe una estrecha relación entre el ritmo de melatonina de 24 horas y los cambios relacionados con la edad en la fisiología y el comportamiento. Considerando que la melatonina actúa mandando información al organismo sobre su organización temporal, esta hormona podría ser un importante agente farmacológico para la atenuación de los cambios relacionados con la edad en la organización circadiana, sistema inmune, sueño y otros desórdenes que acompañan la vejez.

Las posibles implicaciones terapéuticas y fisiopatológicas de las propiedades inmunoestimuladoras de la melatonina no se han investigado suficientemente. En general, se requieren futuras investigaciones para que la melatonina pueda ser propuesta de forma consensuada como “terapéutica de reemplazo” para disminuir la incidencia y/o subsanar algunos desórdenes relacionados con la edad (Reiter y cols., 2003). Nosotros nos unimos a este pensamiento.

5. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en la presente tesis en la que pretendíamos evaluar la acción de la melatonina sobre la función fagocítica (fagocitosis y metabolismo oxidativo) de heterófilos de tórtola collariza (*Streptopelia risoria*), y las variaciones de la hormona con la edad, podemos concluir que:

1.- En esta especie aviar se observan cambios en el ritmo circadiano de melatonina en distintas edades, encontrándose un claro descenso de los niveles plasmáticos de melatonina con la edad.

2.- Al incubar los heterófilos de animales viejos con las concentraciones fisiológicas encontradas en animales jóvenes y maduros, se observa un incremento dosis dependiente de la fagocitosis (ingestión y destrucción de *Cándida albicans*) y un descenso en los niveles de anión superóxido en los heterófilos.

3.- La incubación de los heterófilos de animales maduros, a dos tiempos (30 y 60 minutos) y con diferentes concentraciones de melatonina (50 pg/ml, 300 pg/ml y 23×10^6 pg/ml), produce un incremento tanto del índice de fagocitosis como del poder candidicida con efecto dosis dependiente. Con respecto al metabolismo oxidativo hubo un descenso en los niveles de anión superóxido después de la incubación con todas las concentraciones de la hormona estudiadas. El efecto fue dosis dependiente y más pronunciado a los 60 minutos de incubación.

4.- La función fagocítica de heterófilos de animales viejos presenta un descenso significativo respecto a animales jóvenes a las 0:00 y 10:00. Por otro lado, a estas mismas horas, los niveles de anión superóxido fueron mayores en animales viejos que en jóvenes. Estos resultados podrían ser debido, al menos en parte, a la ausencia del ritmo diario de la melatonina en animales viejos.

5.- La administración oral de melatonina ($23 \mu\text{g}/0.1\text{ml}/\text{animal}/\text{día}$, una hora antes del periodo de oscuridad) a animales viejos, incrementa la diferencia entre los niveles plasmáticos nocturnos (2:00h) y diurnos (16:00h) de la hormona, y en paralelo

incrementa también la fagocitosis, a la vez que reduce los niveles de radical superóxido en los heterófilos.

6.- En heterófilos de animales jóvenes-maduros, la peroxidación lipídica se reduce significativamente tras la incubación con las concentraciones fisiológicas de melatonina observadas en esos animales (50 pg/ml y 300 pg/ml, diurna y nocturna respectivamente). Además, la melatonina reduce el incremento de los niveles de MDA inducido tras la incubación de los heterófilos con bolas de látex. La producción de MDA es dosis dependiente y sufre cambios con el tiempo de incubación.

7.- En condiciones basales, los niveles de MDA fueron mayores en heterófilos de animales viejos que en heterófilos de animales jóvenes. Por otro lado, la incubación de heterófilos de animales viejos con las concentraciones de melatonina encontradas en animales jóvenes (50 pg/ml y 300 pg/ml, diurna y nocturna respectivamente) reduce los niveles de MDA, siendo este efecto significativamente mayor a los 60 minutos de incubación y con la concentración nocturna de melatonina. Además la incubación con melatonina contrarrestó el aumento de MDA inducido por bolas de látex.

CONCLUSIÓN GENERAL:

En heterófilos de *Streptopelia risoria*, tanto in vivo como in vitro, la hormona melatonina actúa como un inmunomodulador potenciando la función fagocítica y neutralizando el estrés oxidativo derivado de esta función inmune. Además, en heterófilos de animales viejos la melatonina revierte los efectos inmunosupresores y oxidativos que acompañan a la función fagocítica a estas edades avanzadas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Acuña-Castroviejo D.; Coto-Montes A.; Monti M.G. y Reiter R.J.** Melatonin is protective against MPTP-induced striatal and hippocampal lesions. *Life Sci.* 60: 23-29. 1997.
- Acuña-Castroviejo D.; Martín M. y Macías M.** Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J. Pineal Res.* 30: 65-74. 2001.
- Acuña-Castroviejo D.; Escames G.; Carozo A.; Leon J.; Khaldy H. y Reiter R.J.** Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. *Curr. Topics. Med. Chem.* 2: 133-52. 2002.
- Akbulut H.; Icli F.; Buyukcelik A.; Akbulut K.G. y Demirci S.** The role of granulocytes-macrophage-colony stimulating factor, cortisol, and melatonin in the regulation of the circadian rhythms of peripheral blood cells in healthy volunteers and patients with breast cancer. *J. Pineal Res.* 26: 1-8. 1999.
- Aldhous M.; Franey C.; Wright J. y Arent J.** Plasma concentrations of melatonin in man following oral absorption different preparations. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 19: 517-521. 1985.
- Alonso R.** La glándula pineal. En: *Fisiología Humana* (Eds.: Tresguerres J.A.F.; Aguilar E.; Cachofeiro M.V. y cols.). McGraw-Hill. Interamericana. pp. 891-901. 1999.
- Alonso R.; Abreu P. y Fajardo N.** Steroid influences on pineal melatonin clinical applications. (Eds.: Yu H.S. y Reiter R.J.) *CRC Press.* Boca Raton. pp. 73-105. 1993.
- Allegra M.; Reiter R.J.; Tan D.X.; Gentile C.; Tesorie L. y Livrea M.A.** The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J. Pineal Res.* 34: 1-10. 2003.
- Ammon M.D.** Melatonin in humans. *The New England Journal of Medicine.* 123: 186-195. 1997.

- Anderson R.** Ascorbic acid and immune functions: mechanism of immunostimulation. In: Vitamin C "Ascorbic Acid". (Ed). Counsell J.N. 249-275. Horning D.H. London. *Applied Science*. 1982.
- Angeli A.; Gatti G.; Sartori M.L.; Del Ponte D. y Carignola R.** Effect of exogenous melatonin on human natural killer (NK) cell activity. An approach to the immunomodulatory role of the pineal gland. *Neuroendocrinol. Lett.* 9: 286. 1987.
- Anisimov V.N.; Khavinson V.K. y Morozov V.G.** Carcinogenesis and aging. IV. Effect of low-molecular-weight factors of thymus, pineal gland and anterior hypophalamus on immunity, tumor incidence and life span of C3H/Sn. *Mech. Ageing Dev.* 19: 245-258. 1982.
- Aoyama H.; Mori N. y Mori W.** Anti-glucocorticoid effects of melatonin on adult rats. *Acta Pathol. Jpn.* 37: 1143-1148. 1987.
- Araki M.; Fukada Y.; Shichida Y.; Yoshiwaza T. y Tokunaga F.** Differentiation of both rod and cone types of photoreceptors in the in vivo and in vitro developing pineal glands of the quail. *Dev. Brain Res.* 65: 85-92. 1992.
- Arendt J.** Melatonin. *Clin. Endocrinol.* 29: 205-229. 1988.
- Arendt J.** Melatonin and the mammalian pineal gland. (Ed). Arent J. *Chapman and Hall*. 1-5 1995.
- Arent J.; Hampton S.; English J.; Kwasowski P. y Marks V.** 24-hour profiles of melatonin, cortisol, insulin, C-peptide and GIP following a meal and subsequent fasting. *Clin. Endocrinol.* 16: 89-95. 1982.
- Ariëns Kappers J.A.** Survey of the innervation of the epiphysis cerebri and the accessory pineal organs of vertebrates. *Prog. Brain. Res.* 10: 87-153. 1995.
- Armstrong S.M. y Redman J.** Melatonin: a chronobiotic with antiageing properties. *Medical Hypotheses.* 34: 300-309. 1991.

- Artz E.S.; Fernández-Castelo S.; Finocchiaro L.M.E.; Criscuolo M.E.; Díaz A.; Finkielman S. y Nahmod V.E.** Immunomodulation by indoleamines: Serotonin and melatonin action on DNA and interferon- γ synthesis by human peripheral blood mononuclear cells. *J. Clin. Immunol.* 8: 513-520. 1988.
- Axelrod J.; Quay W.B. y Baker P.C.** Enzymatic synthesis of the skin-lightning agent, melatonin, in amphibians. *Nature.* 208: 386. 1965.
- Babior B.M.** Oxidants from phagocytes; agents of defence and destruction. *Blood.* 64: 959-966. 1984.
- Barjavel M.J.; Mamdouh Z.; Raghbate N. y Bkouche O.** Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes. *J. Immunol.* 160: 1191-1197. 1998.
- Barlow-Walden L.R.; Reiter R.J.; Abe M.; Pablo M.; Menéndez-Pelaez A.; Chen L.D. y Poeggeler B.** Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem. Int.* 26: 447-452. 1995.
- Barrett P.; MacLean A.; Davidson G. y Morgan P.J.** Regulation of the Mel 1a melatonin receptor mRNA and protein levels in the ovine pars tuberalis: evidence for a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-independent Mel 1a receptor coupling and an autoregulatory mechanism of expression. *Mol. Endocrinol.* 10: 892-902. 1996.
- Barriga C.; Nogales G.; Marchena J.M. y Rodríguez A.B.** Myeloperoxidase activity in ring dove heterophils after latex bead ingestion. Effect of melatonin. *J. Physiol.* 509.: 95. 1998.
- Barriga C.; Madrid J.A.; Terrón M.P.; Rial R.V.; Cubero J.; Paredes S.D.; Sánchez S. y Rodríguez A.B.** The pineal gland: Functional connection between melatonin and immune system in birds. *Biogenic Amines.* 18: 147-176. 2004.
- Bastianelli E. y Pochet R.** Calbindin-D28k, calretinin, and recoverin immunoreactivities in developing chick pineal gland. *J. Pineal Res.* 17: 103-11. 1994.

- Begay V.; Bois P.; Collin J.P.; Lefant J. y Falcon J.** Calcium and melatonin production in dissociated trout pineal photoreceptor cells in culture. *Cell. Calcium*. 16: 37-46. 1994.
- Begay V.; Coon S.L.; Falcon J. Klein D.C.** Expression of melatonin synthesis genes is controlled by a circadian clock in the pike pineal organ but not in the trout. *In. Biological Cell*. 5: 399-405. 1998.
- Bellinger D.L.; Felten S.Y.; Collier T.J. y Felten D.L.** Noradrenergic sympathetic innervation of the spleen:IV Morphometric analysis in adult and aged F344 rats. *J. Neurosci. Res*. 18: 55-63. 1987.
- Bellinger D.L.; Ackerman K.D.; Felten S.Y. y Felten D.L.** A longitudinal study of age-related loss of noradrenergic nerves and lymphoid cells in the rat spleen. *Exp. Neurol*. 166: 295-311. 1992.
- Belokrylov G.A.; Morozov V.G.; Khavinson V.K. y Sofronov B.N.** The influence of low-molecular extracts from heterologous thymus, epiphysis and hypothalamus on the immune response in mice. *Biull. Eksp. Biol. Med*. 81: 202-204. 1976.
- Bendich A.** Antioxidant vitamins and Immune Response. In: Nutrition and Immunology. (Ed). Alan R. 125-147. Liss. Inc. New Yersey. 1988.
- Ben-Nathan D.; Maestroni G.J.M.; Lustig S. y Conti A.** Protective effects of melatonin in mice infected with encephalitis viruses. *Arch. Virol*. 140: 223-230. 1995.
- Bergiannaki J.D.; Soldatos C.R.; Paparrigopoulos T.J.; Syrengelas M. y Stefanis C.N.** Low and high melatonin excretors among healthy individuals. *J. Pineal Res*. 18: 159-164. 1995.
- Bernard M.; Guerlotte J.; Greve P.; Grechez-Cassiau A.; Invone M.P.; Zatz M.; Chong N.W.; Klein D.C. y Voisin P.** Melatonin synthesis pathway: circadian

regulation of the genes encoding the key enzymes in the chicken pineal gland and retina. *Repr. Nutr. Dev.* 39: 325-334. 1999.

Besedovsky H.; Del Rey A. y Sorkin E. Immune-neuroendocrine interactions. *J. Immunol.* 135: 750-754. 1985.

Binkley S.A. Pineal rhythms in vivo and in vitro. *Comp. Biochem. Physiol.* 64A: 201-206. 1979.

Binkley S.A. Circadian rhythm of pineal function in rats. *Endocrine Rev.* 43: 255-270. 1983.

Binkley S. The pineal: endocrine and nonendocrine function. Prentice Hall Endocrinology Series Englewood Cliffs: *Prentice Hall Publishing Co. Inc.* 1988.

Binkley S.A.; Klein D.C. y Weller J.L. Dark induce increase in pineal serotonin N-acetyltransferase activity: a refractory period. *Experientia.* 15; 29: 1339-1340. 1973.

Binkley S.; Stephens J.L.; Riebman J.B. y Reilly K.B. Regulation of pineal rhythms in chickens: photoperiod and dark-time sensitivity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 32: 411-416. 1977.

Binkley S.; Riebman J.B. y Reilly K.B. The pineal gland: a biological clock *in vitro.* *Science.* 202: 1198. 1978.

Bjorkstein J. En: Theoretical aspects of aging. Rockstein M. (Ed). NY. Academic. 43. 1974.

Blalock J.E. The immune system as a sensory organ. *J. Immunol.* 132: 1067-1070. 1984.

- Blask D.E.** Melatonin in oncology. En: Melatonin Biosynthesis, Physiological effects, and Clinical applications. Yu N.S. y Reiter R.J. (Eds). 447-477. CRC Press. Boca Raton. 1993.
- Blask D.E.; Sauer L.A. y Dauchy R.T.** Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian- based cancer therapy. *Curr. Top. Med. Chem.* 2: 113-132. 2002.
- Bolliet V.; Bégay V.; Ravault J.P.; Ali M.A.; Collin J.P. y Falcon J.** Multiple circadian oscillators in the photosensitive pike pineal gland: a study using organ and cell culture. *J. Pineal Res.* 16: 77-84. 1994.
- Bolliet V.; Bégay V.; Taragnat C.; Ravault J.P.; Collin J.P. y Falcon J.** Photoreceptor cells of the pike pineal organ as cellular circadian oscillators. *Eur. J. Neurosci.* 9: 643-653. 1997.
- Bonello R.S.; Marcus R.; Bioch D. y Strober S.** Effect of growth hormone and estrogen on T lymphocytes in older women. *J. Am. Geriatr. Soc.* 44: 1038-1042. 1996.
- Bonilla E.; Valero-Fuenmayor N.; Pons H. y Chacin-Bonilla L.** Melatonin protects mice infected with Venezuelan equine encephalomyelitis virua. *Cell. Mol. Life Sci.* 53: 430-434. 1997.
- Bonilla E.; Rodon C.; Valero N.; Pons H.; Chacin-Bonilla L.; Tamayo J.G.; Rodríguez Z.; Medina-Leendertz S. y Anez F.** Melatonin prolongs survival of immunodepressed mice infected with the Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95: 207-210. 2001.
- Bourhere F.** The assesment of biological age in man. Geneve: WHO Papel. 37. 1970.
- Brainar G.C.; Knobler R.L.; Podoloin P.L.; Lavasa M. y Lublin F.D.** Neuroimmunology: Modulation of the hamster immune system by photoperiod. *Life Sci.* 40: 1319-1326. 1987.

- Brown E.J. y Goodwinm J.L.** Fibronectin receptors of phagocytes. Characterization of the Arg-Gly-Asp binding proteins of human monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* 167: 777-793. 1988.
- Brown E.J.** Phagocytosis. *Bioessays.* 17: 109-117. 1995.
- Brzezinski A.** Melatonin in humans. *N. Engl. J. Med.* 336: 186-95. 1997.
- Burnet F.M.** An immunological approach to ageing. *Lancet.* 2: 358-360. 1970.
- Cahill G.M. y Besharse J.C.** Retinal melatonin in metabolized within the eye of *Xenopus laevis*. *Proc. Nalt. Acad. Sci. USA.* 86: 1098-1102. 1989.
- Calvo J.R.; Raffii-El-Idrissi M.; Pozo D. y Guerrero J.M.** Immunomodulatory role of melatonin: Specific binding sites in human and rodent lymphoid cells. *J. Pineal Res.* 18: 119-126. 1995.
- Cardianli D.P.; Brusco L.I.; García Bonacho M. y Esquifino A.I.** Effect of melatonin on 24-hour rhythms of ornithine decarboxylase activity and norepinephrine and acetylcholine synthesis in submaxillary lymph nodes and speen of young and aged rats. *Neuroendocrinology.* 67: 349-362. 1998.
- Carlson L.L.; Weaver D.R. y Reppert S.M.** Melatonin signal transduction in hamster brain: inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein. *Endocrinology.* 125: 2670-2676. 1989.
- Caroleo M.C.; Frasca D.; Manzini C.; Nistico G. y Doria G.** Effect of melatonin on T helper activity. *Pharmacol. Res.* 22: 53. 1990.
- Caroleo M.C.; Frasca D.; Nistico G. y Doria G.** Melatonin as immunomodulator in immunodeficient mice. *Immunopharmacology.* 23: 81-89. 1992.
- Caspi O.** Melatonin for the prevention and treatment of jet lag. *Alther Ther Health Med.* 10: 74-78. 2004.

- Csaba G. y Barath P.** Morphological changes of thymus and the thyroid gland after postnatal extirpation of pineal body. *Endocrinol. Exp.* 9: 59-67. 1975.
- Cassone V.M. y Menaker M.** Is the avian circadian system a neuroendocrine loop?. *J. Exp. Biol.* 232: 539-549. 1984.
- Cassone V.M. y Natesan A.K.** Time and time again: the phylogeny of melatonin as a transducer of biological time. *J. Biol. Rhythms.* 12: 489-497. 1997.
- Cavallo A. y Ritschel W.A.** Pharmacokinetics of melatonin in human sexual maturation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 1882-6. 1996.
- Cerami A.** Hypothesis: glucose as a mediator of aging. *J. Am. Geriatric Soc.* 13: 626-634. 1985.
- Chakravarti A.** Studies on phagocytosis of unopsonized rabbit erythrocytes by human monocytes. *Cell. Immunol.* 113: 251-260. 1988.
- Champney T.H. ; Allen G.C.; Zanelli M. y Beausang L.E.** Time-dependent effects of melatonin on immune measurements in male Syrian hamsters. *J. Pineal Res.* 25: 142-146. 1998.
- Chandra R.K.** Nutrition and immunity in the elderly. *Nutr. Rev.* 50: 367-371. 1992
- Chavance M.; Herbeth B.; Lemoine A. y Zhu B.P.** Does multivitamin supplementation prevent infections in healthy elderly subject? A controlled trial. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 63: 11-16. 1993.
- Claustrat B.; Chazot G.; Brun J.; Jordan D. y Sassolas G.** A chronobiological study of melatonin and cortisol secretion in dependent subjects. Plasma melatonin, a biochemical marker in major depression. *Biol. Psychiatry.* 19: 1215-1228. 1984.
- Cline M.J.** Metabolism of the circulatory leukocyte. *Physiol. Rev.* 45: 674-720. 1965.

- Cohen H.J.; Newberg P.E. y Chovaniec H.E.** NAD(P)H-dependent superoxide production by phagocytic vesicles from guinea-pig and human granulocytes. *J. Biol. Chem.* 255: 6584. 1980.
- Colombo L.L.; Chen G.J.; López M.C.y Watson R.R.** Melatonin induced increase in gamma-interferon production by murine splenocytes. *Immunol. Lett.* 33: 123-126. 1992.
- Collin J.P.** Differentiation and regression of the cells of the sensory line in the epiphysis cerebri. In *The Pineal Gland* (Ed). Wolstenhome G.E.W. y Knight J. Churchill Livingstone. Edinburgh. 79-125. 1972.
- Collin J.P.; Calas A. y Juillard M.T.** The avian pineal organ. Distribution of exogenous indoleamines: a qualitative study of the rudimentary photoreceptor cells by electron microscopic radioautography. *Exp. Brain Res.* 25: 15-33. 1976.
- Collin J.P.; Briasson P.; Falcón J. y Voisin P.** Multiple cell types in the pinea functional aspects. In: *Pineal and Retinal Relationships*. Eds. P.J.O'Brien y D.C. Klein. Academic Press. Orlando. 15-32. 1986a.
- Collin J.P.; Mirshahi M.; Brisson P.; Falcón J.; Guerlotte J. y Faure J.P.** Pineal retinal molecular relationships: distribution of S-antigen in the pineal complex. *Neuroscience.* 19: 657-666. 1986b.
- Collin J.P.; Voisin P.; Falcon J. ; Faure J.P. ; Brisson P. y Defaye J.R.** Pineal transducer in the course of evolution : molecular organization, rhythmic metabolic activity and role. *Arch. Histol. Cytol.* 52: 441-449. 1989.
- Confort A.** The biology of senescence. 3^a Ed. New York: Elsevier. 81-86. 1979.
- Conti A.; Conconi S.; Reteñis E.; Skwarlo-Sonta K.; Markowska M. Y Maestroni J.M.** Evidence for melatonin síntesis in mouse and human bone marrow cells. *J. Pineal Res.* 28: 193-202. 2000.

- Cossarizza A.; Ortolani C.; Monti D. y Franceschi C.** Cytometric análisis of immunosenescence. *Cytometry*. 27: 297-313. 1997.
- Currier N.L.; Sun L.Z. y Miller S.C.** Exogenous melatonin: qualitative enhancement *in vivo* of cells mediating non-specific immunity. *J. Neuroimmunol.* 104: 101-108. 2000.
- Cutler R.G.** Antioxidants, ageing and longevity. En: Free radicals in biology. Prior, W. (Ed). New York: Academic Press. Vol. VI, Chapt. 11: 371-428. 1984.
- Cutler R.G.** Human longevity and aging: possible role of reactive oxygen species. En: Annals of the New York Academy of Sciences. Pierpaoli W. y Fabris N. (Ed). Acad. of Sci. NY. 621: 1-28. 1991.
- Cuzzocrea S. y Reiter R.J.** Pharmacological actions of melatonin in acute and chronic inflammation. *Curr. Topics. Med. Chem.* 2: 153-166. 2002.
- Daimon T. y Caxton-Martins A.** Electron microscopic and enzyme cytochemical studies on granules of mature chicken granular leukocytes. *J. Anat.* 123: 553-62. 1977.
- De Almeida E.A.; Martinez G.R.; Klitzke C.F.; De Medeiros M.H.G. y Di Mascio P.** Oxidation of melatonin by singlet molecular oxygen (O^2 (1Ag) produces N^1 -acetyl- N^2 -formyl-5-methoxykynuramine. *J. Pineal Res.* 35: 131-137. 2003.
- De Chatelet L.M.; Cooper M.R. y McCall C.E.** Stimulation of the hexose monophosphate shunt in human neutrophils by ascorbic acid: Mechanism of action. *Antimicrobial. Agents. Chemother.* 4: 12-16. 1972.
- Deguchi T.** Circadian rhythm of serotonin N-acetyltransferase activity in organ culture of chicken pineal gland. *Science.* 203: 1245-1247. 1979a.
- Deguchi T.** A Circadian oscillator in cultured cells of chicken pineal gland. *Nature.* 282: 94-96. 1979b.

- Deker J.F. y Quay W.B.** Stimulatory effects of melatonin on ependymal epithelium of choroids plexuses in golden hamsters. *J. Neural. Trasnsm.* 55: 53-67. 1982.
- Del Petre G.; Maggi E. y Romagnani S.** Human Th1 and Th2 cells: Functional properties, mechanisms of regulation and role in disease. *Lab. Invest.* 70: 299-307. 1994.
- Delves P.J. y Roitt I.M.** The immune system Second of two parts. *N. Engl. J. Med.* 343: 108-117. 2000a.
- Delves P.J. y Roitt I.M.** The Immune system. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 343: 37-49. 2000.
- Demas G.E. y Nelson R.J.** Photoperiod and temperature interact to affect immune parameters in adult male deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *J. Biol. Rhythms.* 11: 95-103. 1996.
- Demas G.E. y Nelson R.J.** Short-day enhancement of immune function is independent of steroid hormones in deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *J. Comp. Physiol. B.* 168: 419-426. 1998a.
- Demas G.E. y Nelson R.J.** Exogenous melatonin enhances cell-mediated, but not humoral, immune fuction in adult male deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *J. Biol. Rhythms.* 13: 245-252. 1998b.
- Dense P. y Mandell G.L.** Honococcal interactions with polymorphonuclear neutrophils. Importance of the phagosome for bactericidal activity. *J. Clin. Invest.* 62: 1161-1171. 1978.
- Depres-Brummer P.; Bourin P.; Pages N.; Metzger G. y Levi F.** Persistent T lymphocyte rhythms despite suppressed circadian clock outputs in rats. *Am. J. Physiol.* 273: R1899-R1997. 1997.

- Descartes R.** De Homine. Figuritis et Latinitate Donatus a Schuyt. F. Lugduni Batavorum. 1662.
- Di Stefano A. y Paulesu L.** Inhibitory effect of melatonin on production of IFN γ or TNF α in peripheral blood mononuclear cells of some blood donors. *J. Pineal Res.* 17: 164-169. 1994.
- Dryer S.E. y Henderson D.** A cyclic GMP-activated channel in dissociated cells of the chick pineal gland. *Nature.* 353: 756-758. 1991.
- Dryer S.E. y Henderson D.** Cyclic GMP-activated channels of the chick pineal gland: effects of divalent cations, pH, and cyclic AMP. *J. Comp. Physiol. A.* 172: 271-279. 1993.
- D'Souza T. y Dryer S.E.** Effects of phosphodiesterase inhibitors and forskolin on cyclic GMP-activated channels in intact isolated cells of the chick pineal gland. *Neurochem. Int.* 27: 527-533. 1995.
- Dubbels R.; Reiter R.J.; Klenke E.; Goebel A.; Schnakenberg E.; Ehlers C.; Schiwara H.W. y Schloot W.** Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Pineal Res.* 18: 28-31. 1995.
- Dubocovich M.L.** Pharmacological characterization of melatonin binding sites. *Adv. Pineal Res.* 5: 167-173. 1991.
- Ebihara S.; Oshima I.; Yamada H.; Goto M. y Sato K.** In Comparative Circadian Clocks. (Eds: Hiroshige T. y Honma K.): 84-94. Hokkaido Univ. Press. Sapporo. 1987.
- Ebisawa T.; Karne S.; Lenner M.R. y Reppert S.M.** Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 6133-6137. 1994.

- Ekstrom P. y Vanecek J.** Localization of 2-(¹²⁵I) iodomelatonin binding sites in the brain of the Atlantic salmon, *Salmo salar L.* *Neuroendocrinology.* 55: 529-537. 1992.
- Englard S. y Seifter S.** The biochemical functions of ascorbic acid. *Ann. Rev. Nutr.* 6: 356-406. 1986.
- Esquivel P.; Rivas C.; Mena M.; Barria M. Y Folch H.** Age related capacity of neuroendocrine factors to differentiate T cells *in vitro.* *Immunology.* 75: 99-102. 1992.
- Everitt A.V. y Burgess J.A.** (Eds). Hypothalamus pituitary and aging. Charles C. y Thomas Springfield I.L. 1976.
- Fabris N.** Neuroendocrine-immune interactions: a theoretical approach to aging. *Arch. Gerontolo. Geriatr.* 12: 219-230. 1991.
- Fabris N.** Neuroendocrine regulation of immunity. *Adv. Pineal Res.* 7: 41-56. 1994.
- Falcon J.; Marmillo J.B.; Claustrat B. y Collin J.P.** Regulation of melatonin secretion in a photoreceptive pineal organ: an *in vitro* study in the pike. *J. Neurosci.* 9: 1943-1950. 1989.
- Falcon J. y Begay V.** The vertebrate photoreceptor: a cellular circadian clock. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 839: 279-283. 1998.
- Falcon J.; Brun-Marmillon J.; Claustrat B. y Collin J.P.** Melatonin production in organ cultured chicken pineal: modulation by adenosine and its analogs. *Pflugers Arch.* 413: 93-95. 1988.
- Falcon J.; Thibault C.; Blázquez J.L.; Ling N. y Collin J.P.** Atrial natriuretic factor increases cyclic GMP and cyclic AMP levels in a directly photosensitive pineal organ. *Pflügers Arch. (Eur. J. Physiol.).* 417: 243-245. 1990.

- Falcon J.; Thibault C.; Martín C.; Brun-Marmillon J.; Claustrat B. y Collin J.P.** Regulation of melatonin production by catecholamines and adenosine in a photoreceptive pineal organ. An in vitro study in the pike and the trout. *J. Pineal Res.* 11: 123-134. 1991.
- Falcon J.; Thibault C.; Bégay V.; Zachmann A. y Collin J.P.** Regulation of the rhythmic melatonin secretion by fish pineal photoreceptor cells. In: Rhythms in Fishes, 167-198. Ed. Ali M.A. *Plenum Press. New York.* 1992.
- Falcon J.; Van Camp G. y Collin J.P.** Adenosine A2 receptor-mediated stimulation of cyclic AMP in cultured chicken pineal cells. *J. Pineal Res.* 19: 72-78. 1995.
- Ferguson F.G.; Wikby P.; Maxson P.; Olsson J. y Johansson B.** Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people: a comparasion between survivors and nosurvivors. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 50: B378-B382. 1995.
- Fernandes G.; Carandente F.; Halberg E.; Halberg F. y Godd R.A.** Circadian rhythm in activity of lympholytic natural killer cells from spleens of Ffisher rats. *J. Immunol.* 123: 622-625. 1979.
- Ferrini R.L. y Barret-Connor E.** Sex hormones and age: A cross-selectional study of testosterone and estradiol and their bioavailable fractions in community-dwelling men. *Am. J. Epidemiol.* 147: 750-754. 1998.
- Finocchiaro L.M.; Arzt E.S.; Fernandez-Castelo S.; Criscuolog M.; Finkielman S. y Nahmod V.E.** Serotonin and melatonin síntesis in peripheral blood mononuclear cells: stimulation by interferon-gamma as part of and immunomodulatory pathway. *J. Interferon Res.* 8: 705-716. 1988.
- Finocchiaro L.M.; Nahmod V.E. y Launay J.M.** Melatonin biosíntesis and metabolism in peripheral blood mononuclear leucocytes. *Biochem. J.* 280(Pt3): 727-31. 1991.

- Finocchiaro L.M.; Polack E.; Nahmod V.E. y Glinkin G.C.** Sensitivity of human peripheral blood mononuclear leukocytes to visible light. *Life Sci.* 57: 1097-1110. 1995.
- Fjaerli O.; Lund T. y Osterud B.** The effect of melatonin on cellular activation processes in human blood. *J. Pineal Res.* 26: 50-55. 1999.
- Flescher E.; Ledbetter J.A.; Schieven G.L.; Vela-Roch N.; Fossum D.; Dang H.; Ogawa N. y Talal N.** Longitudinal exposure of human T lymphocytes to weak oxidative stress suppresses transmembrane and nuclear signal transduction. *J. Immunol.* 153: 4880-4889. 1994.
- Fleming J.; Miquel J.; Cotrell S.F.; Yengoyan L.S. y Economos A.C.** Is cell aging caused by respiration-dependent injury to the mitochondrial genome?. *Gerontology.* 28: 44-53. 1982.
- Fleming J.; Quattrochi E.; Latter G.; Miquel J.; Marcuson R.; Zuckerkandi E. y Bench K.G.** Age-dependent changes in proteins of *Drosophila melanogaster*. *Science.* 231: 1157-1159. 1986.
- Foá A. y Menaker M.** Contribution of the pineal and retinae to the circadian rhythms of circulating melatonin in pigeons. *J. Comp. Physiol.* 164: 25-30. 1988.
- Fox A.J. y Solomon J.B.** Chicken non-lymphoid leukocytes. In *Avian Immunology*. (Ed). Rose M.E.; Payne L.N. y Freman M. 135-166. Edinburgh. Poultry Science Ltd. 1981.
- Fowler G.; Daroszewska M. y Ingold K.U.** Melatonin does not directly scavenge hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* 34. 77-83. 2003.
- Frokiš V.V.** Aging and life prolonging processes. Vienna, New York: Springer-Verlag. 1982.

- Fujiwara M.; Shibata Y.; Watanabe T.; Nukiwa T.; hirata F.; Mizuno N. y Hayaishi O.** Indolamina 2,3-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 253: 6081-6085. 1978.
- Furumoto K.; Inoue E.; Nagao N.; Hiyama E. y Miwa N.** Age-dependent telomere shortening is slowed down by enrichment of intracellular vitamin C via supresión of oxidative stress. *Life Sci.* 63: 935-948. 1998.
- Gabella G.** Fall in the number of myenteric neurons in aging guinea pigs. *Gastroenterology.* 96: 1487-1493. Erratum in: *Gastroenterology.* 94: 1072. 1989.
- Gagnerault M.C.; Touraine P.; Savino W.; Kelly P.A. y Dardenne M.** Expression of prolactin receptors in murine lymphoid cells in normal and autoimmune situations. *J. Immunol.* 150: 5673-5681. 1993.
- García-Mauriño S.; González-Haba M.G.; Calvo J.R.; Raffi-El-Idrissi M.; Sánchez-Margalet V.; Goberna R. y Guerrero J.M.** Melatonin enhances IL-2, IL-6 and IFN γ production by human circulating CD4⁺ cells: A posible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type I lymphocytes and monocytes. *J. Immunol.* 159: 574-581. 1997.
- García-Mauriño S.; Gonzalez-Haba M.G.; Calvo J.R.; Goberna R. y Guerrero J.M.** Involvement of nuclear binding sites for melatonin in the regulation of IL-2 and IL-6 production in human blood mononuclear cells. *J. Neuroimmunol.* 92: 76-84. 1998.
- García-Mauriño S.; Pozo D.; Carrillo-Vico A.; Calvo J.R. y Guerrero J.M.** Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-2 production. *Life Sci.* 65: 2143-2150. 1999.
- García-Mauriño S.; Pozo D.; Carrillo-Vico A.; Calvo J.R. y Guerrero J.M.** Correlation between nuclear melatonin receptors expresión and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines. *J. Pineal Res.* 29: 129-137. 2000.

- Gauer F.; Masson M.; Pevet D.J.; Stechle J. y Pevet P.** Daily variations in melatonin receptor density of rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei are distinctly regulated. *Brain Res.* 641: 92-98.1994.
- Gerschaman R.; Gilbert D.L.; Nye S.W.; Dwyer P. y Fenn W.O.** Oxygen poisoning and X irradiation: a mechanism in common. *Science.* 119: 623-626. 1954.
- Gilad E.; Wong H.R.; Zingarelli B.; Virag L.; O'Connor M.; Salzman A.L. y Szabo C.** Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: Role of inhibition of NFkB activation. *FASEB J.* 12: 685-693. 1998.
- Ginaldi L.; De Martinis M.; D'Ostilio A.; Marini L.; Loreto M.F.; Corsi M.P. y Quaglino D.** The immune system in the elderly: I. Specific humoral immunity. *Immunol. Res.* 20: 101-108. 1999a.
- Ginaldi L.; De Martinis M.; D'Ostilio A.; Marini L.; Loreto M.F.; Martorelli V. y Quaglino D.** The immune system in the elderly. II Specific celular immunity. *Immunologic Res.* 20: 109-115. 1999b.
- Ginaldi L.; De Martinis M.; D'Ostilio A.; Marini L.; Loreto M.F. y Quaglino D.** The immune system in the elderly: III. Innate immunity. *Immunol. Res.* 20: 117-126. 1999c.
- Giordano M. y Palermo M.S.** Melatonin-induced enhancement of antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Pineal Res.* 10: 117-121. 1991.
- Giordano M.; Vermeulen M. y Palermo M.S.** Seasonal variations in antibody-dependent cellular cytotoxicity regulation by melatonin. *FASEB J.* 7: 1052-1054. 1993.
- Gitto E.; Tan D.X.; Reiter R.J.; Karbownik M.; Manchester L.C.; Cuzzocrea S.; Fulia F. y Barberi I.** Individual and synergistic actions of melaton: Studies with

vitamin E, vitamin C, glutathione and desferoxamine in liver homogenates. *J. Pharm. Pharmacol.* 53: 1393-1401. 2001.

Goetzl E.J. y Sreedharan S.P. Mediators of communication and adaptation in the neuroendocrine and immune systems. *FASEB J.* 6: 2646-2652. 1992.

Goldschmidt M.C.; Masin W.S.; Brown L.R. y Wyde P.R. The effect of ascorbic acid deficiency on leukocyte phagocytosis and killing of *Actinomyces viscosus*. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 58: 326-334. 1988.

Goldstenin I.M. Células fagocíticas: funciones quimiotácticas y efectores de los macrófagos y los granulocitos. II. Granulocitos. En: *Inmunología básica y clínica*. (Ed). Suites D.P.; Fudenberg H.M.; Stovo J.D. y Wells J.V.: 114-118. 1985.

González G. y Valladali M. El tercer ojo y los ritmos biológicos de los vertebrados. (Incluida la especie humana). Madrid. 1994.

González G. y Valladali M. Ultraestructura de la glándula pineal de aves. *Trab. Inst. Cajal Inv. Biol.* 58: 55-67. 1996.

Gonzalez-Haba M.G.; García-Mauriño S.; Calvo J.R.; Goberna R. y Guerrero J.M. High-affinity binding of melatonin by human circulating T lymphocytes (CD4+). *FASEB J.* 9: 1331-1335. 1995.

Goto K.; Yamagata K.; Miki N. y Kondo H. Direct photosensitivity of chick pinealocytes as demonstrated by visinin immunoreactivity. *Cell Tissue Res.* 262: 501-505. 1990.

Govitrapong P.; Pariyanonth M. y Ebadi M. The presence and actions of opioid receptors in bovine pineal gland. *J. Pineal Res.* 13: 124-132. 1992.

Grad B.R. y Rozenzweig R. The role of melatonin and serotonin in aging: update. *Psychoneuroendocrinology.* 18: 283-295. 1993.

- Guerrero J.M. y Reiter R.J.** Melatonin-Immune system relationships. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2: 167-179. 2002.
- Guerrero J.M.; López-González M.A.; Osuna C. y Calvo J.R.** Specific binding of melatonin by immunocompetent cells in human and rodents. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 719: 369-377. 1994.
- Guerrero J.M.; García-Mauriño S.; Gil-Haba M.; Rafii-El-Idrissi M.; Pozo D.; García-Perganeda A. y Calvo J.R.** Mechanisms of action on the human immune system: membrane receptors versus nuclear receptors. En: *Therapeutic potential of the Pineal Hormone Melatonin*. (Eds). Maestron G.J.M.; Conti A. y Reiter R.J. Krager, Basel, Switzerland. 43-52. 1996.
- Guyton y Hall.** Tratado de Fisiología Médica. 9 edición. McGraw-Hill. Interamericana. 1997.
- Gwinner E.; Hau M. y Heigl S.** Melatonin: generation and modulation of avian circadian rhythms. *Brain Res. Bull.* 44: 439-444. 1997.
- Hadley M.E.** Papel endocrino de la glándula pineal. En: *Endocrinología*. Prentice Hall.: 535-557. 1997.
- Haldar C.; Sing R. y Guchhait P.** Relationship between the annual rhythms in melatonin and immune system status in the tropical palm squirrel, *Fananiulus penalti*. *Chronobiol. Int.* 18: 61-69. 2001.
- Halliwell B. y Aruoma O.I.** DNA damage by oxygen-derived species. *FEBS Lett.* 281: 9. 1991.
- Hardeland R.** The presence and function of melatonin and structurally related indoleamines in a dinoflagellate, and a hypothesis on the evolutionary significance of these tryptophan metabolites in unicellulars. *Experientia.* 49: 614-622. 1993.

- Hardeland R.** Melatonin and 5-methoxytryptamine in non-metazoans. *Reprod. Nutr. Dev.* 39: 399-408. 1999.
- Hardeland R. y Poeggeler B.** Non-vertebrate melatonin. *J. Pineal Res.* 34: 233-241. 2003.
- Hardeland R.; Reiter R.J.; Poeggeler B. y Tan D.X.** The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidant protection and formation of bioactive substances. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17: 347-357. 1993.
- Hardeland R.; Balzer I.; Poeggeler B.; Fuhrber B.; Uría H.; Behrmann G.; Wolf R.; Meyer T.J. y Reiter R.J.** On the primary functions of melatonin in evolution: mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation, and scavenging of free radicals. *J. Pineal Res.* 18: 104-111. 1995.
- Harley C.B.; Futcher A.B. y Greider C.W.** Telomeres shorten during aging of human fibroblast. *Nature.* 345: 458-460. 1990.
- Harman D.** Aging: a theory based on free radicals and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11: 298-300. 1956.
- Harman D.** Free radical theory of aging. *Mutat. Res.* 275: 257-266. 1992.
- Hartmann L.; Roger M.; Lamaitre B.J.; Massias J.F. y Chaussain J.L.** Plasma and urinary melatonin in male infants during the first 12 months of life. *Clin. Chim. Acta.* 121: 37-42. 1982.
- Hartiala K.T.; Scott I.G.; Viljanen M.K. y Akerman K.E.** lack of correlation between calcium modulation induced by chemotactic factors in rabbit polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144: 794-800. 1987.
- Haslett C.; Savill J.L. y Meagher L.** The neutrophil. *Current opinion in Immunology.* 2: 10. 1989.

- Hattori A.; Migataka H.; Iigo M.; Itoh M.; Yamamoto K.; Ohtani-Kaneko R.; Hara M.; Suzuki T. y Reiter R.J.** Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 35: 627-634. 1995.
- Haus E.; Lakouta D.J.; Swoyer J. y Sackett-Lunden L.** Chronobiology in haematology and Immunology. *Am. J. Anat.* 168: 467-517. 1983.
- Hayflick L.** Recent advances in the cell biology of aging. *Mech. Ageing Dev.* 14: 59-79. 1980.
- Heubner O.** Tumor der glandula pinealis, tsch. *M. Tsch. Med. Wschr.* 24: 214-220. 1898.
- Hiddinga H.J.; Isaak D.D. y Lewis R.V.** Enkephalin-containing peptides processed from proenkephalin significantly enhance the antiviral-forming cell responses to antigens. *J. Immunol.* 152: 3748-3758. 1994.
- Hodges R.** The histology of the chicken. London Academic Press. 1974.
- Holmgren U.** On the structure of the pineal area of teleost fishes with special reference to a few deep sea fishes. *Göteborgs Kungl. Vetensk. Vitterhets-Samh. Handl. Ser. B.* 8: 1-66. 1959.
- Homo-Delarche F. y Dardenne M.** The neuroendocrine-immune axis. *Springer Semin. Immunopathol.* 14: 221-238. 1993.
- Huether G.; Poeggeler B.; Reimer A. y George A.** Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life Sci.* 51: 945-53. 1992.

- Iguchi H.; Kato K.I. y Ibayashi H.** Melatonin serum levels and metabolic clearance rate in patients with liver cithosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 54: 1025-1027. 1982.
- Illnerova H.; Backstrom M.; Saaf J.; Wetterberg L. y Vangbo B.** Melatonin in rat pineal gland and serum: rapid parallel decline after light exposure at night. *Neurosci. Lett.* 9: 189-193.1978.
- Illnerova H.; Hoffman J. y Vanecek J.** Adjustment of the rat pineal N-acetyltransferase rhythm to change from long to short photoperiod depends on the direction of the extension of the dark period. *Brain Res.* 362: 403-408.1986.
- Illnerova H.; Sumova A.; Travnickovs Z.; Jac M. y Jelinkova D.** Hormones, subjective night and season of the year. *Physiol. Res.* 49: 1-10. 2000.
- Itoth M.T.; Idhizuka B.; Kudo Y.; Fusama S; Amemiya A. y Sumi Y.** Detection of melatonin and serotonin N-acetyltransferase and hydroxyndole-O-methyltransferase activities in rat ovary. *Mol. Cell. Endocrinol.* 136: 7-13. 1997.
- Itoth M.T.; Ishizuka B.; Kuribayashi A.; Amemiya A. y Sumi Y.** Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. *Mol. Hum. Reprod.* 5: 402-408.1999.
- Iwase S.; Mano T.; Watanabe T.; Saito M. y Kobayashi F.** Age-related changes of sympathetic outflow to muscles in humans. *J. Gerontol.* 46: 111-145. 1991.
- Jankovic B.D.; Knevic Z.; Kojic L. y Nikolic V.** Pineal gland and immune system. Immune fuctions in the chick embryo pinealetomized at 96 hours of incubation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 719: 398-409. 1994.
- Karasek M.** Melatonin in humans: Where we are 40 years after its discovery. *Neuroendocrinol. Lett.* 20: 179-188. 1999.

- Karasek M. y Reiter R.J.** Melatonin and aging. *Neuroendocrinology Letters* 23: 14-16. 2002.
- Karasek M.; Lewinski A. y Reiter R.J.** Melatonina: znaczenie kliniczne i zastosowanie terapeutyczne. (melatonin: Clinical significance and therapeutic application) (In Polish with English abstract) *Endokrynol. Pol – Pol. J. Endocrinol.* 52: 81-100. 2001.
- Karnousky M.L.; Simmons S.R.; Glass E.A.; Shale A.W. y D'Arcy-Hart P.** Metabolism of macrophages. In: Mononuclear phagocytes. (Ed). Van Furth. 103-120. Blackwell Publishing Co. Ltd. Oxford. England. 1975.
- Kasal C.A.; Menaker M. y Perez-Polo J.R.** Circadian clock in cultura: N-acetyltransferase activity of chick pineal glands oscillates *in vitro*. *Science*. 203: 656-658. 1979.
- Kaufmann S.H.** Immunity to bacteria and fungi. *Current opinion in Immunology*. 1: 431. 1989.
- Kennaway D.J. y Wright H.** Melatonin and circadian rhythms. *Curr. Top. Med. Chem.* 2: 199-209. 2002.
- Kennaway D.J.; Stamp G.E. y Goble F.C.** Development of melatonin production in infants and impact of prematurity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75: 367-369. 1992.
- Kitay J.I. y Altschule D.** The pineal gland. Cambridge, Mass: Harvard University Press. 1954.
- Klebanoff S.J.** Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann. Inter. Med.* 93: 480-489. 1980.
- Klein D.C. y Weller J.L.** Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Science*. 177: 532-533. 1970.

- Klein D.C.; Roseboom P.H.; Donohue S.J. y Marrs B.L.** Evolution of melatonin as a night signal: contribution from a primitive photosynthetic organism. *Mol. Cell. Neurosci.* 3: 181-183. 1992.
- Klein D.C.; Coon S.L.; Roseboom P.H.; Weller J.L.; Bernard M.; Gastell J.A.; Zatz M.; Iuvon P.M.; Rodriguez ion J.; Cahill G.M.; Cassone V.M. y Baler R.** The melatonin rhythm-generating-enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent. Prog. Horm. Res.* 52: 307-357. 1997.
- Kliger C.A.; Gehad A.E.; Hulet R.M.; Roush W.B.; Lillehoj H.S. y Mashaly M.M.** Effects of photoperiod and melatonin on lymphocyte activities in male broiler chickens. *Poult. Sci.* 79: 18-25. 2000.
- Kohn R.R.** Principles of mammalian aging (2^a Ed). Englewoods Cliffs NY. 1978.
- Kokkola T. y Laitinen.** Melatonin receptor genes. *Ann. Med.* 30: 88-94. 1998.
- Konakchieva R.; Kyurkchiev S.; Kehayov I.; Taushanova P. y Kanchev L.** Selective effect of methoxyindoles on the lymphocyte proliferation and melatonin binding to activated human lymphoid cells. *J. Neuroimmunol.* 63: 125-132. 1995.
- Kopin I.J.; Pare C.M.B.; Axelrod J. y Weissbach H.** The fate of melatonin in animals. *J. Biol. Chem.* 236: 3072-3073. 1961.
- Korf H.W.; White B.H.; Schaad N.C. y Klein D.C.** Recoverin in pineal organs and retinae of various vertebrate species including man. *Brain Res.* 595: 57-66. 1992.
- Krall J.F.; Connelly M.; Weisbart R. y Tuck M.L.** Age-related elevation of plasma catecholamine concentration and reduced responsiveness of lymphocyte adenylate cyclase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 52: 863-867. 1981.

- Kramer J. y Ben-David M.** Prolactin supresión by (-) delta-9-tetrahydrocannabinol (THC): involvement of serotonergic and dopaminergic pathways. *Endocrinology*. 103: 452-457. 1978.
- Kuci S.; Becker J.; Veit G.; Hangretinger R.; Attanasio A.; Bruchelt G.; Treuner J.; Niethammer D. y Gupta D.** Circadian variations in the immunomodulatory role of the pineal gland. *Neuroendocrinol. Lett.* 10: 65-79. 1988.
- Laitinen J.T. y Saavedra J.M.** Characterization of melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nuclei: modulation of affinity with cations and guanine nucleotides. *Endocrinology*. 126: 2110-2115. 1990.
- Laitinen J.T.; Castren E.; Vakkuri O. y Saavedra J.M.** Diurnal rhythm of melatonin biding in the rat suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology*. 124: 1585-1587. 1989.
- Laitinen J.T.; Flügge G. y Saavedra J.M.** Characterization of melatonin receptors in the rat area postrema: Modulation of affinity with cations and guanine nucleotides. *Neuroendocrinology*. 51: 619-624. 1990.
- Launay J.M.; Lamaitre B.J.; Husson H.P.; Dreux C.; Hartmann L. y Da Prada M.** Melatonin síntesis by rabbit platelests. *Life Sci.* 31: 1487-1494. 1982.
- Lerner A.B. y Norklund J.J.** Comment. Administration of melatonin to human subjects. In: *Frontiers of Pineal Physiology*. 42-43. (Eds). Altschule M.D. Cambridge Press. 1975.
- Lener A.B.; Case J.D. y Takahaski Y.** Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocyte. *J. Amer. Chem. Soc.* 80: 2587-2594. 1958.
- Lerner A.B.; Case J.D. y Takahashi Y.** Isolation of melatonin and 5-methoxyndole-3-acetic acid from bovine pineal gland. *J. Biol. Chem.* 235: 1992-1997. 1960.
- Levi F.; Canon C.; Depres-Brummer P.; Adam R.; Bourin P.; Pati A.; Florentin I.; Missset J.L. y Bismuth H.** The rhythmic organization of the immune network:

implication for the chronopharmacologic delivery of inteferons, interleukins and cyclosporin. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 9: 85-112. 1992.

Levine M. New concepts in the biology and chemistry of ascorbic acid. *New. Engl. J. Med.* 3: 892-902. 1986.

Li X.J.; Gu J. y Lu S.D. Melatonin attenuates MPTP-induced dopaminergic neuronal injury associated with scabenging hydroxyl radical. *J. Pineal Res.* 32: 47-52. 2002.

Liebmann P.M.; Hofer D. Felsner P.; Wölfler A. y Schauenstein K. Beta-blockade enhances adrenergic immunosuppression in rats via inhibition of melatonin release. *J. Neuroimmunol.* 67: 137-142. 1996.

Liebmann P.M.; Wolfler A.; Felsner P.; Hofer D. y Schauenstein K. Melatonin and the immune system. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 112: 203-211. 1997.

Lissoni P.; Marelli O.; Mauri R.; Resentini M.; Franco P.; Esposti D.; Esposti G.; Frascini F.; Halberg F.; Sother R. y Cornélissen G. Ultradian chronomodulation by melatonin of placebo effecto upon human killer cell activity. *Chronobiologia.* 13: 339-343. 1986.

Liu F.; Ng T.B. y Fung M.C. Pineal indoles stimulate the gene expression of immunomodulating cytokines. *J. Neural. Transm.* 108: 397-405. 2001.

Ljungquist B.; Berg S. y Steen B. Determinants of survival: an analysis of the effects of age at observation and legth of the predictive period. *Aging. (Milano).* 8: 22-31. 1996.

López-González M.A.; Calvo J.R.; Osuna C.; Rubio A. y Guerrero J.M. Melatonin potentiates cyclic AMP production stimulated by vasoactive intestinal peptide in human lymphocytes. *Neurosci. Lett.* 136: 150-152. 1992.

- López-González M.A.; Guerrero J.M.; Sánchez B. y Delgado F.** Melatonin retores and enhances the human type B tonsillar lymphocyte subset in recurrent acute tonsillitis. *Neurosci. Lett.* 247: 131-134. 1998.
- Madden K.S.; Rajan S.; Bellinger D.L.; Felten S.Y. y Felten D.L.** Age-associated alterations is sympathetic neural interactions with the immune system. *Dev. Comp. Immunol.* 21: 479-486. 1997
- Maestroni G.J.M.** T-helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin. *J. Pineal Res.* 18: 84-89. 1995.
- Maestroni G.J.M. y Conti A.** The pineal neurohormone melatonin stimulates activated CD4+, Thy-1+ cells to release opioid agonista (s) with immunoenhancing and anti-stress properties. *J. Neuroimmunol.* 28: 167-176. 1990.
- Maestroni G.J.M.; Conti A. y Pierpaoli W.** Role of pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response an antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. *J. Neuroimmunol.* 13: 19-30. 1986.
- Maestroni G.J.M.; Conti A. y Pierpaoli W.** Role of pineal gland in immunity: II. Melatonin enhances the antibody response via an opiatergic mechanism. *Clin. Exp. Immunol.* 68: 384-391. 1987.
- Maestroni G.J.M.; Conti A. y Pierpaoli W.** Role of the pineal gland in immunity: III Melatonin antagonizes the immunosuppressive effect of acute stress via an opiatergic mechanism. *Immunology.* 63: 465-469. 1988.
- Maestroni G.J.M.; Covacci V. y Conti A.** Hematopoietic rescue via T-cell-dependent, endogenous granulocytes-macrophages colony-stimulating factor induced by the pineal neurhormone melatonin in tumor-bearing mice. *Cancer Res.* 54: 2429-2432. 1994.

- Maestroni G.J.M.; Hertens E.; Galli P.; Conti A. y Pedrinis E.** Melatonin-induced T-helper cell hematopoietic cytokines resembling both interleukine-4 and dynorphin. *J. Pineal Res.* 21: 131-139. 1996.
- Maestroni G.J.M.; Zammaretti F. y Pedrinis E.** Hematopoietic effect of melatonin involvement of type 1 k-opioid receptor of bone marrow macrophages and interleukin-1. *J. Pineal Res.* 27: 145-153. 1999.
- Makino R.; Tanaka T.; Lizaca T.; Ishimura y Kanagasaki S.** Stoichiometric conversion of during oxygen to superoxide anion during the respiratory burst in neutrophils. Direct evidence by a new method for measurement of superoxide anion with diacetyldeuterioheme-substituted horseradish peroxidase. *J. Biol. Chem.* 261: 1444-1447. 1986.
- Markowska M.; Bialecka B.; Ciechanowska M.; Koter Z.; Laskowska H.; Karkucinska-Wieckowska A. y Skwarlo-Sonta K.** Effect of immunization on nocturnal NAT activity in chicken pineal gland. *Neuroendocrinol. Lett.* 21: 367-373. 2000.
- Markowska M.; Waloch M. y Skwarlo-Sonta K.** Melatonin inhibits PHA-stimulated chicken lymphocyte proliferation in vitro. *J. Pineal Res.* 30: 220-226. 2001.
- Marshall K.A.; Reiter R.J. y Poeggeler B.** Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro. *Free Radic. Biol. Med.* 21: 307-315. 1996.
- Matusak Z.; Reszka K. y Chignell C.F.** Reaction of melatonin and related indoles with hydroxyl radical: EPR and spin trapping investigations. *Free Radic. Biol. Med.* 23: 367-372. 1997.
- Max M.; McKinnon P.J.; Sidenman K.J.; Barret R.K.; Applebury M.L.; Takahashi J.S. y Margolskee R.F.** Pineal opsin: a nonvisual opsin expressed in chick pineal. *Science.* 267: 1502-1506. 1995.

- Maxwell M.H.** Leucocyte diurnal rhythms in normal and pinealectomised juvenile female fowls. *Res. Vet. Sci.* 31: 113-115. 1981.
- Maxwell M.H.** The distribution and localization of acid trimetaphosphatase in developing heterophils and eosinophils in the bone marrow of the fowl and the duck. *Cell. Tissue Res.* 235: 171-176. 1984a.
- Maxwell M.H.** Histochemical identification of tissue eosinophils in the inflammatory response of the fowl (*Gallus domesticus*). *Res. Vet. Sci.* 37: 7-11. 1984b.
- Mayo J.C.; Sainz R.M.; Antolin I.; Herrera F.; Martin V. y Rodriquez C.** Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expresión. *Cell. Mol. Life Sci.* 59: 1706-1713. 2002.
- Mayo J.C.; Tan D.X.; Sainz R.M.; López-Burillo S. y Reiter R.J.** Oxidative damage to catalase induced by peroxy radicals: Functional protection by melatonin and other antioxidants. *Free Radic. Res.* 37: 543-553. 2003.
- McArthur W.P.** Effect of aging of immunocompetent and inflammatory cells. *Periodontology.* 2000 16: 53-79. 1998.
- McArthur A.J.; Hunt A.E. y Gillette M.U.** Melatonin action and signal transduction in the rat suprachiasmatic circadian clock: activation protein kinase C at dusk and dawn. *Endocrinology.* 138: 627-634. 1997.
- Mc Call G.E.; Chatelet L.R.; Cooper M.R. y Ashburn P.** The effects of ascorbic acid on bactericidal mechanism of neutrophils. *J. Infect. Dis.* 124: 194-197. 1971.
- McCord C.P. y Allen F.P.** Evidence associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J. Exp. Zool.* 23: 207-224. 1917.
- McFarland R.A.** Human factors in air transportation: occupational health and safety. New York: McGraw-Hill. 1953.

- McMillen I.C. y Nowac R.** Maternal pinealectomy abolishes the diurnal rhythm in plasma melatonin concentration in the fetal sheep and pregnant ewe during late gestation. *J. Endocrinol.* 120: 459-464. 1989.
- Medvedev Z.A.** An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol. Rev.* 65: 375-398. 1990.
- Meissl H.; Kroeber S.; Yanez J. y Korf H.W.** Regulation of melatonin production and intracellular calcium concentrations in the trout pineal organ. *Cell. Tissue Res.* 286: 315-323. 1996.
- Meites J.; Goya R. y Takahashi S.** Why the neuroendocrine System is important in aging processes?. *Exp. Gerontol.* 22: 1-15. 1986.
- Menendez-Pelaez A.; Poeggeler V.; Reiter R.J.; Barlow-Walden L.R.; Pablos M.I. y Tan D.X.** Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: Immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J. Cell. Biochem.* 53: 572-582. 1993.
- Meydani S.N.; Barklund M.P.; Liu S.; Meydani M.; Miller R.A.; Cannon J.G.; Morrow F.D.; Rocklin R. y Blumberg J.B.** Vitamin E supplementation enhances cell-mediated immunity in healthy elderly subjects. *Am. J. Clin Nutr.* 52: 557-563. 1990.
- Meydani S.N.; Meydani M.; Blumberg J.B.; Ieka L.S.; Siber G.; Loszewski R.; Thompson C.; Pedrosa M.C.; Diamond R.D. y Stollar B.D.** Vitamin E supplementation and in vivo immune response in healthy elderly subjects. A randomized controller trial. *JAMA.* 277: 1380-1386. 1997.
- Meyer B.J.; Moncrieff J.; Steyn M.E.; Hurter P. y Joubert W.S.** Abnormally high plasma melatonin levels in an adult male of normal maturation [letter]. *S. Afr. Med. J.* 78: 288-289. 1990.

- Meyer K.C.; Ershler W.; Rosenthal N.S.; Lu X.G. y Peterson K.** Immune dysregulation in the aging human lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153: 1072-1079. 1996.
- Meyer K.C.; Rosenthal N.S.; Soergel P. y Peterson K.** Neutrophils and low-grade inflammation in the seemingly normal aging human lung. *Mech. Ageing Dev.* 104: 169-181. 1998.
- Michl J.; Pieczonka M.M.; Unkeless J.C.; Bell G.I. y Silverstein S.C.** Fc receptor modulation in mononuclear phagocytes maintained on immobilized immune complexes occurs by diffusion of the receptor molecule. *J. Exp. Med.* 157: 2121. 1983.
- McLeod J.D.** Apoptotic capability in ageing T cells. *Mech. Ageing Dev.* 121: 151-159. 2000.
- Miller R.A.** The aging immune system: primer and prospectus. *Science.* 273: 70-74. 1996.
- Minot C.S.** The problem of age, growth and death. *Popular Science Monthly.* 71: 509. 1907.
- Miquel J.** Envejecimiento celular y molecular. Teorías de envejecimiento. En: Manual de Geriatria. Salgado A. y Guillén F. (Eds). Barcelona: Salvat. Cap. 1: 1-18. 1990.
- Miquel J.** An integrated theory of aging has the result of mitochondrial DNA mutation in differentiated cells. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 12: 99-117. 1991.
- Miquel J.** An update on the mitochondrial-DNA mutation hypothesis of cell aging. *Mut. Res.* 275: 209-216. 1992.
- Miquel J.** Envejecimiento celular y molecular. Teorías del envejecimiento. En: Manual de Geriatria. 3ª Edición. Salgado A. y Guillén F. (Eds). Barcelona: Salvat Cap.: 1-3. 2001.

- Miquel J. y Fleming J.** A two sep hipótesis on the mechanism of in vitro cell aging: cell differentiation followed by intrinsic mitochondrial mutagenesis. *Exp. Gerontol.* 19: 31-36. 1983.
- Miquel J.; Economos A.C.; Fleming J. y Jonson J.E.J.** Mitochondrial role in cell aging. *Exp. Gerontol.* 15: 575-591. 1980.
- Mirshahi M.; Faure J.P.; Brisson P.; Falcon J.; Guerlotte J. y Collin J.** S-antigen immunoreactivity in retinal rods and cones and pineal photosensitive cells. *Biol. Cell.* 52: 195-198. 1984.
- Mocchegiani E.; Bulian D.; Santerelli L.; Tibaldi A.; Muzziolo M.; Lesnikov V.; Pierpaoli W. y Fabris N.** The zinc pool is envolved in the immune-reconstituting effect of melatonin in pinealectomized mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 19: 463-468. 1993.
- Molinero P.; Soutto M.; Benot S.; Hmadcha A. y Guerrero J.M.** Melatonin is responsible for the nocturnal increase observed in serum and thymus of thymosi α_1 and thymulin concentrations: Observations in rats and humans. *J. Neuroimmunol.* 103: 180-188. 2000.
- Mollinedo F. y Schneider D.L.** Membrane fusion as a mechanism for activation of the superoxide generating system in human netrophils. In: Redox Funtions of the Eukariotic Plasma membrane. 232. (Ed). Ramirez J.M.C.S.C. Madrid. 1987.
- Moore C.B.; Siopes T.D.; Steele C.T. y Underwood H.** Pineal melatonin secretion, but not ocular melatonin secretion, is sufficient to maintain normal immune responses in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 126: 352-358. 2002
- Morgan P.J.; Lawson W.; Davodspm G. y Howell E.** Guanine nucleotides regulate the affinity of melatonin receptors on the ovine pars tuberalis. *Neuroendocrinology.* 50: 359-362. 1989.

- Mori W.; Aoyama H. y Mori N.** Melatonin protects rats from injurious effects of a glucocorticoid, dexamethasone. *Jpn. J. Exp. Med.* 54: 255-261. 1984.
- Morita Y.** Absence of electrical activity of the pigeon's in response to light. *Experientia.* 22: 402. 1966.
- Morrey K.M.; McLachan J.A.; Serkin C.D. y Bakouche O.** Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. *J. immunol.* 153: 2671-2680. 1994.
- Moser P.J. y Weber F.** Uptake of ascorbic acid by human granulocytes. *Int. J. Vitamin. Nutr. Res.* 54: 47-53. 1984.
- Mucha S.; Zylinska K.; Zerek-Melen G.; Swietoslowski J. y Stepien H.** Effect of interleukin-1 on in vivo melatonin secretion by the pineal gland in rats. *Adv. Pineal Res.* 7. 177-181. 1994.
- Murakami N.; Nakamura H.; Nishi R.; Maemoto N. y Nasu T.** Comparison of circadian oscillation of melatonin release in pineal cells of house sparrow, pingeon and Japanese quail, using cell perfusion systems. *Brain Res.* 651: 209-214. 1994.
- Murphy J.W.** Immunity to fungi. *Current opinion in Immunology.* 2: 360. 1990.
- Nathan C.F.** Respiratory burst in adherence human neutrophils: triggering by colony-stimulating factor CSF-GM and CSF-G. *Blood.* 73: 301-306. 1988.
- Nelson R.J. y Drazen D.L.** Melatonin mediates seasonal adjustments in immune fuction. *Reprod. Nutr. Dev.* 39: 383-398. 1999.
- Nelson R.J.; Demas G.E. y Klein S.L.** Photoperiod mediation of seasonal breeding and immune function in rodents: A multifactorial approach. *Amer. Zool.* 38: 226-237. 1998.

- Nielson C.P.** β -adrenergic nodulation of the polymorphonuclear leukocyte respiratory burst is dependent upon the mechanism of cell activation. *J. Immunol.* 139: 2392-2397. 1987.
- Oberley T.D. y Oberley L.W.** Oxygen radicals and cancer, in "Free Radicals in Aging" B.P. Yu (Ed). *CRC Press. Boca Raton.* 1993.
- Ogata K.; Yokose N.; Tamura H.; An E.; Nakamura K.; Dan K. y Nombra T.** Natural killer cells in the late decades of human life. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 84: 269-275. 1997.
- Okano T.; Yoshizawa T. y Fukada Y.** Pinopsin is a chicken pineal photoreceptive molecule. *Nature.* 372: 94-97. 1994.
- Okano T.; Yamazaki K.; Kasahara T. y Fukada Y.** Molecular cloning of heterotrimeric G-protein alpha-subunits in chicken pineal gland. *J. Mol. Evol.* 44: 91-97. 1997.
- Okatani Y.; Wakatsuki A.; Reiter R.J. y Miyahara Y.** Acutely administered melatonin restores hepatic mitochondrial physiology in old mice. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 35: 367-375. 2003.
- Okatani Y.; Wakatsuki A. y Reiter R.J.** Melatonin protects hepatic mitochondrial chain activity in senescence-accelerated mice. *J. Pineal Res.* 23: 143-148. 2002a.
- Okatani Y.; Wakatsuki A. y Reiter R.J.** Hepatic mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice: Correction by long-term, orally administered physiological levels of melatonin. *J. Pineal Res.* 33: 127-133. 2002b.
- Okatani Y.; Wakatsuki A.; Reiter R.J. y Miyahara Y.** Acutely administered melatonin restores hepatic mitochondrial physiology in old mice. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35: 367-375. 2003a.

- Okatani Y.; Wakatsuki A.; Reiter R.J.; Enzan H. y Miyahara Y.** Protective effective of melatonin against mitochondrial injury induced by ischemia and reperfusion of rat liver. *Eur. J. Pharmacol.* 469: 145-152. 2003b.
- O'Leary J.J. y Hallgren H.M.** Aging and Imphocyte function: a model for testing gerontológico hypotheses of aging in man. *Arch. Gerontol. Geriatri.* 12: 199-218. 1991.
- Olson C.** Variation in cells and haemoglobin content in blood of normal domestic chickens. *Cornell Vet.* 235. 1937.
- Orgel L.E.** The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*: 517-521. 1963.
- Ortega E.** Physiology and Biochemistry: Influence of exercise on phagocytosis. *Int. J. Sports Med.* 15: 172-178. 1994.
- Ortega E.; García J.J. y De la Fuente M.** Ageing modulates some aspects of the non specific immune response of murine macrophages and lymphocytes. *Exp. Physiol.* 85: 519-525. 2000.
- Osculati F.** Fine structural localization of acid phosphatase and arylsufatase in the chick heterophil leucocytes. *Z. Zellforsch Mikrosk Anat.* 109: 398-406. 1970.
- Pablos M.I.; Guerrero J.M.; Ortiz G.G.; Agapito M.T. y Reiter R.J.** Both melatonin and a putative nuclear receptor agonist CGP 52608 stimulate glutathione peroxidasa and glutathione reductasa activities in mouse brain in vivo. *Neuroendocrinol. Lett.* 18: 49-58. 1997.
- Paglieroni T.G. y Holland P.V.** Circannual variation in lymphocytes subsets, revisited. *Transfusion.* 34: 512-516. 1994.

- Pahlavani M.A. y Harris M.D.** In vitro effects of melatonin on mitogen-induced lymphocyte proliferation and cytokine expression in young and old rats. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 19: 327-337. 1997.
- Pappolla M.A.; Sos M.; Omar R.A.; Bixk E.J.; Hickson-Bick L.M.; Reiter R.J.; Efthimiopolos S. y Robakis N.K.** Melatonin prevents death of neuroblastoma cells exposed to the alzheimer amyloid peptide. *J. Neuroscience.* 17: 1683-1690. 1997.
- Pawalec G.** Immunosenescence: impact in the young as well as the old?. *Mech. Ageing Dev.* 108: 1-7. 1999.
- Persengiev S.P. y Kyurkchiev S.** Selective effect of melatonin on the proliferation of lumphoid cells. *Int. J. Biochem.* 25: 441-444. 1993.
- Petrovsky N. y Harrison L.C.** Diurnal rhythmicity of human cytokine production. A dynamic disequilibrium in T helper cell type 1/T helper cell type 2 balance?. *J. Immunol.* 158: 5163-5168. 1997.
- Pickard G.E. y Tang W.X.** Individual pineal cells exhibit a circadian rhythm in melatonin secretion. *Brain Res.* 627: 141-146. 1993.
- Pickar G.E. y Tang W.X.** Pineal photoreceptors rhythmically secrete melatonin. *Neurosci. Lett.* 171: 109-112. 1994.
- Pieri C.; Recchione R. y Moroni F.** Age-dependent modifications of mitochondrial trans-membrane potencial and mass in rat splenic lymphocytes during proliferation. *Mech. Ageing Dev.* 70: 201-212. 1993.
- Pieri C. ; Recchioni R.; Moroni F.; Marcheselli F.; Marra M.; Marinoni S. y Di Primio R.** Melatonin regulates the respiratory burst of human neutrophils and their depolarisation. *J. Pineal Res.* 24: 43-49. 1998.

- Pierpaoli W.** The pineal gland: a circadian or seasonal aging clock?. *Aging*. 3: 99-101. 1991.
- Pierpaoli W. y Maestroni G.J.M.** Melatonin: a principal neuroimmunomodulatory and anti-stress hormona: its anti-aging effects. *Immunol. Lett.* 16: 355-362. 1987.
- Pierpaoli W. y Regelson W.** Pineal control of aging: effect of melatonin and pineal grafting on aging mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 787-791. 1991.
- Pierpaoli W. y Lesnikov V.** Theoretical considerations on the nature of the pineal “aging clock”. *Gerontology*. 43: 20-25. 1997.
- Pioli C.; Caroleo M.C.; Nistico G. y Doria G.** Melatonin increases antigen presentation and amplifies specific and non specific signals for T-cell proliferation. *Int. J. Pharmacol.* 15: 463-468. 1993.
- Poeggeler B.; Balzer I.; Hardeland R. y Lerichl A.** Pineal hormone melatonin oscillates also in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Naturwissenschaften*. 78: 268-269. 1991.
- Poeggeler B.; Saarela B.; Reiter R.J.; Tan D.X.; Chen L.D.; Manchester L.C. y Barlow-Walden L.R.** Melatonin- a highly potent endogenous radiacal scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 738: 419-420. 1994.
- Poeggeler B.H.; Barlow-Walden L.R.; Reiter R.J.; Saarela S.; Menendez-Pelaez A.; Yag.; Manchester L.C.; Chen L.D. y Tan D.X.** Red-light-induced supresión of melatonin synthesis is mediated by methyl-D-aspartate receptor activation in retinally normal and retin: degenerate rats. *J. Neurobiol.* 28: 1-8. 1995.
- Poeggeler G.; Reiter R.J. y Hardeland R.** Melatonin structurally related, endogenous indoles act as potent electron donors and radical scavengers in vitro. *Redox Rept.* 2: 179-184. 1996.

- Poeggeler G.; Thuermann S.; Does A.; Schoenke M.; Burkhardt S. y Hardeland R.** Melatonin's unique scavenging properties roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogues. *J. Pineal Res.* 33: 20-30. 2002.
- Poon A.M.S. y Pang S.F.** 2-[¹²⁵I] iodomelatonin binding sites in spleens of guinea pig. *Life Sci.* 50: 1709-1726. 1992.
- Poon A.M.; Liu Z.M.; Pang C.S.; Brown G.M. y Pang S.F.** Evidence for a direct action of melatonin on the immune system. *Biol. Signals.* 3: 107-117. 1994.
- Pozo D.; Delgado M.; Fernández-Santos J.M.; Calvo J.R.; Gomoriz R.O.; Martín-Lacave J.; Ortiz G.G. y Guerrero J.M.** Expresión of the Mel 1-melatonin receptor mRNA in T and B subsets of lymphocyte from rat thymus and spleen. *FASEB J.* 11: 466-473. 1997.
- Pratt B.L. y Takahashi J.S.** Vasoactive intestinal polypeptide and alpha 2-adrenoceptor agonists regulate adenosine 3',5'-monophosphate accumulation and melatonin release in chick pineal cell cultures. *Endocrinology.* 125: 2375-2384. 1989.
- Prince R.C. y Gunso D.E.** Superoxide production by neutrophils. *TIBS.* 12: 86-87. 1987.
- Quay W.B.** Volumetric and cytologic variation in the pineal body of *Peromyscus leucopus* (Rodentia) with respect to sex, captivity and day-length. *J. Morph.* 98: 471-495. 1995.
- Rafii-El-Idrissi M.; Calvo J.J.; Pozo D.; Harmouch A. y Guerrero J.M.** Specific binding of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin by rat splenocytes: characterization and its role on regulation of cyclic AMP production. *J. Neuroimmunol.* 57: 171-178. 1995.

- Ralph C.L. y Dawson D.C.** Failure of pineal body of 2 species of birds (*Coturnix coturnix japonica* and *Passer domesticus*) to show electrical responses to illumination. *Experientia*. 24: 147-148. 1968.
- Rao K.S. y Loeb L.A.** DNA damage and repair in the brain: relationship to aging. *Mutat. Res.* 275: 317. 1992.
- Ravaglia G.; Forti P.; Maoli F.; Seali R.C. ; Boschi F. ; Pratelli L. y Pizzoferrato A.** Calcium regulating hormones in healthy elderly men : relation to intestinal calcium absorption. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 70: 323-328. 1994.
- Rea I.M.; Stewart M.; Campbell P.; Alexander H.D.; Crockard A.D. y Morris T.C.** Changes in lymphocyte subsets, interleukin 2, and soluble interleukin 2 receptor in old and very old age. *Gerontology*. 42: 69-78. 1996.
- Reiter R.J.** Comparative physiology: pineal gland. *Annu. Rev. Physiol.* 35: 305-328. 1973.
- Reiter R.J.** The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr. Rev.* 1: 169-175. 1980.
- Reiter R.J.** The pineal and its indole products: basic aspects and clinical applications. *Int. The brain as and endocrine organ.* Edited by Cohe M.P. y Foley P.P. *Springer. Vienna.* 96-149. 1989.
- Reiter R.J.** Neuroendocrine effects of light. *Intern. J. Biometerol.* 35: 169-175. 1991a.
- Reiter R.J.** Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol. Cell. Endocrinol.* 79: 153-158. 1991b.
- Reiter R.J.** Pineal melatonin: cell biology of its synthesis end of its physiological interactions. *Endocr. Rev.* 12: 151-180. 1991c.

- Reiter R.J.** The aging pineal gland and its physiological consequences. *Bio. Bassays.* 14: 169-175. 1992.
- Reiter R.J.** The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia.* 49: 654-664. 1993.
- Reiter R.J.** Pineal function during aging: attenuation of the melatonin rhythm and its neurobiological consequences. *Acta Neurobiol. Exp.* 54: 31-39. 1994.
- Reiter R.J.** Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J.* 9: 526-533. 1995.
- Reiter R.J.** Aging and oxygen toxicity: relation to changes in melatonin. *Ages.* 20: 201-213. 1997.
- Reiter R.J.** Oxidative damage in the central nervous system: Proteccion by melatonin. *Prog. Neurobiol.* 56: 359-384. 1998.
- Reiter R.J.** Melatonin: lowering the high price of free radicals. *News Physiol. Sci.* 15: 246-250. 2000a.
- Reiter R.J.** Melatonin and aging. In *The Science of Geriatrics.* (Ed). Mosley J.E.; Armbrrecht H.J.; Coe R.M. y Vellas B. Vol I: 232-333. Springer. New York. 2000b.
- Reiter R.J.** Melatonin: Clinical relevance. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 17: 273-285. 2003.
- Reier R.J. y Lerchel A.** Regulation of mammalian pineal melatonin production by the electromagnetic spectrum. En *Melatonin: biosynthesis, physiological effects, and clinical applications.* (Eds). Yu H.S. y Reiter R.J. *Boca Raton. CRC Press.* 107-127. 1993.

- Reiter R.J. y Maestroni G.J.M.** Melatonin in relation to the antioxidative defense and immune systems: possible implications for cell and organ transplantation. *J. Mol. Med.* 77: 36-39. 1999.
- Reiter R.J.; Tand D.X.; Poeggeler B.; Menendez-Pelaez A.; Chen L.D. y Saarela S.** Melatonin as a free radical scavenger: implications for aging and age-related diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 719: 1. 1994a.
- Reiter R.J.; Tan D.X.; Poeggeler B.; Chen L.D. y Menéndez-Pelaez A.** Melatonin, free radicals and cancer initiation, in: “Advances in Pineal Research, Vol. 7”. Maestroni G.J.M.; Conto A. y Reiter R.J. (Eds). John Libbey. London. 1994b.
- Reiter R.J.; Pablos M.I.; Agapito M.T. y Guerrero J.M.** Melatonin in the context of the free radical theory of aging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 786: 362-378. 1996.
- Reiter R.J.; Tang L.; García J.J. y Muñoz-Hoyos A.** Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci.* 60: 2255-2271. 1997.
- Reiter R.J.; Tan D.X.; Kim S.J.; Manchester L.C.; Qi W.; García J.J.; Cabrera J.C.; El-sokkary G. y Rouvier-Garay V.** Augmentation of indices of oxidative damage in life-long melatonin-deficient rats. *Mech. Aging Dev.* 110: 157-173. 1999.
- Reiter R.J.; Tan D.X.; Qi W.; Manchester L.C. Karbownik M. y Calvo J.R.** Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. *Biol. Signals Recept.* 9: 160-171. 2000a.
- Reiter R.J.; Tan D.X.; Osuna C. y Gitto E.** Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: A review, *J. Biomed. Res.* 7: 444-458. 2000b.
- Reiter R.J.; Tan D.X. y Acuña-Castroviejo D.** Melatonin: mechanisms and actions as an antioxidant. *Curr. Top. Biophys.* 24: 171-183. 2000c.

- Reiter R.J.; Tan D.X.; Manchester L.C. y Calvo J.R.** Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the literature. *Cell. Biochem. Biophys.* 34: 237-256. 2001.
- Reiter R.J.; Tan D.X.; Manchester L.C. y El-Sawi M.R.** Melatonin reduces oxidant damage and promotes mitochondrial respiration. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 959: 238-250. 2002a.
- Reiter R.J.; Tan D.X.; Mayo J.M.; Sainz R.M. y Lopez-Burilla S.** Melatonin, longevity and health in the aged: an assessment. *Free Radical Research.* 36: 1323-1329. 2002b.
- Reiter R.J.; Tan D.X.; Mayo J.C.; Sainz R.M. Leon J. y Czarnocki Z.** Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Review Acta Biochimica Polonica.* 50: 1129-1146. 2003.
- Reppert S.M.** Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors. *J. Biol. Rhythms.* 12: 528-531. 1997.
- Reppert S.M. y Weaver D.R.** Melatonin madness. *Cell.* 83: 1059-1062. 1995.
- Reppert S.M.; Weaver D.R. y Godson C.** Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends. Pharmacol. Sci.* 17: 100-102. 1996.
- Richter M. y Jodouin C.A.** The delay in the synthesis and secretion of immunoglobulins by the B cells of healthy ambulatory elderly is due to subtle defects in the null cells and the B cells. *Aging Immunol. Infect. Dis.* 4: 1-16. 1993.
- Ribkees S.A.; Cassone V.M.; Weaver D.J. y Reppert S.M.** Melatonin receptors in chick brain: characterization and localization. *Endocrinology.* 125: 363-368. 1989.
- Roberts J.E.; Hu D.N. y Martinez L.** Photophysical studies on melatonin and its receptor agonists. *J. Pineal Res.* 29: 94-99. 2000.

- Robertson L.M. y Takahashi J.S.** Circadian clock in cell culture: II. *In vitro* photic entrainment of melatonin oscillation from dissociated chick pineal cells. *J. Neurosci.* 8: 22-30. 1988.
- Rodríguez A.B. y Lea R.W.** Effect of pinealectomy upon non-specific immune response of the ring dove (*Streptopelia risoria*). *J. Pineal Res.* 16: 159-166. 1994.
- Rodríguez A.B.; Ortega E.; Lea R.W. y Barriga C.** Melatonin and the phagocytic process of heterophils from ring dove (*Streptopelia risoria*). *Mol Cell. Biochem.* 168: 185-190. 1997.
- Rodríguez A.B.; Nogales G.; Ortega E. y Barriga C.** Melatonin controls of superoxide anion level: modulation of superoxide dismutase activity in ring dove heterophils. *J. Pineal Res.* 24: 9-14. 1998.
- Rodríguez A.B.; Marchena J.M.; Nogales G.; Durán J. y Barriga C.** Correlation between the circadian rhythm of melatonin, phagocytosis, and superoxide anion levels in ring dove heterophils. *J. Pineal Res.* 26: 35-42. 1999a.
- Rodríguez A.B.; Nogales G.; Marchena J.M. y Barriga C.** Supresión of both basal and antigen-induced lipid peroxidation in ring dove heterophils by melatonin. *Biochem. Pharmacol.* 58: 1301-1306. 1999b.
- Rodríguez A.B.; Terrón M.P.; Durán J.; Ortega E. y Barriga C.** Physiological concentrations of melatonin and corticosterone affect phagocytosis and oxidative metabolism of ring dove heterophils. *J. Pineal Res.* 31: 31-38. 2001.
- Rodríguez C.; Mayo J.C.; Sainz R.M.; Antolin I.; Herrera F.; Martín V. y Reiter R.J.** Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J. Pineal Res.* 36: 1-9. 2004.
- Rojas W.** Inmunología. In. Fondo Educ.Interamericana. Medellin. (Colombia). 29-50. 1982.

- Root R.K. y Cohen M.S.** The microbicidal mechanism of human neutrophils and eosinophils. *Rev. Infect. Dis.* 3: 565-598. 1981.
- Rosen G.M.; Pou S.; Ramos G.L.; Cohen M.S. y Britiga B.E.** Free radicals and phagocytic cells. *FASEB J.* 200-209. 1995.
- Rossi F.; Berton G.; Bellavite D. y Della Bianca V.** The inflammatory cells and their respiratory Bursa. *Inflammation Res.* 3: 329-340. 1982.
- Rosolowska-Huszcz D.; Thaela M.J.; Jagura M.; Stepien D. y Skwarlo-Sonta K.** Pineal influence on the diurnal rhythm of nonspecific immunity indices in chickens. *J. Pineal Res.* 10: 190-195. 1991.
- Roth J.J. y Roth E.C.** The parietal-pineal complex among paleovertebrates. In: A cool Look at the Warm-Blooded Dinosaurs. AAAS Selected symposium. 189-231. (Eds). Thomas R.D.K. y Olson E.C. Weshiew Press. Boulder C.O. 1980.
- Rothstein M.** Post-translational alteration of protein. En: CRC Handbook of Biochemistry and aging. Florini J.R. (Ed). Boca Ratón: CRP Press.: 103-11. 1981.
- Rowe J.W. y Troen B.R.** Sympathetic nervous system and aging in man. *Endocr. Rev.* 1: 167-179. 1980.
- Samiec P.S.; Drews-Botsch C.; Flagg E.W.; Kurtz J.C.; Sternberg P.J.; Reed R.L. y Jones D.P.** Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* 24: 699-704. 1998.
- Schiffmann E.** *Annual Review Physiol.* 44: 553-562. 1982.
- Schmidt R.; Penka B.; Trauner M.; Reinsperger L.; Ranner G.; Ebner F. y Waldhauser F.** Lack of pineal growth durin childhood. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 1221-1225. 1995.

- Serino I.; D'Istria M. y Monteleone P.** A comparative study of melatonin production in the retina, pineal gland and harderian gland of *Bufo viridis* and *Rana esculenta*. *Comp. Biochem. Physiol C.* 106: 189-193. 1993.
- Shafer W.N.; Martin L.E. y Spitzagel J.K.** Cationic antimicrobial proteins isolated from human neutrophil granulocytes in the presence of diisoprophyl fluorophosphates. *Infect. Immun.* 45: 29-35. 1984.
- Shinkai S.; Konishi M. y Shephard R.J.** Aging and immune response to exercise. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 76: 562-572. 1998.
- Shock N.W.** Physiological and chronological age. En: Aging its chemistry. Dietz A.A. (Ed). The American Association for Clinical Chemistry. 1979.
- Silverstein S.C.; Greenberg S.; Di Virgilio F. y Steinberg T.H.** Phagocytosis. *In Fundamental Immunology.* 703. Ed. Paul W. Raven Press. New York. 1989.
- Skwarlo-Sonta K.** Functional connections between the pineal gland and immune system. *Acta Neurobiol. Exp.* 56: 341-357. 1996.
- Skwarlo-Sonta K.** Reciprocal interdependence between pineal gland and avian immune System. *Neuroendocrinol. Lett.* 20: 151-156. 1999.
- Skwarlo-Sonta K.** Melatonin in immunity: comparative aspects. *Neuroendocrinol. Lett.* 23: 61-66. 2002.
- Skwarlo-Sonta.; Majewski P.; Markowska M.; Oblap R. y Olszanska B.** Bidirectional communication between the pineal gland and the immune System. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 81: 342-349. 2003.
- Smith J.A.** Neutrophils, host defense and inflammation: a double-edged sword. *J. Leukocyte Biol.* 56: 672-686. 1994.
- Smith J.A.** Exercise Immunology and neutrophils. *Int. J. Sports Med.* 18: 46-55. 1997.

- Solana R. y Pawelec G.** Molecular and cellular basis of immunosenescence. *Mech. Ageing Dev.* 102: 115-129. 1998.
- Song H.; Price P.W. y Cerny J.** Age-related changes in antibody repertoire: contribution from T cells. *Immunol. Rev.* 160: 55-62. 1997.
- Sprenger M.J.; Mulder P.G.; Beyer W.E.; Van Strik R. y Masurel N.** Impact of influenza on mortality in relation to age and underlying diseases. *Int. J. Epidemiol.* 22: 334-340. 1993.
- Stankova L.; Gerhardt N.B.; Nabgel L. y Bigley R.H.** Ascorbate and Phagocyte function. *Infect. Immun.* 12: 252-256. 1975.
- Stasica P.; Paneth P. y Rosiak J.M.** Hydroxyl radical reaction with melatonin molecule: a computational study. *J. Pineal Res.* 29: 125-127. 2000
- Stefulj J.; Hörtner M.; Ghosh M.; Schauenstein K.; Rinner I.; Wölfler A.; Semmler J. y Liebmann P.M.** Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J. Pineal Res.* 30: 243-247. 2001.
- Stendahl O.I.; Hartwig J.H.; Brotschi E.A. y Stossel T.P.** Distribution of actin-binding protein and myosin in macrophages during spreading and phagocytosis. *J. Cell. Biol.* 84: 215-224. 1980.
- Steinhilber D.; Brungs M.; Werz O.; Wiesenberg I.; Danielsson C.; Kalen J.P.; Nayeri S.; Scharäder M. y Carlberg C.** The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 270: 7037-7040. 1995.
- Stossel T.P. y Hartwig J.H.** Interaction of actin of rabbit pulmonary macrophages. *J. Cell. Biol.* 68: 602-619. 1976.
- Strehler B.L.** Time, cells and aging. NY: Academic Press. 1977.

- Strehler B.L.** Understanding aging. En: *Aging Methods and Protocols*. Barnett Y.A. y Barnett C.R. (Eds). Totowa. New Jersey: Human Press.: 1-19. 2000.
- Strong R.; Mattamal M.B. y Andor A.C.** Free radicals, the aging brain, and age-related neurodegenerative disorders, in: "Free Radicals in Aging". Yu B.P. (Ed). *CRC Press. Boca Raton*. 1993.
- Sturkie P.** *Avian Physiology*. Springes-Verlag. New York. 1986.
- Sun J.H.; Reiter R.J.; Mata N.L. y Tsin A.T.** Identification of 11-cis-retinal and demonstration of its light-induced isomerization in the chicken pineal gland. *Neurosci. Lett.* 133: 97-99. 1991.
- Sun J.H.; Reiter R.J.; Hattori A.; Yaga K.; Hebert D.C. y Tsin A.T.** Phototransduction-related circadian changes in indolamine metabolism in the chicken pineal gland in vivo. *J. Pineal Res.* 15: 132-137. 1993.
- Sugden D. y Chong N.W.** Pharmacological identity of 2-(¹²⁵I)iodomelatonin binding sites in chicken brain and sheep pars tuberalis. *Brain Res.* 539: 151-154. 1991.
- Sugden D.; Weller J.L.; Klein D.C.; Kirk K.L. y Creveling C.R.** Alpha-adrenergic potentiation of beta-adrenergic stimulation of rat pineal N-acetyltransferase. Studies using cirazoline and fluorine analogs of norepinephrine. *Biochem. Pharmacol.* 33: 3947-3950. 1984.
- Sze S.F.; Liu W.K. y Ng T.B.** Stimulation of murine splenocytes by melatonin and methoxytryptamine. *J. Neural. Transm. Gen. Sect.* 94: 115-126. 1993.
- Takahashi J.S.; Hamm H.E. y Menaker M.** Circadian rhythms of melatonin release from individual superfused chicken pineal glands *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 2319-2322. 1980.
- Takahashi J.S.; Murakami N.; Nikaido S.S.; Pratt B.L. y Robertson L.M.** The avian pineal, a vertebrate model system of the circadian oscillator: cellular

regulation of circadian rhythms by light, second messengers and macromolecular synthesis. *Recent. Prog. Horm. Res.* 45: 279-348. 1989.

Tamarkin L.; Cohen M.; Roselle D.; Reichert C.; Lippman M. y Chabner B. Melatonin inhibition and pinealectomy enhancement of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in the rat. *Cancer Res.* 41: 4432-4436. 1981.

Tan D.X.; Chen L.D.; Poeggeler B.; Manchester L.C. y Reiter R.J. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr. J.* 1: 57-60. 1993.

Tan D.X.; Reiter R.J.; Chen L.D.; Poeggeler B.; Manchester L.C. y Barlow-Walden L.R. Both physiological and pharmacological levels of melatonin reduce DNA adduct formation induced by the carcinogen saffrole in vivo. *Carcinog.* 15: 215-218. 1994.

Tan D.X.; Manchester L.C.; Reiter R.J.; Plummer B.F.; Hardies L.J.; Weintraub S.T. y Vijayalaxmi Shepherd A.M.M. A novel melatonin metabolite cyclic 3-hydroxymelatonin: A biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253: 614-620. 1998.

Tan D.X.; Manchester L.C.; Reiter R.J.; Qi W.B.; Zhang M.; Weintraub S.T.; Cabrera J.; Sainz R.M. y Mayo J.C. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. *Biochim. Biophys. Acta.* 1472: 206-214. 1999.

Tan D.X.; Chen L.D.; Poeggeler B.; Mancheste L.C. y Reiter R.J. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr. J.* 1: 57-60. 2000a.

Tan D.X.; Manchester L.C.; Reiter R.J.; Qi W.B.; Karbownik M. y Calvo J.R. Significance of melatonin in antioxidative defense system: Reactions and products. *Biol. Signals Recept.* 9: 137-159. 2000b.

- Tan D.X.; Reiter R.J.; Manchester L.C.; Yan M.T.; El-Sawi M.; Sainz R.M.; Mayo J.C.; Kohen R.; Allegra M. y Hardeland R.** Chemical and physical properties and potencial mechanisms: Melatonin as a broad-spectrum antioxidant and free radical scabenger. *Curr. Topics. Med. Chem.*. 2: 181-198. 2002.
- Tauber A.I.** Protein kinase C and the activation of the human neutrophil NADPH-oxidase. *Blood*. 69: 711-720. 1987.
- Tsai S.Y. y McNulty J.A.** Microglia in the pineal gland of the neonatal rat: characterization and effects on pinealocyte neurite length and serotonin content. *Glia*. 20: 243-253. 1997.
- Tsai S.Y. y McNulty J.A.** Interleukin-1 β expression in the pineal gland of the rats. *J. Pineal Res.* 27: 42-48. 1999.
- Tsai S.Y.; O'Brien R.E. y McNulty J.A.** Microglia play a role in mediating the effects of cytokines on the structure and function of the rat pineal gland. *Cell Tissue Res.* 303: 431-433. 2001.
- Turek F.W.; Zee P. y Van Reeth O.** Melatonin and aging. *Kluwer Academic. Plenum Publishers. New York*. 2000.
- Urata Y.; Homma S.; Goto S.; Todoroki S.; Cho S.; Homma K. y Kondo T.** Melatonin induces γ -glutamyl-cysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endotelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 838-847. 1999.
- Vacas M.I.; Sarmiento I.K. y Cardinali D.P.** Interaction between β -and α -adrenoceptors in rat pineal adenosine cyclic 3'5'-monophosphate phosphodiesterase activation. *J. Neural. Trens.* 26: 295-304. 1985.
- Vancauter E.; Leproult R. y Kupfer D.J.** Effects of gender and age on the levels and circadian rhythmicity of plasma cortisol. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 2468-2473. 1996.

- Vanecek J.** Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol. Rev.* 78: 687-721. 1998.
- Vanecek J. y Vollrath L.** Melatonin inhibits cyclic AMP and cyclic GMP accumulation in the rat pituitary. *Brain Res.* 505: 157-159. 1989.
- Vanecek J. Vollrath L.** Melatonin modulates diacylglycerol and arachidonic acid metabolism in the anterior pituitary of immature rats. *Neurosci. Lett.* 110: 199-203. 1990.
- Vanecek J. y Klein D.C.** Melatonin inhibits gonadotropin-releasing hormone-induced elevation of intracellular Ca^{2+} in neonatal rat pituitary cells. *Endocrinology.* 130: 701-707. 1992.
- Vanecek J.; Korser E. y Vorlicek J.** Daily changes in melatonin binding sites and the effect of castration. *Mol. Cell. Endocrinol.* 73: 165-170. 1990.
- Van Lieshout E.M. y Peters W.H.** Age and gender dependent levels of glutathione and glutathione S-transferases in human lymphocytes. *Carcinogenesis.* 19: 1873-1875. 1998.
- Vaughan M.K.; Vaughan G.M. y Reiter R.J.** Effect of ovariectomy and constant dark on the weight of reproductive and certain other organs in the female vole. *Microtus montanus. J. Reprod. Fert.* 32: 9-14. 1973.
- Vaughan M.K.; Vaughan F.M.; Blask D.R. y Reiter R.J.** Influence of melatonin, constant light, or blinding on reproductive system of gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Experientia.* 32: 1341-1342. 1979.
- Vaughan M.K.; Hubbars G.B.; Champney T.H.; Vaughan G.M.; Little J.C. y Reiter J.R.** Splenic hypertrophy and extramedullary hematopoiesis induced in male Syrian hamster by short photoperiod or melatonin injections and reversed by melatonin pellets or pinealectomy. *Am. J. Anat.* 179: 131-136. 1987.

- Vigh B. y Vigh-Teichman I.** Light-and electron-microscopic demonstration of immunoreactive opsin in the pinealocytes of various vertebrates. *Cell. Tissue Res.* 22: 451-463. 1981.
- Vivien-Roels B. y Arent J.** How does the indoleamine production of the pineal gland respond to variations in the environment in a non mammalian vertebrate, Testudo Gemilin. *Psychoneuroendocrinology.* 8: 327-332. 1983.
- Vivien-Roels B.; Pitrosky B.; Zitouni M.; Malan A.; Canguhem B.; Boun D. y Pevet P.** Environmental control of the seasonal variations in the daily pattern of melatonin synthesis in the European hamster, *Criostus cricens.* *Gen. Comp. Endocrinol.* 106: 85-94. 1997.
- Voisin P y Collin J.P.** Regulation of chicken pineal arylalkylamine-N-acetyltransferase by postsynaptic alpha 2-adrenergic receptors. *Life Sci.* 39: 2025-2032. 1986.
- Voisin P.; Van Camp G.; Pontoire C. y Collin J.P.** Prostaglandins stimulate secretion acetylation in chick pineal cell: Involvement of cyclic AMP-dependent and calcium/calmodulin-dependent mechanisms. *J. Neurochem.* 60: 666-670. 1993.
- Wakikawa A.; Utsuyama M.; Wakabayashi A.; Kitagawa M. y Hirokawa K.** Age-related alteration of cytokine production profile by T cell subsets in mice: A flow cytometric study. *Exp. Gerontol.* 34: 231-242. 1999.
- Wakatsuki A.; Okatani Y. y Shinohara K.** Melatonin protect fetal rat brain against oxidative mitochondria damage. *J. Pineal Res.* 30: 22-28. 2001.
- Waldhauser F. y Dietzel M.** Daily and annual rhythms in human melatonin secretion: Role in puberty control. *Am N.Y. Acad. Sci.* 543: 205-214. 1985.
- Waldhauser F.; Walkhauser M.; Lieberman H.R.; Deng M.H.; Lynch H.J. y Wurtman R.J.** Bioavailability of oral melatonin in humans. *Neuroendocrinology.* 39: 307-313. 1984.

- Waldhauser F.; Weizenbacher G.; Tatzler E.; Gisinger B.; Waldhauser M.; Schemper M. y Frisch H.** Alterations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66: 648-652. 1988.
- Waldhauser F. Kovác J. y Reiter R.J.** Age-related changes in melatonin levels in humans and its potential consequences for sleep disorders. *Exp. Gerontol.* 33: 759-772. 1998.
- Walford R.L.** The immunological theory of aging. Musksgaard. Copenhagen. 1-248. 1969.
- Wayne S.J.; Rhyne R.L.; Garry P.J. y Goodwin J.S.** Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over. *J. Gerontol.* 45: 45-98. 1990.
- Weiss J.; Victor M.; Stendhal O.Y. y Elsbach P.** Killing of gram-negative bacteria by polymorphonuclear leukocytes. Role of and O₂-in-dependent bactericidal system. *J. Clin. Invest.* 69: 954-970. 1982.
- Weissman A.** Essays upon heredity and kindred biological problems. Clarendon P. (Ed). London-New York: Oxford University. 1891.
- Williams R.** Immunología 5nd. (Ed). Fondo Educ. Interamericana. Medellin. (Colombia). 29. 1982.
- Willis H.E.; Browder B.; Feiste A.J.; Mohanakumar R. y Ruddy S.** Monoclonal antibody to human IgG Fc receptors. Cross-linking of receptors induces lysosomal enzyme release and superoxide generation by neutrophils. *J. Immunol.* 140: 234-239. 1988.
- Winkler B.S.; Orseli S.M. y Rex T.S.** The redox couple between glutathione and ascorbic acid: A chemical and physiological perspective. *Free Radic. Biol. Med.* 17: 333-349. 1994.

- Wölfler A.; Schauenstein K. y Liebmann P.M.** Lack of calmodulin antagonist of melatonin in T-lymphocyte activation. *Life Sci.* 63: 835-842. 1998.
- Wurtman R.J. y Axelrod J.** The formation, metabolism and physiologic effects of melatonin. *Adv. Pharmacol.* 6: 141-151. 1968.
- Wurtman R.J.; Axelrod J. y Barchas J.D.** Age and enzyme activity in the human pineal. *J. Clin. Endocrinol. Med.* 24: 299-301. 1964.
- Yakes F.M. y Van Houten B.** Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 514-519. 1997.
- Yang C.S.; Chou S.T.; Liu L.; Tsai P.J. y Kuo J.S.** Effect of ageing on human plasma glutathione concentrations as determined by high-performance. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* 674: 23-30. 1995.
- Yellon S.M.** Daily melatonin treatments regulate the circadian melatonin rhythm in the adult *Djungarian* hamster. *J. Biol. Rhythms.* 11: 4-13. 1996.
- Yellon S.M. y Longo L.D.** Effect of maternal pinealectomy and reverse photoperiod on the circadian melatonin rhythm in the streep and fetus during the last trimester of pregnancy. *Biol. Reprod.* 39: 1093-1099. 1988.
- Yin H.L. y Stossel T.P.** Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. *Nature.* 281: 583-586. 1979.
- Yoshikawa T.T.** Perspective: aging and infectious disease: past, present, and future. *J. Infect. Dis.* 176: 1053-1057. 1997.
- Youbicier-Simo B.J. Boudard F.; Mekaouche M.; Bayle J.D. y Bastide M.** A role bursa fabricii and bursin in the ontogeny of the pineal biosynthetic activity in the chicken. *J. Pineal Res.* 21: 35-43. 1996.

- Young I.M.; Francis P.L.; Leone A.M.; Stovell P. y Silman R.E.** Constant pineal output and increasing body mass account for declining melatonin levels during human growth and sexual maturation. *J. Pineal Res.* 5: 71-85. 1988.
- Yu Q.; Miller S.C. y Osmond D.G.** Melatonin inhibits apoptosis during early B-cell development in mouse bone marrow. *J. Pineal Res.* 29: 86-93. 2000.
- Zang L.Y.; cosma G.; Gardner H. y Vallynathan V.** Scavenging of reactive oxygen species by melatonin. *Biochim Biophys. Acta.* 1425: 469-477. 1998.
- Zapata A.G.; Varas A. y Torroba M.** Seasonal variations in the immune System of lower vertebrates. *Immunol. Today.* 13: 142-147. 1992.
- Zatz M.** Agents that affect calcium influx can change cyclic nucleotide levels in cultured chick pineal cell. *Brain Res.* 583: 304-307. 1992.
- Zatz M. y Mullen D.A.** Norepinephrine, acting via adenylate cyclase, inhibits melatonin output but does not phaseshift the pacemaker in cultured chick pineal cells. *Brain Res.* 450: 137-143. 1988.
- Zatz M.; Kasper G. y Marquez C.R.** Vasoactive intestinal peptide stimulates chick pineal melatonin production and interacts with other stimulatory and inhibitory agents but does not show alpha 1-adrenergic potentiation. *J. Neurochem.* 55: 1149-1153. 1990.
- Zawilska J.B.; Woldan-Tambor A. y Nowak J.Z.** Prolonged exposure of chicks to light or darkness differentially affects the quinpirole-evoked suppression of serotonin N-acetyltransferase activity in chick retina: an impact on dopamine D4-like receptor. *J. Pineal Res.* 22: 59-64. 1997.
- Zemdegs L.Z.; McMillen I.C.; Walker D.W.; Thorburn G.D. y Nowak R.** Diurnal rhythms in plasma melatonin concentrations in the fetal sheep and pregnant ewe during late gestation. *Endocrinology.* 123: 284-289. 1988.

Zhao K.S.; Wang Y.F.; Gueret R. y Weksler M.E. Dydregulation of the humoral immune response in old mice. *Int. Immunol.* 7: 929-934. 1995.

Zrenner C. Theories of pineal function from classical antiquity to 1900: A history. *Pineal Res. Rev.* 3: 1-40. 1985.

Zs.Nagy I. The role of membrane structure and function in cellular aging: a review. *Mech. Ageing Dev.* 9: 237-246. 1974.