

EFFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE PÉPTIDOS OPIOIDES EN EL SISTEMA INMUNE DE LA RATA

Marcela Valdés-Tovar*, Miguel Asai*, Gilberto Matamoros-Trejo*

SUMMARY

Melatonin (MEL) physiology has been related to the immune system regulation. The pharmacological inhibition of MEL synthesis decreased the primary antibody response produced by an antigenic stimulus. Moreover, the exogenous MEL administration antagonized the immunosuppressive effects of corticosterone and acute stress in mice. Also, MEL induces the interleukin-12 release from monocytes and promotes the lymphocytes T_H1 differentiation. In these lymphocytes, MEL stimulates the interleukin-2 and interferon- γ release. The MEL receptors localized in the plasma membrane and in the nucleus, either from monocytes and lymphocytes, are the MEL effector signals in the cell. It has been suggested that the immunoenhancing effect produced by the hormone could be mediated by an opioid mechanism. Several lines of evidence have shown that lymphocytes, monocytes, and polymorphonuclear cells have the biochemical machinery to produce and release opioid peptides. In the central nervous system (CNS), the endogenous melatonin absence disrupted the enkephalin circadian rhythm and its tissue content was decreased as well. If the MEL absence in the CNS decreased the enkephalin tissue content, it is possible to consider that the opioid peptides content also decreased in the immune system. The present study was performed to evaluate the effect of endogenous MEL absence over opioid peptides concentration in the thymus and spleen of the rat.

Materials and methods

Sixty male Wistar rats, weighing each 220-240 g, were housed under a 12 h. light: 12 h. dark cycle in a temperature controlled room ($21 \pm 1^\circ\text{C}$); the illumination period started at 06:00. Water and food pellets were available *ad libitum*. This group was divided in six subgroups:

- Naïve* control group: Ten animals were housed under a 12 h. light: 12 h. dark cycle. The darkness period started at 18:00.
- Control group + MEL: 10 animals kept with a 12 x 12 h. light-darkness cycle were subcutaneously (s.c.) injected with melatonin (800 $\mu\text{g}/\text{kg}$) at 9:00. These rats were maintained four hours under light conditions before being sacrificed.
- Control group + vehicle: Ten control animals were s.c. injected (at 9:00) with the same volume used to dissolve the hormone (ethanol: isotonic saline solution). These rats were maintained four hours under light conditions before being sacrificed.

- Continuous light (CL): In order to reduce the melatonin plasma concentration, ten rats were kept in a room with continuous light during 15 days. Light intensity was ≤ 50 lux to avoid stress.
- Continuous light + MEL: Ten CL animals were injected with melatonin (800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.c.) at 9:00. These rats were maintained four hours under light conditions before being sacrificed.
- Continuous light + darkness: In order to enhance the melatonin plasma concentration, ten CL rats were kept in a dark room during four hours. The darkness period started at 9:00 and rats were sacrificed four hours later.

Animals were sacrificed by decapitation and thymuses and spleens were dissected and subjected to preparative processes before enkephalin determination. Opioid peptides IR-ME, IR-LE, IR-HE, IR-OC content was measured using a radioimmunoassay technique. Statistical differences between groups were established by one-way ANOVA test ($\alpha=0.05$), and then calculated using Tukey HSD and Tamhane as *post hoc* tests. A $p<0.05$ level was accepted as significant. The concentration values were expressed as IR-peptide (pmol/mg protein).

Results

In this work, three main features were found: 1. The endogenous melatonin absence produced by a chronic lighting exposure significantly reduced (50%) the opioid peptides content in both thymus and spleen. 2. Melatonin administration to CL rats produced an enkephalin tissue content increase ($>100\%$), in both lymphoid organs. 3. No changes were found in control groups after melatonin or vehicle administration.

Discussion

The immune system is susceptible to stress. Recent evidences in neuroimmunology have begun to define how mood alterations, stress, seasons, depression, and daily rhythms have profound effects on immune response through hormonal modulation. Several lines of evidence have suggested that immune system functions could be regulated by the melatonin-opioid peptides relation. In the present work, we found that endogenous melatonin absence significantly reduced the enkephalin content in both thymus and spleen of the rat. This reduction could be directly related to the cytokine and antibody production, since the primary response to an antigen could be mediated by opioids. Our results are related with those obtained for the CNS, where the melatonin absence significantly decreased the opioid peptide tissue content and

* Laboratorio de Análisis Químicos. División de Investigaciones en Neurociencias. Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente. Calz. México-Xochimilco 101, San Lorenzo Huipulco, 14370, México, DF.

Recibido primera versión: 29 de noviembre de 2002. Recibido segunda versión: 25 de marzo de 2003. Aceptado: 15 de abril de 2003.

disrupted the enkephalins circadian rhythm. It has been reported that MEL was able to induce the Proopiomelanocortin (POMC) synthesis in the immune system. These data suggest that MEL is related to the neuropeptides synthesis. However, the basic mechanisms underlying the melatonin effect over the opioid peptides synthesis remain unknown at present.

The signaling pathway may include the union to MT1 membrane receptors that had been located in the thymus and spleen, and the activation of phospholipase C. These events may cause an increase of intracellular calcium and the activation of the protein kinase C (PKC). PKC can phosphorylate and activate other kinases as the mitogen-activated protein kinases (MAPK), which include the ERK and JNK families. The ERK1/2 and the JNK activate the expression of transcription factors such as c-Fos and c-Jun, which form a heterodimer called AP-1. This protein can modulate the expression of the Proenkephalin A gene as described for the CNS. There is experimental evidence about the involvement of the MT1 receptor with the activation of EKR and JNK enzymes. Moreover, MEL had been described to stimulate the DNA binding activity of AP-1. Furthermore, the JNK phosphorylation had been associated to the regulation of Proenkephalin A gene expression, mediated by c-Fos and c-Jun. The induction of Proenkephalin A gene expression would produce an increase of the tissue content of the enkephalins.

Key words: Melatonin, opioid peptides, immune system.

RESUMEN

La fisiología de la melatonina (MEL) se asocia con la regulación del sistema inmune. La inhibición farmacológica de la síntesis de MEL disminuye la respuesta humoral primaria desencadenada por un estímulo antigénico. Asimismo, la administración exógena de MEL antagoniza los efectos inmunosupresores de la corticosterona y del estrés agudo. La MEL induce la liberación de interleucina-12 a partir de los monocitos, lo que a su vez promueve la diferenciación de los linfocitos T_H1. En estos linfocitos, la MEL estimula la liberación de interleucina-2 e interferón- γ . Los receptores de la MEL presentes en la membrana plasmática y en el núcleo de los monocitos y los linfocitos son los responsables de producir la acción de la hormona. Se ha sugerido que el efecto inmunoestimulante de la MEL se produce por un mecanismo mediado por los péptidos opioides. Los linfocitos, los monocitos y las células polimorfonucleares producen y liberan péptidos opioides. En el SNC de la rata, la ausencia de MEL endógena rompe el ritmo circádico de las encefalinas y disminuye su concentración. Si la inhibición fisiológica de la síntesis endógena de MEL disminuye la concentración y liberación de encefalinas en el SNC de la rata, es factible suponer que el contenido de estos péptidos disminuye también en las células del sistema inmune. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar la concentración de encefalinas en el bazo y el timo de la rata, en ausencia y presencia de melatonina.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que en ausencia de MEL endógena se produjo una disminución significativa en la concentración de Met-enkefalina, Leu-enkefalina, Octapéptido y Heptapéptido en los órganos del sistema inmune. Por el contrario, en animales sometidos a luz continua a los cuales se administró MEL en forma exógena, el contenido de los cuatro péptidos aumentó significativamente tanto en el bazo como en el

timo. Estos datos sugieren que la MEL estimula la síntesis *de novo* del precursor de las encefalinas y su procesamiento postraduccional hasta los péptidos biológicamente activos. En los animales control a los que se administró un exceso de MEL, no se produjo la sobreexpresión de las encefalinas. Estos datos nos indican que la relación fisiológica melatonina-opioides se encuentra sujeta a la homeostasis del organismo. Hasta la fecha, no se ha dilucidado el mecanismo molecular a través del cual la MEL promueve la síntesis de los péptidos opioides.

Palabras clave: Melatonina, opioides, sistema inmune.

ANTECEDENTES

Una función de la glándula pineal es informar al organismo de los cambios de luz en el medio ambiente. La señal bioquímica se transmite a través de la liberación de su hormona, la melatonina (MEL). Esta hormona es capaz de sincronizar la actividad celular con el fotoperiodo. La MEL se sintetiza a partir de la serotonina por acción secuencial de las enzimas N-acetiltransferasa (NAT) e hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT). La fisiología de la MEL como mensajero químico es la de contribuir a mantener la homeostasis celular en todos los aparatos y sistemas que conforman el organismo.

En el sistema inmune, la MEL participa tanto en la respuesta humoral como en la celular. La inhibición farmacológica de la síntesis de MEL generada por la administración vespertina de antagonistas β -adrenérgicos, o de inhibidores de la síntesis de serotonina, disminuye la respuesta humoral primaria ante un estímulo antigénico (20). Además, la administración exógena de MEL antagoniza los efectos inmunosupresores inducidos por la corticosterona y por el estrés agudo sobre la respuesta humoral primaria y sobre el tamaño del timo (21).

En la respuesta inmune celular, el mecanismo de acción de la MEL está mediado por la unión a sus receptores localizados en la membrana plasmática y en el núcleo de los monocitos y de los linfocitos (5, 13, 22). La dinámica de este proceso estimulado por la MEL incluye la liberación de interleucina-12 a partir de los monocitos, lo que a su vez promueve la diferenciación de los linfocitos T_H1 (12). En estos últimos, la MEL induce la liberación de interleucina-2 e interferón- γ (13, 22), cuya función es proteger al organismo contra la presencia de microorganismos intracelulares.

Maestroni y cols., han sugerido que la participación de la MEL en la respuesta inmune está mediada por los péptidos opioides, ya que la presencia de la naltrexona (antagonista específico de los opioides) revierte el efecto inmunoestimulante producido por la MEL (21, 23).

Es reconocido que las células del sistema inmune, como los linfocitos, los monocitos y las células polimorfonucleares, poseen la maquinaria bioquímica necesaria para efectuar la síntesis del precursor de las encefalinas, la Proencefalina A (PA), así como para realizar el procesamiento postraduccional de la PA, que da lugar a los péptidos biológicamente activos y a la liberación de los mismos (14, 31, 34, 35). La relación funcional entre la MEL y los péptidos opioides ha sido establecida previamente. Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la ausencia de MEL endógena rompe el ritmo circádico de las encefalinas y disminuye significativamente su contenido tisular en varias estructuras del sistema nervioso central de la rata (4).

Sin embargo, el efecto de la ausencia de melatonina en la concentración de los opioides en el sistema inmune es desconocido. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es establecer si la ausencia de melatonina endógena modifica el contenido tisular de los opioides en el timo y en el bazo de la rata.

DISEÑO EXPERIMENTAL

a) Control naïve: Ratas macho de la cepa Wistar con un ciclo de luz oscuridad de 12 x 12 h. (En el presente trabajo se utilizará el término *naïve* para señalar aquellos animales que no han sido sometidos a ningún tratamiento, modificación o cambio de horario, a fin de diferenciarlos de los animales control que recibieron una inyección con el vehículo o con melatonina en forma exógena).

b) Administración exógena de melatonina a los animales control: Con el propósito de analizar si un exceso de la hormona modifica la concentración de opioides en los animales control, se administró por vía subcutánea una dosis de 800 µg/kg.

c) Administración del vehículo a los animales control: Dado que la MEL no es soluble en agua, se disuelve en una cantidad mínima de etanol y posteriormente se lleva al volumen deseado con solución salina isotónica (SSI). Para descartar que los cambios producidos en la concentración de encefalinas pudieran deberse a la inyección del vehículo, un grupo de animales control fue inyectado con el mismo volumen del vehículo utilizado para administrar la hormona.

d) Ausencia de melatonina endógena: La estrategia metodológica para reducir la concentración plasmática de melatonina (sin usar inhibidores farmacológicos) consiste en someter a los animales a un periodo de 15 días con luz continua (30). Para evitar el estrés que la luz puede producir en las ratas, se utilizó una intensidad de <50 lux.

e) Administración de melatonina exógena: Si la concentración de opioides se reduce en los animales sometidos a luz continua, entonces la administración de una dosis alta y única de melatonina (800 µg/kg s.c.) podría reestablecer la concentración basal de encefalinas.

f) Efecto de la oscuridad: Como se ha mencionado, cuando los animales se someten a un periodo de 15 días con luz continua, se reduce la concentración plasmática de melatonina. Por el contrario, la oscuridad activa el mecanismo de síntesis de la hormona (30). Con el propósito de reestablecer la concentración de melatonina, las ratas fueron colocadas en un cuarto oscuro por un lapso de 4 h antes de ser sacrificadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Un grupo de 60 ratas macho de la cepa Wistar (220-240 g), fue colocado en un cuarto con una temperatura controlada de $21 \pm 1^\circ\text{C}$. El ciclo de luz-oscuridad fue de 12 x 12 h; la fase luminosa comenzó a las 06:00 h. El alimento y el agua fueron suministrados *ad libitum*.

En función del diseño experimental previamente descrito, los animales fueron divididos en seis subgrupos:

a) Grupo control *naïve*: Diez ratas fueron colocadas en un cuarto con un ciclo de luz-oscuridad de 12 x 12 horas. La fase de luz comenzó a las 06:00 h.

b) Grupo control + MEL: Diez animales control fueron inyectados con MEL (800 µg/kg s.c.) a las 9:00 h. Los animales fueron sacrificados cuatro horas después de la administración de la hormona.

c) Grupo control + vehículo: Diez ratas control fueron inyectadas por vía subcutánea con el mismo volumen del vehículo utilizado para la administración de la hormona (etanol: SSI). La administración del vehículo se realizó a las 9:00 y los animales fueron sacrificados cuatro horas después.

d) Grupo experimental: Diez ratas fueron colocadas en un cuarto con luz continua (LC) por un periodo de 15 días. La intensidad de la luz utilizada para no causar estrés en los animales fue de <50 lux.

e) Grupo melatonina exógena: Un grupo de diez ratas sometidas a un periodo de 15 días con luz continua recibió una dosis única de MEL (800 µg/kg s.c.) a las 9:00. Después de la inyección, las ratas permanecieron cuatro horas en condiciones de luz, antes de ser sacrificadas.

f) Grupo oscuridad: Diez ratas fueron sometidas a un periodo de 15 días con luz continua. Una vez terminado este periodo, las ratas fueron colocadas en

un cuarto oscuro durante cuatro horas, antes de ser sacrificadas. El periodo de oscuridad comenzó a las 9:00.

La razón por la que se esperaron cuatro horas antes de sacrificar a los animales de los grupos b, c, e y f se debe al tiempo necesario para la síntesis *de novo* de los opioides.

Métodos

Las ratas se sacrificaron por decapitación, y el bazo y el timo se disecaron de acuerdo con la técnica descrita previamente (24).

Cada órgano se introdujo en tubos de ensayo con 5 ml de ácido acético 2 M. Las muestras se hirvieron en baño María durante 15 minutos y después se colocaron en un baño de hielo. Posteriormente se homogeneizaron y centrifugaron a 50,000 x g, durante 1 h a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y para purificarlo se aplicó en una columna de vidrio (0.5 x 12 cm) con Amberlita XAD-2. La secuencia de lavado fue la siguiente: 20 ml de HCl 0.1 N, 40 ml de agua destilada y para eluir la muestra se utilizaron 20 ml de metanol absoluto. Las muestras fueron evaporadas a sequedad, resuspendidas en 1 ml de agua destilada y congeladas a -20°C hasta la posterior cuantificación de las encefalinas.

Determinación de proteínas: El contenido de proteínas se determinó mediante la técnica de Lowry (18). Se utilizó albúmina sérica bovina (ASB) como sustancia patrón. El límite de sensibilidad fue de 5 µg.

Cuantificación de los péptidos opioides: Los péptidos opioides presentes en el timo y en el bazo se cuantificaron con la técnica de radioinmunoensayo. Para este análisis se utilizaron anticuerpos policlonales obtenidos en nuestro laboratorio. Los datos de la reactividad cruzada de los anticuerpos se han reportado previamente (3). El contenido de la inmunoreactividad (IR) para la Met-Encefalina (IR-ME), el Heptapéptido (IR-HE), la Leu-Encefalina (IR-LE), y el Octapéptido (IR-OC) se expresó como pmol del péptido por miligramo de proteína.

Análisis estadístico: Las diferencias estadísticas entre los grupos fueron determinadas mediante el Análisis de la Varianza de una vía y las pruebas *post hoc*, Tukey HSD y Tamhane. El valor de la significancia utilizada en este trabajo fue de $p < 0.05$.

RESULTADOS

En la figura 1 se muestra la concentración de IR-ME en el timo y en el bazo de la rata. En los grupos con un ciclo de luz oscuridad de 12 x 12 h, inyectados con el vehículo o con la dosis de MEL (800 µg/kg),

la concentración de IR-ME no se modificó con respecto al control *naïve*. Sin embargo, en el timo (panel A), el grupo de animales sometidos a 15 días con luz continua mostró una disminución de 54% con respecto al control *naïve* ($p < 0.005$). Por su parte, en los animales a los que se administró la hormona en forma exógena (800 µg/kg), y que habían permanecido en luz continua, encontramos un incremento de 185% en el contenido de IR-ME con respecto al grupo de luz continua ($p < 0.001$). En el grupo sometido a la oscuridad durante cuatro horas, la concentración de Met-Encefalina no se modificó con respecto al grupo de luz continua.

En el panel B se muestra el contenido de IR-ME en el bazo de la rata. El comportamiento de este péptido fue similar con respecto al timo. En los grupos control tratados con el vehículo o con la dosis en exceso de melatonina, el contenido de IR-ME no se modificó con respecto al control *naïve*. El grupo sometido a luz continua presentó una disminución de 45% con respecto al control *naïve* ($p < 0.0001$), y cuando se le administró melatonina en forma exógena, la concentración de IR-ME aumentó 63%, con respecto al grupo de luz continua ($p < 0.001$). El grupo de oscuridad no presentó cambios con respecto al grupo de luz continua.

En la figura 2 se observa el contenido de IR-HE en el timo de la rata (panel A). Este péptido derivado de la Proencefalina A muestra un patrón de distribución similar a la IR-ME, toda vez que su contenido en los animales sometidos a luz continua se redujo significativamente con respecto al control *naïve* ($p < 0.001$). La administración del vehículo o de la melatonina exógena en los animales control no produjo cambios en la concentración del péptido al compararlo con el control *naïve*. Sin embargo, en aquellos animales carentes de la hormona por estar sometidos al efecto de la luz continua, la administración de MEL en forma exógena produjo un incremento de 129% ($p < 0.007$). El grupo de oscuridad no se modificó con respecto al grupo de luz continua.

El panel B corresponde al contenido de IR-HE en el bazo. En estos resultados observamos que en el grupo control al cual se administró el vehículo existe un incremento no significativo en la concentración de IR-HE. En el grupo control al cual se administró melatonina no se obtuvieron modificaciones con respecto al control *naïve*. En el grupo de luz continua, el contenido tisular de IR-HE en el timo se redujo aproximadamente 50% ($p = 0.08$), para incrementarse más de 130% ($p < 0.0001$) después de la administración exógena de la hormona. Cuatro horas de oscuridad no modificaron el contenido de este péptido.

En la figura 3 se muestra el contenido de IR-LE en el timo de la rata (panel A). En forma semejante a los dos péptidos descritos, el efecto del vehículo o de la hormona en exceso no se modificó con respecto al grupo control *naïve*. En el grupo sometido a luz continua, se redujo 55% la concentración de IR-LE con respecto al control *naïve* ($p < 0.01$). Cuando se administró MEL por vía exógena al grupo sometido a luz

continua, el contenido de IR-LE aumentó significativamente ($>116\%$) con respecto al grupo de luz continua ($p < 0.01$). No se observaron cambios entre el grupo control *naïve* y los grupos a los que se administró en forma exógena el vehículo o la melatonina. El grupo sometido a la oscuridad durante cuatro horas no sufrió cambios con respecto al de luz continua.

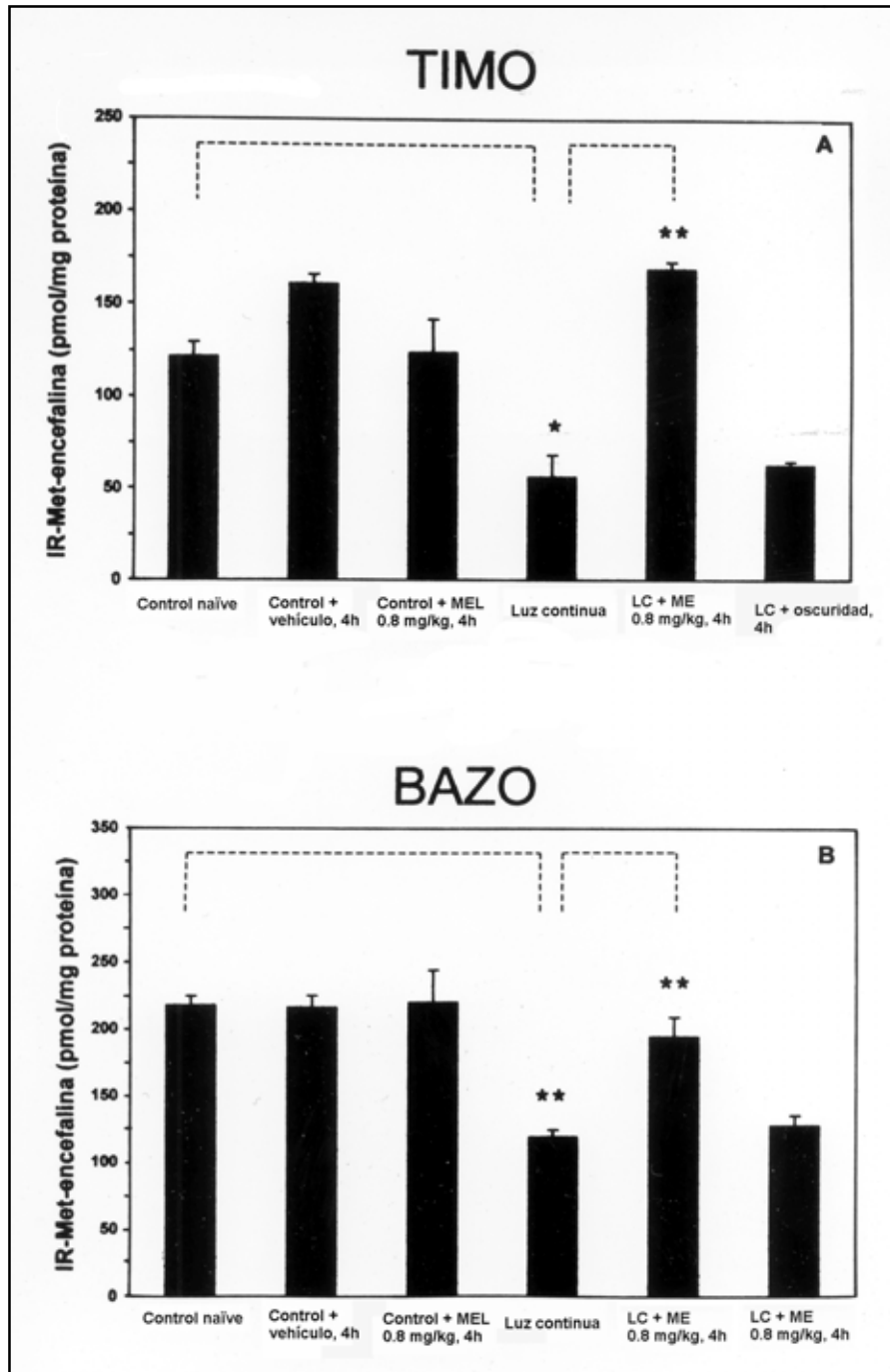


Fig. 1. Contenido de IR-Met-enkefalina en el timo (panel A) y en el bazo (panel B). Los resultados se expresan como pmol/mg de proteína. Cada valor es el promedio \pm s.e.m. ($n=7$). Los niveles de significancia fueron calculados mediante el análisis de varianza de una vía y las pruebas *post hoc*, Tukey HSD y Tamhane. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

En el panel B, que corresponde al bazo, encontramos que el contenido tisular de IR-LE sufrió un decremento de 54% ($p < 0.006$) en los animales con luz continua con respecto al control *naïve*. La administración exógena de melatonina a los animales sometidos a luz continua produjo un incremento de 112% ($p < 0.01$) en la concentración del péptido, con respecto al grupo de luz continua. En el grupo

sometido a la oscuridad no hubo cambios con respecto al de la luz continua. Los grupos control tampoco sufrieron modificaciones.

Finalmente, en la figura 4 se muestra el contenido de IR-OC en el timo (panel A) y en el bazo (panel B) de la rata. El efecto observado de este péptido en el timo es similar al descrito para IR-ME, IR-HE e IR-LE.

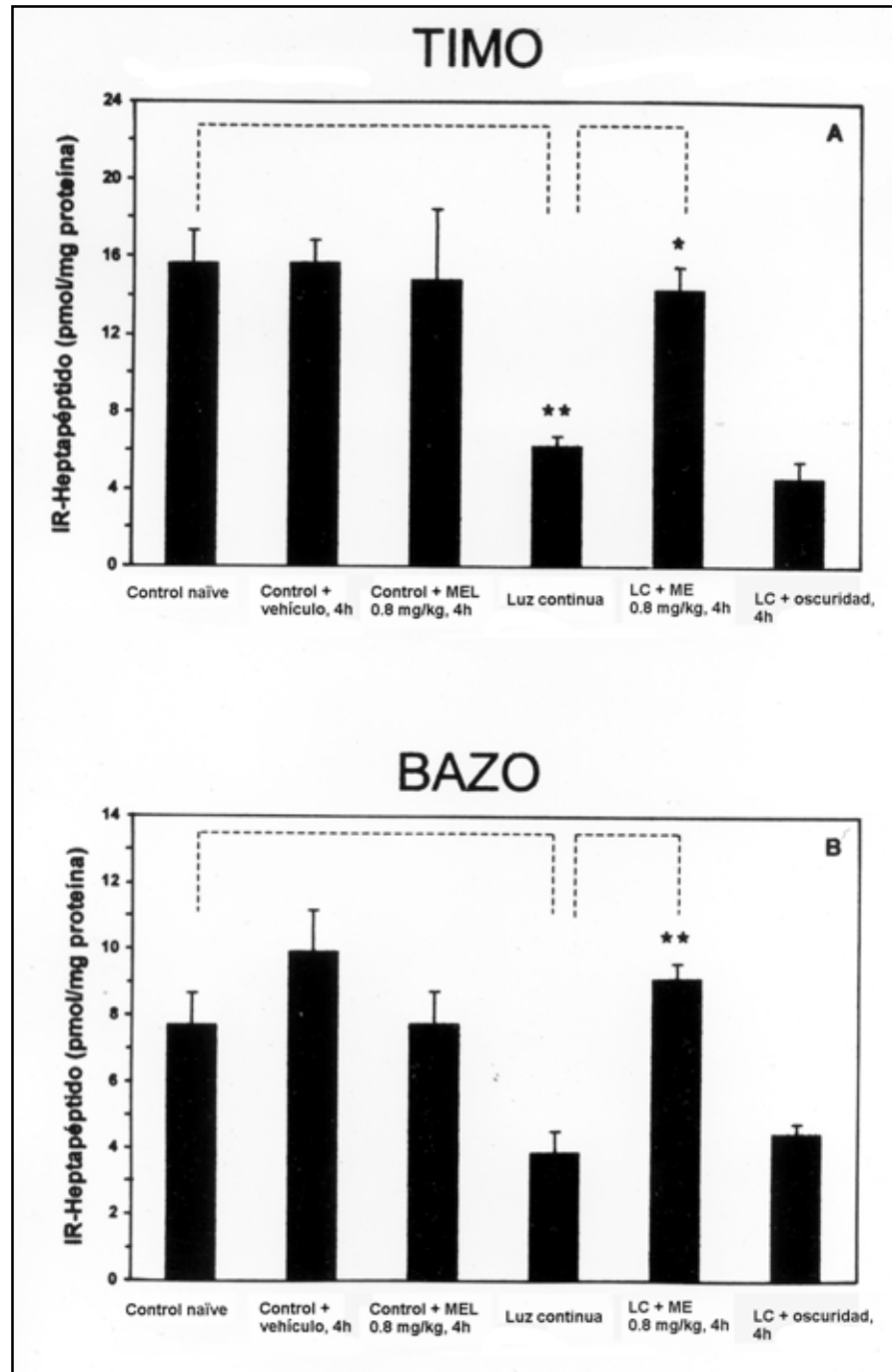


Fig. 2. Contenido de IR-Heptapéptido en el timo (panel A) y en el bazo (panel B). Los resultados se expresan como pmol/mg de proteína. Cada valor es el promedio \pm s.e.m. ($n=8$). Los niveles de significancia fueron calculados mediante el análisis de varianza de una vía y las pruebas *post hoc*, Tukey HSD y Tamhane. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

En el timo, la concentración de IR-OC se redujo 60% en el grupo de luz continua con respecto al control *naïve* ($p < 0.001$). Cuando el grupo de luz continua recibió una dosis de MEL exógena, se produjo un incremento de 150% ($p < 0.001$), en el contenido de IR-OC con respecto a los animales en luz continua y que no recibieron la dosis de la hormona. En el bazo, el contenido de IR-OC

disminuyó 40% en el grupo de luz continua comparado con el control *naïve*. Los animales a los que se administró MEL exógena después de un periodo de 15 días de luz continua mostraron un incremento de 182% ($p < 0.0001$) en el contenido de dicho péptido, en comparación con los animales que no recibieron la dosis de la hormona. En ambos órganos linfoides se observó que la administración

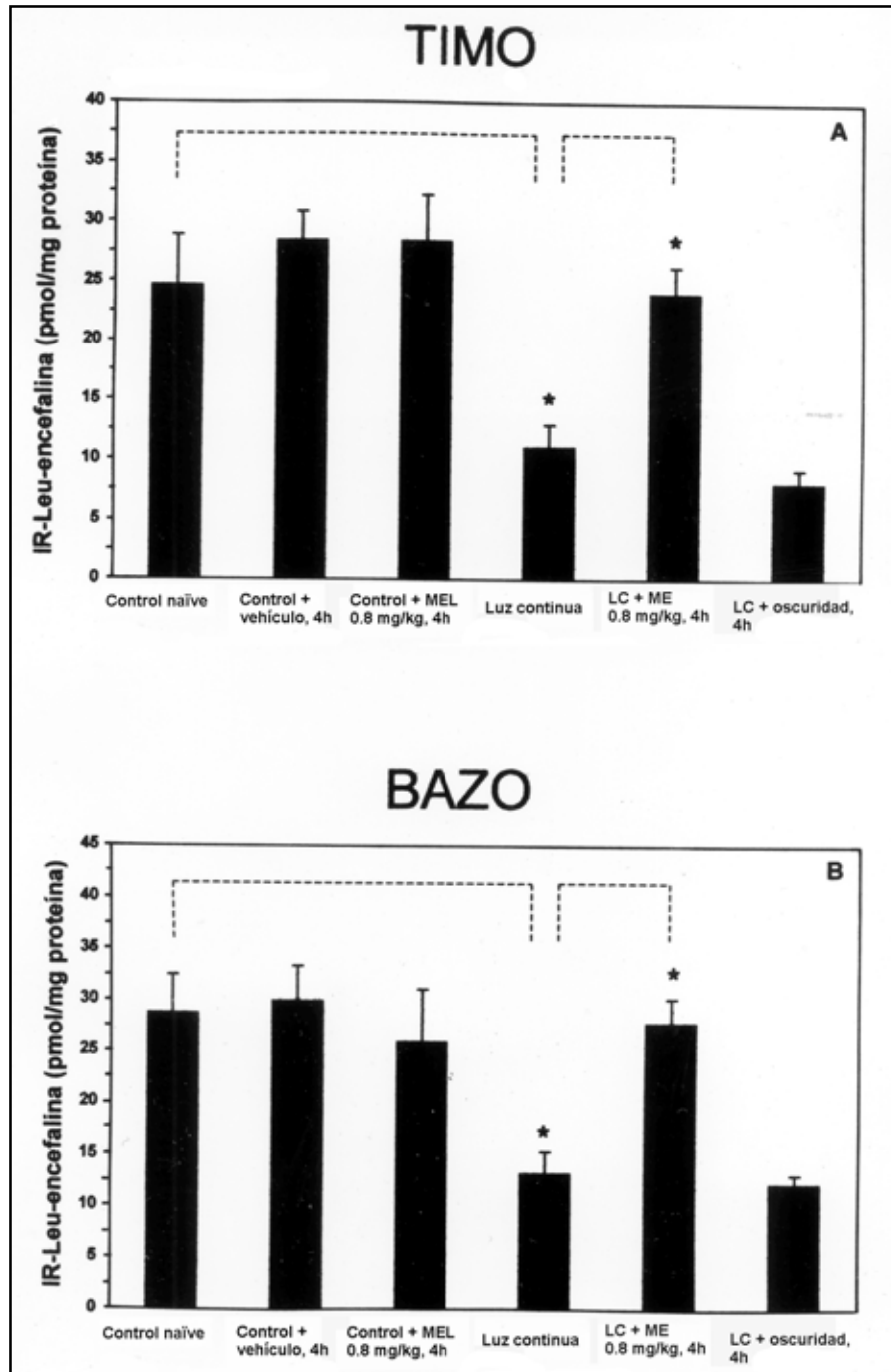


Fig. 3. Contenido de IR-Leu-Enkefalina en el timo (panel A) y en el bazo (panel B). Los resultados se expresan como pmol/mg de proteína. Cada valor es el promedio \pm s.e.m. ($n=8$). Los niveles de significancia fueron calculados mediante el análisis de variancia de una vía y las pruebas *post hoc*, Tukey HSD y Tamhane. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

de MEL o del vehículo a los animales control no modificó la concentración de IR-OC. Asimismo, en los animales sometidos a oscuridad durante cuatro horas no se observaron cambios en el contenido de IR-OC con respecto al grupo en luz continua.

DISCUSIÓN

Los siguientes son resultados de mayor relevancia del presente trabajo: 1. el contenido tisular de los cuatro péptidos opioides analizados se redujo 50% ante la

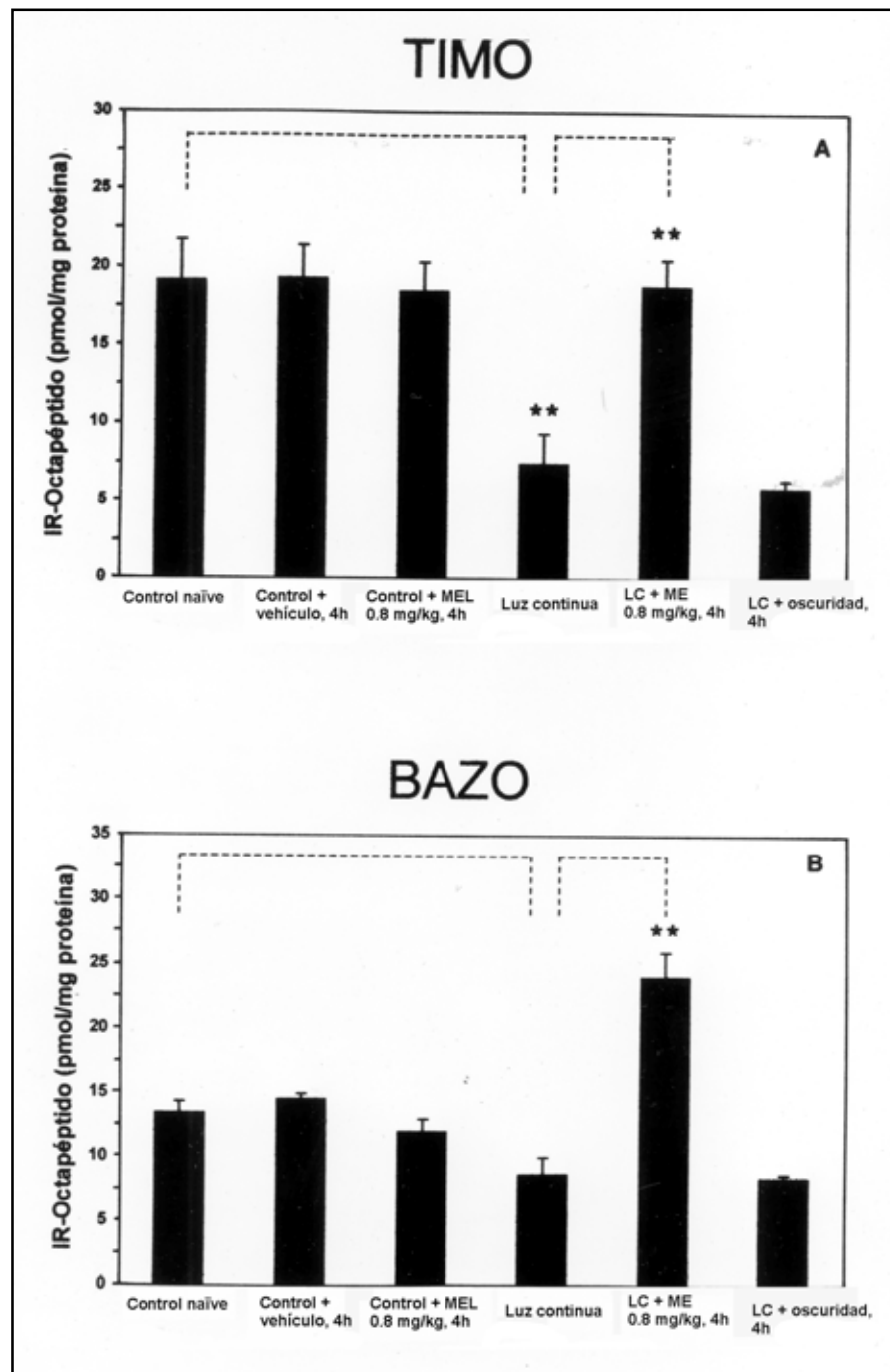


Fig. 4. Contenido de IR-Octapéptido en el timo (panel A) y en el bazo (panel B). Los resultados se expresan como pmol/mg de proteína. Cada valor es el promedio \pm s.e.m. (n=8). Los niveles de significancia fueron calculados mediante el análisis de varianza de una vía y las pruebas *post hoc*, Tukey HSD y Tamhane. * p < 0.01, ** p < 0.001.

ausencia de melatonina endógena; 2. una vez que se administró la melatonina a los animales carentes de la hormona, la concentración de opioides se incrementó en un orden superior a 100% con respecto a los animales con luz continua. No hubo un aumento significativo con respecto a los animales control *naïve*, y 3. no hubo cambios en los grupos control después de la administración de MEL o el vehículo.

Cuando los animales se someten a un periodo de 15 días con luz continua, el contenido plasmático de la MEL se reduce significativamente durante las 24 horas del día (30). Como se observa en las cuatro figuras de resultados, en los animales sometidos a un periodo de 15 días con luz continua, el contenido de IR-ME, IR-HE, IR-LE e IR-OC se redujo significativamente en el timo y en el bazo. Estos datos son similares a los reportados para el sistema nervioso central, en el que la falta de melatonina endógena disminuyó el contenido y la liberación de las encefalinas en varias estructuras cerebrales (4). Los datos del presente trabajo sugieren por primera vez que la melatonina interviene indirectamente en la síntesis de los opioides en el bazo y en el timo. La administración exógena de la hormona produjo un incremento superior a 100% en la concentración de los cuatro péptidos en los dos órganos linfoides analizados, y este incremento se produjo en un periodo de cuatro horas después de la administración de la MEL. Nuestros datos sugieren que la MEL cumple no sólo una función como mensajero fotoneuroendocrino, sino que puede participar en la síntesis de los neuropéptidos. El aumento en la concentración de los péptidos opioides por la presencia de la MEL en el sistema inmune, es coherente con los resultados reportados por Wajs y cols. (37). Estos autores encontraron que la administración de MEL es capaz de inducir la expresión del gen que codifica para la síntesis de la Proopiomelanocortina (POMC), en órganos linfoides como la médula ósea y los nódulos linfáticos. De la POMC se derivan varias hormonas peptídicas, como la MSH, ACTH y la β -endorfina. Hasta donde conocemos, el trabajo de Wajs y su grupo es la única evidencia directa de la acción de la MEL sobre la síntesis de los péptidos opioides en el sistema inmune.

Aún resta dilucidar las vías de señalización implicadas en el mecanismo molecular de acción de la MEL sobre la síntesis de las encefalinas en el sistema inmune. Sin embargo, ya se ha demostrado la presencia de receptores estereoespecíficos para la MEL en las membranas y núcleos celulares del timo y del bazo (28, 29). Rafii-El-Idrissi y cols. han reportado que los receptores membranales de la MEL en el bazo

presentan una mayor avidéz por su ligando natural después de que los animales se han pinealectomizado o sometido a un periodo de luz continua (29). La unión de la MEL con los receptores de membrana del tipo MT1 activa la fosfolipasa C (36). La consecuente cascada de señalización puede incluir el aumento del Ca^{2+} intracelular y la activación de la proteína cinasa C (PKC), como se ha demostrado en experimentos realizados en células de neuroblastoma N1E-115 y en neuronas hipotalámicas GT1 (1, 6, 7, 19, 32). La PKC y sus diferentes isoenzimas son capaces de fosforilar las cinasas del tipo ERK1/2 (10, 27, 32) y JNK (9, 17, 25), pertenecientes a la familia de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Las enzimas ERK1/2 y JNK activan la expresión del ARNm de los factores de transcripción Fos (c-fos, fra-1, fra-2) y Jun (c-jun, junB), que a su vez forman un heterodímero denominado AP-1 (9, 15, 25, 32). Este factor de transcripción induce la expresión del gen de la Proencefalina A en diversas estructuras y células del SNC (11, 15, 38, 39, 40, 41). Además de estas evidencias, se ha demostrado que en cultivos de células de los tipos COS-7 y MCF-7, la estimulación de los receptores del tipo MT1 activa las enzimas JNK y ERK (8). Se ha descrito también que la MEL estimula la unión de la proteína AP-1 al ADN (33).

En el grupo de animales sometido a un periodo de cuatro horas de oscuridad después de 15 días con luz continua, no se observaron cambios significativos en los dos péptidos analizados. Es posible que el lapso de cuatro horas no haya sido suficiente para que se pudiera completar la síntesis *de novo* de las encefalinas. En el SNC, este lapso de oscuridad fue suficiente para restablecer el contenido basal de opioides en varias estructuras cerebrales, en comparación con los animales carentes de MEL (4).

En el grupo control que recibió una dosis en exceso de MEL durante la fase de luz (cuando la concentración fisiológica de la MEL es muy baja), ninguno de los cuatro péptidos analizados modificó su contenido tisular.

Es reconocido que en el SNC la secreción de la melatonina y de los opioides ocurre durante la fase de oscuridad (24:00-01:00 h). Si la melatonina es capaz de sincronizar la actividad celular con el fotoperiodo, es factible que el ritmo circádico de los opioides se encuentre sujeto a la presencia de la hormona (2, 3, 16). Por lo tanto, una vez inducida la síntesis de opioides durante la noche, sus concentraciones plasmáticas y tisulares serán suficientes para llevar a cabo su papel fisiológico. Estos datos sugieren que si el organismo conserva el ritmo circádico de secreción de la hormona y tiene la

concentración fisiológica de la misma, un exceso de ésta durante la fase de luz no producirá efecto alguno sobre el contenido basal de los opioides en el sistema inmune. Esta hipótesis es coherente con los resultados de Mocchegiani y cols (26) quienes, en un estudio acerca de la participación del zinc y de la MEL en el restablecimiento de las funciones inmunes en animales pinealectomizados, reportaron que la administración de MEL en ratones falsos-operados no produjo una sobreexpresión en los niveles de interleucina-2. Esto significa que, cuando se conservó la concentración fisiológica de la hormona en los animales control, la respuesta inmune no sufrió cambios (26).

En conclusión podemos decir que, en forma semejante a lo que ocurre en el sistema nervioso central, en el sistema inmune la presencia de melatonina es necesaria para mantener las concentraciones fisiológicas de las encefalinas. Además, nuestros resultados sugieren que, en el sistema inmune, la melatonina puede participar en la síntesis *de novo* de los péptidos opioides.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración de Gabriel Linares y Mauro Abonza por su ayuda técnica, y de Raúl Cardoso por el material de ilustración.

REFERENCIAS

- ANTON-TAY F, RAMIREZ G, MARTINEZ I, BENITEZ-KING G: In vitro stimulation of protein kinase C by melatonin. *Neurochem Res*, 23(5):601-6, 1998.
- ASAI M, VINDROLA O, ZUBIETA M, TALAVERA E, MASSARINI A: Diurnal variations of IR-Met-enkephalin in the brain of pentylentetrazol-kindled rats. *Brain Res*, 442:81-85, 1988.
- ASAI M, ZUBIETA M, MATAMOROS-TREJO G, LINARES G, AGUSTIN P: Diurnal variations of opioid peptides and synenkephalin *in vitro* release in the amygdala of kindled rats. *Neuropeptides*, 32(3):293-299, 1998.
- ASAI M: Efecto de la melatonina sobre el sistema endógeno opioide. XLII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Cancún, QR. Septiembre 2000.
- BARJAVEL MJ, MAMDOUH Z, RAGHBATE N, BAKOU-CHE O: Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes. *J Immunol*, 160(3):1191-1197, 1998.
- BENITEZ-KING G: PKC activation by melatonin modulates vimentin intermediate filament organization in N1E-115 cells. *J Pineal Research*, 29(1):8-14, 2000.
- BENITEZ-KING G, HERNANDEZ ME, TOVAR R, RAMIREZ G: Melatonin activates PKC- α but not PKC- ϵ in N1E-115 cells. *Neurochem Int*, 39(2):95-102, 2001.
- CHAN AS, LAI FP, LO RK, VOYNO-YASENETSKAYA TA, STANBRIDGE EJ, WONG YH: Melatonin MT1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. *Cell Signal*, 14(3):249-57, 2002.
- CHEN Y, WU Q, SONG SY, SU WJ: Activation of JNK by TPA promotes apoptosis via PKC pathway in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol*, 8(6):1014-8, 2002.
- CHOE Y, LEE BJ, KIM M: Participation of protein kinase C alpha isoform and extracellular signal-regulated kinase in neurite outgrowth of GT1 hypothalamic neurons. *J Neurochem*, 83(6):1412-22, 2002.
- FU W, SHAH SR, JIANG H, HILT DC, DAVE HP, JOSHI JB: Transactivation of proenkephalin gene by HTLV-1 tax1 protein in glial cells: involvement of Fos/Jun complex at an AP-1 element in the proenkephalin gene promoter. *J Neurovirol*, 3(1):16-27, 1997.
- GARCIA-MAURINO S, POZO D, CARRILLO-VICO A, CALVO JR, GUERRERO JM: Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. *Life Sci*, 65(20):2143-50, 1999.
- GARCIA-MAURINO S, GONZALEZ-HABA MG, CALVO JR, RAFII-EL-IDRISSI M, SANCHEZ-MARGALET V, GOBERNA R, GUERRERO JM: Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol*, 159(2):574-81, 1997.
- KAVELAARS A, HEIJNEN CJ: Expression of prepro-enkephalin mRNA and production and secretion of enkephalins by human thymocytes. *Ann NY Acad Sci*, 917:778-783, 2000.
- KIM YH, CHOI SS, LEE JK, WON JS, CHOI MR, SUH HW: Possible roles of JNK pathway in the regulation of hippocampal proenkephalin and immediate early gene expression induced by kainic acid. *Mol Cells*, 11(2):144-50, 2001.
- KUMAR MSA, CHEN CL, SHARP DC, LIU JM, KALRA PS, KALRA SP: Diurnal fluctuations in Methionine-enkephalin levels in the hypothalamus and preoptic area of the male rat: effects of pinealectomy. *Neuroendocrinology*, 35:28-31, 1982.
- LEVI NL, HANOCH T, BENARD O, ROZENBLAT M, HARRIS D, REISS N, NAOR Z, SEGER R: Stimulation of Jun N-terminal kinase (JNK) by gonadotropin releasing hormone in pituitary alpha T3-1 cell line is mediated by protein kinase C, c-Src, and CDC42. *Mol Endocrinol*, 12(6):815-24, 1998.
- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193:265-275, 1951.
- LUPOWITZ Z, RIMLER A, ZISAPEL N: Evaluation of signal transduction pathways mediating the nuclear exclusion of the androgen receptor by melatonin. *Cell Mol Life Sci*, 58(14): 2129-35, 2001.
- MAESTRONI GJ, CONTI A, PIERPAOLI W: The pineal gland and the circadian, opiate, immunoregulatory role of melatonin. *Ann NY Acad Sci*, 496:67-77, 1987.
- 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 mechanism. *Immunology*, 63(3):465-9, 1988.
- MAESTRONI GJ: The photoperiod transducer melatonin and the immune-hematopoietic system. *J Photochem Photobiol*, 43(3):186-92, 1998.
- MAESTRONI GJ, CONTI A: Immuno-derived opioids as mediators of the immuno-enhancing and anti-stress action of melatonin. *Acta Neurol*, 13(4):356-60, 1991.
- MISHELL BB, SHIIGI SM: Selected methods in cellular immunology. WH. FREEMAN and Co. E.U.A. páginas 4,5. Nueva York, 1980.
- MITSUTAKE N, NAMBA H, SHKLYAEV SS, TSUKAZAKI T, OHTSURU A, OHBA M, KUROKI T, AYABE H, YAMASHITA S: PKC delta mediates ionizing radiation-induced activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase through MKK7 in human thyroid cells. *Oncogene*, 20(8):989-96, 2001.

26. MOCCHEGIANI E, BULIAN D, SANTARELLI L, TIBALDI A, MUZZIOLI M, LESNIKOV V, PIERPAOLI W, FABRIS N: The zinc pool is involved in the immune-reconstituting effect of melatonin in pinealectomized mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 277(3):1200-8, 1996.
27. NADAL-WOLBOLD F, PAWLOWSKI M, LEVY-TOLEDANO S, BERROU E, ROSA JP, BRYCKAERT M: Platelet ERK2 activation by thrombin is dependent on calcium and conventional protein kinases C but not Raf-1 or R-Raf. *FEBS Lett*, 531(3):475-82, 2002.
28. POZO D, DELGADO M, FERNANDEZ-SANTOS JM, CALVO JR, GOMARIZ RP, MARTIN-LACAVE I, ORTIZ GG, GUERRERO JM: Expression of the Mel1a-melatonin receptor mRNA in T and B subsets of lymphocytes from rat thymus and spleen. *FASEB J*, 11(6):466-73, 1997.
29. RAFII-EL-IDRISSI M, CALVO JR, GIORDANO M, GUERRERO JM: Specific binding of 2-[125I]iodomelatonin by rat spleen crude membranes: day-night variations and effect of pinealectomy and continuous light exposure. *J Pineal Res*, 20(1):33-8, 1996.
30. REITER RJ: The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*, 49:654-664, 1993.
31. ROSEN H, BEHAR O, ABRAMSKY O, OVADIA H: Regulated expression of proenkephalin A in normal lymphocytes. *J Immunol*, 143:3703-3707, 1989.
32. ROY D, BELSHAM DD: Melatonin receptor activation regulates GnRH gene expression and secretion in GT1-7 GnRH neurons. Signal transduction mechanisms. *J Biol Chem*, 277(1):251-258, 2002.
33. URATA Y, HONMA S, GOTO S, TODOROKI S, IIDA T, CHO S, HONMA K, KOND T: Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med*, 27(7-8):838-47, 1999.
34. VINDROLA O, PADROS MR, STERIN-PRYNC A, ASE A, FINKIELMAN S, NAHMOD V: Proenkephalin system in human polymorphonuclear cells. Production and release of a novel 1.0-kD peptide derived from synenkephalin. *J Clin Invest*, 86:531-537, 1990.
35. VINDROLA O, PADROS MR, BAUTISTA D: Opioides endógenos en la comunicación entre el sistema nervioso y el sistema inmune. Precongreso Actualización en Fisiología. Puebla, Pue. 1997.
36. VON GALL C, STEHLE JH, WEAVER DR: Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res*, 309(1):151-62, 2002.
37. WAJS E, KUTOH E, GUPTA D: Melatonin affects proopiomelanocortin gene expression in the immune organs of the rat. *Eur J Endocrinol*, 133:754-60, 1995.
38. WON JS, SONG DK, KIM YH, HUH SO, SUH HW: The stimulation of rat astrocytes with phorbol-12-myristate-13-acetate increases the proenkephalin mRNA: involvement of proto-oncogenes. *Brain Res Mol Brain Res*, 54(2):288-97, 1998.
39. WON JS, SONG DK, HUH SO, KIM YH, SUH HW: Effect of melatonin on the regulation of proenkephalin and prodynorphin mRNA levels induced by kainic acid in the rat hippocampus. *Hippocampus*, 10(3):236-43, 2000.
40. WON JS, KIM YH, SONG DK, HUH SO, LEE JK, SUH HW: Stimulation of astrocyte-enriched culture with arachidonic acid increases proenkephalin mRNA: involvement of proto-oncoprotein and mitogen activated protein kinases. *Brain Res Mol Brain Res*, 76(2):396-406, 2000.
41. ZIOLKOWSKA B, PRZEWLOCKA B, MIKA J, LABUZ D, PRZEWLOCKI R: Evidence for Fos involvement in the regulation of proenkephalin and prodynorphin gene expression in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*, 54(2):243-51, 1998.