
Efecto de la Melatonina en la proliferación linfocitaria y la producción de Interleucina 2 (IL-2) e Interleucina 1 beta (IL-1 β) en esplenocitos de ratones.

Julia Arias¹, Eddy Melean¹, Nereida Valero¹, Héctor Pons², Leonor Chacín-Bonilla¹, Yraima Larreal¹ y Ernesto Bonilla¹.

¹Instituto de Investigaciones Clínicas “Dr. Américo Negrette” y ²Centro de Cirugía Experimental. Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Apartado 1151. Maracaibo 4001-A, Venezuela.

Palabras clave: Melatonina, IL-2, IL-1 β , proliferación celular, esplenocitos.

Resumen: La Melatonina (MLT) influye en la modulación del sistema inmunitario. Previos estudios describen incremento de la proliferación celular con aumento o disminución de citocinas; otros autores reportan efectos inhibitorios o ningún efecto en las funciones inmunitarias. Debido a esta controversia, y con el objeto de estudiar el mecanismo mediante el cual la MLT ejerce sus acciones, se planteó examinar su efecto en la proliferación de esplenocitos mûridos ante un estímulo mitogénico y cuantificar los niveles de IL-2 e IL-1 β en ausencia o presencia de la Fitoheماغlutinina (PHA) en sobrenadantes de cultivo de células esplénicas de ratones tratados o no con MLT. La respuesta linfoproliferativa se evaluó utilizando la incorporación de timidina marcada con tritio, en esplenocitos de ratones tratados con 500 μg de MLT/Kg de peso e *in vitro* con 5, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MLT. La detección de IL-2 e IL-1 β se realizó con la técnica de ELISA. Se observó una elevación ($p < 0,01$) de la proliferación, a dosis óptima de PHA, de los esplenocitos tratados *in vitro* con 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MLT, con respecto al grupo control. El tratamiento *in vivo* e *in vitro* con MLT incrementó los niveles de IL-2 e IL-1 β en ausencia o presencia de PHA, manteniendo elevada la concentración de IL-1 β hasta el noveno día de tratamiento. Estos resultados sugieren que la MLT actúa en forma directa en la proliferación linfocitaria uniéndose, posiblemente, a los receptores de alta afinidad para la hormona localizados en los esplenocitos, que estimula la producción de IL-2 e IL-1 β originando un incremento de la inmunidad celular.

Effect of Melatonin on lymphocyte proliferation and production of Interleukin-2 (IL-2) and Interleukin-1-beta (IL-1 β) in splenocytes of mice.

Invest Clin 2003; 44(1): 41-50

Key words: Melatonin, IL-2, IL-1 β , cell proliferation, splenocytes.

Abstract: The influence of Melatonin (MLT) on the modulation of the immune system has been described. In previous studies an increment of cell proliferation and an increase or a decrease of cytokines have been reported. Other workers have found inhibitory effects or no effect in the immune functions. Because of this controversy, and for the purpose of studying the mechanism by which MLT performs its functions, we evaluated its effect on murine splenocytes' proliferation after a mitogenic stimulation, and quantified the levels of IL-2 and IL-1 β in the absence or presence of Phytohemagglutinin (PHA) in supernatants of mice splenocytes cell culture treated or not with MLT. The lymphoproliferative response was assessed using tritiated thymidine in the splenocytes of mice treated with 500 μg of MLT/Kg b.w. and in cell cultures containing 5, 50 and 100 μg MLT/mL. The production of IL-2 and IL-1 β was detected by the ELISA test. An increase in the proliferation ($p < 0.01$) of spleen cells treated with 50 and 100 μg MLT/mL an optimal dose of PHA, was detected. The *in vivo* or *in vitro* treatment with MLT increased the levels of IL-2 and IL-1 β in the absence or the presence of PHA, maintaining the increase in the concentration of IL-1 β up to the to ninth day of treatment. These results suggest that MLT acts directly on cell proliferation probably by binding to high affinity receptors located on spleen cells, that stimulates the production of IL-2 and IL-1 β giving rise to an increment of cell immunity.

Recibido: 20-03-2002. Aceptado: 23-09-2002.

INTRODUCCIÓN

La Melatonina o N-acetil-5-metoxi-triptamina es una hormona producida principalmente por la glándula pineal y la retina de los vertebrados incluyendo a los humanos; es sintetizada durante la noche a partir del triptofano y es vertida a la circulación para alcanzar sus tejidos blancos, entre los que se encuentra el Sistema Nervioso Central (SNC) (1-3). La función principal de la MLT es conducir la influencia del ciclo luz – oscuridad sobre la fisiología del organismo, afectando así la regulación de los sistemas neuroendocrino e inmunitario (4, 5). Se ha determinado

que esta hormona, influye directa e indirectamente en la modulación del sistema inmunitario, provocando efectos múltiples en las células inmunitarias (6). De igual forma, corrige algunos estados de inmunodeficiencia causados por el estrés (5, 7-9), el envejecimiento (7, 10, 11), algunas drogas (7, 9, 12, 13) y las enfermedades virales (14-18). Con respecto a estas últimas, diversos autores, reportan el efecto protector de la MLT en infecciones virales producidas por los virus Semliki Forest, West Nile (14, 15) y Encefalitis Equina Venezolana (EEV) (17) al prolongar la sobrevivencia de ratones y retardar el inicio de la enfermedad.

Previos estudios reportan que el tratamiento *in vivo* con MLT estimula la respuesta inmunitaria humoral y celular (5, 7).

Los estudios *in vitro* son herramientas valiosas en la exploración de las propiedades de la MLT, ya que eliminan el efecto confuso que *in vivo* pudieran producir otras hormonas o factores solubles circulantes. Previas investigaciones con tratamientos *in vitro* con MLT reportan aumento de las funciones del sistema inmunitario. Así, la MLT incrementa la producción de IFN γ e IL-2 (19, 20), activa los monocitos humanos e induce la producción de IL-1 (21). Recientemente Drazen y col. (22), observaron un incremento de la proliferación de esplenocitos estimulados con Concanavalina A (Con A) y Shaji y col. (23) reportan que la MLT estimula la proliferación de células T CD4 y aumenta la síntesis de IL-4. Sin embargo, otros estudios *in vitro* reportan efectos inhibidores (24) o ningún efecto (25) en las funciones inmunitarias.

El presente trabajo tiene como objetivo determinar la respuesta linfoproliferativa de esplenocitos de ratones tratados o no con MLT, ante estímulos mitogénicos con fitohema glutinina (PHA) y la cuantificación de los niveles de IL-2 e IL-1 en ausencia o presencia del mitógeno, en sobrenadantes de cultivo de células esplenicas de ratones tratados o no con MLT.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 140 ratones NMRI albinos, machos, de 25 a 30 g de peso, obtenidos del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), alimentados "*ad libitum*" y mantenidos bajo ciclos de 12 horas luz/ oscuridad, en ambiente a temperatura de 25°C.

Melatonina

Se utilizó Melatonina (Research Biochemical International MA, USA), altamente purificada, diluida en solución salina fos-

fatada (PBS) estéril, a dosis de 500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso para el tratamiento *in vivo* de los animales y de 5, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el tratamiento *in vitro* de los esplenocitos, diluida en medio de cultivo RPMI-1640 estéril (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO).

Ensayo de Proliferación linfocitaria

Tratamiento *in vivo* con MLT

Los ratones fueron inyectados diariamente con MLT por vía subcutánea (s.c), dos horas antes de oscurecer (entre 5:00 y 6:00 p.m.) por diez días consecutivos; los ratones controles recibieron inyecciones de PBS por la misma vía. Al quinto, séptimo y noveno día de tratamiento, cinco ratones tratados y cinco no tratados, por grupo, fueron sacrificados por dislocación cervical. Sus bazos fueron extraídos en condiciones asépticas y los esplenocitos fueron separados del tejido, comprimiendo todo el bazo, según la técnica de descrita por Hudson y col. (26). Se preparó una suspensión de cada bazo en medio de cultivo RPMI-1640, suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina G y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomina. Las células rojas fueron lisadas con buffer (8,9 g de NH_4Cl , KHCO_3 y 0,037 g EDTA en un litro de agua destilada). La viabilidad celular se determinó utilizando la técnica de exclusión del colorante azul tripán al 0,4%. Las células viables (> 95%) fueron ajustadas a una concentración de 2×10^6 células/mL por dilución con medio de cultivo.

La proliferación de los esplenocitos en respuesta a mitógenos como la PHA (Sigma Chemical Co) fue determinada utilizando la incorporación de timidina marcada con tritio (^3H -Timidina). Alícuotas de 175 μL (2×10^5 células/pozo) de cada suspensión celular fueron cultivadas por triplicado en placas de microtitulación de 96 pozos de fondo plano (Falcon 3072, Beckton Dickinson). La PHA fue diluida en medio de cultivo a las siguientes concentraciones: 2,5, 10

y 20 μg /mL. Se adicionaron 25 μL de cada concentración a los pozos de la placa correspondiente para un volumen final de 200 μL /pozo. Las placas fueron incubadas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 , durante 72 horas. Ocho horas antes de culminar este período se agregó 1 μCi (20 μL) de timidina marcada con tritio (Methyl- ^3H) (NENTM Boston, USA) a cada uno de los pozos, incubando luego bajo las mismas condiciones de cultivo. Las células se recolectaron en filtros de fibra de vidrio utilizando un recolector de muestras múltiples (Combi Cell Harvester – 11025MAN 00D. Skatron Inst.), lavando con agua destilada para lisar las células. Los filtros fueron colocados en viales con líquido de centelleo y la timidina incorporada se cuantificó en un contador beta de centelleo (1217 RACK BETA Liquid Scintillation Counter LKB Wallac) registrándose en cuentas por minuto (cpm).

Tratamiento *in vitro* con MLT

A tres ratones sanos, por experimento, se les extrajo el bazo y de cada uno se preparó la suspensión celular de la misma manera descrita anteriormente, obteniendo un porcentaje de células viables mayor de 98%. Una alícuota de cada suspensión celular, ajustada a 2×10^6 células /mL (100 μL), fue cultivada por triplicado en placas de microtitulación de 96 pozos de fondo plano. Las células fueron tratadas con dosis de MLT de 5, 50 y 100 μg /mL (25 μL) e incubadas a 37°C por 30 minutos, previo a la estimulación con concentraciones crecientes de PHA 2.5, 10 y 20 μg /mL (25 μL). Las placas fueron incubadas bajo las mismas condiciones antes descritas y las células fueron recolectadas y contadas de igual forma que en el protocolo anterior.

Cuantificación de IL-2 e IL-1 β

Los niveles de IL-2 e IL-1 β se cuantificaron empleando la técnica de ELISA de fase sólida, de alta sensibilidad (< 8 pg /mL

de IL-2 y < 3 pg /mL de IL-1 β) y 99% de especificidad (BioSource International, Inc.) en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos de los dos grupos experimentales, en presencia o ausencia de concentraciones óptimas de PHA. Los resultados son expresados en pg /mL.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y el test de comparaciones múltiples de Turkey-Kramer, utilizando el programa de Graph Pad InStat 3.0, según el caso y se representaron como promedio \pm desviación estándar (DE). El criterio para la significancia estadística fue de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Proliferación linfocitaria

La dosis óptima de PHA en los cultivos de esplenocitos resultó ser de 10 μg /mL, dado que fue con ésta donde se observaron diferencias estadísticamente significativas en los distintos tratamientos, razón por la cual no se muestran los resultados con dosis sub y supraóptimas.

Tratamiento *in vivo* con MLT

Se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) de la proliferación de esplenocitos a dosis óptima de PHA (10 μg /mL) en ratones tratados con MLT, en el día 7 de tratamiento, con respecto al grupo no tratado estimulado. No se encontraron diferencias significativas en los días 5 y 9 de tratamiento con MLT (Fig. 1).

Tratamiento *in vitro* con MLT

No se evidenció alteración alguna de la respuesta proliferativa de esplenocitos mûridos tratados *in vitro* con 5 μg /mL de MLT; sin embargo, cuando fueron tratados con 50 y 100 μg /mL de MLT, a una concentración de PHA de 10 μg /mL, se observó una

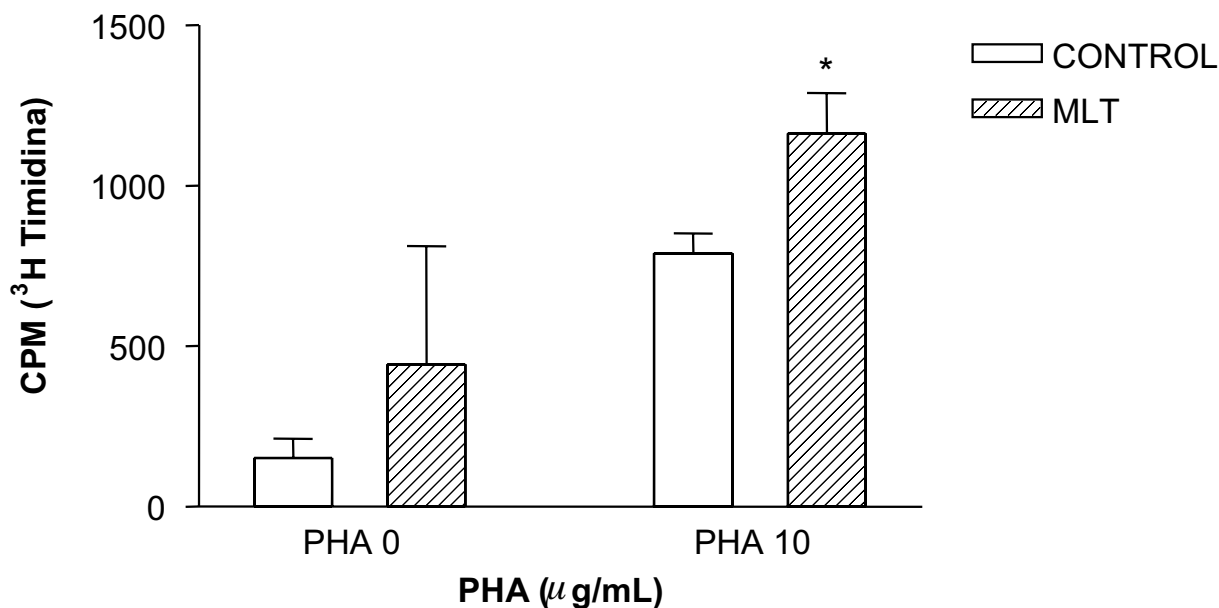


Fig. 1. Respuesta proliferativa de esplenocitos de ratones tratados o no con Melatonina en presencia y ausencia de 10 µg/mL PHA, el día siete (7) de tratamiento. Los valores representan los promedios ± DE de cinco experimentos. * $p < 0,01$ con respecto al grupo control estimulado con PHA 10.

elevación significativa ($p < 0,05$) de esplenocitos, comparada con las células control estimuladas (Fig. 2).

Cuantificación de Citocinas

Tratamiento *in vivo* con MLT

En los días 5, 7 y 9 de tratamiento, la MLT produjo un incremento significativo ($p < 0,01$) en los niveles de IL-2 en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos sin estímulo mitogénico, comparado con el grupo control. Al día 7 de tratamiento se encontraron, bajo estímulos mitogénicos con PHA, niveles significativos ($p < 0,01$) de IL-2 en el grupo de ratones tratados con MLT con respecto al grupo control. Al día 9 de tratamiento se obtuvo un incremento de un 400% en los niveles de esta citocina en el mismo grupo, cuando se comparó con el grupo control (Fig. 3).

Los niveles de IL-1 β en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos no estimulados con PHA, se incrementaron significativamen-

te ($p < 0,01$) en el grupo de ratones tratados el día 5 con MLT con respecto al grupo control. De igual forma, se incrementaron significativamente al día 7 y 9 de tratamiento en el mismo grupo de animales tratados con respecto al control en ausencia o presencia de PHA (Fig. 4).

Tratamiento *in vitro* con MLT

En la Tabla I se observa un aumento evidente ($p < 0,01$) de los niveles de IL-2 en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos tratados *in vitro* con 50 µg/mL de MLT estimulados con dosis óptima de PHA (10 µg/mL), comparados con los niveles obtenidos en las células control (0 PHA 0 MLT), con las estimuladas (10 PHA 0 MLT), y con las tratadas con 50 µg/mL de MLT no estimuladas (0 PHA 50 MLT). El tratamiento de los esplenocitos con 100 µg/mL de MLT estimulados o no con el mitógeno produjo un incremento significativo ($p < 0,01$) de los niveles de IL-2 en el grupo de células tratadas, comparadas con las del grupo

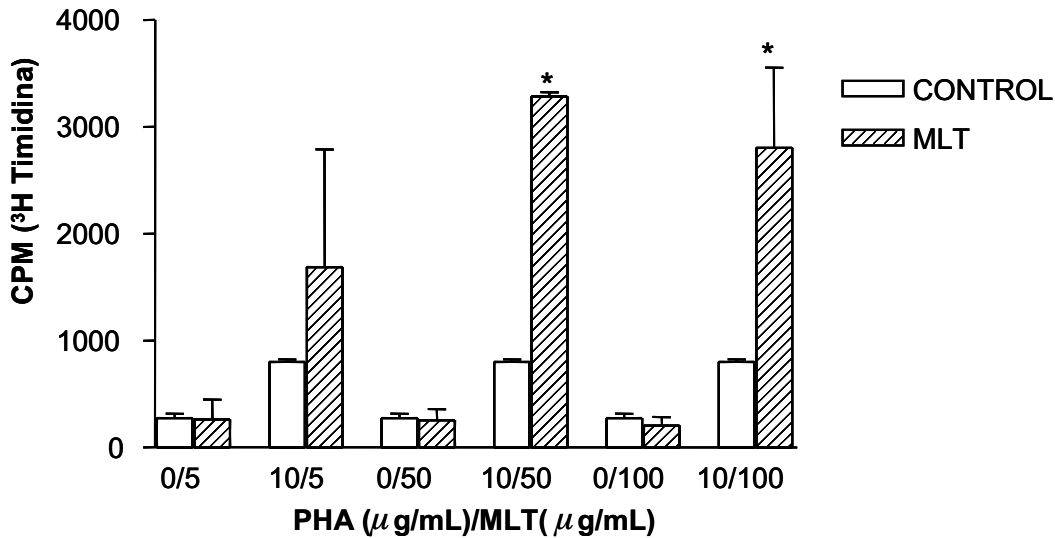


Fig. 2. Respuesta proliferativa de esplenocitos de ratones tratados *in vitro* con dosis crecientes (5, 50 y 100 µg/mL) de Melatonina en presencia y ausencia de 10 µg/mL de PHA. La incorporación de Timidina es expresada en cuentas por minutos (cpm). Los valores representan los promedios ± DE de cinco experimentos. *p < 0,01 con respecto al grupo control.

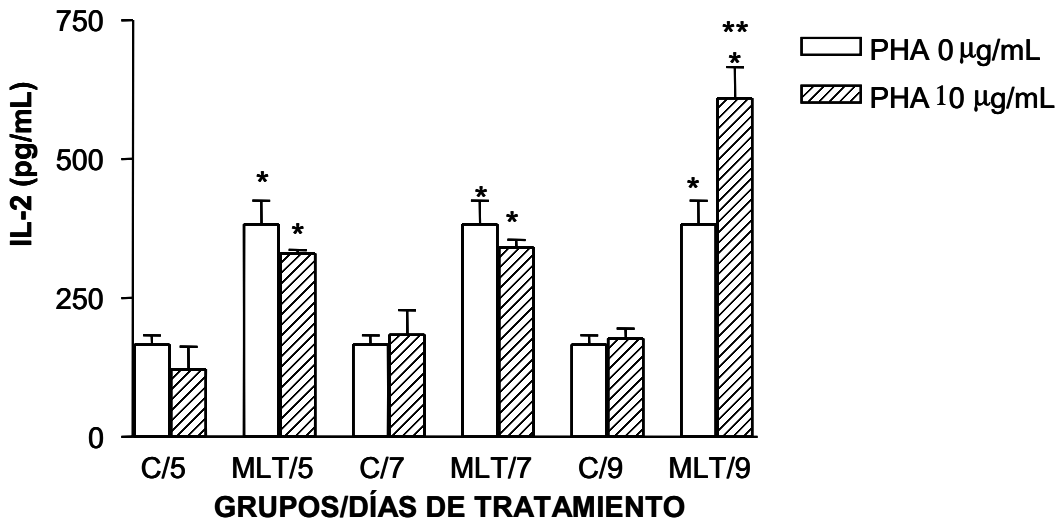


Fig. 3. Niveles de IL-2 en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos de ratones tratados *in vitro* con 500 µg de Melatonina por Kg. de peso, en presencia y no de 10 µg/mL de PHA. Las concentraciones son representadas en pg/mL y los valores son expresados en promedio ± DE. *p < 0,01 con respecto al grupo control (PBS). **p < 0,05 con respecto al grupo tratado no estimulado.

control estimuladas (10 PHA 0 MLT) o no (0 PHA 0 MLT).

Los niveles de IL-1β aumentaron significativamente (p < 0,01) en los grupos de células tratadas con 50 µg/mL de MLT no estimuladas (0 PHA 50 MLT) y estimuladas (10 PHA 50 MLT), comparados con los nive-

les de los grupos de células control (0 PHA 0 MLT) y con las estimuladas (10 PHA 0 MLT). Se encontraron niveles altos de IL-1β en el grupo de esplenocitos tratados *in vitro* con 100 µg/mL de MLT no estimulados (0 PHA 100 MLT) con respecto al grupo control (0 PHA 0 MLT) y a las estimuladas (10

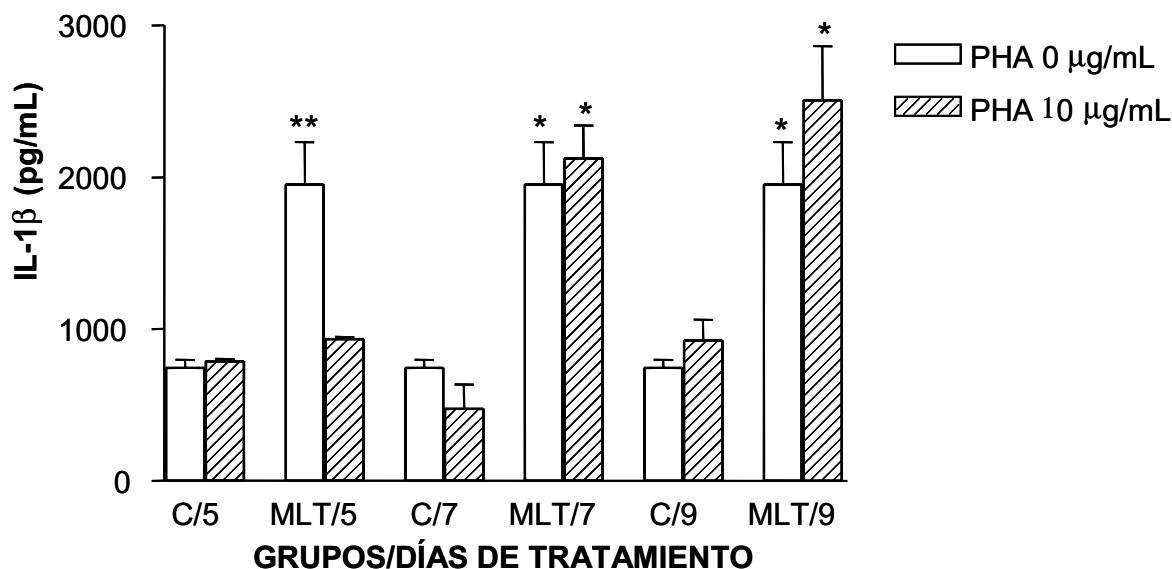


Fig. 4. Niveles de IL-1 β en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos de ratones tratados *in vivo* con 500 μ g de Melatonina por Kg. de peso, en presencia y no de 10 μ g/mL de PHA. Las concentraciones son representadas en pg/mL y los valores son expresados en promedio \pm DE.

*p < 0,01 con respecto al grupo control (PBS).

**p < 0,01 con respecto al grupo control (PBS) y al tratado estimulado.

TABLA I

NIVELES DE IL-2 E IL-1 β EN SOBRENADANTES DE CULTIVO DE ESPLENOCITOS MÚRIDOS TRATADOS *IN VITRO* CON DOSIS CRECIENTES DE MELATONINA EN PRESENCIA O AUSENCIA DE PHA (10 μ g/mL)

	IL-2		IL-1b	
	PHA 0	PHA 10	PHA 0	PHA 10
Control	42,95 \pm 3,20	61,0 \pm 9,6	395,40 \pm 32,15	469,77 \pm 119,0
MLT 50 mg/mL	53,30 \pm 11,45	215,5 \pm 21,4 ^a	1332,00 \pm 96,50 ^b	1021,70 \pm 176,4 ^b
MLT 100 mg/mL	247,10 \pm 60,20 ^a	337,50 \pm 1,8 ^a	1125,90 \pm 38,50 ^b	757,70 \pm 155,0

* Todos los valores indicados representan el Promedio \pm DE de cinco ensayos.

^ap < 0,01 con respecto a los grupos de células control 0 PHA 0 MLT, 10 PHA 0 MLT y al grupo 0 PHA 50 MLT.

^bp < 0,01 con respecto a los grupos de células control 0 PHA 0 MLT y al 10 PHA 0 MLT.

PHA 0 MLT) (p < 0,01). No se detectó alteración significativa de esta citocina cuando las células fueron estimuladas con el mitógeno a la misma concentración de MLT.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio evidencian un incremento significativo de la proliferación de los esplenocitos de ratones tratados con 500 μ g de MLT /Kg de peso, 7

días después de tratamiento, comparados con el grupo control. Esta propiedad inmunostimulante de la MLT concuerda con lo demostrado por otros autores (27), quienes sugieren que la hormona incrementa *in vivo* las funciones del sistema inmunitario. Demas y Nelson (28) reportaron que la administración de MLT exógena incrementa la respuesta inmunitaria celular de ratones.

La adición al cultivo de MLT a concentraciones de 50 y 100 μ g/mL aumentó la res-

puesta proliferativa mitogénica de los esplenocitos múridos, comparados con los cultivos que no recibieron tratamiento. Este efecto inmunoestimulante de la MLT es consistente con los hallazgos previos de Sze y col. (29), quienes demostraron la acción inmunoestimuladora de la hormona sobre los esplenocitos múridos una vez determinado el índice de estimulación proliferativa ante Con A y LPS. De igual manera, Drazen y col. (22) sostienen la hipótesis de que la MLT ejerce un efecto directo sobre la proliferación de esplenocitos de ratones a través de los receptores de alta afinidad para esta hormona que poseen estas células. Contrario a lo descrito por Pahlavani y col. (25), quienes reportaron que la MLT no ejerce efecto alguno sobre la proliferación linfocitaria de esplenocitos de ratas jóvenes y viejas inducida por Concanavalina A (Con A).

Con respecto a la cuantificación de IL-2 en ratones tratados *in vivo* con MLT, se evidenció una regulación positiva de esta hormona con o sin estímulo mitogénico, lo que corrobora lo descrito por otros autores, como Sze y col. (29) quienes reportaron niveles incrementados de IL-2 e IFN γ en esplenocitos múridos provenientes de ratones tratados con MLT y metoxitriptamina (MTA). No obstante, Shaji y col. (23) y Pahlavani y col. (25) no encontraron efecto alguno de la MLT sobre la proliferación de esplenocitos de ratas y ratones, mediada por la síntesis de IL-2, sugiriendo que la MLT podría actuar por activación selectiva de un tipo de respuesta inmunitaria, dado el conocido rol de esta hormona en la regulación de las células Th1 (20). De igual forma, nuestros resultados demostraron una asociación positiva entre los niveles de IL-2 y la capacidad proliferativa observada en esplenocitos de ratones tratados *in vivo* e *in vitro* con MLT. Asimismo, se observó una estimulación de IL-2 en los sobrenadantes de esplenocitos múridos tratados *in vitro* con MLT.

Se ha descrito que la IL-1 β podría ser una citocina clave en el efecto protector que la MLT ejerce en ratones infectados con el virus de la EEV (30), dado el incremento significativo observado en sueros de ratones infectados tratados y el promedio de mortalidad en ensayos de bloqueo *in vivo*, los cuales sugieren que la IL-1 β inducida por la MLT juega un papel relevante en la resolución de la infección por el virus de la EEV y en la promoción de una respuesta inmunitaria temprana para el "clearance" viral. Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que el tratamiento *in vivo* con MLT, es capaz de incrementar los niveles de IL-1 β en los esplenocitos múridos tratados, en ausencia o presencia de PHA. En cuanto a los niveles de IL-1 β obtenidos en sobrenadantes de células esplénicas tratadas *in vitro* con concentraciones crecientes de MLT, se observó que la MLT incrementó la producción de esta citocina en ausencia o presencia del mitógeno, lo que sugiere un efecto inmunoestimulador de la MLT sobre la IL-1 β , tal como lo reportaron Morrey y col. (21) quienes consiguieron un incremento de IL-1, IL-6 y Factor de Necrosis Tumoral (TNF) en monocitos humanos.

Nuestros resultados soportan la hipótesis de que la MLT actúa, en parte, directamente en la proliferación linfocitaria, uniéndose a los receptores localizados en los esplenocitos e incrementa la capacidad proliferativa de estas células; dicho complejo es posible que active las células e estimule la producción de IL-2 e IL-1 β , originando un aumento de la inmunidad celular. Esta suposición es consecuente con hallazgos previos de identificación de receptores de alta afinidad para la MLT en diferentes células linfoides, particularmente linfocitos, esplenocitos y timocitos (31, 32).

Es importante resaltar en esta investigación, que la proliferación linfocitaria y los niveles de IL-2 e IL-1 β son más evidentes

cuando la MLT se adiciona al cultivo que cuando es administrada *in vivo*. En este último caso, los esplenocitos son lavados, antes de ser cultivados, con medio suplementado con suero fetal bovino en cultivos, tanto para los ensayos de proliferación como para la determinación de citocinas en sobrenadantes durante 72 horas de incubación; es decir, se trata de esplenocitos que estuvieron en contacto con la MLT en el animal *in vivo*, pero no durante el cultivo. Sin embargo, cuando la MLT se adiciona al cultivo de esplenocitos, éstos permanecen en contacto con la hormona y los mejores resultados observados en estas condiciones reflejan la necesidad de la presencia constante de la MLT durante el ensayo.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por FONACIT, Venezuela bajo el proyecto G-97000638.

REFERENCIAS

1. **Reiter RJ.** Melatonin Synthesis: Multiplicity of regulation. En: Kynurenine and Serotonin Pathways. 2nd Ed. New York: Plenum Press; 1991, p 149-158.
2. **Krause, DN, Dubocovich ML.** Regulatory sites in the melatonin system of mammals. TINS 1990; 13 (11): 464-470.
3. **Dubocovich M.** Melatonin receptors in the central nervous system. En: Kynurenine and Serotonin Pathways. 2nd Ed. New York: Plenum Press; 1991, p 255-265.
4. **Maestroni GJ, Conti A, Pierpaoli W.** Role of the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibodies response and antagonize the immunosuppressive effect of corticosterone. J Neuroimmunol 1986; 13: 19-30.
5. **Maestroni GJ, Conti A, Pierpaoli W.** Role of the pineal gland in immunity II. Melatonin enhances the antibody response via an opiateergic mechanism. Clin Exp Immunol. 1987; 68: 384-391.
6. **Angeli A, Gatti G, Sartori M, Del Ponte D, Cerignola R.** Effect of exogenous melatonin on human natural killer (NK) cell activity. An approach to the immunomodulatory role of the pineal gland. The Pineal Gland and Cancer, Müller and Bass Eds. Tubingen; 1988, p 145-157.
7. **Caroleo MC, Frasca D, Nistico G, Doria G.** Melatonin as immunomodulator in immunodeficient mice. Immunopharmacol. 1992; 23:81-89.
8. **Pierpaoli W.** Pineal grafting and Melatonin induce immunocompetence in nude (athymic) mice. Inter J Neurosci 1993; 68:123-131.
9. **Maestroni GJ.** Therapeutic potential of melatonin in immunodeficiency states, viral diseases and cancer. Adv Exp Med Biol 1999; 467:217-26.
10. **Humbert W, Pevet P.** The decrease of pineal Melatonin production with age. Causes and consequences. Ann NY Acad Sci 1994; 719: 43-63.
11. **Atre D, Blumenthal EJ.** Melatonin: immune modulation of spleen cell in young, middle-aged and senescent mice. Mech Ageing Dev 1998; 103 (3): 255-268.
12. **Maestroni GJ, Covacci V, Conti A.** Hematopoietic rescue via T-cell-dependent, endogenous Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor induced by the pineal neurohormone melatonin in tumor bearing mice. Cancer Res 1994; 54:2429-2432.
13. **Maestroni GJ.** The photoperiod transducer melatonin and the immune-hematopoietic system. J Photochem Photobiol 1998; 43:186-192.
14. **Lissoni P, Brivio F, Barni S.** Low-dose subcutaneous interleukin 2 therapy in association with the pineal indole Melatonin in treating AIDS. Abstract. Recent Advances in Chemotherapy, 18th International Congress of Chemotherapy, 1993; p 769-770.
15. **Ben-Nathan D, Maestroni GJ, Lustig S, Conti A.** Protection by melatonin in mice infected with SemLiki Forest virus. En: Adv Pineal Res. John Libbey and Co. Ltd. Eds. 1994, p 125-130.
16. **Ben-Nathan D, Maestroni GJ, Lustig S, Conti A.** Protective effects of melatonin in mice infected with encephalitis viruses. Arch Virol 1995; 140: 223-230.

17. **Bonilla E, Valero N, Pons H, Chacin-Bonilla L.** Melatonin protects mice infected with Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Cell Mol Life Sci* 1997; 53: 430-434.
18. **Bonilla E, Rodón C, Valero N, Pons H, Chacin-Bonilla L, García J, Rodríguez Z, Medina-Leendertz S, Añez F.** Melatonin prolongs survival of immunodepressed mice infected with the Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95: 207-210.
19. **Colombo L, Chen GJ, Lopez MC, Watson R.** Melatonin induced increase in gamma interferon production by murine splenocytes. *Immunol Letters* 1992; 33: 123-126.
20. **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* 1997; 159 (2): 574-581.
21. **Morrey KM, McLachlan JA, Serkin CD, Bakouche O.** Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. *J Immunol* 1994; 153: 2671-2680.
22. **Drazen DL, Klein SL, Yellon SM, Nelson RJ.** *In vitro* melatonin treatment enhances splenocytes proliferation in prairie voles. *J Pineal Res* 2000; 28:34-40.
23. **Shaji AV, Kulkarni SK, Agrewala JN.** Regulation of secretion of IL-4 and IgG1 isotype by melatonin-stimulated ovalbumin-specific T cells. *Clin Exp Immunol* 1998; 111 (1): 181-185.
24. **Finochiaro LM, Nahmod VE, Launay JM.** Melatonin biosynthesis and metabolism in peripheral blood mononuclear leucocytes. *Biochem J* 1991; 280: 727-731.
25. **Pahlavani MA, Harris MD.** *In vitro* effects of melatonin on mitogen-induced lymphocyte proliferation and cytokine expression in young and old rats. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1997; 19 (3): 327-337.
26. **Hudson FC, Hay BW.** *Practical Immunology*. 2nd Ed. Scientific Publications; 1980, p 68-74.
27. **Guerrero J, Reiter R.** A brief survey of pineal gland immune system interrelationships. *Endocr Res* 1992; 18: 91-113.
28. **Demas G, Nelson R.** Exogenous Melatonin enhances cell-mediated, but not humoral immune function in adult male deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *J Biol Rhythms* 1998; 13:245-256.
29. **Sze SF, Liu WK, Ng TG.** Stimulation of murine splenocytes by melatonin and methoxytryptamine. *J Neural Transm Gen Sect* 1993; 94 (2):115-126.
30. **Valero N, Bonilla E, Estévez J, Mosquera J, Añez F, Negrette B, Rodríguez Z.** Cytokines in the generation of immune response to Venezuelan equine encephalomyelitis virus in mice. Abstract, 47th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 1998. Puerto Rico. p 261.
31. **Gonzalez-Haba M, García-Maurino S, Calvo JR, Goberna R, Guerrero JM.** High-affinity binding of melatonin by human circulating T lymphocytes (CD4+). *FASEB J* 1995; 9:1331-1335.
32. **Guerrero J, Calvo J, Osuna C, Lopez-Gonzalez M.** Binding of melatonin by lymphoid cells in humans and rodents. *Adv Pineal Res* 1994; 7:109-117.