



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

USO POTENCIAL DE LA MELATONINA EN LA LESIÓN POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN HEPÁTICA

POTENTIAL USE OF MELATONIN IN ISCHEMIC INJURY AND LIVER REPERFUSION

Autora:

Claudia Bareas Bueno

Directores:

Dr. José María Remartínez Fernández, Dr. José Joaquín García García

Facultad de Medicina: Departamento de Farmacología, Fisiología y Medicina Legal y Forense.

Universidad de Zaragoza

2020

ÍNDICE

Resumen.....	4
Abstract.....	5
Palabras clave.....	5
1. Melatonina.....	6
2. Estrés oxidativo y radicales libres.....	13
3. Fisiopatología de la lesión mediada por isquemia y reperfusión.....	17
4. Utilización de la melatonina en modelos de isquemia y reperfusión hepática.....	23
Conclusiones.....	32
Bibliografía.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: Ácido araquidónico

AC: Adenilatociclasa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMPK: Activador de la proteína kinasa

ATP: Adenosín trifosfato

BRZ: Inhibidores reversibles de la UPS bortezomib

EROS: Especies reactivas de oxígeno

TNF: Factor de necrosis tumoral

GPx: Glutación peroxidasa

GSH: Glutación hepático

IP: Intra portal

IR: Isquemia y reperfusión

LDH: Lactato deshidrogenasa

NAC: N-acetilcisteína

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintasa

OH: Radical hidroxilo

$^1\text{O}_2$: Oxígeno singlete

H_2O_2 : Peróxido de hidrógeno

O_2^- : Anión superóxido

RESUMEN

La melatonina es un potente antioxidante y agente antiinflamatorio sintetizado a partir del aminoácido esencial L-triptófano. Se produce en la glándula pineal y en muchos otros órganos. Sus beneficios se basan en sus acciones directas como eliminadora de radicales libres, así como en sus funciones antioxidantes indirectas estimulando el sistema de defensa celular. En muchas enfermedades hepáticas, como la esteatosis o la cirrosis, se produce la generación de especies reactivas de oxígeno, seguida de daños moleculares generando así la muerte celular de los tejidos. El trasplante es el tratamiento de último recurso para la etapa final de las enfermedades hepáticas tanto agudas como crónicas. Este tratamiento puede fracasar debido a un proceso inherente al procedimiento del trasplante: el fenómeno isquemia y reperfusión. El éxito del trasplante depende, al menos en parte, de la capacidad de controlar dicho proceso y de la calidad del injerto a trasplantar. Para reducir sus lesiones es primordial encontrar fármacos o sustancias eficaces contra el rechazo, con el fin de aumentar la supervivencia a largo plazo de los injertos. La melatonina mejora el resultado de los trasplantes de órganos en modelos experimentales mediante la reducción de la lesión por isquemia y reperfusión desempeñando un papel importante en la prevención del rechazo del injerto. Varios estudios demuestran que la melatonina previene la lesión por isquemia y reperfusión hepática y reduce la peroxidación lipídica en las membranas biológicas, beneficiando así la supervivencia del injerto. Por ello, se ha propuesto que esta indolamina desempeña una defensa eficaz frente al rechazo del injerto. En esta revisión se resumen los efectos protectores de la melatonina contra el daño hepático producido por isquemia y reperfusión mediada por radicales libres, y su utilización terapéutica potencial en el trasplante de órganos.

ABSTRACT

Melatonin is a powerful antioxidant and anti-inflammatory agent synthesized from the essential amino acid L-tryptophan. It is produced in the pineal gland and many other organs. Its benefits are based on its direct actions as a free radical scavenger, as well as on its indirect antioxidant functions by stimulating the cellular defense system. In many hepatic diseases, such as steatosis or cirrhosis, the generation of reactive oxygen species is produced, followed by molecular damage generating tissue cell death. Transplantation is the treatment of last resort for the final stage of both acute and chronic liver diseases. This treatment can fail due to a process inherent to the transplant procedure: the phenomenon of ischemia and reperfusion. The success of the transplant depends, at least in part, on the ability to control this process and the quality of the graft to be transplanted. In order to reduce their injuries it is essential to find drugs or substances effective against rejection, in order to increase the long-term survival of the grafts. Melatonin improves the outcome of organ transplants in experimental models by reducing ischemic and reperfusion injury and playing an important role in preventing graft rejection. Several studies show that melatonin prevents ischemia and reperfusion injury and reduces lipid peroxidation in the biological membranes, thus benefiting graft survival. Therefore, it has been proposed that this indolamine plays an effective defense against graft rejection. This review summarizes the protective effects of melatonin against liver damage from ischaemia and free radical-mediated reperfusion, and its potential therapeutic use in organ transplantation.

PALABRAS CLAVE

- Melatonina
- Isquemia
- Reperusión
- Trasplante hepático
- Radicales libres
- Estrés oxidativo

1. MELATONINA

Descubrimiento

La primera descripción de la glándula pineal se atribuye a Herófilo de Alejandría, en el siglo III a.C., quién la vinculó a funciones valvulares reguladoras del “flujo del pensamiento” en el sistema ventricular. En el siglo II d.C., Galeno describió su anatomía e introdujo el término de konarium (cono de piña), denominación que ha perdurado hasta nuestros días junto con la de pineal, de pinea (piña en latín). El siguiente avance en el conocimiento de la glándula pineal tuvo lugar en el Renacimiento. Una de sus mejores descripciones la realizó Andrés Vesalio en su obra “De Humanis Corporis Fabrica” (1543). Posteriormente, Descartes (1514-1564) la calificó como sede del alma y pensó que los estímulos percibidos por los ojos eran llevados al cerebro y desde allí alcanzaban la glándula pineal. En la segunda mitad del siglo XIX se replanteó la fisiología de la glándula pineal abordando su anatomía e histología gracias al desarrollo de métodos técnicos más refinados de corte y tinción tisular. En 1850, Von Kolliker observó la presencia de fibras nerviosas en la glándula pineal de mamífero, y Santiago Ramón y Cajal, encontró fibras nerviosas ramificadas en la glándula pineal de ratón y sugirió que eran de origen simpático (Ramón y Cajal, 1904). A finales del siglo XIX, gracias al desarrollo de la fisiología del sistema endocrino se sospechó que la glándula pineal de los mamíferos pudiera desempeñar un papel como glándula endocrina. Esta hipótesis se confirmó más adelante por Heubner (1898) quién publicó el caso clínico de tres niñas con tumores pineales estableciéndose una relación entre la glándula pineal y la reproducción. En 1943, Bargman sugirió que la función endocrina de dicha glándula estaba regulada por la luz a través del sistema nervioso central (Guerrero et al., 2007). El descubrimiento más importante, en referencia a la glándula pineal, fue el de su principal hormona, la melatonina, una estructura aislada por Lerner y colaboradores, y que le dieron el nombre de melatonina al relacionar su función con el pigmento melanina y su estructura con la serotonina (Lerner et al., 1958).

Basándose en estudios fisiológicos y anatómicos, se constató que la síntesis de melatonina estaba controlada por la luz ambiental a través del sistema nervioso. Hoffman y Reiter en 1965 demostraron que la oscuridad inducía cambios gonadales en un hámster que podían ser suprimidos por la pinealectomía, lo que dejaba clara la importancia de la luz/oscuridad (Fiske y Huppert, 1968). Axelrod y Wurtman acuñaron la expresión “transductor neuroendocrino” para describir a la glándula como un órgano que convierte un estímulo neural

proveniente de la retina y originado por la luz ambiental en una respuesta endocrina produciendo melatonina. Posteriormente, aparecieron los primeros anticuerpos específicos para melatonina identificándose en órganos, tejidos y células muy dispares poniendo de manifiesto la existencia de fuentes extrapineales de melatonina (Guerrero et al., 2007).

Biosíntesis

La melatonina es una molécula de al menos dos mil millones de años (Poeggeler et al., 1994) que está presente en todos los animales y plantas donde se ha buscado, presentando la misma estructura molecular. Es una indolamina descrita por primera vez por McCord y Allen (1917) y aislada por Lerner et al. (1958) a partir de extractos de glándula pineal. Se trata de un cristal orgánico, de color blanco, constituida por 67,22 % de carbono, 6,94% de hidrógeno, 12,06 % de nitrógeno y 13,78 % de oxígeno. Su peso molecular es de 232,38 Daltons. Es un sólido orgánico poco soluble en agua y muy soluble en etanol, con punto de fusión entre 116 ° y 118 ° Celsius (Reyes, 2008).

La melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina se produce en la glándula pineal o epífisis principalmente y en otras fuentes extrapineales como la placenta, los testículos, la médula ósea, los ovarios, la retina, el intestino y el hígado (Esteban-Zubero et al., 2016a). Su síntesis está controlada por el núcleo supraquiasmático, que está sincronizado con el ciclo luz/oscuridad. Durante la noche, éste envía señales provocando la activación de la vía retino-hipotálamica e induciendo la liberación de noradrenalina. La unión de la noradrenalina a sus receptores, localizados en las membranas de los pinealocitos, promueve la síntesis de melatonina.

La formación de la melatonina comienza con la captación del triptófano del torrente circulatorio que se hidroxila en la mitocondria mediante la triptofano-hidroxilasa. Posteriormente se activan otras tres enzimas: descarboxilasa de aminoácidos L-aromáticos, N-acetiltransferasa y acetilserotonina metiltransferasa. La mayor parte del 5-hidroxitriptofano se convierte en serotonina en el citosol, gracias a la intervención de la enzima descarboxilasa (Guerrero et al., 2007). La serotonina tiene dos vías principales de metabolización en la glándula pineal, una catabólica, puede desaminarse por acción de la monoamino oxidasa (MAO), o bien anabólica, convirtiéndose en melatonina por la acción de la N-acetil-trasferasa (NAT), que presenta un ritmo circadiano, dando lugar a la N-acetilserotonina, y a continuación, por la enzima hidroxindol-O-metil transferasa (HIOMT) transfiere un grupo metoxi de un cofactor y la convierte en N-acetil-5-metoxitriptamina o melatonina (figura 1).

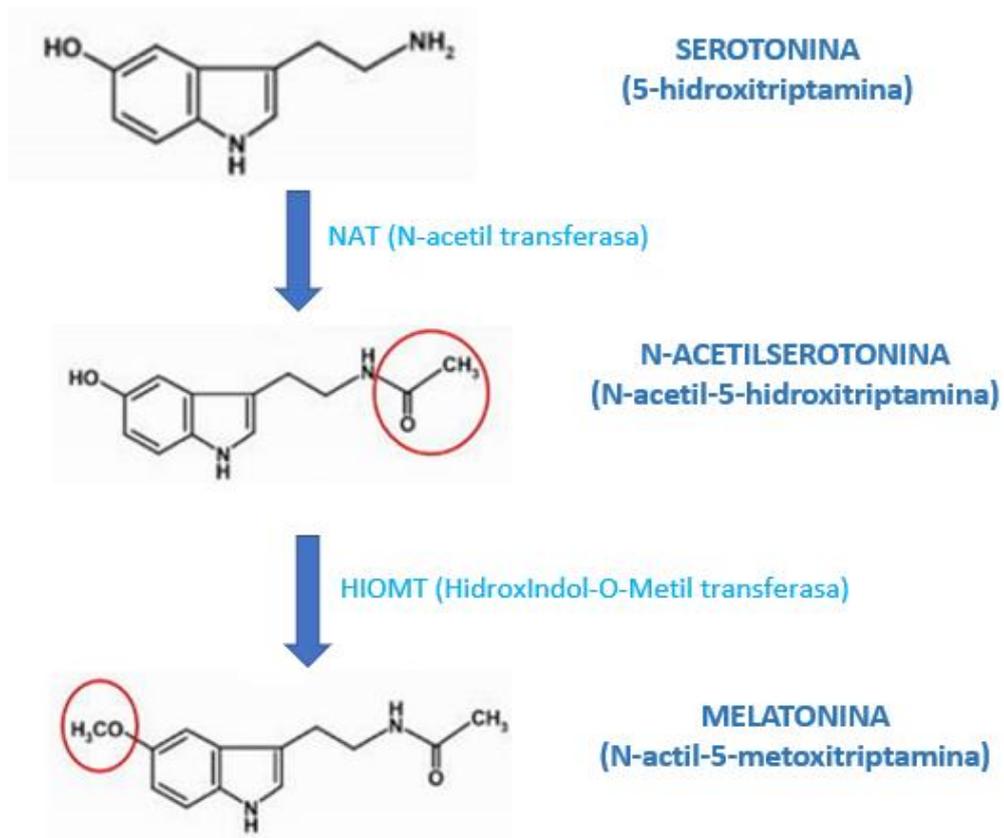


FIGURA 1. Metabolización de la serotonina

Regulación de la síntesis de melatonina

La síntesis de melatonina se regula por el ritmo circadiano luz/oscuridad ya que presenta un perfil rítmico de producción proporcional al estímulo noradrenérgico nocturno, con valores mínimos diurnos y máximos nocturnos (Esteban-Zubero et al., 2016b), causado por el ritmo circadiano de la NAT. En ausencia de luz, se generan potenciales de acción en la retina que son conducidos hasta el núcleo supraquiasmático del hipotálamo. Se conduce el impulso eléctrico hasta el ganglio cervical superior, desde donde partirán las fibras adrenérgicas postganglionares que regresarán a la cavidad craneal y alcanzarán la membrana del pinealocito. Es aquí donde se produce la liberación de norepinefrina que se unirá a receptores α_1 y β_1 del pinealocito provocando el aumento de la concentración de adenosín monofosfato cíclico (AMPC), que activa una serie de fosforilasas y aumenta la actividad de la NAT, lo que determina mayor concentración de N-acetilserotonina y melatonina (Reyes, 2008) (figura 2).

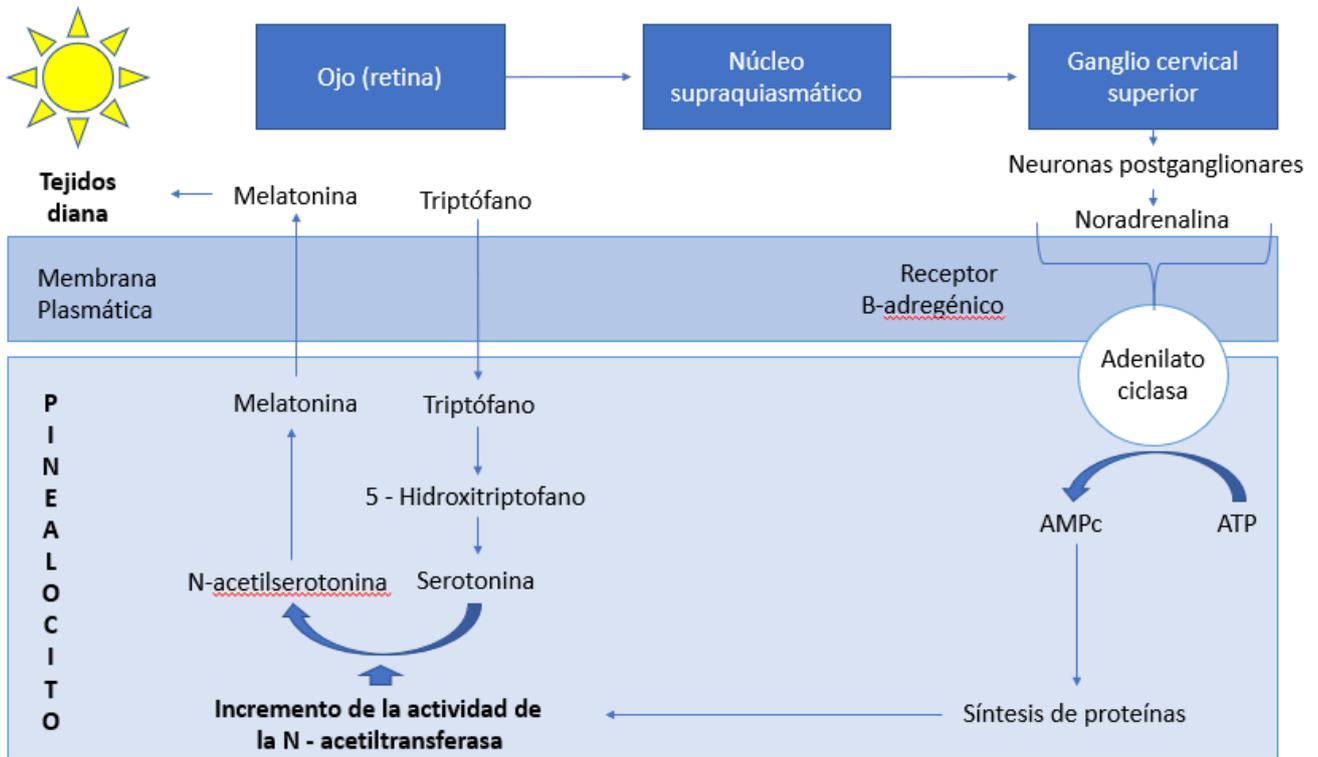


FIGURA 2. Regulación de la síntesis de melatonina. AMPc: Adenosín monofosfato cíclico. ATP: adenosín trifosfato

Distribución, niveles en sangre y catabolismo.

La estructura indólica de la melatonina le confiere liposolubilidad, por lo que atraviesa fácilmente la bicapa de la membrana del pinealocito por difusión. Esto determina que tras el estímulo de la síntesis de melatonina se eleven rápidamente sus niveles en plasma y, por lo tanto, en todos los compartimentos del organismo. Por otra parte, la melatonina sintetizada por las fuentes extrapineales escasamente pasa a la circulación, manteniendo niveles elevados de melatonina en los tejidos. Una vez sintetizada, la melatonina es liberada al sistema vascular accediendo a fluidos, tejidos y compartimentos celulares. Debido a que la melatonina no se acumula y a su rápida liberación a sangre, los niveles de la hormona en este fluido son considerados el principal índice de síntesis pineal (Guerrero et al., 2007).

Se transporta en plasma principalmente unida a la albúmina (70%) y también en forma libre (30%). Su vida media oscila entre los 20 y 40 minutos. De cualquier forma, sus niveles están condicionados por la duración del ciclo luz/oscuridad siguiendo un ritmo circadiano, con concentraciones altas durante la noche y basales durante el día (Pang et al., 1980; Aimoto et al., 1985; Menéndez-Peláez et al., 1987; Reiter, 1991). También sigue un ritmo estacional, siendo sus valores más altos en invierno.

La secreción de melatonina varía a lo largo de la vida (figura 3). Durante los primeros seis meses de vida los niveles nocturnos de melatonina son bajos, siendo entre los 1 y los 3 años cuando se alcanzan los niveles más elevados. Entre los 15 y los 20 años se produce una caída en los niveles a pesar de la producción constante de melatonina después de la infancia. Durante las siguientes décadas disminuyen de forma progresiva hasta los 70-90 años, en que sus niveles son los más bajos (Berzosa, 2011).

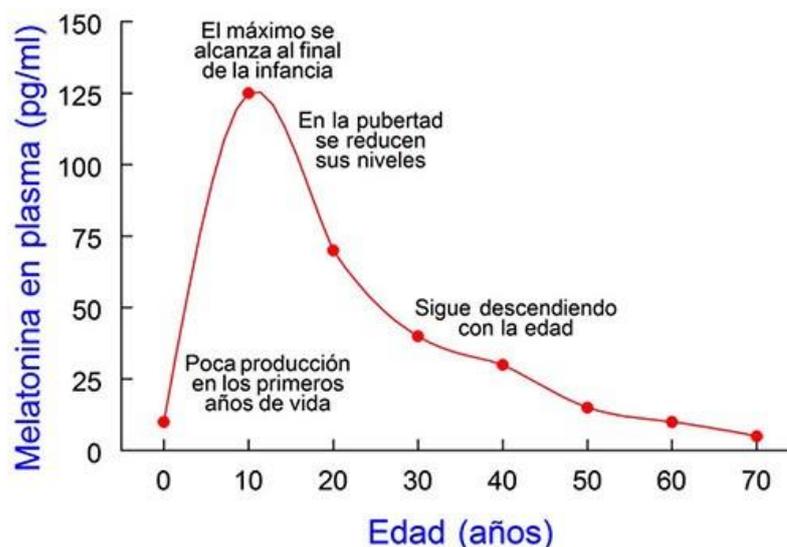


FIGURA 3. Niveles de melatonina a lo largo de la vida. Fuente: International Institute of Melatonin.

La melatonina se cataboliza muy rápida en el hígado, dónde se transforma en 6-hidroximelatonina, gracias a la acción de las enzimas del citocromo P450. Este metabolito se elimina fácilmente por orina (Kopin et al., 1961; Kveder et al., 1961; Hardeland et al., 1993). También puede seguir otras vías catabólicas, como la desacetilación y desaminación para convertirse en 5-metoxiindolacético y 5-metoxitriptofol (Galzin et al., 1998; Grace et al., 1991).

Mecanismos de acción

Como primeramente la melatonina se consideró como una hormona, sus funciones se intentaron explicar a través de su interacción a través de los receptores de membrana. Posteriormente, se describieron funciones independientes de receptores (Fuentes, 2008). Los mecanismos de acción mediados por receptores se pueden subdividir en los de unión a un receptor de membrana o nuclear, y los que se realizan independientemente de la unión a

receptor que incluyen la interacción con proteínas intracelulares y la actividad antioxidante (Reyes, 2008) (figura 4).

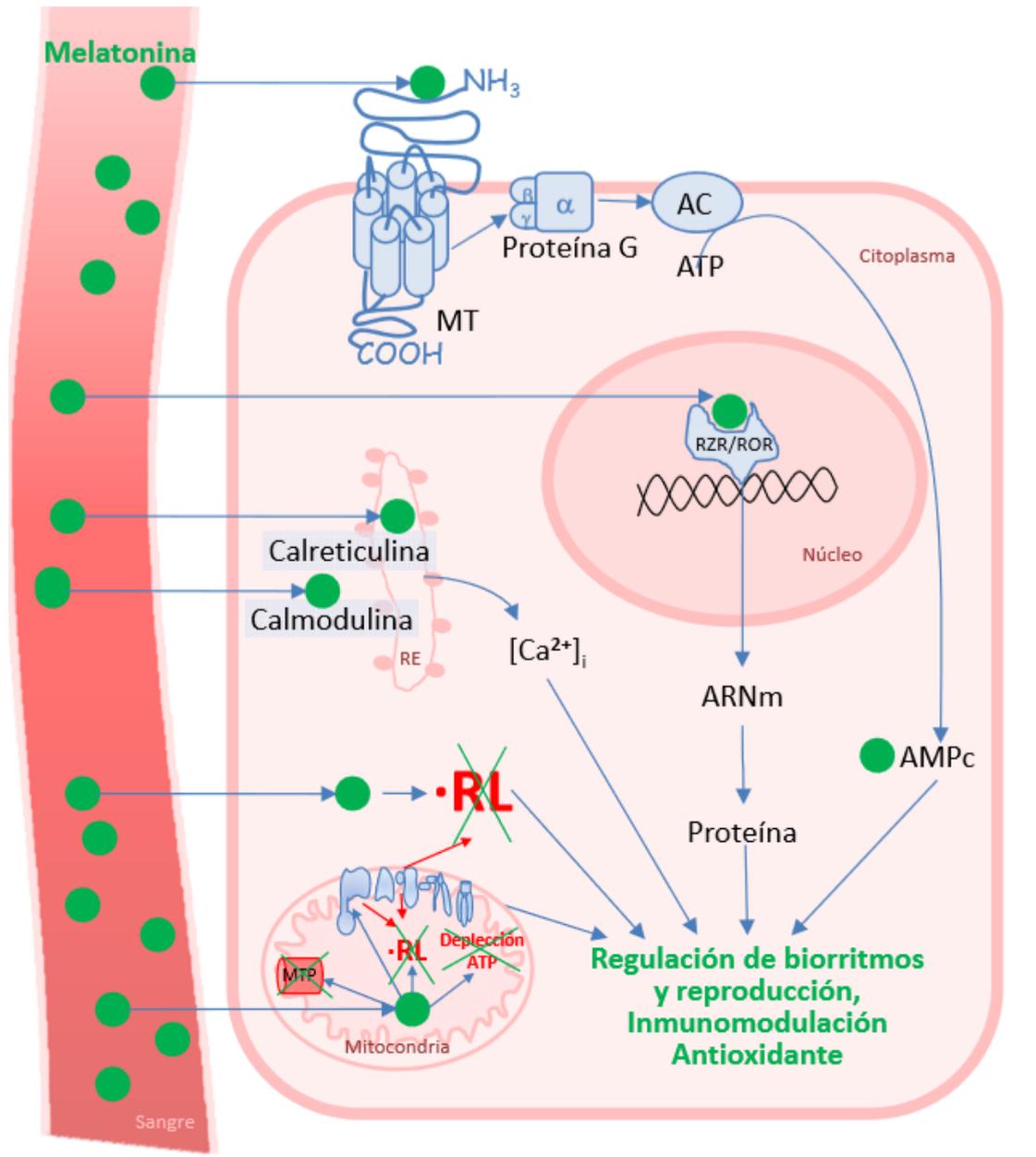


FIGURA 4. Resumen de los principales mecanismos de acción y funciones de la melatonina. MT: receptor de membrana de melatonina, AC: adenilato ciclasa, RZR/ROR: Receptores nucleares de melatonina, RL: radicales libres, MTP: poro de permeabilidad transitoria mitocondrial, RE: retículo endoplásmico.

Funciones

La melatonina controla diversas funciones que tienen relación con el eje neuroendocrino-reproductor además de inmunomoduladoras, tanto en su vertiente celular como humoral. También regula el ritmo biológico y un componente muy importante del sistema de defensa antioxidante (Guerrero et al., 2007):

- 1) Tiene la capacidad para resincronizar los ritmos circadianos regulando los ciclos de sueño y vigilia en situaciones, desde el ciclo circadiano libre de control medioambiental hasta el trabajo por turnos pasando por el malestar que acompaña a los viajes transoceánicos.
- 2) Con el fin de adaptarse a los cambios anuales, los organismos de muchas especies siguen ritmos estacionales y presentan diversas oscilaciones en su comportamiento reproductor y alimentario.
- 3) Interviene en la maduración sexual: el desarrollo puberal va ligado a un importante descenso en los niveles de melatonina plasmática. De tal forma que una disfunción pineal puede adelantar la pubertad, mientras que una hiperproducción de melatonina puede retrasarla.
- 4) Repercute de forma beneficiosa en el envejecimiento (Guerrero et al., 2007).
- 5) Tiene una potente capacidad antioxidante neutralizando directamente a los radicales libres y potenciando el efecto antioxidante mediante la activación de otras enzimas antioxidantes (Romero et al., 2008).
- 6) Conserva los estados funcionales y energéticos durante la isquemia-reperfusión al reducir las concentraciones de factor de necrosis tumoral (TNF) y óxido nítrico (NO).
- 7) Presenta una capacidad oncostática reduciendo el crecimiento del tumor por lo que puede ser útil en terapias adyuvantes antitumorales.
- 8) Tiene una función inmunomoduladora, que ejerce múltiples acciones sobre el sistema inmunitario operando por la vía de regulación de las citoquinas. Es capaz de modular la respuesta inmunitaria innata y adaptativa estimulando la proliferación celular y sus mediadores inmunológicos en timo, bazo y médula ósea. Además, estimula la función de los neutrófilos, macrófagos y células natural killer (NK).
- 9) Estabiliza las membranas microsomales, permitiéndoles, de manera dependiente de la concentración, resistir la rigidez inducida por el ataque de radicales libres (García et al., 1997).
- 10) A nivel mitocondrial, aumenta la síntesis de adenosín trifosfato (ATP), disminuye el potencial de membrana mitocondrial con lo que disminuye la pérdida de electrones y, por tanto, reduce la producción de radicales libres de oxígeno al mejorar la eficiencia de la cadena de transporte de electrones.

2. ESTRÉS OXIDATIVO Y RADICALES LIBRES

El daño o estrés oxidativo es consecuencia de la exposición de la materia biológica a los radicales libres y especies reactivas de oxígeno (EROS), que son generadas mediante el metabolismo aerobio y cuya producción aumenta ante cualquier lesión tisular (Reyes, 2008). La sobreexposición a los radicales libres produce una ruptura del equilibrio que debe existir entre factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes defensivos encargados de eliminar dichas sustancias reactivas. Como consecuencia se producen alteraciones estructurales y funcionales del órgano sometido al estrés, que también acelera su envejecimiento y favorece la muerte celular ya sea por apoptosis o necrosis (Andonis y García, 2002).

El átomo está compuesto por un núcleo formado por protones y neutrones y una corteza de electrones que orbitan en torno al núcleo dispuestos en orbitales, que son regiones en el espacio donde la probabilidad de encontrar un electrón es mayor. Los electrones se reparten en orbitales según su nivel energético. Los radicales libres son toda aquella estructura química que presenta uno o varios electrones desapareados o impares en su orbital más externo, dándole una configuración que genera gran inestabilidad electrónica (Justo y Gutiérrez, 2002). El orbital desapareado compensa su orbital incompleto a expensas de desestabilizar la configuración electrónica de un átomo vecino con el que reacciona, convirtiéndole a su vez en otro radical libre. Por ello, los radicales libres son muy reactivos, con una vida media corta. Por otra parte, los radicales libres de oxígeno pueden participar en funciones normales como la fagocitosis y quimiotaxis, la síntesis de colágeno y prostaglandinas, activando enzimas de la membrana celular y disminuyendo la síntesis de catecolaminas.

Los radicales libres son elaborados continuamente como producto normal del metabolismo de cada célula. Es importante considerar que el oxígeno es imprescindible para el metabolismo de las células de nuestro organismo, pero no hay que olvidar que sus productos tienen muchos efectos tóxicos sobre nuestros propios tejidos.

Existe una gran variedad de radicales libres, tanto derivados del oxígeno como del nitrógeno, o incluso centrados en otras moléculas, como el azufre. El término EROS incluye tanto a los radicales libres como a sus moléculas precursoras y derivadas (Justo y Gutiérrez, 2002). Algunas son radicales libres, como el hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y, en cambio, otras no son radicales en realidad, pero son fuentes de radicales libres como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Reyes,

2008). Las principales EROS son (figura 5): $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 , anión superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), óxido nítrico (NO), peróxilo ($\text{ROO}\cdot$), oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y ozono (O_3).

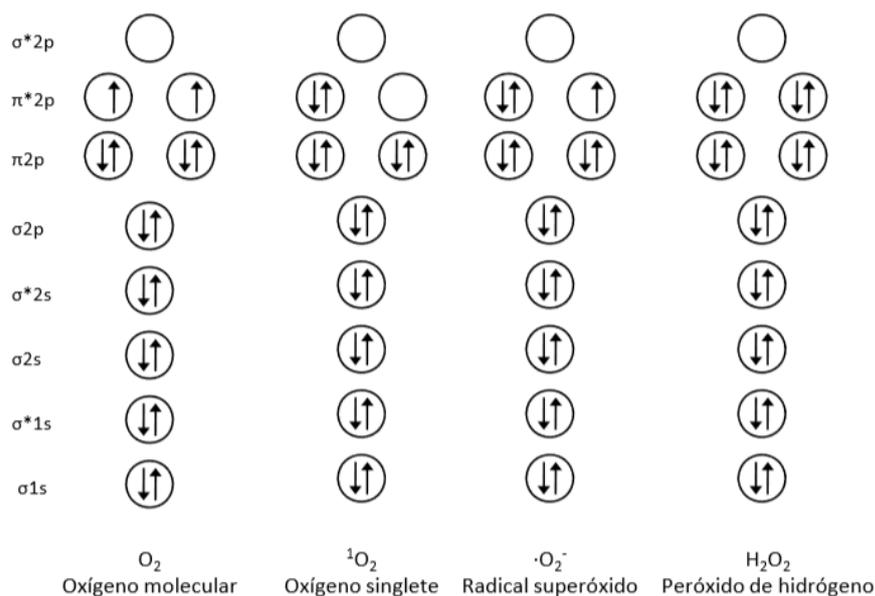


Figura 5. Configuración electrónica de los orbitales moleculares de diferentes especies reactivas de oxígeno.

Pueden clasificarse en: *inorgánicos o primarios* que se originan por la transferencia de electrones sobre el átomo de oxígeno, que se caracterizan por tener una vida media muy corta, y entre los que destacan $\cdot\text{OH}$, NO y $\cdot\text{O}_2^-$. Por otra parte, los *orgánicos o secundarios* se originan por la transferencia de un electrón de un radical primario a un átomo de una molécula orgánica o por la reacción de dos radicales primarios entre sí. Poseen una vida media un poco más larga que los primarios. Finalmente, los *intermedios* incluyen un grupo de especies químicas que generan radicales libres o resultan de la reducción o metabolismo de ellas, entre las que se encuentran el H_2O_2 , el ácido hipocloroso, el peroxinitrito y los hidroperóxidos orgánicos.

Los radicales libres se producen por diferentes mecanismos, entre los que los producen destaca la cadena de transporte de electrones mitocondrial. El oxígeno es utilizado por los organismos aerobios como aceptor final de electrones durante la cadena respiratoria mitocondrial generándose ATP y es inevitable la formación de especies reactivas a partir del oxígeno. Por eso, la mitocondria es la principal fuente de radicales libres y se producen fundamentalmente durante la fosforilación oxidativa, que es una cadena de reacciones catalizadas enzimáticamente por una serie de complejos situados en la membrana interna. Los principales complejos productores de radicales libres son el I y el III. Otro mecanismo, también

mitocondrial, es la oxidación de los ácidos grasos que se realiza en la matriz, aunque también se pueden oxidar los ácidos grasos en otros compartimentos celulares gracias a la enzima acetil-CoA. El citocromo P₄₅₀ se localiza en el retículo endoplásmico y cataliza reacciones de hidroxilación de diversos sustratos endógenos y exógenos haciendo que muchas sustancias tóxicas sean más hidrosolubles, consiguiendo así, que sean más fáciles de eliminar por la orina. Para ello, utiliza como cofactor nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) con la formación de $\cdot\text{O}_2^-$ mediante la reducción directa del oxígeno. Mediante la fagocitosis se producen grandes cantidades de EROS. Este proceso se realiza por los leucocitos granulocitos y el sistema monocito-macrófago e implica la acción de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH). Sin control, los radicales libres producidos se utilizan como defensa contra el ataque de la bacteria fagocitada, pudiendo dañar los tejidos sanos circundantes. Finalmente, otras enzimas implicadas en la producción son la monoamino oxidasa y la xantina oxidasa, que participan en la oxidación de monoaminas y xantinas respectivamente. Otras circunstancias en las que también se producen radicales libres son: los procesos inflamatorios, los traumatismos y los fenómenos de isquemia y reperfusión (Justo y Gutiérrez, 2002), la contaminación ambiental, el tabaco, el alcohol, la exposición solar, los fármacos antineoplásicos y antibióticos dependientes de unión a metales para su actividad, anestésicos, los pesticidas, y la actividad física desequilibrada favorecen el estrés oxidativo.

El daño celular producido por una sobreexposición a EROS afecta a moléculas como los lípidos, donde desencadena un proceso denominado peroxidación lipídica, alterando la permeabilidad de la membrana celular y produciendo edema y muerte celular. Los ácidos grasos insaturados, componentes esenciales de las membranas celulares, son muy susceptibles de sufrir un ataque oxidativo iniciado por radicales libres. Otra diana de este ataque son las proteínas mediante la oxidación de aminoácidos esenciales provocando alteraciones en la síntesis de proteínas. El ácido desoxirribonucleico (ADN) también es vulnerable y puede sufrir alteraciones que conllevan la supresión o pérdida de genes supresores de tumores que puede derivar en carcinogénesis. Por eso, desde el punto de vista clínico, la exposición a estas especies reactivas contribuye al envejecimiento y a la fisiopatología de la aterosclerosis, el infarto de miocardio, la diabetes, la enfermedad de Parkinson, el Alzheimer y el cáncer, entre otros (Justo y Gutiérrez, 2002).

El sistema de defensa antioxidante está constituido por un grupo de sustancias que, al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen la oxidación de éste. Los antioxidantes interactúan más rápido con los radicales libres de oxígeno y las especies reactivas que con otras moléculas presentes. Por eso, actúan como depuradores

de radicales libres ayudando a mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante a favor de estos últimos.

Los antioxidantes que tomamos de forma exógena pueden actuar como moléculas “suicidas” neutralizando el radical libre y oxidándose simultáneamente, de ahí que la reposición de estos debe ser de forma continua. Estos antioxidantes incluyen, entre otros, la vitamina E, la vitamina C y los betacarotenos (tabla 1) (Justo y Gutiérrez, 2002).

Además, la protección frente a los radicales libres se puede realizar mediante un sistema enzimático que incluye a la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) o mediante un sistema paralelo denominado depurador de radicales libres localizado en el citosol y en las membranas de las células. La neutralización de los radicales libres involucra otros sistemas celulares como las membranas, ácidos nucleicos y proteínas, lo que lleva a la muerte celular (Reyes, 2008).

Tabla 1. Clasificación de los antioxidantes

Exógenos	Endógenos	Cofactores
Vitamina E	Glutatión	Cobre
Vitamina C	Coenzima Q	Zinc
Beta caroteno	Ácido tióctico	Manganeso
Flavonoides	Enzimas: <ul style="list-style-type: none"> • Superóxido dismutasa • Catalasa • Glutatión peroxidasa 	
Licopeno	Melatonina	Selenio

3. FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN MEDIADA POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN EN EL HÍGADO

La isquemia se define como una disminución transitoria o permanente del flujo de sangre en un tejido y, consecuentemente una disminución tanto del aporte de oxígeno (hipoxia) como de la eliminación de productos de metabolismo del tejido. Esto provoca un sufrimiento celular que puede provocar la muerte celular. En cada tejido encontramos un nivel diferente de tolerancia a la hipoxia. El fenómeno de la isquemia se da en muchas patologías vasculares, como el infarto agudo de miocardio, el accidente vascular cerebral y, en especial, el trasplante de órganos (Esteban-Zubero et al., 2016b). Dentro del campo quirúrgico se presenta en los pinzamientos de vasos de un trasplante y en la cirugía plástica y cardíaca para evitar el sangrado en los procedimientos o durante la transferencia de órganos. Además, esta lesión también puede presentarse en situaciones de shock sistémico. Cuando la isquemia finaliza, se restablece la reperfusión del órgano. El conjunto de los dos fenómenos se acompaña de una cadena de acontecimientos conocida como el fenómeno de isquemia-reperfusión (IR) (Ramos-Gallardo y Altamirano, 2014). Se trata de un fenómeno caracterizado por una restricción inicial de suministro de sangre a un órgano seguida de la restauración de la perfusión causando así la reoxigenación del tejido produciendo una exacerbación del daño tisular y un aumento de la respuesta inflamatoria. Esto conlleva un deterioro de la función del mismo (Siemionow y Arslan, 2004).

Podemos definir la reperfusión como un fenómeno post-isquemia, donde el oxígeno molecular es una fuente de radicales libres de oxígeno, asociado a peroxidación lipídica y ruptura de la membrana celular, y que causa aún más daño tisular que la isquemia (Férez et al., 2004). Además, la restauración del flujo sanguíneo provoca la liberación de radicales libres que activan a los neutrófilos y ocasionan daño endotelial, lo que agrava el proceso de isquemia-reperfusión al ocluir los vasos, además de la migración de leucocitos al tejido afectado (Ramos-Gargallo y Altamirano, 2014). Así, podemos dividir la lesión por isquemia-reperfusión en dos fases, la lesión producida por la isquemia y después la producida por la restauración del flujo sanguíneo (Casillas-Ramírez et al., 2006).

Desde el punto de vista fisiopatológico, en condiciones de isquemia ocurren una serie de cambios funcionales que incluyen: primero, la disminución de la fosforilación oxidativa y de la actividad de las bombas dependientes de ATP produciendo una disminución de éste y

provocando la entrada de sodio, calcio y agua al interior celular. Segundo, la acumulación de hipoxantina debido al catabolismo del ATP, generando especies reactivas de oxígeno. Además, se produce un exceso de ácido láctico y reducción del pH debido a una elevación de la glicólisis anaeróbica durante la isquemia, lo que produce una afectación de la membrana interna de la mitocondria provocando la despolarización de los potenciales de membrana, dejando de ser impermeable a numerosos iones y moléculas. Como consecuencia, se produce edema celular y ruptura de la membrana mitocondrial con la liberación y activación de moléculas proapoptóticas. Al terminar la isquemia sobreviene la reperfusión, en la que se generan abundantes EROS provocando mayor daño tisular (Siemionow y Arslan, 2004). Esta situación de isquemia provoca un estado proinflamatorio que causa en el tejido una vulnerabilidad durante la reperfusión del flujo sanguíneo. La isquemia causa la muerte de células parenquimatosas.

Durante este proceso se producen efectos del metabolismo celular: en la mitocondria, largos periodos de isquemia producen la alteración de los procesos de transporte de electrones, reduciendo su actividad. El resultado es el acúmulo de ésteres de Acetil-CoA, la disminución de los depósitos de ATP, el aumento de fosfatos inorgánicos, el incremento de la permeabilidad de la membrana, la alteración de la glucólisis, la disminución del pH, la liberación del hierro ferroso y la formación de radicales libres. Adicionalmente, conlleva una reducción de los mecanismos antioxidantes de la mitocondria, haciéndola más susceptible al estrés oxidativo, disminuyendo enzimas como la glutatión peroxidasa (GP). Además, se produce la apertura de canales no específicos, denominados megacanales que permiten el paso de moléculas como hidrógeno, sacarosa y agua al interior de la mitocondria favoreciendo daño estructural de la misma.

Se produce una acumulación de hipoxantinas, fruto de la actividad aumentada de la xantina oxidasa (XO) producida a través de la rápida conversión de la xantina-deshidrogenasa, que refleja la rotura y agotamiento de las moléculas de ATP. El óxido nítrico (NO) es uno de los mayores factores del daño por IR, en especial a partir de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Otros efectos de la alteración de la respiración mitocondrial son las modificaciones en la síntesis de proteínas y lípidos, la formación de N_2O_2 , la alteración en el transporte de electrones, la disminución en la actividad del citocromo C y las alteraciones en la permeabilidad celular.

A medida que progresa la lesión, la conversión de las moléculas de hipoxantina en ácido úrico (AU) es una fuente de producción de radicales libres. A la par, a nivel mitocondrial el estrés oxidativo es una fuente importante de H_2O_2 y de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH).

La producción de radicales libres de oxígeno produce daño en las membranas celulares por peroxidación de los lípidos. Estimulan la activación leucocitaria y la quimiotaxis por la

activación de la fosfolipasa A₂ (FLA2) para formar ácido araquidónico (AA), un importante precursor para la síntesis de eicosanoides, que actúan como potentes reguladores participando en gran medida en los procesos inflamatorios y en la respuesta inmune. Algunos radicales libres tienen la capacidad de inducir la expresión de citoquinas mediante la activación de factores de transcripción y a partir de la inducción de múltiples señales a partir de la producción de proteínas citoesqueléticas asociadas con la NADPH oxidasa y en particular a partir de la subunidad p47, que constituye la oxidasa activa y facilita el daño endotelial. El efecto neto es una pérdida de los mecanismos de vasodilatación dependientes del endotelio por una pérdida de la actividad del óxido nítrico.

Las citoquinas inician y mantienen la respuesta inflamatoria provocada por la reperusión gracias a su acción a nivel endocrino, paracrino, autocrino y por su actividad como mediadores inflamatorios. Cabe destacar en la lesión por reperusión la acción de la interleuquina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF), que son inductores de otras citoquinas como la IL-6 e IL-8. También induce la formación de quimiocina, la cual desempeña un importante papel en la activación y quimiotaxis y en la producción de radicales superóxido.

La isquemia-reperusión permite la activación y migración leucocitaria tras interactuar con el endotelio vascular. La diapédesis mediada por el factor activador de plaquetas permite el paso del leucocito al intersticio, rechazando el tejido dañado. Así se producen los efectos generales del proceso IR a nivel extravascular y se hace más notorio el desbalance entre prostaglandina y NO como vasodilatadores y del tromboxano y la endotelina como vasoconstrictores.

Uno de los sistemas de defensa del huésped es el sistema del complemento, siendo uno de los mayores efectores de inmunidad inespecífica. Se define como mediador fundamental en la lesión de IR, en la que se activan complejos inmunes. Su activación ocurre a través de la vía clásica. El más potente es el factor C5a, el cual amplifica la respuesta inflamatoria con la producción de citoquinas. Los resultados efectivos a nivel celular son la formación de poros en las membranas celulares, la transmisión de señales y la posible lisis celular.

La síntesis de proteínas se reduce tras la reperusión. Algunos factores implicados son el fallo en la integridad de ADN, las alteraciones de la maquinaria de transcripción, transporte y procesamiento del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y la inadecuada recuperación de los fosfatos de alta energía para realizar una correcta síntesis de péptidos. Como resultado final, se produce la disminución de la síntesis proteica y de aminoácidos no esenciales. Sumado a una inadecuada transmisión de las señales que determinan la incorrecta realización de los procesos

celulares y el fallo en los componentes celulares básicos de las membranas (Domínguez y Gómez, 2005).

La muerte celular se produce en forma de necrosis o apoptosis dependiendo de la disminución de ATP celular (Esteban-Zubero et al., 2019). La apoptosis es un proceso de muerte celular autoprogramada que incluye la activación de mecanismos relacionados con el genoma. En la lesión por IR, es un proceso dependiente de energía que altera la homeostasis del calcio, el funcionamiento del retículo endoplásmico y de la mitocondria, aumentando el estrés oxidativo. Esto permite que se dañe el ADN. En consecuencia, se activan proteasas efectoras que causan la degradación por fagocitosis de la célula dentro de un proceso fisiológico normal sin producir un estado inflamatorio. Por el contrario, los fenómenos de necrosis comienzan con la pérdida de energía asociada a la depleción de ATP inducida por la isquemia y se acompañan de componente inflamatorio. El fenómeno IR se caracteriza por la simultaneidad de los procesos de necrosis y apoptosis mediante una serie de eventos resumidos en la tabla 2 (Domínguez y Gómez, 2005).

Tabla 2. Mecanismos de la isquemia-reperfusión. XDH (xantina deshidrogenasa), XO (xantina oxidasa), GP (glutación peroxidasa).

Alteración de la función mitocondrial
Conversión XDH a XO o fosforilación
Aumento en la producción de radicales libres
Disminución de la actividad de la GP y de otras enzimas
Alteración en el transporte epitelial del hierro
Disminución de la prostaglandina I ₂
Inducción de la oxido nítrico sintasa
Incremento de la permeabilidad celular
Activación de la vía de la quinasa y la proteína cinasa
Alteración proteica y consecuente apoptosis-necrosis



La IR hepática es causa de una elevada morbi-mortalidad en situaciones como las resecciones hepáticas mayores, el trasplante hepático y en situaciones que originan hipoxia sistémica o que implican un bajo flujo sanguíneo (Ildefonso y Arias-Díaz, 2010). El daño por IR es un proceso multifactorial y representa un problema grave que limita la supervivencia del injerto en el caso de trasplantes o de fallo de órganos. La IR es un claro determinante de disfunción temprana de injertos y órganos (Flores-Villalba et al., 2015).

En la lesión por IR del hígado, al igual que para cualquier otro órgano, podemos diferenciar entre la lesión por isquemia caliente, que se produce tras el clampaje de los vasos y la lesión por isquemia en frío, dada la necesidad de preservar en frío el órgano donante seguido de la reperfusión. El daño tisular que se genera en el hígado tiene dos fases: *una temprana*, que ocurre dentro de las seis primeras horas después de la reperfusión a consecuencia del cambio rápido del estado redox del tejido hepático en la que se produce la activación de las células de Kupffer (Weigand et al., 2012) con la consiguiente producción de EROS, la activación de factores del complemento y el reclutamiento y activación de linfocitos residentes. Y *una fase tardía*, caracterizada por infiltración masiva de neutrófilos, que alcanza su máximo a las 18-24h de la reperfusión. Estos neutrófilos liberan EROS y proteasas, causantes ambos del estrés oxidativo y de la lesión hepatocelular (Ildefonso y Arias-Díaz, 2010).

Durante la isquemia hepática se interrumpe el suministro de oxígeno y se detiene la cadena respiratoria mitocondrial provocando un agotamiento celular de ATP. Su falta provoca aumenta la glucólisis anaeróbica elevando la producción de ácido láctico, con disminución del pH celular alterándose la cinética normal de muchas enzimas, y las células se ven privadas de la energía necesaria para mantener la homeostasis.

La falta de ATP también provoca una reducción en la actividad de la bomba sodio-potasio-ATPasa que produce edema e hinchazón de las células de Kupffer, alterando la función de sus orgánulos citoplasmáticos y provocando la rotura de la membrana celular, causando la muerte de la célula (Casillas-Ramírez et al., 2006). La inflamación y el edema provocan un estrechamiento de la luz sinusoidal y disfunción microcirculatoria que contribuyen a la acumulación y a la activación de neutrófilos en los órganos. Su diapédesis interviene en la lesión parenquimatosa debido a la producción de radicales libres (Esteban-Zubero et al., 2019).

La reperfusión hepática desencadena la activación de las células de Kupffer, de los polimorfonucleares, de las células endoteliales y la formación de EROS. Todo ello conlleva la activación de una serie de cascadas celulares cuya consecuencia final es la disfunción hepatocelular. Los cambios histopatológicos que ocurren en el hígado tras el fenómeno de IR

incluyen el edema y la inflamación vacuolar, la disrupción del endotelio e infiltración de neutrófilos, lo que lleva a cambios muy significativos en la microcirculación hepática, cuyos niveles máximos de daño son alcanzados a las 48h de la reperfusión (Flores-Villalba et al., 2015).

La reperfusión del hígado inicia una serie de fenómenos inflamatorios en los que están implicados múltiples mediadores inflamatorios, plaquetas, leucocitos y el endotelio vascular, los cuales, al interactuar provocan la lesión por reperfusión. Entre los mediadores inflamatorios descritos en la lesión por IR hepática destacan los radicales libres, el interferón beta (IFN- β), el factor de necrosis tumoral y las interleuquinas (IL). Éstas y el TNF- α causan daño por estrés oxidativo y por el reclutamiento de leucocitos. Durante la reperfusión vascular, se producen metabolitos de ATP con aumentos en los niveles de EROS que incluyen el $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 y el radical hidroxilo $\cdot\text{OH}$. De esta forma, se inicia la peroxidación lipídica, que consiste en una reacción en cadena radical que conduce a la destrucción de los ácidos grasos poliinsaturados disminuyendo la fluidez y la permeabilidad normales de las membranas celulares causando edema celular, sobrecarga masiva de Ca^{2+} y Na^+ , y lisis celular (Esteban-zubero et al., 2016b). La restauración del flujo sanguíneo también implica la participación de cinasas intracelulares, interleuquinas y citoquinas provocando la migración de los neutrófilos. Se considera que esta acumulación de neutrófilos está regulada por citocinas y quimiocinas, factores del complemento y moléculas de adhesión.

Por último, se produce una disfunción microcirculatoria debido a las interacciones entre las células intravasculares como los neutrófilos con células no parenquimales como las células endoteliales y las células de Kupffer (Casillas-Ramírez et al., 2006). El endotelio representa uno de los elementos con mayor importancia en esta cascada de acontecimientos debido a su capacidad para regular la adhesión y la infiltración tisular de leucocitos y polimorfonucleares que son potencialmente dañinos (Montalvo-Jave et al., 2008).

4. UTILIZACIÓN DE LA MELATONINA EN MODELOS DE ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN HEPÁTICA

En este apartado se resume el efecto protector de la melatonina contra el daño hepático molecular producido durante la IR mediante la evidencia experimental en distintos modelos de isquemia-reperfusión hepática. El fracaso de los injertos de órganos va acompañado de complejos problemas inmunológicos y no inmunológicos. La lesión por IR produce una cascada de eventos no inmunológicos independientes de los antígenos (Esteban-Zubero et al., 2016b). Tanto en las enfermedades hepáticas agudas como en las crónicas, el trasplante es el tratamiento de último recurso. Sin embargo, este tratamiento puede fallar debido a un proceso inherente al trasplante de órganos, la lesión por IR.

Concretamente, en el 81% de los retrasplantes está involucrada la lesión por IR. Sucede durante la primera semana después de la cirugía debido al mal funcionamiento del aloinjerto hepático (Belzer y Southar, 1988; Shaw, 1995). Debido a la actividad de la melatonina contra la IR y el estrés oxidativo, se ha estudiado su papel en el rechazo de los injertos hepáticos. Hay que resaltar que el 60% de los injertos de hígado con esteatosis se asocian con una tasa de no funcionamiento primario en comparación con menos del 5% para los injertos no esteatósicos. Por ello es especialmente relevante si la edad del paciente es superior a los 70 años, ya que éstos presentan una mayor incidencia de esteatosis hepática (Esteban-Zubero et al., 2019). Esto se debe a que los pacientes con esteatosis hepática presentan alteraciones microvasculares, disfunción mitocondrial y un menor número de sinusoides, lo que aumenta la lesión por IR (Hui et al., 2004). Además, los hepatocitos son muy susceptibles debido a la presencia de grasa excesiva y a la mayor producción de radicales libres (Esteban-Zubero et al., 2016a). Durante la IR fría, los hígados con esteatosis tienen un exacerbado estrés tisular e inician la muerte celular y, en consecuencia, se produce el rechazo del injerto. Debido a la actividad de la melatonina contra la IR y el estrés oxidativo, se ha estudiado el papel de la melatonina en el rechazo del injerto en hígados esteatósicos (Esteban-Zubero et al., 2019).

Las elevadas concentraciones de ácidos grasos producen una peroxidación lipídica a nivel de las mitocondrias que genera H_2O_2 ; ésta última molécula, en presencia de hierro libre, se convierte en el $\cdot OH$, altamente reactivo. Además, se ha demostrado en modelos de rata

genéticamente obesas, que son más sensibles a los efectos de dosis bajas de lipopolisacárido que las ratas de control. La lesión del liposacárido está mediada por el TNF y se ha observado que el daño se produce debido al TNF- α o a la sobreexpresión en el ARNm del interferón gamma y a la reducción de la IL-10, que sensibiliza a los hepatocitos a la toxicidad del TNF- α . También se reduce la actividad fagocítica de las células de Kupffer (Yang et al., 1997).

Para explicar la patogénesis esteatohepática, se creó el "modelo de dos golpes". El primario está causado por el exceso de lipopolisacáridos, una característica de la obesidad, la diabetes de tipo 2, la hiperlipidemia y el síndrome metabólico X debido a su resistencia a la insulina, en el hígado que son esterificados a triglicéridos. Las lesiones iniciales hacen que el hígado sea vulnerable a la lesión del "segundo golpe", que consiste en la generación de radicales libres, malondialdehído y 4-hidroxinonenal durante el proceso de peroxidación lipídica que induce la muerte celular. La disfunción mitocondrial se ha demostrado en los hepatocitos con ácidos grasos que aumentan la formación de especies reactivas de oxígeno debido a un aumento de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos. Las citoquinas también participan en el "segundo golpe" ya que tienen la capacidad de producir muerte/apoptosis de hepatocitos. Además, se aumenta la actividad de la termogenina (UCP-2), lo que da lugar a una reducción del potencial de la membrana mitocondrial. Esto favorece la transición de permeabilidad de la membrana mitocondrial que contribuye a la muerte celular. Debido a que la esteatosis es una consecuencia de un proceso de estrés oxidativo, la melatonina debería ser efectiva en la reducción de su patogénesis (Pessayre et al., 2001).

Usando un modelo de rata con hígado graso de etiología no alcohólica, se evidenció que la melatonina atenúa la esteatosis hepática y reduce el aumento del peso del hígado, la presión de la vena porta y las aminotransferasas séricas. En este estudio se administró melatonina en la dieta (5 ó 10 mg/kg de melatonina durante 4 u 8 semanas). La melatonina redujo la peroxidación lipídica y limitó el estrés oxidativo debido a sus potentes acciones antioxidantes, tanto directas como indirectas. Los autores también observaron que la melatonina aumentó los niveles reducidos de GSH y mejoró los niveles de marcadores séricos lipídicos: triglicéridos, colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y colesterol de baja densidad (LDL) (Hatzis et al., 2013). Por ello, concluyeron que la melatonina tiene un efecto beneficioso sobre la esteatosis, fundamentalmente en su fase inicial.

El estrés del tejido hepático aumenta en modelos animales con enfermedad de hígado graso no alcohólico induciendo la acumulación de triglicéridos y resultando en la liberación de calcio del retículo endoplásmico. En el modelo de rata que utiliza tunicamicina, un inductor de esteatosis hepática, la melatonina (50 mg/kg i.p. durante 2 días después de la administración de tunicamicina) tuvo un efecto protector contra el estrés oxidativo al disminuir los niveles de TNF- α y F4/80, un marcador de macrófagos. Además, la indolamina, desempeña un papel crucial en la regulación de las funciones celulares y las disfunciones metabólicas. Se observó que la sobreexpresión de miR-23a aumentó la concentración de calcio, mientras que la melatonina controlaba las respuestas de miR-23-a (Chhabra et al., 2011; Kim et al., 2015). Se observaron resultados similares con otros agentes o procesos que generan esteatosis hepática, como el tetracloruro de carbono o las toxicidades de los lipopolisacáridos (Xu et al., 2005). La melatonina alivia de manera dosis-dependiente la esteatosis hepática y la inflamación producida en la célula, previniendo así el hígado graso inducido por una dieta alta en grasas. En seres humanos, se realizó un estudio con 74 pacientes afectados con hígado graso no alcohólico y se documentó la disminución de los niveles plasmáticos de colesterol, gammaglutamil transferasa (GGT), triglicéridos y LDL después de la terapia de 14 meses con melatonina y su precursor el triptófano. Sin embargo, no se comprobó que las diferencias fueran estadísticamente significativas y no se redujeron los niveles de las citoquinas IL-1, IL-6 y TNF- α (Cichoż-Lach et al., 2010). En estudios a corto plazo, la melatonina causó diferencias estadísticamente significativas en los niveles de ALT y AST y en los niveles de citoquinas y TNF- α . Además, la melatonina y el triptófano redujeron la inflamación en el tejido hepático de los pacientes que se sometieron a una biopsia de hígado (Esteban-Zubero et al., 2016a).

En el modelo de rata Zucker, que es muy obesa, se descubrió un elevado nivel de grasa peroxisomal acetil-CoA oxidasa, que constituye una importante fuente de aumento del H₂O₂. La bilirrubina, un producto de descomposición de la hemoglobina, y otros pigmentos biliares pueden desempeñar un papel importante como sistema vasoprotector endógeno debido a su capacidad antioxidante y anti óxido nítrico. La adición de melatonina aumentó la producción de bilis de manera dependiente de la dosis y mejoró la excreción de bilirrubina y los niveles de ATP en los tejidos durante la IR. Este aumento fue tanto cuantitativo como cualitativo (Vairetti et al., 2005).

Los niveles de ATP se correlacionan con la producción de ácidos biliares. Por ello, la excreción de ácidos biliares es un parámetro útil para evaluar el estado metabólico hepático, que es esencial para la viabilidad de los órganos. 500 microgramos/kg/día/i.p. de melatonina

pueden tener un efecto hepatoprotector en la lesión hepática secundaria a la ligadura del conducto biliar, al reducir las enzimas que se elevan en la colestasis (Montilla et al., 2001).

Moussavian y colaboradores, utilizaron un procedimiento de precondicionamiento multimedicamentoso (MDDP) basado en la administración de curcumina, simvastatina, N-acetilcisteína (NAC), eritropoyetina, pentoxifilina, melatonina, glicina y metilprednisolona para reducir el daño hepático. Durante la isquemia fría de 24 h seguida de la reperfusión durante 60 minutos, concluyeron que las acciones preventivas de la melatonina sobre la lesión por reperfusión mejoraron el precondicionamiento al disminuir los radicales y, por lo tanto, la acumulación de malondialdehído. El precondicionamiento previno casi completamente la lesión de reperfusión post isquemia (Moussavian et al., 2011). Otro modelo basado en la combinación de pentoxifilina, glicina, deferoxamina, N-acetilcisteína, eritropoyetina, melatonina y simvastatina para la condición previa del donante de hígado esteatósico de rata, obtuvo resultados similares, ya que encontraron una reducción significativa de la disfunción post isquemia y la lesión por reperfusión no sólo en los donantes con hígado graso sino también en los hígados normales de ratas en comparación con los tejidos de control. Además, se redujo la respuesta leucocitaria infiltrativa, mayor en los hígados esteatósicos en comparación con los controles, y la toxicidad por EROS (Von Heesen et al., 2012).

Las soluciones de preservación desempeñan un papel importante en el mantenimiento de los tejidos para el trasplante; estos fluidos han sido sometidos a numerosas pruebas basadas en los cambios en la composición iónica y en la inclusión de moléculas diseñadas para reducir el edema intracelular e intersticial. Los niveles de ATP en los hígados conservados en solución de la Universidad Winconsin (UW) o en la de Celsior y reperfundidos sin melatonina tenían niveles de ATP aproximadamente siete veces menores que los hígados control. Cuando se administró la melatonina durante la reperfusión (vía intravenosa), se observaron aumentos del ATP hepático y de la producción de bilis con ambas soluciones. Los niveles de LDH y GSH de las ratas tratadas con melatonina fueron similares a los de los controles. El edema mediado por radicales libres y sus niveles fueron menos intensos con la melatonina incorporada a la solución de preservación (Freitas et al., 2006). El efecto combinado de la melatonina y la trimetazidina (TMZ) como aditivos de la solución de preservación de injertos hepáticos esteatósicos también fueron evaluados por Zaouali y colaboradores. Este estudio valoró la activación de la proteína quinasa (AMPK), una enzima que aumenta la actividad durante la IR que conduce a la estimulación de la oxidación de los ácidos grasos y a la inhibición de la lipogénesis, la producción de glucosa y la síntesis de proteínas. Hubo una relación entre la activación de la AMPK y la acumulación de una subunidad del factor-1 (HIF-1 α) inducible por la hipoxia, un factor de transcripción, que funciona

como regulador maestro de las respuestas adaptativas a la reducción de la disponibilidad de O₂. Además, la activación de la AMPK activa la NOS endotelial durante la IR y este proceso en el hígado graso perjudica la degradación normóxica del HIF-1 α y contribuye a su estabilización. La melatonina y la trimetazidina activaron genes protectores, incluyendo la proteína de choque térmico 70 (HSP70), la bcl-2, la eritropoyetina, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la hemo oxigenasa (HO-1), enzima que cataboliza el paso limitante de la velocidad de degradación del grupo hemo (Zaouali et al., 2011 y 2013) (tabla 3).

Kireev y colaboradores realizaron un experimento con cuarenta ratas Zucker sometidas a 35 min de isquemia hepática caliente y 36h de reperfusión. Se administró melatonina (10mg/kg) por vía intraperitoneal/oral. Se determinó en el hígado la ALT, AST y el contenido hepático de ATP, MDA, hidroxialcenos, metabolitos de NO, actividad enzimática antioxidante, caspasa 9 y fragmentación de ADN. Las expresiones NOS, Bcl2, Bax, Bad y AIF se determinaron mediante RT-PCR. La melatonina fue efectiva disminuyendo la lesión hepática debido a su capacidad de mantener los niveles de transaminasas hepáticas, marcadores de apoptosis, de estrés oxidativo y mejorando el contenido de ATP. Se produjo debido a la capacidad de la melatonina de recuperar la disfunción mitocondrial y mejorar la capacidad del hepatocito esteatósico para producir ATP. La melatonina fue capaz de disminuir la expresión de los genes apoptóticos, y también evitó la activación de la caspasa 9, que inicia la vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis (Kireev et al., 2013) (tabla 3).

Estos resultados concuerdan con estudios anteriores que describieron un efecto beneficioso dosis-dependiente, de la melatonina en la producción de bilis, y la secreción de bilirrubina. Aumentaron los niveles de ATP y los niveles de gammaglutamil transferasa (GGT), sin embargo, el glutatión hepático (GSH) y la lactato deshidrogenasa (LDH) no presentaron cambios (Vairetti et al., 2005). El sistema proteasoma de ubiquitina (UPS) es dependiente de la energía que degrada las proteínas mal plegadas y regula varios procesos celulares (Padrissa-Altés et al., 2010). En el hígado, se ha demostrado recientemente que la adición de los inhibidores reversibles de la UPS bortezomib (BRZ) y carbobenzoxy-Leu-Leu-leucina (MG132) a la solución de UW mejoró la preservación del hígado esteatósico y no esteatósico, y que el efecto protector del BRZ fue superior al del MG132 (Zaouali et al., 2013). La solución de IGL1 con BRZ también tuvo efectos protectores, parcialmente mediados por la activación de la señalización de AMPK y Akt/mTOR (vía de señalización intracelular para regular el ciclo celular) (Bejaoui et al., 2014). La melatonina tiene acciones beneficiosas similares a las del BRZ, lo que podría contribuir a su capacidad para proteger los tejidos trasplantados (Vriend et al., 2014a,b).

Las células madre de la pulpa dental humana (hDPSC) pueden diferenciarse en células similares a las de los hepatocitos y su trasplante puede reducir la progresión de la fibrosis hepática en la lesión por tetracloruro de carbono (Ikeda et al., 2008) (Ishkitiev et al., 2012). Recientemente, se ha descubierto que la melatonina promueve la diferenciación hepatogénica de las hDPSCs. Así, la expresión de los marcadores hepáticos como la albúmina (Alb), la citoqueratina-18 (CK18), la proteína a (C/ EBPa), y el factor nuclear hepático-1 α (HNF1 α) aumentan en el grupo de tratamiento de la melatonina más hDPSCs (Cho et al., 2015). Un estudio reciente demostró los beneficios de este tratamiento y de la melatonina (5 mg/kg dos veces por semana) en la cirrosis hepática. Además, se observó una mejora de la respuesta inmunológica y una disminución de los niveles séricos de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato amino transferasa (AST) y amoníaco como resultado de la adición de melatonina (Esteban-Zubero et al., 2016a).

La coadministración de melatonina y la NAC disminuyó la oxidación de lípidos y proteínas y la actividad de la mieloperoxidasa, y también mantuvieron los niveles de GSH. Los hallazgos histológicos también apoyan el papel protector de la melatonina y/o NAC (Sener et al., 2003)

Una cuestión importante que surge es determinar si la acumulación y activación de neutrófilos es una causa o un efecto de la lesión por reperfusión. La mieloperoxidasa (MPO) desempeña un papel fundamental en la producción de radicales libres por los neutrófilos. Muchos trastornos inflamatorios agudos, están vinculados a la capacidad de los neutrófilos de liberar agentes que pueden destruir las células normales y disolver el tejido conectivo (Sullivan et al., 2000). Cada vez hay más indicios que sugieren que las células mesangiales y los neutrófilos liberan sustancias quimiotácticas, por ejemplo, la interleucina 8, que potencian la migración de los neutrófilos al tejido, activan los neutrófilos y aumentan el daño (Donnahoo et al., 1999) (Cuzzocrea et al., 2000). La melatonina y la NAC inhibieron la actividad de la MPO, inducida por la IR (Sener et al., 2003). Otra cuestión es que el glutatión proporciona una protección importante en las lesiones oxidativas al participar en los sistemas de defensa celular contra el daño oxidativo. Este tripéptido está presente en altas concentraciones en el hígado. Se ha propuesto que los niveles hepáticos de glutatión peroxidasa son un indicador de la lesión hepática post-isquémica. Los niveles tisulares de GSH y las actividades de la glutatión reductasa y la glutatión peroxidasa se redujeron significativamente debido al estrés oxidativo, y el deterioro de los mecanismos de defensa antioxidante exacerba el daño tisular inducido por los radicales libres. La melatonina y la NAC previnieron el agotamiento de GSH en el tejido hepático (Sener et al., 2003). Por lo tanto, la melatonina puede ser importante para preservar la

homeostasis celular del GSH. También estimula la γ -glutamylcisteína sintetasa, lo que sugiere que recicla el GSH e influye en su síntesis de novo, por ello, la melatonina es más potente que la NAC en la protección contra el estrés oxidativo inducido por IR (Sener et al., 2003).

En la insuficiencia hepática, los niveles de amoníaco aumentan y pueden aumentar la producción de melatonina en la glándula pineal. Situación que se corrige después de un trasplante hepático exitoso (Córdoba et al., 2004). Sin embargo, se discute si la hiperbilirrubinemia puede interferir con el ensayo de melatonina en plasma (Middleton, 2006). La activación de la AMPK durante la IR conduce a la estimulación de la oxidación de los ácidos grasos y a la inhibición de la lipogénesis, la producción de glucosa y la síntesis de proteínas (Viollet et al., 2006). La activación de la AMPK produce la acumulación de α -subunidad del factor-1 inducible por la hipoxia e induce la generación de NO, lo que perjudica la degradación normal de HIF1 α (Zaouali et al., 2011). En los hígados grasos, el efecto combinado de la melatonina y la trimetazidina como aditivos de solución de preservación IGL1 indujo la activación de la AMPK y mejoró la inducción de la enzima NOS.

El cóctel de TMZ y melatonina añadido a la solución de IGL1 redujo el estrés del retículo endoplásmico y aumentó la autofagia en los injertos de hígado graso mediante la modulación de la actividad de la AMPK (Matsui et al. 2008, Wang et al. 2011). Las acciones beneficiosas de la melatonina se investigaron examinando un cóctel de pretratamiento farmacológico, que incluía pentoxifilina (50 mg/kg intraarterial), glicina (100 mg/kg intraarterial), deferoxamina (30 mg/kg intraarterial), NAC (150 mg/kg i.p.), eritropoyetina (1000 UI i.p.), simvastatina (5 mg/kg intragástrico) y melatonina (10 mg/kg i.p.). La adición de melatonina indujo una disminución de los niveles de TNF- α y de la molécula de adhesión intercelular 1, con una atenuación significativa de la infiltración de leucocitos hepáticos, la vacuolización y la muerte celular. También disminuyeron los niveles de malondialdehído (MDA), las enzimas hepáticas se recuperaron hasta alcanzar niveles similares a los controles (Von Heesen et al., 2012) (tabla 3). Utilizando un tratamiento multimedicamentoso basado en la curcumina (50 mg/kg intragástrico), la simvastatina (5 mg/kg intragástrico), la NAC (150 mg/kg i.p.), la eritropoyetina (3000 UI/kg i.p.), la pentoxifilina (50 mg/kg i.p.), la melatonina (10 mg/kg i.p.), la glicina (100 mg/kg intraarterial) y la metilprednisolona (5 mg/kg intraarterial) los aumentos significativos de K⁺, un marcador de la integridad de la membrana celular, y de las enzimas ALT, AST y LDH, indicadores de la muerte celular parenquimatosa, se normalizaron mediante un tratamiento previo con este cóctel. Además, se restauró el flujo de bilis y se redujeron los niveles de TNF- α , IL6 y MDA, resultados compatibles con los hallazgos histopatológicos, en los que se observó una reducción de la

vacuolización y de la expresión de la caspasa 3 cuando se añadió melatonina al cóctel (Moussavian et al., 2011).

La administración de melatonina antes de la isquemia-reperfusión, durante la misma y hasta dos días después del posoperatorio en ratas Wistar jóvenes o viejas y en Zucker con esteatosis hepática, redujeron el daño generado por el estrés oxidativo tras la IR, responsable de la “no función primaria” o “la pobre función inicial”, las transaminasas y la esteatosis. (Fernández-Tresguerres, 2011).

Los hepatocitos humanos primarios aislados son un potencial tratamiento alternativo al trasplante ortotópico de hígado (Smets et al., 2008), y también una vía para el desarrollo de hígados bioartificiales extracorpóreos (Allen et al., 2001). Durante su proceso de aislamiento, los hepatocitos sufren IR (Francés et al., 2007). Un estudio reciente, utilizó la melatonina o el dimetilsulfóxido (DMSO) para prevenir estas lesiones. Los dos antioxidantes produjeron resultados similares en cuanto a la viabilidad celular y la adhesión. La actividad de la deshidrogenasa celular, los niveles de urea y albúmina mejoraron con la melatonina y el DMSO. Sin embargo, la melatonina disminuyó la peroxidación lipídica en los hepatocitos de forma más potente que el DMSO (Solanas et al., 2015).

Tabla 3. Papel de la melatonina durante la IR hepática en algunos de los estudios realizados

AUTORES	MÉTODOS	RESULTADOS
(Zaouli et al., 2011)	Se añadió melatonina a la solución del Instituto Georges López (IGL-1) durante 24 h (4°C). A partir de entonces, los hígados fueron sometidos a una reperusión de 2 h (37°C). Se midieron las transaminasas, la producción de bilis y la eliminación de sulfobromoftaleína (BSP) (marcador de resistencia vascular), el estrés oxidativo y los mediadores inflamatorios relacionados, incluyendo el óxido nítrico y las citoquinas... También se estudiaron factores citoprotectores como la hemoxigenasa 1 (HO-1).	Se observaron niveles más bajos de transaminasa y una mayor producción de bilis y eliminación de BSP en hígados grasos conservados en una solución de IGL-1 enriquecida con melatonina. Los beneficios de la melatonina se correlacionaron con la generación de óxido nítrico y la prevención del estrés oxidativo y la liberación de citoquinas inflamatorias, incluidos el factor de necrosis tumoral y la adiponectina, respectivamente.
(Von Heesen et al., 2012)	Se realizó un proceso de precondicionamiento de donantes múltiples (MDDP) antes de las 24 horas de isquemia fría. Los MDDP incluyen pentoxifilina (50 mg/kg), glicina (100 mg/kg), deferoxamina (30 mg/kg), N-acetilcisteína (150 mg/kg), eritropoyetina (1000 UI), melatonina (10 mg/kg) y simvastatina (5 mg/kg). El MDDP se aplicó antes de la perfusión hepática con una solución de histidina-triptofanketoglutarato (HTK) de 4°C y la extracción de órganos. Después de 60 minutos de reperusión, se midió el volumen de la bilis, ALT, AST, LDH, MDA, IL1, GDH y los trastornos histopatológicos.	El MDDP mostró una reducción significativa del flujo biliar, así como un marcado aumento de los niveles de enzimas hepáticas y la muerte celular apoptótica. Esto se asoció con un aumento de la formación de MDA, la producción de IL-1 y la infiltración de tejido leucocitario.
(Zaouali et al., 2013)	Efecto combinado de la melatonina y la trimetazidina como aditivos de la solución de IGL-1 en la modulación del estrés y la autofagia en los injertos hepáticos esteáticos mediante la activación de AMPK. Se midió la función (producción de bilis) de la lesión hepática (ALT y AST) y el estrés del retículo endoplásmico (ER) (GRP78, PERK y CHOP) y la autofagia (beclin-1, ATG7, LC3B y P62).	La melatonina y la trimetazidina generan menos lesiones y mejor funcionamiento de los injertos hepáticos. Además, también se observó una disminución significativa en la activación de GRP78, pPERK y CHOP después de la reperusión. Esto fue consistente con una mayor activación de los parámetros autofágicos (beclin-1, ATG7 y LC3B) y la fosforilación de AMPK. La inhibición de la AMPK indujo un aumento del estrés en el retículo endoplásmico y una reducción significativa de la autofagia.
(Kireev et al., 2013)	Cuarenta ratas Zucker sometidas isquemia hepática caliente seguidas de reperusión. Se administró melatonina (10mg/kg) por vía intraperitoneal. Se determinó en el hígado la ALT, AST y el contenido hepático de ATP, MDA, hidroxialcenos, metabolitos de NO, actividad enzimática antioxidante, caspasa9 y fragmentación de ADN.	La melatonina fue efectiva disminuyendo la lesión hepática debido a su capacidad antioxidante manteniendo las transaminasas hepáticas y marcadores de apoptosis en niveles adecuados, y mejorando el contenido de ATP debido a la capacidad de ésta para aumentar su producción en el hígado esteatósico.

CONCLUSIONES

1. La melatonina, un antioxidante muy reconocido por su capacidad de estimular la respuesta inmunológica, promover la actividad de varias enzimas antioxidantes, así como su papel depurador de radicales libres, puede tener un efecto protector en el trasplante de hígado. Todos los estudios sugieren que, gracias a estos efectos, se puede obtener un beneficio de su uso tanto en injertos con esteatosis como en hígados sanos. No obstante, se necesitan más estudios para confirmar las teorías, especialmente en humanos.
2. El trasplante de órganos puede ser una herramienta terapéutica útil para el tratamiento de pacientes con insuficiencia hepática en fase terminal. Los resultados de estos procedimientos han mejorado recientemente gracias a la utilización de nuevas soluciones de preservación, comentadas con anterioridad, para prevenir el rechazo de los injertos. La isquemia-reperfusión se produce durante el trasplante de órganos y la melatonina puede ser protectora. Además, es eficaz no sólo para reducir el rechazo del injerto, sino que también mejora la función del órgano durante el período posterior al trasplante. También aumenta la eficacia de la preservación de los fluidos de los órganos, que desempeña un papel fundamental en la conservación de los mismos.
3. La isquemia-reperfusión, inherente al trasplante hepático, es responsable del fracaso de injertos, siendo más frecuente en los injertos de hígado con esteatosis. El papel de la melatonina para prevenir el rechazo de los injertos y mejorar los resultados de los trasplantes de órganos se ha estudiado principalmente en modelos animales. Hoy en día, no hay estudios en humanos. Por lo tanto, es difícil confirmar los beneficios de la melatonina en nuestra especie, pero los resultados observados en animales son esperanzadores.
4. Los resultados observados abren un nuevo avance para la mejora de esta técnica quirúrgica. Estudios adicionales ayudarían a definir mecanismos más concretos para explicar las acciones beneficiosas de la melatonina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adonis L, García EZ. El envejecimiento y el estrés oxidativo. *Rev Cub Inv Bio.* 2002;21(3):178–85.
2. Aimoto T, Rodhe BH, Chiou GC, Lauber JK. N-acetyltransferase Activity and Melatonin Level in the Eyes of Glaucomatous Chickens. *J Ocul Pharmacol.* 1985;1(2):149-60.
3. Allen JW, Hassanein T, Bhatia SN. Advances in Bioartificial Liver Devices. *Hepatol.* 2001;34:447–55.
4. Bejaoui M, Zaouali MA, Folch-Puy E, Pantazi E, Bardag-Gorce F, Carbonell T, Oliva J, Rimola A, Abdennebi HB, Rosello-Catafau J. Bortezomib Enhances Fatty Liver Preservation in Institut George Lopez-1 Solution Through Adenosine Monophosphate Activated Protein Kinase and Akt/mTOR Pathways. *J Pharm Pharmacol.* 2014;66:62–72.
5. Belzer FO, Southar JH. Principles of Solid-Organ Preservation by Cold Storage. *Transplant.* 1988;45(4):673-6.
6. Berzosa C. Estudio del daño oxidativo, niveles de defensas antioxidantes y efecto ergogénico de la melatonina en pruebas de esfuerzo físico agudo. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza; 2011.
7. Casillas-Ramírez A, Mosbah IB, Franco-gou R, Rimola A, Rosello-catafau J, Peralta C. Síndrome de isquemia-reperfusión asociado al trasplante hepático: una visión actualizada. *Gastroenterol Hepatol.* 2006;29(5): 306–13.
8. Chhabra R, Dubey R, Saini N. Gene Expression Profiling Indicate Role of ER Stress in MiR-23a-27a-24-2 Cluster Induced Apoptosis in HEK293T Cells. *RNA Biol.* 2011;8:648–64.
9. Cho YA, Noh K, Jue SS, Lee SY, Kim EC, Melatonin Promotes Hepatic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells: Clinical Implications for the Prevention of Liver Fibrosis. *J Pineal Res.* 2015;58:127–35.
10. Cichoz-Lach H, Celinski K, Konturek PC, Konturek SJ, Slomka M. The Effects of L-Tryptophan and Melatonin on Selected Biochemical Parameters in Patients with Steatohepatitis. *J Physiol Pharmacol.* 2010;61:577–80.
11. Cordoba J, Steindl P, Blei AT. Melatonin Arrhythmia is Corrected After Liver Transplantation. *Am J Gastroenterol.* 2004;104:1862–3.
12. Cuzzocrea S, Mazzon E, Costantino G, Serraino I, De Sarro A, Caputi AP. Beneficial Effects of Melatonin in a Rat Model of Splanchnic Artery Occlusion and Reperfusion. *J Pineal Research.* 2000;28:52-63.

13. Dominguez LC, Gómez G. Síndrome de reperfusión. *Univ Med.* 2005;46:94–102.
14. Donnahoo KK, Meng X, Ayala A, Cain MP, Harken AH, Meldrum DR. Early kidney TNF- α Expression Mediates Neutrophil Infiltration and Injury After Renal Ischemia-Reperfusion. *Am J Physiol.* 1999;277:922-9.
15. Esteban-Zubero E, García Gil FA, López-pingarrón L, Alatorre-jimenez MA, Ramírez JM, Tan D, García JJ, Reiter RJ. Melatonin Role Preventing Steatohepatitis and Improving Liver Transplantation Results. *Cell Mol life Sci.* 2016a;73:2911–27.
16. Esteban-zubero E, García-Gil FA, López-pingarrón L, Alatorre-Jiménez MA, Íñigo-Gil P, Tan D, García JJ, Reiter RJ. Potential Benefits of Melatonin in Organ Transplantation: a review. *J Endocrinol.* 2016b;229:129–46.
17. Esteban-Zubero E, García-Muro C, Alatorre-Jiménez MA, Marín-Medina A, Buisac-Ramón C, Soto A, Diaram-Strand S, López-García C, Delgado de Lara D. Melatonin's Role in Preventing Graft Rejection in Steatotic Liver Transplantation, a Review. *EC Gastroenterol Dig Syst* 62. 2019;6:76–84.
18. Férez SM, Márquez MF, Peña MA. Daño miocárdico por reperfusión. *Rev Esp Cardiol.* 2004;57(Supl 1):9–21.
19. Fernández-Tresguerres JA. Efecto del pretratamiento con melatonina en la lesión oxidativa, e inflamatoria causada por isquemia/reperfusión hepática en ratas Zucker. *R Acad Nac Med.* 2011;3:391–411.
20. Fiske VM, Huppert LC. Melatonin Action on Pineal Varies with Photoperiod. *Science.* 1968;162(850):279.
21. Flores-villalba E, Rodríguez-Montalvo C, Tijerina-Gómez L, Castilleja F, Bosques F, Guraieb-Trueba M. Lesión hepática por isquemia/reperfusión: mecanismos , vías de activación y perspectivas futuras. *Rev Mex Trasp.* 2015;4:74–9.
22. Francés D, Ronco MT, Ochoa E, Alvarez ML, Quiroga A, Parody JP, Monti J, Carrillo MC, Carnovale CE. Oxidative Stress in Primary Culture Hepatocytes Isolated from Partially Hepatectomized Rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2007;85:1047–51.
23. Freitas I, Bertone V, Guarnaschelli C, Ferrigno A, Boncompagni E, Rizzo V, Reiter RJ, Barni S, Vairetti M. In Situ Demonstration of Improvement of Liver Mitochondria Function by Melatonin After Cold Ischemia. *In Vivo.* 2006;20:229–37.
24. Fuentes L. Melatonina como protector frente a los radicales libres en la hepatotoxicidad por ácidos biliares. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza; 2008.
25. Galzin AM, Eon MT, Esnaud H, Lee CR, Pevet P, Langer SZ. Day-Night Rhythm of 5-Methoxytryptamine Biosynthesis in the Pineal Gland of the Golden Hámster. *J Endocrinol.* 1988;118:389-97.

26. Grace MS, Cahill GM, Besharse JC. Melatonin Deacetylation: Retinal Vertebrate Class Distribution and *Xenopus Laevis* Tissue Distribution. *Brain Res.* 1991;559:56-63.
27. Guerrero JM, Carrillo-vico A, Lardone PJ. La melatonina. *Invest y Cienc.* 2007;27:30-8.
28. Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX. The Significance of Metabolismo of the Neurohormone Melatonin: Antioxidative Protection and Formation of Bioactive Substances. *Neurosci Biobehav Rev.* 1993;17:347-57.
29. Hatzis G, Ziakas P, Kavantzias N, Triantafyllou A, Sigalas P, Andreadou I, Ioannidis K, Chatzis S, Filis K, Papalampros A, Sigala F. Melatonin Attenuates High Fat Diet-Induced Fatty Liver Disease in Rats. *World J Hepatol.* 2013;5:160-9.
30. Heubner O. Tumor de la glándula pinealis. *Detsch Med Wochenschr.* 1898;24:214-20.
31. Hofmann AF, Reiter RJ. Pineal Gland Influence on Gonads of Male Hamsters. *Sci.* 1965;148:1609-11.
32. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond Insulin Resistance in NASH: TNF-alpha or Adiponectin?. *Hepatol.* 2004;40(1):46-54.
33. Ikeda E, Yagi K, Kojima M, Yagyuu T, Ohshima A, Sobajima S, Tadokoro M, Katsube Y, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Go MJ, Adachi H, Yokota Y, Kirita T, Ohgushi H. Multipotent Cells From the Human Third Molar: Feasibility of Cellbased Therapy for Liver Disease. *Res Bio Diver.* 2008;76:495-505.
34. Ildfonso A, Arias-Díaz J. Fisiopatología de la lesión hepática por isquemia-reperfusión. *Cir Esp.* 2010;87(4):202-9.
35. Ishkitiev N, Yaegaki K, Imai T, Tanaka T, Nakahara T, Ishikawa H, Mitev V, Haapasalo M. High-Purity Hepatic Lineage Differentiated from Dental Pulp Stem Cells in Serum-Free Medium. *J Endod.* 2012;38:475-80.
36. Justo C, Gutiérrez RV. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Mil.* 2002;31(2):126-31.
37. Kim SJ, Kang HS, Lee JH, Park JH, Jung CH, Bae JH, Oh BC, Song DK, Baek WK, Im SS. Melatonin ameliorates ER Stress-Mediated Hepatic Steatosis Through MiR-23a in the Liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;458:462-9.
38. Kireev R, Bitoun S, Cuesta S, Tejerina A, Ibarrola C, Moreno E, Vara E, Tresguerres JA. Melatonin Treatment Protects Liver of Zucker Rats after Ischemia/Reperfusion by Diminishing Oxidative Stress and Apoptosis. *Eur J Pharmacol.* 2013;701(1-3):185-93.
39. Kopin IJ, Pare CM, Axelrod J, Weissbach H. The Fate of Melatonin in Animals. *J Biol Chem.* 1961;236:3072-5.
40. Kveder S, Mclsaac WM. The Metabolism of Melatonin. *J Biol Chem.* 1961;236:3214-20.

41. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of Melatonin, The Pineal Gland Factor that Lightens Melanocytes. *J Am Chem Soc.* 1958;80:2587.
42. Matsui Y, Kyoji S, Takagi H, Hsu CP, Hariharan N, Ago T, Vatner SF, Sadoshima J. Molecular Mechanisms and Physiological Significance of Autophagy During Myocardial Ischemia and Reperfusion. *Autophagy.* 2008;4(4):409-15.
43. McCord CP y Allen FP. Evidences Associating Pineal Gland Function with Alterations in Pigmentation. *J Exp Zool.* 1917;23:207-24.
44. Menéndez-Peláez A, Howes KA, González-Brito A y Reiter RJ. N-Acetyltransferase Activity, Hydroxyindole-O-Methyltransferase Activity, and Melatonin Levels in the Harderian Glands of the Female Syrian Hamster: Changes During the Light: Dark Cycle and the Effect of 6-Parachlorophenylalanine Administration. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987;145:1231-8.
45. Middleton B. Measurement of Melatonin and 6-Sulphatoxymelatonin. *Methods in Molecular Biology.* 2006;324:235–54.
46. Montalvo-jave EE, Rodríguez AV, Gil AM, Hidalgo F, Arenas C, Arturo J, Piña E. Lesión por isquemia reperfusión y trauma hepático. *Rev Traumatol.* 2008;11(3):92–100.
47. Montilla P, Cruz A, Padillo FJ, Túnez I, Gascon F, Muñoz MC, Gómez M, Pera C. Melatonin Versus Vitamin E as Protective Treatment Against Oxidative Stress after Extra-Hepatic Bile Duct Ligation in Rats. *J Pineal Res.* 2001;31:138–44.
48. Moussavian MR, Scheuer C, Schimidt M, Kollmar O, Wagner M, Von Heesen M, Schilling MK, Menger MD. “Multidrug Donor Preconditioning Prevents Cold Liver Preservation and Reperfusion injury”. *Langenbecks Arch Surg.* 2011;396(2):231-41.
49. Padrisa-Alte’s S, Zaouali MA, Bartrons R, Rosello-Catafau J. Ubiquitin-Proteasome System Inhibitors and AMPK Regulation in Hepatic Cold Ischaemia and Reperfusion Injury: Possible Mechanisms. *Clin Sci.* 2010;123:93–8.
50. Pang SF, Yu HS, Suen HC, Brown GM. Melatonin in the Retina of Rats: a Diurnal Rhythm. *J Endocrinol.* 1980;87 89-93.
51. Pessayre D, Berson A, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondria in Steatohepatitis. *Semin Liver Dis.* 2001;21:57–69.
52. Ramón y Cajal S. *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados.* Madrid. 1904.
53. Ramos-Gallardo G, Altamirano AM. Importancia del daño isquemia-reperfusión. *Rev Cir Plast.* 2014;24(1):57–60.
54. Reiter RJ. Melatonin Synthesis: Multiplicity of Regulation. *Adv Exp Med Biol.* 1991;294:149-58

55. Reyes MC. Melatonina y metabolitos derivados del triptófano como protectores de la fluidez de membranas plasmáticas de hepatocitos frente al estrés oxidativo. Tesis doctoral. Zaragoza: Universidad de Zaragoza; 2008.
56. Romero A, Cabaleiro T, Caride A, Lafuente A. Posible papel protector de la melatonina frente a la toxicidad neuroendocrina inducida por cadmio. *Rev Toxicol Esp.* 2008;25:3-11.
57. Sener G, Tosun O, Şehirli AÖ, Kaçmaz A, Arbak S, Ersoy Y, Ayanoglu-Dülger G. Melatonin and N-Acetylcysteine Have Beneficial Effects During Hepatic Ischemia and Reperfusion. *Life Sci.* 2003;72(24):2707–18.
58. Shaw JR. Auxiliary Liver Transplantation for Acute Liver Failure. *Liv Transplant Surg.* 1995;1:194-200.
59. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/Reperfusion Injury: a Review in Relation to Free Tissue Transfers. *Surg.* 2004;24:468–75.
60. Smets F, Najimi M, Sokal EM. Cell Transplantation in the Treatment of Liver Diseases. *Pediatr Transplant.* 2008;12:6–13.
61. Solanas E, Sostres C, Serrablo A, García-Gil A, García JJ, Aranguren FJ, Jiménez P, Hughes RD, Serrano MT. Effect of Dimethyl Sulfoxide and Melatonin on the Isolation of Human Primary Hepatocytes. *Cells Tissues Organs.* 2015;200:316–25.
62. Sullivan GW, Sarembock IJ, Linden J. The Role of Inflammation in Vascular Diseases. *J Leukocyte Biology.* 2000;67:591-602.
63. Vairetti M, Ferrigno A, Bertone R, Rizzo V, Richelmi P, Berte F, Reiter RJ, Freitas I. Exogenous Melatonin Enhances Bile Flow and ATP Levels after Cold Storage and Reperfusion in Rat Liver: Implications for Liver Transplantation. *J Pineal Res.* 2005;8:223–30.
64. Viollet B, Foretz M, Guigas B, Horman S, Dentin R, Bertrand L, Hue L, Andreelli F. Activation of AMP-Activated Protein Kinase in the Liver: a New Strategy for the Management of Metabolic Hepatic Disorders. *J Physiol.* 2006;574:41–53.
65. Von Heesen M, Seibert K, Hülser M, Scheuer C, Wagner M, Menger MD, Schilling MK, Moussavian MR. Multidrug Donor Preconditioning Protects Steatotic Liver Grafts Against Ischemia-Reperfusion Injury. *Am J Surg.* 2012;203(2):168-76.
66. Vriend J, Reiter RJ. Melatonin as a Proteasome Inhibitor. Is there any Clinical Evidence?. *Life Sci.* 2014a;115:8–14.
67. Vriend J, Reiter RJ. Melatonin and Ubiquitin: What's the Connection?. *Cell Mol Life Sci.* 2014b;71:3409–18.

68. Weigand K, Brost S, Steinebrunner N, Markus B, Schemmer P, Müller M. Ischemia/Reperfusion Injury in Liver Surgery and Transplantation: Pathophysiology. *Surg.* 2012;2012:1–8.
69. Xu DX, Wei W, Sun MF, Wei LZ, Wang JP. Melatonin Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Down-Regulation of Pregnane X Receptor and its Target Gene CYP3A in Mouse Liver. *J Pineal Res.* 2005;38:27–34.
70. Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM. Obesity Increases Sensitivity to Endotoxin Liver Injury: Implications for the Pathogenesis of Steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94:2557–62.
71. Zaouali MA, Boncompagni E, Reiter RJ, Bejaoui M, Freitas I, Pantazi E, Folch-Puy E, Abdennebi HB, Garcia-Gil FA, Rosello-Catafau J. AMPK Involvement in Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy Modulation after Fatty Liver Graft Preservation: a Role for Melatonin and Trimetazidine Cocktail. *J Pineal Res.* 2013;55(1):65-78.
72. Zaouali MA, Reiter RJ, Padrissa-Atlés S, Boncompagni E, García JJ, Ben Abnennebi H, Freitas I, García-Gil FA, Rosello-Catafau J. Melatonin Protects Steatotic and Nonsteatotic Liver Grafts Against Cold Ischemia and Reperfusion Injury. *J Pineal Res.* 2011;50(2):213-21.