

## Trabajo Fin de Grado

### **APLICACIÓN DE LA MELATONINA EN MODELOS DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN. REVISIÓN.**

Application of melatonin in ischemia-reperfusion  
injury models. Review.

Autora

Laura María Fernández López

Directora

Dra. Laura López Pingarrón



Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza.

Departamento de Farmacología y Fisiología

Junio 2018

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	3
2. OBJETIVOS.....	4
3. INTRODUCCIÓN.....	5
4. LA MELATONINA.....	7
4.1. Biosíntesis, secreción y metabolismo.....	7
4.2. Mecanismo de acción y funciones.....	8
5. ESTRÉS OXIDATIVO.....	10
6. LESIÓN POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN.....	16
6.1 Fisiopatología de la lesión por isquemia-reperfusión.....	16
6.2 Repercusión orgánica de la isquemia-reperfusión .....	18
7. APLICACIONES CLÍNICAS DE LA MELATONINA EN LA LESIÓN POR ISQUEMIA- REPERFUSIÓN.....	24
7.1 A nivel cardiovascular.....	24
7.2 A nivel cerebrovascular.....	27
7.3 En el trasplante de órganos.....	28
8. CONCLUSIONES.....	30
9. BIBLIOGRAFÍA.....	31

## 1.-RESUMEN

La melatonina es una molécula con funciones variadas en el organismo, sintetizada mayoritariamente en la glándula pineal siguiendo un ritmo circadiano, y también está presente a otros niveles. En el estrés oxidativo sucesivo a la isquemia y a la reperfusión, los mecanismos antioxidantes que el organismo posee se ven sobrepasados, debido a la excesiva respuesta inflamatoria y a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno. La ubicuidad de la melatonina, así como su conocida acción antioxidante ha suscitado la investigación de su utilización como potencial agente terapéutico en el tratamiento de patologías tan prevalentes en nuestro medio como las enfermedades cardiovasculares o la amenaza de la viabilidad de los trasplantes de órganos, debido a la lesión por isquemia reperfusión. Estos fenómenos de estrés oxidativo son causados por la isquemia, aunque también por la reperfusión, tras la desobstrucción del vaso ocluido en el caso de procedimientos terapéuticos a nivel cardiovascular, o tras el restablecimiento del flujo sanguíneo en el trasplante de órganos o injertos tisulares. Tanto a nivel cardiovascular como en el trasplante de órganos, la melatonina es considerada como un posible tratamiento complementario a los procedimientos de reperfusión tisular, paliando la lesión por isquemia reperfusión resultante.

**PALABRAS CLAVE:** Melatonina. Estrés oxidativo. Lesión por isquemia-reperfusión. Aplicación clínica.

## ABSTRACT

Melatonin is a molecule with several functions in the organism, whose synthesis takes place in pineal gland, following a circadian rhythm. However, melatonin is found in other localizations as well. After ischemia-reperfusion procedures, oxidative stress may ensue when antioxidant mechanisms of the body are overwhelmed by excessive proinflammatory response and reactive oxygen species production is excessive. The ubiquity of melatonin and its antioxidant properties have lead to investigations of its use as a treatment for prevalent pathologies such as cardiovascular diseases or the organ rejection as a result of ischemia-reperfusion injury. This would be consequence of ischemia but also because of reperfusion, when the occluded vessel is unblocked or after blood supply returns to the transplanted organ or graft. On the cardiovascular system as well as on organ transplantation, melatonin turns out to be a potential supplementary therapeutic agent to procedures of restoration of tissue oxygenation, relieving the resulting ischemia-reperfusion injury.

**KEY WORDS:** Melatonin. Oxidative stress. Ischemia-reperfusion injury. Clinical application.

## 2.- OBJETIVOS

Este trabajo tiene como objetivo realizar una revisión bibliográfica de artículos que recogen el potencial uso terapéutico de la melatonina en el tratamiento o paliación de la lesión por isquemia reperfusion. El trabajo se centra en esta lesión a nivel cardiovascular y el trasplante de órganos, así como el potencial uso terapéutico de la melatonina a estos dos niveles, debido a la gran prevalencia e incidencia en nuestro medio de patologías como el síndrome coronario agudo o la importancia del descubrimiento de nuevas terapias que favorezcan la viabilidad de los trasplantes.

En la recopilación de artículos de evidencia científica del trabajo se emplearon las bases de datos Pubmed-Medline y Dialnet, y la biblioteca electrónica Cochrane. Por un lado, se han revisado 11 artículos con el objetivo de conocer en profundidad la multitud de funciones de la melatonina, así como sus mecanismos de acción fisiológicos en diferentes órganos y sistemas. Debido a la implicación del estrés oxidativo como base de la lesión por isquemia reperfusion, se procedió a la revisión de 25 artículos acerca de su repercusión tanto en el organismo en general como en la lesión por isquemia reperfusion. Por otro lado, el trabajo recoge información sobre la lesión por isquemia reperfusion. Así pues, a través de la revisión de 14 artículos, se intenta dar a conocer qué ocurre en la fisiopatología de la lesión por isquemia reperfusion cuando ésta tiene lugar a nivel cardiovascular y de 13 artículos en los que se recoge la fisiopatología a nivel del trasplante de órganos. Por último, se recoge la aportación de 11 artículos en los que se propone un posible uso de la melatonina como arma complementaria en el tratamiento de la lesión por isquemia reperfusion a nivel cardiovascular y cerebrovascular, y 8 en el trasplante de órganos, así como se incluyen artículos en los que se han realizado experimentos con melatonina. En los artículos revisados se objetiva el papel beneficioso de la melatonina sobre el aparato cardiovascular y en el trasplante de órganos, además de en los diferentes niveles en los que se encuentra esta molécula, en contra del estrés oxidativo propio de la isquemia-reperfusion.

### 3.- INTRODUCCIÓN

La melatonina es una molécula sintetizada por la glándula pineal, que posee diferentes mecanismos de acción y funciones a distintos niveles, que podrían ser aprovechadas para el tratamiento de patologías tan prevalentes en nuestro medio como la enfermedad cardiovascular, o la lesión por isquemia reperfundida a este mismo nivel y en el trasplante de órganos. A pesar de que la mayor parte de la melatonina se sintetiza en la glándula pineal, siguiendo un ritmo circadiano, también en la retina, el intestino o en el páncreas se produce esta molécula. La melatonina posee acciones independientes de receptor, de modo que interacciona directamente con proteínas intracelulares como la calmodulina o la calreticulina, y también con receptores MT1, MT2 (ambos de la membrana plasmática), y MT3 (citoplásmico) (José F. y cols., 2016). Además, presenta acciones a diferentes niveles como las enfermedades cardiovasculares, debido a su acción antioxidante contra los productos de desecho derivados de episodios de sufrimiento miocárdico, y también contrarresta el daño por reperfundida consecuencia, de técnicas de reperfundida miocárdica como la apertura de una arteria ocluida o la ACTP (angioplastia coronaria transluminal percutánea). Al inhibir la producción de citocinas proinflamatorias, evita la progresión hacia enfermedad aterosclerótica (Dominguez-Rodriguez A. y cols., 2012).

Por otro lado, en determinadas situaciones, los mecanismos antioxidantes que el organismo posee se ven sobrepasados por situaciones oxidantes, resultando el estrés oxidativo propio de la sobreproducción de radicales libres, oxidándose las proteínas y produciéndose la peroxidación lipídica. Este proceso se observa en situaciones patológicas como la aterosclerosis, la obesidad o el envejecimiento (Díaz G., 2012), y en otras como la reperfundida postisquemia, en la que se produce un desequilibrio en la cadena respiratoria mitocondrial, en la que normalmente una parte del O<sub>2</sub> se convierte en anión superóxido y peróxido de hidrógeno (Becker L., 2004). Paradójicamente, también en la fase de isquemia, de hipoxia, se produce daño por sobreproducción de radicales libres de oxígeno debido al aumento de síntesis de xantina oxidasa, principal fuente biológica de producción de superóxido en tejidos post isquémicos (Karg E. y cols., 1997). La alta incidencia de patologías cardiovasculares en las que se ve involucrada la isquemia reperfundida, o procedimientos como el trasplante de órganos, obliga a buscar moléculas antioxidantes que pudieran paliar este daño (Muñoz R. y cols., 2017).

Durante la isquemia producida en un tejido, se suceden una serie de procesos que afectarán a cada órgano de manera diferente, además de las consecuencias a nivel sistémico que esta privación del flujo sanguíneo pudieran tener (Becker, 2004): el daño celular y el aumento de la liberación de radicales libres, así como un desequilibrio en la producción de sustancias vasoconstrictoras y vasodilatadoras (de la Asuncion J.G. y cols., 1996), cambios en la microcirculación (Zhou H. y cols., 2018), y la implicación de las plaquetas, clave en la homeostasis vascular en circunstancias fisiológicas (Zhou H., y cols., 2018), contribuyen a esta patología. El restablecimiento del flujo sanguíneo tras la isquemia, podría llevar a un daño mayor incluso que la isquemia *per se* (Özkan N. y cols., 2018).

En el aparato cardiovascular, la isquemia se ve traducida en la activación del metabolismo aeróbico y la generación de sustancias tóxicas, y la reperfusión, cuyo objetivo es la reducción de las células necrosadas así como salvar el máximo número de células de la zona de penumbra (Zhou H. y cols., 2018), llevará a un brusco aumento de calcio y oxígeno, con pérdida del potencial de membrana de la membrana interna mitocondrial, pudiéndose dar incluso un daño irreversible (Férez Santander S. y cols., 2004).

También a nivel intestinal, el aporte sanguíneo para evitar dehiscencia anastomótica en las anastomosis quirúrgicas, conlleva una excesiva respuesta sistémica, que junto con la vasoconstricción y la falta de oxígeno previa, y la producción de radicales libres consecuencia de la isquemia y reperfusión, comprometen la viabilidad de dicha anastomosis (Özkan N. y cols., 2018).

En el pulmón, a pesar de ser un caso distinto en el que la hipoxia podría verse minimizada por el contenido de oxígeno de los alveolos que mantendría el metabolismo aeróbico, también se ven afectada la viabilidad del trasplante, debido a la afectación de la microcirculación que ocasionará entre otros, edema pulmonar (Chen G. y cols., 2011) . El papel protector de la melatonina contra el estrés oxidativo ha vuelto a constatarse en experimentos con ratas, además de en estadios avanzados de enfermedades pulmonares (Inci I. y cols., 2002).

La lesión por isquemia reperfusión a nivel hepático tanto en fase caliente, durante la resección hepática, como en la fase fría durante la preservación *ex vivo* del hígado a trasplantar, lleva a una activación de los neutrófilos y células de Kupffer, así como a alteraciones electrolíticas (Tani M. y cols., 1989).

A nivel renal, también se dan los cambios descritos, en la isquemia previa a su implante en el receptor, y en la reperfusión, cuando el órgano recupera el flujo sanguíneo, elevando su temperatura con la consiguiente excesiva respuesta inflamatoria (Leong CL y cols., 2007), teniendo como particularidad que la lesión por isquemia en el riñón, y la posterior necrosis tubular aguda, repercutirá de forma especial en la hemodinámica, afectándose parámetros como la presión arterial o cambios en el filtrado glomerular (Devarajan P., 2006). La melatonina, junto con otros antioxidantes como la vitamina E y C, modula la producción de estrés oxidativo y disminuye la nefrotoxicidad de algunos fármacos, además de regular los ritmos circadianos en patología renal en los que éstos se pueden ver alterados (Esteban-Zubero E. y cols., 2016).

## 4.- MELATONINA

La melatonina (N-acetil-5-metoxi-triptamina) es un producto derivado del triptófano, sintetizado en su mayor parte en la glándula pineal (Reiter RJ y cols., 2010). Esta molécula presente en los seres vivos, es producida en la glándula pineal, sobre todo por la noche ya que su síntesis es predominantemente nocturna y es inhibida por la luz, siguiendo un ritmo circadiano y actuando como promotor del sueño (Milani M. y cols, 2014).

### 4.1 BIOSÍNTESIS, SECRECIÓN Y METABOLISMO DE LA MELATONINA

Tanto la luz ambiental como las hormonas circulantes van a regular el ritmo de síntesis de la melatonina por parte de la glándula pineal, estimulada por el sistema nervioso simpático. La Noradrenalina actúa sobre los receptores beta-adrenérgicos de la glándula pineal, siendo su número mayor por la noche, lo cual implica la mayor producción nocturna de la molécula. La estimulación del nervio óptico y del núcleo supraquiasmático y la consiguiente inhibición del ganglio cervical superior llevarán por su parte a la producción de melatonina (Muñoz Hoyos A. y cols., 1994). Estos dos procesos tienen como consecuencia la conversión del triptófano en 5-hidroxitriptófano y éste en serotonina, cuyos niveles son mucho más altos en la glándula pineal que en el resto del cerebro. Para la conversión de serotonina en melatonina se requieren las enzimas AA-NAT (Arlalquilamina N-acetiltransferasa) y la HIOMT (hidroxiindol-O-metiltransferasa), cuyos niveles son mayores por la noche (José F. y cols., 2016). Pero la mayor parte de la síntesis de melatonina no es llevada a cabo solo por la glándula pineal, sino que se ha demostrado su síntesis por parte de la retina, el intestino, el cuerpo carotídeo, el páncreas e incluso las células inmunes, así como en el cuerpo ciliado del iris, el hipocampo o la glándula lacrimal (José F. y cols., 2016). En cambio la sintetizada por estos tejidos extrapineales no va a tener una función endocrina, sino que actúa de forma local, con una acción, paracrina, autocrina y luminal (Bubenik G. y cols., 1999). Además ésta tampoco seguirá el ritmo circadiano de la producida por la glándula pineal (Domínguez-Rodríguez A. y cols., 2009).

La melatonina se secreta a medida que se va sintetizando, tanto al líquido cefalorraquídeo como al sistema cardiovascular, por un mecanismo que podría ser de difusión pasiva aunque también se habla de una secreción pulsátil. Esta liberación es máxima entre las 2.00 y las 4.00 de la madrugada, tras lo cual comienza a descender, siendo mínima durante el día, y viéndose también influida por otros factores como la edad del individuo. Se trata de una hormona de acción rápida, que tras 40 minutos será en su mayoría metabolizada por el hígado (José F. y cols., 2016).

No solo éste se encarga de su catabolismo, sino también el intestino, la piel o el líquido cefalorraquídeo, donde se han detectado altos valores de CYP1B126. Otro de sus metabolitos, la N-acetil-N-formil-5-metoxicinuramina (AFMK) se produce sobre todo en la mitocondria, encontrándose altas concentraciones en situación de estrés oxidativo, y que, al igual que otros metabolitos de la melatonina, impide el daño oxidativo del ADN e interactúa con especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Domínguez-Rodríguez A. y cols., 2009).

## 4.2 MECANISMOS DE ACCIÓN Y FUNCIONES DE LA MELATONINA

### a) Mecanismos de acción.

La melatonina interacciona con receptores, tanto específicos como proteínas intracelulares, cuyos agonistas y antagonistas ayudan a entender su implicación en procesos fisiológicos. Tanto en el sistema nervioso central como en los vasos sanguíneos o el corazón, se encuentran los receptores de membrana plasmática MT1 y MT2 de la melatonina, acoplados a proteínas G y que se diferencian en sus localizaciones y distribución. Ambos van a inhibir a la enzima adenilato ciclasa, activando la fosfolipasa C gracias a la reducción de los niveles de adenosín monofosfato cíclico. El receptor MT2, inhibirá en cambio al nucleótido guanosín monofosfato cíclico (Dubocovich ML y cols., 2005). Por su parte del receptor MT3, citosólico, aislado en órganos de hámster, no se conoce aún su papel fisiológico, se habla de su implicación en la detoxificación de radicales libre y toxinas, debido a su homología del 95% con la quinona oxidoreductasa 2 humana (Nosjean O. y cols., 2000).

La melatonina también posee acciones independientes de receptor. Se habla de la capacidad reguladora del citoesqueleto y de la óxido nítrico sintasa neuronal y de la calmodulina, gracias a la interacción de la melatonina con proteínas intracelulares como la calmodulina, y de la regulación genómica por su unión con la calreticulina, una proteína de RE que une calcio (Benítez-King G., 1993). Además de potenciar los efectos antioxidantes de la vitamina C o E, la ubicua distribución de la melatonina permite también la protección del ADN nuclear, las proteínas o lípidos frente al estrés oxidativo, ya que los productos derivados de su metabolismo, tienen capacidad de secuestrar radicales libres, y también la melatonina actúa estimulando la actividad de la catalasa o la superóxido dismutasa, y de glutatión, todos ellos antioxidantes ( Tan D. y cols., 2002).

### b) Acciones fisiológicas de la melatonina en diferentes órganos y sistemas.

El carácter lipofílico y ubicuo de la melatonina le concede la característica de ser una molécula con funciones muy numerosas y diversas, ya que actúa a diferentes niveles en los seres vivos. Comenzando por su función antioxidante en unicelulares, cumple también funciones cronobióticas en vertebrados, así como ambientales, en las plantas (Martín CS y cols., 2017), y sexuales en pájaros y peces, así como de regulación de la reproducción estacional en mamíferos. También es conocido su efecto regulador del sueño y de la temperatura corporal, sus funciones antiinflamatorias en el aparato gastrointestinal y cardiovascular y su relación con el envejecimiento (José F. y cols., 2016). Es lógico pensar que esta variedad de distribución y de funciones de la molécula, tenga que ver con la amplitud de metabolitos bioactivos formados durante su metabolismo, resultando de vías tanto multi como no-enzimáticas (Tan DX y cols., 2009). Se ha relacionado la cronodisrupción propia de las sociedades modernas, con el estrés propio de éstas, iluminación débil, así como tiempo de sueño irregular y baja actividad física, con las alteraciones en la melatonina y el riesgo incrementado de sufrir algunas de las enfermedades degenerativas más prevalentes como obesidad, envejecimiento prematuro o las



enfermedades cardiovasculares, tanto por hacer más susceptibles a las personas como por empeorar su padecimiento (Martín CS y cols., 2017).

La evidente acción antioxidante de la melatonina vuelve a ejercer acciones en contra de productos como las especies moleculares de oxígeno y de nitrógeno reactivos, en contra de la toxicidad de estos.

Las enfermedades cardiovasculares constituyen la primera causa de muerte en nuestro país, y el tratamiento de reperfusión del infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST, lleva a la liberación de múltiples productos de desecho por parte de las células, que junto con la isquemia producida previamente, resultan tóxicos para el corazón. Así pues, la apertura de la arteria por trombólisis o ICP (intervención coronaria percutánea), conlleva un consumo de O<sub>2</sub> y posterior disfunción cardíaca por el aumento de radicales libres y de la agregación plaquetaria por el cambio en la señalización del calcio en éstas, así como la disminución del flujo coronario y la disponibilidad de óxido nítrico. Como se ha expuesto antes, inhibe la producción de citocinas proinflamatorias. Estas citocinas también contribuyen a la activación endotelial necesaria para el desarrollo de la placa promotora de la enfermedad aterosclerótica. Así pues, su efecto cardioprotector reduciría el tamaño del área de riesgo y la incidencia de arritmias de reperfusión (Dominguez-Rodriguez A. y cols., 2012).

Además de ser un sistema efector, el sistema inmune recibe información de parte del sistema neuroendocrino, y se ve a su vez afectado por señales ambientales como la luz. La médula ósea, el timo o los linfocitos son algunos de los sitios que sintetizan melatonina, y ejercen a su vez una acción anti-inflamatoria. La melatonina estimula por un lado la expresión de moléculas del MHC de las células presentadoras de antígenos, así como la presentación antigénica por macrófagos esplénico a los linfocitos T CD4+, activando además a estas células, modulando la inmunosupresión. También estimula la producción de células NK (natural killer) e inhibe la producción de linfocitos estimulados por mitógenos. Todo ello conlleva a la producción de las citocinas y al uso de melatonina en la protección del tejido pancreático frente a la inflamación en patología como la pancreatitis aguda (Chen HM y cols., 2006). También se ha observado ritmos circadianos anormales en pacientes oncológicos. La citada promoción de la inmunomodulación por parte de la melatonina, apoyaría esta acción antineoplásica, así como su efecto inhibitor de los factores de crecimiento y diferenciadores de células neoplásicas, incluso se ha observado mejoría en la calidad de vida de estos pacientes al administrarles melatonina intramuscular para mejorar su respuesta al tratamiento (Muñoz Hoyos A. y cols., 1994).

La piel es otra localización de la producción extrapineal de la melatonina, ya que posee aparato enzimático y precursores necesarios para su síntesis. La regulación del sistema cutáneo melatoninérgico sufre, a diferencia de la glándula pineal, una estimulación continua y una implicación en la homeostasis del pelo, así como en la fase catágena de su ciclo de crecimiento, ya que la melatonina cultivada in vitro a bajas concentraciones induce el alargamiento de la vaina capilar e inhibe la apoptosis de los queratinocitos, y aumentando la fase anágena (Milani M. y cols., 2014).

Respecto a la reproducción, la secreción de melatonina es importante en los animales estacionales en los que la actividad reproductiva depende de la época del año, ya que el ciclo

luz-oscuridad informa de la estación en la que se encuentran, siendo los días más cortos del año, cuando los niveles de melatonina son máximos, cuando muchas especies son sexualmente más activas. A nivel de los gametos, contribuye a la maduración de los folículos ováricos y a la protección de los espermatozoides. Su poder antioxidante vuelve a ser decisivo, junto con la localización en las células de granulosa y las lúteas, de receptores MT1 Y MT2 (José F. y cols., 2016). También en la fisiología ovárica, se han visto las implicaciones de la melatonina en la ovulación, desarrollo y maduración del ovocito. Antioxidantes como la vitamina E, 1,2-propanediol han sido usados con éxito para la supervivencia del injerto ovárico. Además, estudios en ratas pinealectomizadas se ha observado un aumento de la endometriosis (Esteban-Zubero E. y cols., 2016).

En trastornos del sueño en trabajadores en turnos de noche, se ha observado una pérdida de la capacidad inhibitoria del crecimiento celular y oncostática por parte de la melatonina, debido a la desregulación que se da en su síntesis, disminuyendo pues su acción protectora contra el daño al DNA y la reparación del DNA dañado (Martín CS y cols., 2017).

En pacientes diabéticos existe un menor pico nocturno de aMT, desapareciendo además el ritmo circadiano en aquellos con neuropatía diabética (Muñoz Hoyos A. y cols., 1994). La melatonina ha mostrado efectos antidiabéticos en el caso de la diabetes tipo 2 consecuencia de la obesidad, ya que incrementa el  $Ca^{2+}$  en el músculo, el hígado, páncreas y tejido adiposo, y reduce la resistencia a la insulina asociada a la edad. Modula la carcinogénesis pancreática por sus acciones antioncogénicas y el incremento de quimioterápicos (Esteban-Zubero E. y cols., 2016).

Se sabe que las convulsiones epilépticas se ven influidas por los ritmos circadianos y que alteraciones de estos podrán aumentar su frecuencia y la duración de los episodios, por lo que se podía plantear la acción de la melatonina en contra de su aparición, y el desequilibrio existente entre las vías metabólicas del triptófano en las crisis convulsivas. En esta y otras situaciones de estrés como el estrés agudo de los recién nacidos con sufrimiento fetal agudo, aparece un aumento en la producción de melatonina (Muñoz Hoyos A. y cols., 1994).

## 5.- ESTRÉS OXIDATIVO

El oxígeno, al igual que las situaciones que promueven los efectos oxidativos en los seres vivos como las radiaciones solares, han llevado al desarrollo por parte del organismo de mecanismos antioxidantes que intentan contrarrestar los efectos perjudiciales de determinadas condiciones ambientales. En el metabolismo celular se ven implicadas múltiples reacciones de oxidación-reducción. Un ejemplo de esto es el proceso de respiración celular en las mitocondrias, por el cual se obtiene energía a partir de nutrientes orgánicos. La oxidación consiste en la eliminación de electrones, y la reducción, la adición de electrones. Por lo tanto, los átomos de carbono y de hidrógeno de las moléculas orgánicas, inicialmente reducidos, se transformarán en  $CO_2$  y  $H_2O_2$  (muy oxidadas porque han cedido electrones), ya que es en esta forma en la que se encuentran más estables. Las especies reactivas de oxígeno (ERO) y otros

radicales libres, quedarán como productos residuales de este proceso (de Teresa Galván C. y cols., 2008).

El estrés oxidativo es el resultado o bien de la deficiencia de mecanismos antioxidantes, que se muestran incapaces de mantener la homeostasis de la óxido-reducción intracelular, o bien por una excesiva producción de radicales libres, moléculas altamente inestables debido a que contienen electrones desapareados en el orbital más externo de su estructura, y que van a tender a reaccionar con otras moléculas del organismo con la finalidad de recuperar la estabilidad, muchas veces oxidándolas, como hacen con los carbohidratos, los aminoácidos o los ácidos grasos. Cuando el radical libre sustrae un electrón de la molécula con la que reacciona, comienza una sucesión en cadena de ataque a las células. En el organismo se dan procesos exergónicos, donde el último aceptor de los electrones liberados de los átomos de hidrógeno de los nutrientes es el oxígeno. El proceso endergónico en cambio, utiliza la energía libre de la oxidación. Las células aeróbicas de nuestro organismo están expuestas al estrés oxidativo, teniendo como consecuencia la inactivación enzimática, la oxidación y cambio en la estructura de proteínas y la peroxidación de lípidos (Díaz G., 2012). Dentro del daño en el DNA podemos distinguir daño pasivo y daño activo. El estrés oxidativo va a causar mayoritariamente daño pasivo del DNA, por la reacción de éste con las especies reactivas de oxígeno o indirectamente con los productos de la interacción de éstos y los lípidos o proteínas, que conllevan modificaciones en las bases de nucleótidos. El daño activo es mediado por DNA endonucleasas que inducirán la apoptosis y que fragmentan la doble cadena, gracias a la endonucleasa G (Sun MS y cols., 2018).

El organismo posee mecanismos antioxidantes, desarrollados para la protección frente a los radicales libres. Se trata de moléculas suicidas que neutralizan al radical libre, oxidándose, por lo que deben ser repuestas mediante nutrientes. El organismo utiliza sustancias no enzimáticas endógenas, como la melatonina, y otras que en su mayoría proceden de la alimentación, como la vitamina C, cofactor enzimático imprescindible para la biosíntesis de importantes compuestos bioquímicos (ácido ascórbico), o la vitamina E (atocoferol), presente en multitud de alimentos de origen vegetal como el brócoli. También la provitamina A (Beta caroteno) y proteínas transportadoras de metales de transición. Por otro lado, las enzimas Glutathion peroxidasa protegen a la hemoglobina de los eritrocitos de una rotura oxidativa. La catalasa se encarga de la transformación del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en oxígeno y agua, y la superóxido dimutasa se encarga de catalizar la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno (López Chicharro J. y cols., 2006).

Existe evidencia de que aunque el ejercicio físico moderado resulta protector frente al estrés oxidativo, el ejercicio de alta intensidad lo aumenta, favoreciendo la peroxidación lipídica de las membranas, por el incremento masivo en el consumo de oxígeno (Stadtman ER y cols., 1991).

Radical	Nombre	Moléculas diana
$O_2^{\cdot-}$	Superóxido	Enzimas
$H_2O_2$	Peróxido de hidrógeno	Ácidos grasos insaturados
$OH^{\cdot}$	Hidroxilo	Todas las moléculas
R	R-ilo	Ácidos grasos insaturados
RO	R-oxilo	Ácidos grasos insaturados
ROO	R-dioxilo (peroxilo)	Ácidos grasos insaturados
ROOH	Hidroperóxido	Ácidos grasos insaturados
O	Singlete de oxígeno	Distintas moléculas
NO	Nitroxilo	Distintas moléculas
CCl	Triclorometileno	Oxígeno

Figura 1: Algunos ejemplos de Radicales Libres y moléculas diana sobre las que actúan (de Teresa Galván C. y cols, 2008)

En numerosas enfermedades con alta prevalencia, como la aterosclerosis, obesidad o procesos reumáticos, se ha demostrado la participación del estrés oxidativo, así como en el envejecimiento, por acúmulo de lesiones orgánicas producidas por radicales libres. Sin embargo, también este proceso tiene su impacto positivo a través del sistema inmune, ya que favorece la eliminación de moléculas patógenas (Díaz G., 2012).

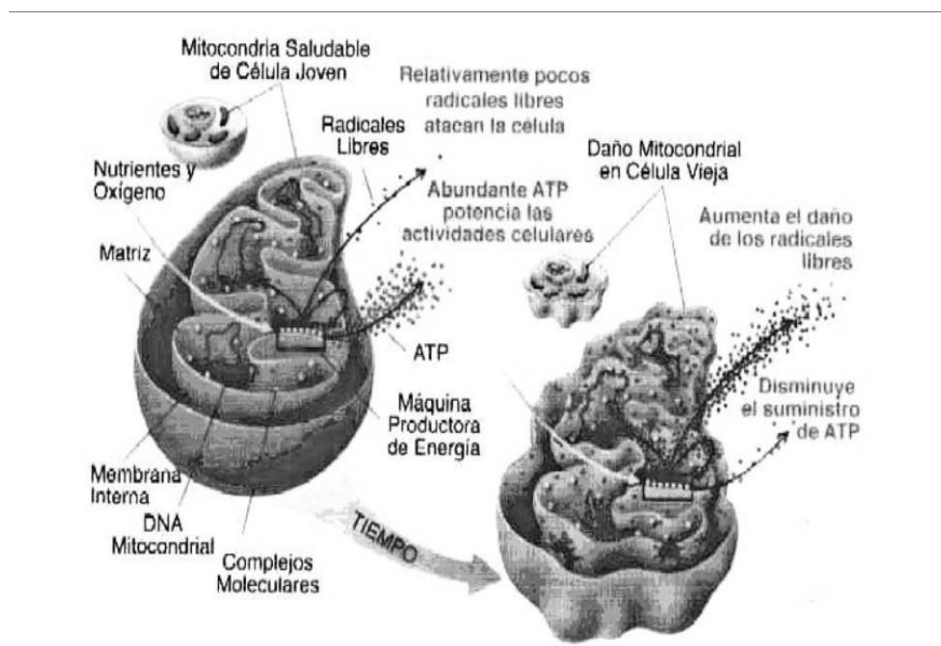


Figura 2: Mitocondria saludable (joven) versus mitocondria desgastada (ancianos) (Díaz G., 2012).

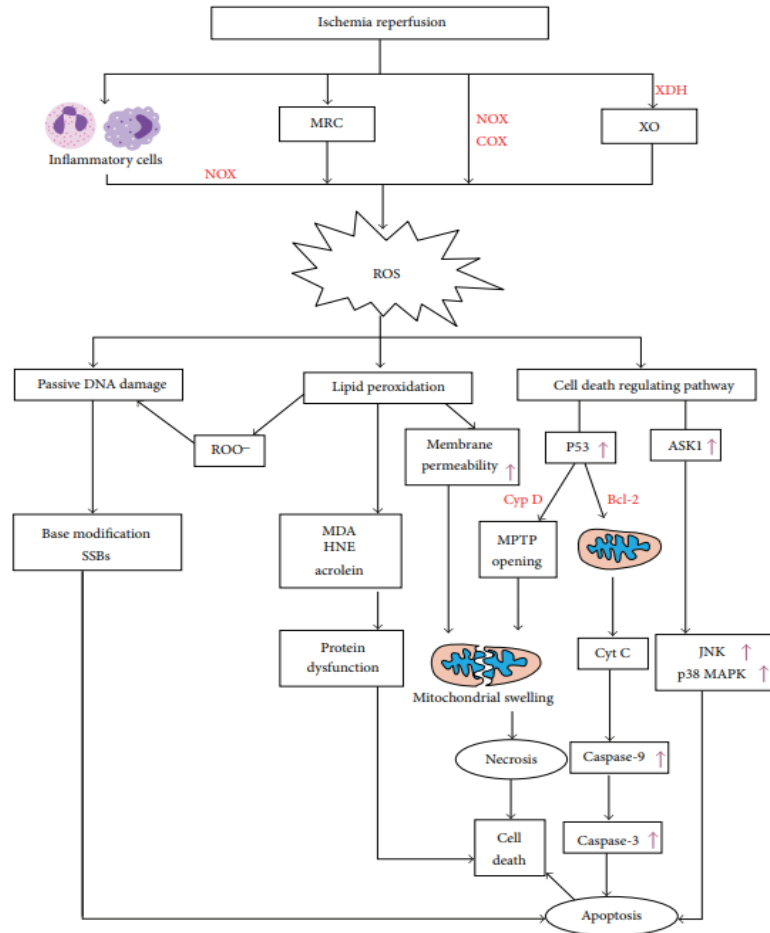


Figura 3: daño por ROS en lesión por isquemia-reperfusión. Las ROS reaccionan con el DNA causando daño pasivo en éste, peroxidación lipídica y participan en la regulación de la muerte celular. (Sun MS y cols., 2018)

La oclusión de una arteria coronaria, condiciona la aparición de una serie de mecanismos como la disminución de la fosfocreatina y la detención del metabolismo aeróbico, teniendo como consecuencia la generación de una serie de sustancias tóxicas para la célula. Sin embargo a veces el daño producido es más por la reperfusión posterior que por la propia isquemia, debido al aumento brusco del oxígeno en el tejido, y del calcio, y la producción de radicales libres (Férez Santander S. y cols., 2004).

El cerebro tan solo representa un 2% del peso corporal. En cambio, consume casi el 20% del oxígeno del cuerpo, lo que lleva a la generación de más radicales libres que otros órganos, además de que contiene una gran cantidad de lípidos y ácidos grasos insaturados, y altas concentraciones de hierro, lo que lo hace aún más vulnerable al daño por radicales libres. El ictus isquémico es una causa común de morbilidad en todo el mundo. La trombolisis con activador del plasminógeno tisular recombinante y la trombectomía constituyen las principales terapias para el ictus isquémico agudo. La liberación excesiva de radicales libres juega un papel fundamental en la lesión consecuencia de la reperfusión. El estrés oxidativo en la isquemia-reperfusión puede favorecer la conversión hemorrágica del ictus isquémico y el edema cerebral tras la terapia de reperfusión (Sun MS y cols., 2018).

Cuando el oxígeno vuelve a fluir por el tejido previamente hipoperfundido, el resultado es una producción excesiva de radicales libres derivados de oxígeno, como el anión superóxido ( $O_2^-$ ); radicales hidroxilos ( $\cdot OH$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Férez Santander S. y cols., 2004). En el caso del trasplante de hígado, este fenómeno se produce en la fase temprana, unas 6 horas tras la reperfusión, para darse después, en la fase tardía, la excesiva producción de factores proinflamatorios (Wanner GA y cols., 1996).

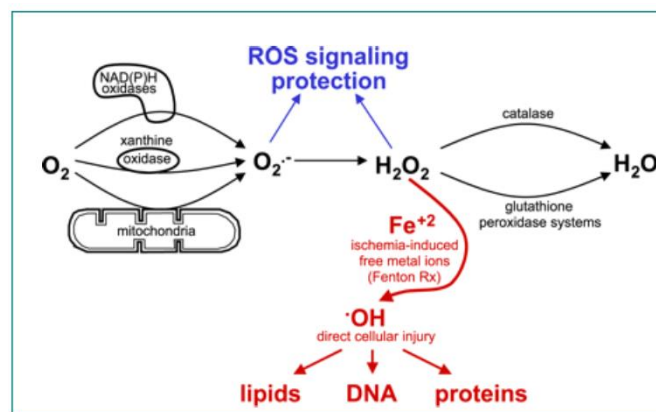


Figura 4: En condiciones normales, en torno al 3% del  $O_2$  se convierte, previo paso por la cadena respiratoria mitocondrial en anión superóxido y peróxido de hidrógeno. En cambio, en situaciones de isquemia-reperfusión, este equilibrio normal va a perderse y se producirán radicales hidroxilo (Becker L., 2004).

Los radicales libres se formarán a partir pues, del oxígeno que se aporta en la reperfusión, (Zweier J. y cols., 2006) . Sin embargo, se ha documentado el daño por especies reactivas de oxígeno también en la fase de isquemia. Podría parecer paradójico que en un periodo en el que el daño celular es consecuencia de la hipoxia, se produzca a su vez daño por sobreproducción de RLO (radicales libres de oxígeno). En cambio, incluso en situaciones de hasta un 90% de disminución del aporte sanguíneo al miocardio, sigue habiendo suficiente  $O_2$  que reciba electrones procedentes de la cadena respiratoria molecular, que en la fase de isquemia pasa a un estado reducido, generándose radical superóxido (Becker L., 2004). Estos RLO producidos en la fase isquemia, podrían suponer moléculas de señalización en el daño oxidativo (Carmody RJ y cols., 2001).

La producción de RL va a verse incrementada a través de varios mecanismos: Por un lado, por los defectos en la transferencia de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial y también, a través de la activación de la xantina/xantina oxidoreductasa; y por último, por la quimiotaxis de los leucocitos polimorfonucleares que se concentrarán en el área tisular de la lesión (Zaouali MA y cols., 2010).

La formación del anión superóxido a partir del oxígeno va a estar catalizada por la enzima NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa), que convierte xantina deshidrogenasa (XDH) en xantina oxidasa (XO), previa disminución de glutatión. Tras el estímulo hipóxico, el ATP es degradado a AMP, adenosina, xantina, urato e hipoxantina. Será esta última, la que gracias a la XO, cuya formación se ha convertido en irreversible tras la acción proteolítica, se oxide a xantina y ácido úrico, generándose peróxido de hidrógeno y anión superóxido. La XO constituye la mayor fuente biológica de producción de superóxido en tejidos post isquémicos (Karg E. y cols., 1997). El agotamiento del ATP llevara además a la necrosis celular, ya que se pierde el gradiente transmembrana  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , y el de calcio del retículo sarcoplásmico (Kim JS y cols., 2003). A partir del peróxido de hidrógeno y del anión superóxido, se formarán radicales hidroxilo. Esta reacción es catalizada por metales de transición como Fe o Cu, que a su vez inducen la apoptosis y aumentan la lesión (Lemasters JJ, 2004). El anión superóxido, es a su vez reducido para originar peróxido de hidrógeno, que será liberado gracias a la mieloperoxidasa de los gránulos citoplásmicos de los neutrófilos, formándose radical hidroxilo o ácido hipocloroso (Eiserich JP y cols., 1998). Éstos contribuirán, en el caso del trasplante hepático, al daño del órgano, ya que entre otros fenómenos, potencian la acción de las proteasas liberadas por los neutrófilos (Lentsch AB y cols., 2000).

Tras la producción de RLO, éstos interaccionan con las membranas endoteliales vasculares del tejido isquémico, aumentándose la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por el aumento de permeabilidad en la membrana, lo cual llevaría a la activación de proteasas y fosfolipasas (fosfolipasa A2). Éstas llevarán a la liberación de sustancias favorecedoras de la quimiotaxis leucocitaria, como metabolitos del ácido araquidónico (leucotrienos, tromboxanos o prostaglandinas) (Hao CM y cols., 2007). Esto no hace otra cosa que aumentar el daño endotelial, a través por un lado de la adherencia de los polimorfonucleares que son atraídos por estas sustancias al sitio de la lesión, y por otro lado por la producción por parte de éstos de más radicales libres, impidiendo que el daño cese (Ferrari RS y cols., 2015). Uno de los principales mecanismos por los cuales los RLO producen daño, será esta capacidad de dañar las membranas celulares a través de la peroxidación lipídica (Férez Santander S. y cols., 2004). El posterior incremento del Calcio intracelular, tendrá como consecuencia, además de la degradación de proteínas por la activación de proteasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , la lisis de los lípidos de la membrana, por activación de lipasas dependientes de calcio (Férez Santander S. y cols., 2004). El radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) extraerá un átomo de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado de los fosfolípidos de la membrana, comenzando una serie de sucesivas oxidaciones a lo largo de la bicapa lipídica (Gutteridge J., 1995). No solo la membrana se puede ver dañada, sino también los orgánulos intracelulares (Ferrari RS y cols., 2015).

Otro daño resultante de la sobreproducción de radicales es la rotura del ADN (Férez Santander S. y cols., 2004). Esto se debe a su capacidad para alterar sistemas enzimáticos, contribuyendo a la necrosis tisular por destrucción del ADN (Legrand M. y cols., 2008). A su vez, se incrementa la producción de RLO por la activación de factores de la transcripción que aumentan la producción de óxido nítrico y citocinas como  $\text{TNF-}\alpha$  (Cunningham P. y cols., 2002).

A nivel cardíaco, el estrés oxidativo también está incrementado en la isquemia-reperfusión, la hipertrofia o el fallo cardíaco, por el desacoplamiento de la cadena mitocondrial por la

inactivación del complejo I. En el miocardio, las principales fuentes de especies reactivas de oxígeno (ERO) incluyen la cadena de transporte de electrones mitocondrial, la xantina oxidoreductasa, las NADPH oxidasas y sintasas de óxido nítrico. El fallo cardiaco producirá aumento en la permeabilidad mitocondrial y disfunción de la membrana, con la generación de señales de apoptosis como citocromo C procedente del espacio intermembrana. La xantina oxidoreductasa (XOR) se encuentra sobre activada en estas situaciones. Uno de los dos tipos de XOR que existen, la xantina oxidasa, constituye una importante fuente de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ . La NADPH oxidasas, inicialmente descritas en neutrófilos pero también presentes en células endoteliales y del músculo liso, catalizan el descenso de oxígeno molecular, llevando a la generación de ERO. El óxido nítrico es un gas que difunde fácilmente a través de las membranas celulares, con una importancia clave en la patología cardiaca, cuya síntesis es catalizada por las sintasas de óxido nítrico a partir de L-arginina. En ausencia de sustratos, éstas pueden también producir  $O_2^-$  (Moris D. y cols., 2017). En las terapias de reperfusión de enfermedades tan prevalentes como el síndrome coronario agudo se ha hecho patente la presencia de radicales libres (Férez Santander S. y cols., 2004). La alta incidencia de estas patologías en la población general, así como de enfermedades cerebrovasculares como el infarto cerebral, en la que una vez más están presentes las especies reactivas de oxígeno, ha impulsado la investigación de moléculas antioxidantes que disminuyan el daño producido por estas terapias y por los radicales libres secundarios a éstas (Muñoz P. y cols., 2017)

Esta serie de procesos van a tener por tanto una especial implicación en el trasplante de órganos ya que la activación por parte de los RLO (especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno) del sistema inmune tanto del donante como del receptor, llevan al daño del aloinjerto (Land WG, 2005).

## 6.- LESIÓN POR ISQUEMIA-REPERFUSION

### 6.1 Fisiopatología de la lesión por isquemia/reperfusión

El daño por isquemia-reperfusión es un factor determinante en la morbimortalidad de muchos procesos quirúrgicos. La privación del flujo sanguíneo de un órgano puede conllevar a la necrosis y posterior disfunción de este. En cambio, el restablecimiento del flujo, puede llevar a un daño incluso mayor que el producido por la isquemia. La recuperación del aporte de oxígeno es necesaria para el restablecimiento de la correcta producción de energía y de funciones perdidas a causa de la isquemia, aunque también constituye el desencadenante en la producción de radicales libres que paradójicamente dañaran el tejido. Se entiende que, en caso de isquemia mesentérica, sería beneficioso el aporte de un agente terapéutico que evitase este daño por reperfusión, como paso previo al restablecimiento del flujo sanguíneo (Özkan N. y cols., 2018). Cada órgano reacciona y se ve afectado en mayor o menor medida por la falta de aporte de oxígeno, y, como se expondrá más adelante, la reperfusión aunque es necesaria, produce una serie de lesiones tanto en el órgano diana como a nivel sistémico (Becker L., 2004).



Durante la isquemia se suceden en los órganos una serie de mecanismos biológicos, como la activación de enzimas citotóxicas que conllevan una disminución de la fosforilación oxidativa, lo que disminuirá el ATP, por lo que el transporte de iones a nivel de las membranas celulares será deficitario, acumulándose el sodio y el agua dentro de estas y produciéndose edema celular, con la consiguiente muerte celular (Mura M. y cols., 2007). El edema es consecuencia en parte de la disfunción de la bomba ATPasa, ralentizada por la isquemia acontecida, ya que se pierde el potencial de membrana y excitabilidad celular y el desequilibrio  $\text{Na}^+/\text{K}$  lleva a la entrada de  $\text{Na}^+$  al citoplasma, con el consiguiente edema. Éste puede verse incluso incrementado en casos de trasplante de órganos, en los que la solución de la máquina de perfusión con la que se lava el medio extracelular no es hiperosmolar, dándose una hipotonicidad del espacio extracelular que agravaría el edema (Mangino MJ y cols., 2008).

Estos procesos iniciados en la isquemia, favorecerán el daño celular gracias al citado aumento de permeabilidad celular y el aumento de la liberación de radicales libres. La hipoperfusión endotelial lleva a un desequilibrio entre la producción de sustancias vasoconstrictoras como la endotelina 1,2 y 3, que se verá aumentada, y vasodilatadoras, como el óxido nítrico, cuya producción estará disminuida. Este último, junto con factores quimiotácticos y citocinas, favorecen el reclutamiento de polimorfonucleares en el sitio de reperfusión y la adherencia al endotelio dañado (de la Asuncion JG y cols., 1996).

Por otro lado, el cambio en el fenotipo de la microcirculación, llevara a un aumento en la impedancia de los vasos y la disfunción de la microcirculación, tanto a nivel cardiovascular como en el hígado o el riñón (Dhar DK y cols., 1998). La microcirculación va a determinar de forma notable la perfusión tisular. Muchos son los estudios centrados en la terapia y prevención del daño directo que estos eventos causan en las células, y no tantos se han centrado en estrategias que preserven la microcirculación y disminuyan el daño post reperfusión (Zhou H. y cols., 2018).

Asimismo, en el tejido reperfundido se produce la migración de los neutrófilos, contribuyendo a la lesión de la microvasculatura, con un aumento de la permeabilidad a las proteínas plasmáticas. La presencia de los neutrófilos, se ha demostrado por un aumento de la actividad de la mieloperoxidasa en este tejido respecto al isquémico. El uso de anticuerpos monoclonales contra la membrana de los leucocitos ha demostrado una disminución en la lesión microvascular producida, ya que disminuye la adhesión del neutrófilo al endotelio (Baran KW y cols., 2001). El hecho de que una arteria esté abierta no implica necesariamente una correcta irrigación del miocardio, debido a la vasoconstricción presente y al aumento de la resistencia ofrecida por la circulación coronaria, secundaria al citado aumento de sustancias vasoconstrictoras o la disminución de vasodilatadoras como el NO. Este fenómeno paradójico se denomina "fenómeno de no reflujo", explicado a su vez por otros fenómenos como la compresión extravascular de las arterias consecuencia del edema intracelular e intersticial, así como por trombos que puedan ocluir los capilares (Férez Santander S. y cols., 2004). Este cambio en el fenotipo de la microcirculación, llevara a un aumento en la impedancia de los vasos y la disfunción de la microcirculación, que no solo se da a nivel cardiovascular sino también a otro niveles, como en el hígado o el riñón (Dhar DK y cols., 1998).

Las plaquetas desempeñan una función crucial en la fisiopatología del daño por isquemia perfusión, ya que son una de las principales responsables de la homeostasis vascular en

circunstancias fisiológicas, contribuyendo en cambio a una excesiva agregación en casos de disfunción plaquetaria, como es el caso de los fenómenos aterotrombóticos. La isquemia conlleva un aumento de la adhesión leucocitaria y de las plaquetas con los leucocitos, y una disminución de la vasodilatación dependiente del endotelio, afectando todo ello al flujo sanguíneo. El uso de fármacos antiagregantes e inactivadores de las plaquetas como aspirina o clopidogrel, contribuye a la disminución del daño por isquemia reperfundida del que son partícipes las plaquetas, que además, debido a su atracción por parte del colágeno subendotelial (Zhou H. y cols., 2018), y por su activación por parte de los radicales libres, contribuirán a la formación de trombos que producirán la reoclusión arterial (Férez Santander S. y cols., 2004).

Este fenómeno de isquemia reperfundida es observable tanto en procesos fisiológicos como el envejecimiento y el ejercicio intenso, como en procesos patológicos como la enfermedad cerebrovascular, la cardiopatía isquémica, o el trasplante de órganos (de la Asuncion JG y cols., 1996).

## **6.2 Repercusión de la lesión por isquemia-reperfusión en diferentes órganos**

### **Lesión por isquemia-reperfusión a nivel cardiovascular**

El síndrome coronario agudo, consecuencia de la oclusión de arterias coronarias es la causa principal de morbimortalidad en los países desarrollados (Zhou H. y cols., 2018). El daño miocárdico por reperfundida corresponde a las consecuencias del restablecimiento del flujo sanguíneo en células previamente isquémicas. En el caso del sistema cardiovascular, la oclusión de una arteria coronaria resultante de procesos de aterotrombosis, activarán el metabolismo aeróbico, iniciándose el metabolismo anaeróbico con la consiguiente generación de sustancias tóxicas como lactato y la producción de daño miocárdico tanto funcional como estructural. En cuanto al fenómeno de reperfundida, el incremento brusco de oxígeno y calcio, podrá producir un daño todavía mayor en el miocardio. Analizadas con el microscopio electrónico, se observan células dañadas de forma irreversible, que antes de la reperfundida habían sufrido un daño reversible (Férez Santander S. y cols, 2004). La zona infartada está formada por dos zonas, la zona interna con células muertas necróticas, y la zona que la rodea, la penumbra, formada por células que potencialmente pueden ser salvadas de la muerte, y en la que se encuentran células apoptóticas. El objetivo de las estrategias de reperfundida es tanto disminuir el número de células muertas de la zona necrosada como salvar el máximo número de células en apoptosis de la zona de penumbra (Zhou H. y cols., 2018). Se han observado incluso, fenómenos hemorrágicos aparentemente secundarios al daño irreversible producido por reperfundida, limitado a ese territorio, incluso en casos en los que no se usó terapia trombolítica (Férez Santander S., 2004).

Se habla del concepto de miocardio aturdido, como resultado de una disfunción miocárdica tras un periodo de isquemia transitoria, que tiene como resultado una disfunción ventricular postisquémica. A su vez, este aturdimiento puede ser agudo o crónico. El agudo, parece ser consecuencia de la entrada masiva de calcio con elevación de las enzimas cardíacas, y la liberación excesiva de radicales libres, por lo que se vería beneficiado por fármacos antagonistas del calcio o por agentes barredores de radicales libres. La isquemia habrá producido una

disminución del ATP celular por el acúmulo de calcio en las mitocondrias, y cuando se lleve a cabo la reperfusión, la incapacidad para regular la homeostasis del calcio provocará un desacoplamiento excitación-contracción, que tendrá como consecuencia esta disfunción ventricular postisquémica, y la afectación de la microcirculación (Férez Santander S. y cols., 2004). La disminución de la actividad de la C-ATPasa inhibirá al complejo NADH (nicotinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa y afectará a los complejos citocromo bc1 y citocromo C oxidasa, contribuyendo al incremento de concentración de calcio en el interior de la mitocondria, que produce la apertura del poro mPT (poro de transición mitocondrial), el cual fisiológicamente permanecía cerrado. Esta hipercalcemia mitocondrial llevara a la muerte celular al producir la pérdida del potencial de membrana de la membrana interna mitocondrial, y la irreversible apertura del poro mPT, que dejara pasar moléculas de mayor peso molecular hacia la matriz mitocondrial (Cohen M. y cols., 2008). La salida del contenido intracelular por esta disrupción en la membrana se ve reflejada en el aumento plasmático de las troponinas, sensible marcador del daño cardiaco y de la muerte de los cardiomiocitos, que aparece en un 60-80% de los eventos de fallo cardiaco (Zhou H. y cols., 2018).

El aturdimiento crónico del miocardio estará determinado además de por los factores determinantes del agudo, por factores estructurales como la alteración en la síntesis de proteínas, consecuencia de la remodelación estructural del ventrículo, resultante de la alteración en la expresión de los genes tras la isquemia aguda. Se habla también de que una sucesión de eventos agudos puede tener como resultado este aturdimiento crónico del miocardio. El fenómeno de aturdimiento se pone de manifiesto en diferentes patologías como el IAM y la angina inestable, o en cirugía cardiaca tras el uso de una bomba de circulación extracorpórea, aunque también, en menor medida, en la ACTP, ya que la falta de perfusión miocárdica se da durante un breve espacio de tiempo. En el IAM (infarto agudo de miocardio) y la angina inestable la función ventricular se recupera en torno a una semana después de la reperfusión, dependiendo en parte de la magnitud de la estenosis (Férez Santander S. y cols., 2004).

Distintos modelos experimentales demostraron la aparición de arritmias ventriculares de reperfusión (Férez Santander S. y cols., 2004). Goldberg S. y cols., 1993, observaron que tras la reperfusión con estreptocinasa intracoronaria, 10 de 12 pacientes desarrollaron un ritmo ventricular acelerado (Goldberg S. y cols., 1983). Algunos estudios han demostrado que estos ritmos idioventriculares acelerados y arritmias malignas, aparecen con frecuencia en el periodo de reperfusión en vez de en el de isquemia (Esente P. y cols., 1983). Su baja frecuencia hace que se trate en cambio de un parámetro específico, pero poco sensible. La afectación de la arteria del nodo sinusal en la reperfusión de los infartos inferiores llevará a la aparición de bradicardia sinusal e hipotensión arterial sistémica mediante el reflejo de Bezold-Jarisch (Esente P. y cols., 1983). Otros estudios llevados a cabo por Cowan C. y cols., 1987, objetivan la aparición de fibrilación ventricular espontánea, no relacionada con reperfusión farmacológica, podrían hacer dudar entre la relación de la reperfusión y las arritmias. En cambio en este mismo estudio se observó que en 3 de los 27 pacientes que sí fueron sometidos a trombólisis, sí que aparecieron taquicardias ventriculares, inmediatamente después de la trombolisis, y además en los 3 pacientes la arteria se encontraba permeable, lo que evidencia la relación de estas TV con la reperfusión (Cowan C. y cols., 1987). Se ha evidenciado también que a mayor rapidez de apertura de la arteria en la angioplastia primaria, mayor es incidencia de aparición de arritmias

ventriculares (Opie LH, 1997). Hagar y cols., 1991, sugirieron que los diferentes resultados obtenidos en corazones humanos y en corazones animales, tendrían que ver con la falta de preconditionamiento en éstos últimos. El concepto de preconditionamiento hace referencia a que episodios repetitivos de isquemia sufridos por el miocardio, previos a un IAM, se han relacionado con infartos de menor tamaño, por lo que el preconditionamiento tendría más beneficio frente al daño por perfusión que frente al daño isquémico (Hagar JM y cols., 1991). Esto explicaría también, casos de aparición de arritmias malignas en angina de Prinzmetal tras ceder el vasoespasmo coronario (Opie LH, 1997).

### **Lesión por isquemia reperfusion en el trasplante de órganos**

La lesión por isquemia reperfusion es uno de los principales objetos de investigación de la biomedicina debido a su importancia en la viabilidad de los órganos trasplantados

En el hígado, la lesión producida por el fenómeno bifásico que se da en la isquemia reperfusion, en el que la ausencia de estímulos biomecánicos lesiona el parénquima, conlleva la participación de neutrófilos, plaquetas, macrófagos, además de las propias células del parénquima (hepatocitos, células endoteliales del sinusoides hepático, células de Kupffer y células estrelladas hepáticas), produciendo cambios en el fenotipo hepático. En concreto, son los hepatocitos los que de manera particular se ven afectados por la I/R, por el cambio producido en su cadena respiratoria mitocondrial en situación de hipoxia (Jaeschke H. y cols., 2003). Pueden distinguirse dos tipos principales de lesión por isquemia/reperfusion. En primer lugar, la producida en la fase caliente, durante la resección hepática, hasta que el órgano es perfundido con la solución hipotérmica de preservación, y que puede llevar a disfunción del órgano e incluso a shock multiorgánico. Por su parte, la lesión por isquemia fría se da durante la preservación ex vivo del hígado a trasplantar, tras las fases de isquemia caliente durante la extracción del órgano y la revascularización del aloinjerto. A pesar de que en un principio las células diana de ambos tipos de isquemia pudieran ser diferentes, hay procesos comunes tanto en una como en otra fase, como la generación de especies tóxicas reactivas de oxígeno, la activación de las células de Kupffer y neutrófilos, o el incremento de la expresión de moléculas de adhesión. De nuevo a este nivel se produce disfunción de los sistemas dependientes de ATP, por la pérdida del gradiente transmembrana y las alteraciones electrolíticas ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) así como la acumulación intracelular de calcio, provocando la conversión de xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa. Solo unos segundos tras el cese del flujo sanguíneo, todo el oxígeno habrá sido consumido, parándose la cadena respiratoria mitocondrial (Tani M. y cols., 1989).

La lesión por isquemia va a afectar en especial a las células endoteliales del sinusoides hepático, encargadas del control de la homeostasis, la inflamación, el tono vascular y el aclaramiento de tóxicos. Se han descrito cambios estructurales tanto en estas células como en las células de Kupffer, observándose edema y discontinuidad de la membrana plasmática, vacuolización de la membrana nuclear y forma celular ovalada (Caldwell-Kenkel JC, y cols. 1988). El restablecimiento de la perfusión en el hígado isquémico, implica la sucesión de fenómenos que podrían dividirse en dos fases. Por un lado la fase aguda, en las seis primeras horas, en la cual las especies reactivas de oxígeno así como los mediadores de la inflamación son liberados,

y una fase tardía, de 6 a 48h tras la reperfusión, en la cual el daño hepático aumenta por la respuesta inflamatoria por parte de los neutrófilos y macrófagos (Wanner GA y cols., 1996).

Respecto a la reperfusión, en un primer momento se producirá la activación de las células de Kupffer (CK) gracias a la liberación de autoantígenos por parte de las células hepáticas (Farmer DG y cols., 2000). Son varias las teorías acerca de qué es exactamente lo que ocurre a nivel hepático en la reperfusión, y sobre cómo se produce el daño por ésta. Por un lado se habla de que las moléculas de adhesión intracelular, CAMs, miembros de la familia de las inmunoglobulinas-like, interaccionan con las integrinas de la superficie de los neutrófilos, en respuesta a las especies tóxicas reactivas de oxígeno y al factor de secreción de plaquetas. Esto llevaría a la migración del neutrófilo a la superficie de la célula endotelial y a la extravasación por la decreciente expresión de las cadherinas y de otros componentes de las uniones intercelulares (Jaeschke H., 1996). Tanto las especies tóxicas reactivas de oxígeno (ROS) como las citoquinas inflamatorias contribuyen al daño del parénquima. La interleucina 1 (IL-1) aumentara la liberación de ROS, que a su vez potenciara la liberación de TNF- $\alpha$  por las CK. El TNF contribuye a la unión de neutrófilos en la cara luminal de las células de los sinusoides hepáticos, ya que regula la expresión de moléculas de adhesión como P-selectina, ICAM-1 o  $\beta$ -1-integrinas. Estas moléculas proinflamatorias y la reclusión de linfocitos CD4+ que producen, llevarán a una mayor incorporación de neutrófilos y adherencia a los sinusoides hepáticos. El desequilibrio entre las sustancias vasodilatadoras como el NO, y vasoconstrictoras como la endotelina y el tromboxano A<sub>2</sub>, también es observable a nivel hepático. El edema de las CK y de las células de los sinusoides hepáticos, y la lesión que se produce en la microcirculación, van a determinar el grado de lesión resultante, debido a su influencia en la producción de neutrófilos, la agregación plaquetaria y la contracción de las células estrelladas hepáticas. En la fase subaguda, a partir de 6h tras la reperfusión y prolongable hasta varios días después, se produce la infiltración masiva de los neutrófilos desde el endotelio al parénquima, y la liberación de radicales libres de oxígeno y de especies citotóxicas como proteasas liberadas por los neutrófilos (catepsina o elastasa) que provocarán la necrosis de los hepatocitos (Farmer DG y cols., 2000).

Se propone también una teoría al margen de moléculas de adhesión celular como ICAM-1. Basándose en factores mecánicos como la vasoconstricción o la inflamación vascular, se cree que estos se ven implicados en la atracción de los leucocitos hacia los sinusoides hepáticos, ya que tendrían acceso directo a los hepatocitos debido a la eliminación de la barrera de las células endoteliales de los sinusoides hepáticos por el extenso daño vascular producido durante la reperfusión. Además la liberación del contenido de los gránulos de los neutrófilos, como ácido hipocloroso o enzimas de degradación como proteasas colagenasas, lipooxigenasas y mieloperoxidasas contribuiría a aumentar el daño (Jaeschke H. y cols., 1997).

Al igual que a nivel cardiaco, surge a nivel hepático la discusión de si la lesión resultante de la isquemia/reperfusión es tejido apoptótico o necrótico. La mayoría de los grupos apuntan a la necrosis experimentada por los hepatocitos y células endoteliales del sinusoides. Sin embargo, a pesar de que apoptosis y necrosis suelen ser entendidos como procesos diferentes, quizá en este caso haya que usar el termino necrapoptosis, entendido como un proceso que comienza con una señal común de muerte celular y que acabara con la lisis celular (necrosis) o con la resorción programada de la célula (apoptosis), según el nivel de ATP celular (Jaeschke H. y cols., 2003).

Por otro lado, los hígados con esteatosis han demostrado presentar lesiones más amplias por isquemia/reperfusión. Se habla de la ya de base dañada microcirculación sinusoidal, que les haría susceptibles a un mayor daño. El flujo sanguíneo estaría ya disminuido a causa del aumento de resistencia vascular intrahepática por la compresión y distorsión de los sinusoides por el acúmulo de grasa en el citoplasma de los hepatocitos. La oxidación de la grasa extramitocondrial incrementaría además la producción de las especies tóxicas reactivas de oxígeno, lo que llevaría a la síntesis de la proteína UCP-2 y a una todavía mayor reducción de la producción de ATP y disfunción de los reguladores apoptóticos. Además, los hígados con esteatosis causada por el alcohol, tendrían ya de base una producción inducida de superóxido dismutasa, por lo que la presencia de neutrófilos les haría todavía más vulnerables que el resto a una lesión por isquemia/reperfusión. Esta diferencia en la fisiopatología de la lesión por isquemia/reperfusión, nos lleva a pensar que los potenciales tratamientos que pudieran aplicarse para evitarla, no serían igual de eficaces para ambos tipos de hígado. Así pues, tratamientos que redujeran la expresión de UCP-2 serían beneficiosos para hígados esteatósicos; estos también requieren una menor dosis de activadores de HO-1, ya que la cantidad basal de esta sustancia en estos hígados es mayor (Selzner M. y cols., 2000).

En el caso del riñón, se dan características comunes en su fisiopatología, aunque también se observan cambios propios de este órgano. Al igual que en los órganos anteriormente expuestos, distinguiremos los daños por isquemia, al cesar el aporte sanguíneo, paso previo a su implante en el receptor, y los paradójicos daños ocurridos en la reperfusión, cuando el órgano recupera el flujo sanguíneo, eleva su temperatura y se activa el metabolismo celular y la respuesta inflamatoria (Leong CL y cols., 2007). Ambas lesiones pueden tener como desencadenantes procesos patológicos como la sepsis, hemorragia, tratamientos farmacológicos o intervenciones clínicas. Cabe mencionar la particular vulnerabilidad de las células epiteliales del túbulo proximal renal a esta falta de oxígeno y nutrientes, debido a sus características especiales, que se expondrán más adelante (Gunaratnam L. y cols., 2009). El daño en el tejido renal, será principalmente tubular, pudiendo llevar a insuficiencia renal aguda y rechazo agudo del injerto.

La magnitud de la lesión en el parénquima tendrá que ver con la intensidad de la isquemia, su duración, y con las necesidades metabólicas de las células sometidas a ella. La rápida desaparición de las microvellosidades apicales puede observarse desde los pocos minutos tras el comienzo de la isquemia, ya que las alteraciones ultraestructurales se detectan en estadios muy precoces. La necrosis tubular aguda producida por la disminución de la tasa de filtración glomerular, conducirá a cambios glomerulares con la consiguiente respuesta hemodinámica: contracción mesangial, congestión medular y vasoconstricción renal, provocando una disminución tanto del O<sub>2</sub> en la médula renal como del flujo plasmático y la presión de ultrafiltrado. El daño endotelial provocará la activación de vasoconstrictores y disfunción en la vasodilatación, así como incremento de la adhesión leucocitaria, llevando a obstrucción capilar e isquemia. Todo ello provoca daño tubular, con alteración del citoesqueleto de actina de las células del túbulo, y pérdida de la polaridad y las uniones celulares y de éstas con la matriz extracelular y las membranas basales, con la consiguiente necrosis y apoptosis, llevando al acúmulo de restos celulares y a la obstrucción tubular por la formación de cilindros intratubulares, y filtración de éstos al espacio intersticial (Devarajan P., 2006).

El citoesqueleto es una estructura crucial para el mantenimiento de funciones celulares como la citocinesis, el mantenimiento de la forma celular, la motilidad, la mitosis, la endocitosis y la secreción. (Apodaca G., 2001) La isquemia resultará en una rápida pérdida de la organización del citoesqueleto y de la polaridad celular. La actina apical migrará a la membrana plasmática lateral y se producirá la desorganización del borde en cepillo (Hamm-Alvarez SF y cols., 1998). La lesión del citoesqueleto determina la necrosis tubular aguda por esta obstrucción a nivel tubular y disminución del filtrado glomerular. Las células tubulares isquémicas provocan la liberación de citocinas proinflamatorias y quimiocinas, que, junto con la expresión de moléculas de adhesión (CAMs), inician la invasión leucocitaria que obstruirá la microcirculación y liberará sustancias citotóxicas como radicales libres de oxígeno y enzimas proteolíticas. Las células de la médula externa, pobremente oxigenada, se ven especialmente afectadas por el daño oxidativo resultante de la disminución del ATP y la sucesiva activación de proteasas y fosfatasa, produciéndose un daño similar al sufrido por las células endoteliales de los capilares peritubulares (Devarajan P., 2006).

La lesión por isquemia reperfusión producida a nivel pulmonar se pone de manifiesto en procesos como el embolismo pulmonar, traumatismos, aterosclerosis o intervenciones quirúrgicas, de las cuales la más estudiada ha sido el trasplante pulmonar, debido al condicionamiento que supone la isquemia reperfusión en cuanto a la viabilidad del injerto, así como la morbimortalidad en el postoperatorio inmediato. Si bien puede darse este fenómeno en diferentes órganos ya descritos como el intestino o el corazón, y otros como el sistema nervioso central, el hígado o el riñón, en el parénquima pulmonar ocurre de una forma diferente, ya que es posible observar una isquemia de éste sin que exista hipoxia tisular. Esto se explica debido al oxígeno alveolar, que mantiene el metabolismo aeróbico. Esto no quiere decir que la hipoxia e hipoperfusión sean inocuos para el pulmón, y de hecho se han descrito cambios inducidos por esta situación de privación de oxígeno. Los mediadores liberados durante la reperfusión como el TNF-  $\alpha$ , o los metabolitos del NO, pasan a la circulación, y provocan daño en otros órganos debido a la activación de células endoteliales, y las plaquetas, induciendo su adhesión y la liberación de sustancias vasoactivas. También a este nivel se ve afectada la microcirculación, cuya permeabilidad se ve aumentada, ocasionando edema pulmonar. La muerte celular, y no necesariamente una infección, parece ser estímulo suficiente para la migración de las células inflamatorias al órgano isquémico y para el desencadenado de la respuesta autoinmune, que activará los receptores TRL (receptor toll-like) a través de la vía de la proteína-quinasa (MAPK) o la del interferón tipo I (Chen G. y cols., 2011).

Por otro lado, a pesar de los avances en la optimización y previsión de complicaciones en el peri y postoperatorio de la cirugía intestinal, las fugas anastomóticas continúan siendo una de las principales causas de morbimortalidad en lo que a estos procedimientos respecta, siendo la falta de aporte de oxígeno uno de los factores determinantes.

Al igual que ocurría a nivel cardiaco, la excesiva reperfusión a nivel intestinal puede llegar a causar más daño incluso que la propia isquemia, debido a la exagerada respuesta sistémica, mediada por mediadores inflamatorios como citocinas, y la expresión de moléculas de adhesión

durante la reperfusión. En un gran número de operaciones, como en la reparación de un aneurisma aórtico, es necesaria una anastomosis gastrointestinal, cuya cicatrización y cura se ve perjudicada por el daño producido por la isquemia reperfusión. Tanto los efectos vasoconstrictores como la falta de oxígeno y esta excesiva respuesta sistémica tras la reperfusión, van a influir negativamente en la duración anastomótica, favoreciendo la isquemia local, así como un retraso en la curación. La síntesis de colágeno por parte de los fibroblastos, macrófagos, lisina y la hidroxilación de la prolina requieren una adecuada perfusión tisular, siendo la isquemia intestinal una complicación potencialmente mortal (60-80%), además de una urgencia que requiere tratamiento inmediato (Özkan N. y cols., 2018).

## **7.- APLICACIONES CLÍNICAS DE LA MELATONINA**

### **7.1 Aplicaciones clínicas de la melatonina en el sistema cardiovascular**

El tratamiento y paliación de las lesiones por isquemia reperfusión y de la insatisfactoria recuperación del miocardio tras sufrir un síndrome coronario agudo, es objeto de continuas investigaciones. La investigación de sustancias adecuadas para ello está cobrando protagonismo, como es el caso de la melatonina, que se ha mostrado eficaz en la mejora de parámetros hemodinámicos y reducción de arritmias de reperfusión (Yang Y. y cols., 2014). El daño por isquemia reperfusión producido en patologías tan prevalentes como el síndrome coronario agudo, se produce en procesos terapéuticos como la angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP).

Se ha estudiado por ello la posibilidad del uso de la melatonina intravenosa como tratamiento complementario en casos de IAMCEST (infarto agudo de miocardio con elevación del ST), siendo ésta administrada justo antes de la intervención coronaria percutánea primaria. También se ha estudiado su inyección intracoronaria, tratando de limitar la lesión relacionada con la isquemia reperfusión (Dominguez-Rodriguez A. y cols., 2012). No son muchos los estudios publicados en corazones humanos acerca del efecto cardioprotector de la melatonina. En el estudio realizado por Domínguez-Rodríguez y cols., 2012, se estudió la eficacia y seguridad de la aplicación de melatonina en pacientes sometidos a intervención coronaria percutánea primaria. Sorprendentemente la melatonina no resultó ser muy efectiva en la reducción del área infartada, objetivándose incluso una menor recuperación de la fracción de eyección en aquellos pacientes tratados con melatonina, frente a aquellos en los que se usó placebo. El autor sugirió también que el tiempo de isquemia acontecido fue tan prolongado, que pudo enmascarar las acciones de la melatonina. De hecho sí se objetivó reducción del área infartada en el grupo de pacientes con menor tiempo de isquemia (Dominguez-Rodriguez A. y cols., 2017b). Este estudio también pone de manifiesto la rapidez de la melatonina para difundir por los tejidos, cruzando barreras celulares, obteniéndose resultados diferentes según la vía por la que se administra (oral, intravenoso o intracoronario), no conociéndose todavía cuál de las vías sería más efectiva.



Por otro lado, en el experimento llevado a cabo por Natalie y cols., los investigadores aplicaron la melatonina en la arteria coronaria en el momento de la reperfusión. Considerando que la mayoría del daño cardiaco se inicia en la fase de isquemia, cabe pensar que resultados más fidedignos, así como beneficiosos resultarían de aplicarla previa a la fase de isquemia. Además, en pacientes con infarto agudo de miocardio y posterior angioplastia primaria, se observaron niveles de albúmina (marcador de isquemia) correlacionados negativamente con la melatonina, es decir, que en pacientes con niveles bajos de melatonina, los niveles de albúmina se vieron incrementados (Domínguez-Rodríguez A. y cols., 2009).

La melatonina, debido tanto a sus propiedades antiinflamatorias como antioxidantes, ha sido estudiada en modelos experimentales de isquemia reperfusión. En ratas pinealectomizadas, es decir, con concentraciones bajas de melatonina endógena, presentaban áreas más extensas de necrosis de la zona infartada. Además, la administración de ésta se demostró eficaz en la reducción de las arritmias de reperfusión y el restablecimiento de la función ventricular (Sahna E. y cols., 2002). Además de que tanto la melatonina como sus metabolitos gozan de capacidad antioxidante, induce la acción de enzimas antioxidantes como la superóxido dimutasa y la glutatión peroxidasa, y estimula al glutatión. No solo se produce en la glándula pineal si no también en los megacariocitos y plaquetas. Se ha demostrado que su concentración intraplaquetaria es mayor en pacientes que fueron sometidos a terapias de reperfusión del miocardio que en otros que no lo fueron (Dominguez-Rodriguez A. y cols., 2012).

La inactivación de las plaquetas mediada por la melatonina se explica por su contribución a la generación de ROS y  $Ca^{2+}$  plaquetaria, induciendo la despolarización de la membrana mitocondrial y la activación de las caspasas, lo que lleva a la disfunción plaquetaria. El ácido acetil salicílico, antiagregante de primera línea, inactiva la ciclo-oxigenasa 1, expresada de forma constitutiva en las plaquetas y que promueve la formación de tromboxano, agente que favorece la agregación, y que es inhibido a su vez por la melatonina. También aumenta la eliminación de moléculas de adhesión intercelular a través de la potenciación de la señalización del NO que las degrada, disminuyéndose otra vez la agregación de las plaquetas. Todo esto demuestra el poder antitrombótico de la melatonina. Así pues, la misma melatonina de las plaquetas contribuye a evitar su excesiva agregación.

El papel antioxidante de la melatonina le confiere la capacidad de disminuir el papel de los radicales en el proceso de isquemia, así como en las arritmias derivadas de la reperfusión. Se encarga de activar el receptor Tom70, receptor de translocasas, que disminuye el estrés oxidativo mitocondrial, paliando la actividad de este orgánulo cuya acción resulta en la sobreproducción de ROS por las alteraciones de la cadenas respiratoria mitocondrial. Los complejos I y III, fuentes de generación de ROS, se ven también regulados por la melatonina por su acción recolectora de radicales libres, e indirectamente por la potenciación de enzimas antioxidantes como SOD y GPX.

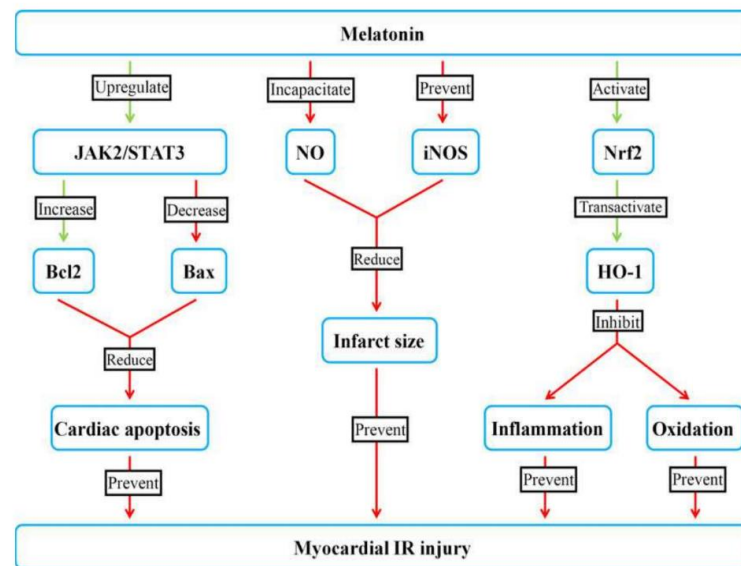
A pesar de la evidente repercusión de la melatonina en la modulación de la repuesta inflamatoria derivada de la isquemia-reperfusión, la evidencia de que ésta proporcionaría un papel protector en el corazón infartado es todavía escasa, ya que no se han realizado suficientes experimentos (Zhou H. y cols., 2018). Se observó por ejemplo, que la melatonina tenía tan sólo un pequeño impacto en la liberación de marcadores proinflamatorios en un experimento realizado por Natalie y cols., (Eggert S. y cols., 2014) en modelos de cerdo con infarto agudo de

miocardio, resultando niveles similares de troponina de alta sensibilidad, malondialdehído o IL-1B, IL-6 e IL-10 entre los tratados con melatonina y los tratados con placebo, tras 45 minutos de isquemia y 4 horas de reperfusión. Sin embargo, esto podría deberse a que el tiempo de isquemia de solo 45 minutos se muestra demasiado corto, en comparación con experimentos con ratones en los que sí se objetiva el papel beneficioso de la melatonina, en los cuales el tiempo de isquemia es de 2 horas, y el de reperfusión de 4 a 24 horas. De hecho, la mayoría de los pacientes que sufren un síndrome coronario agudo presentan un tiempo de isquemia de 3 a 12 horas (Zhou H. y cols., 2018).

En estudios llevados a cabo por Yang y cols., se pone de manifiesto la estimulación por parte de la melatonina de la vía de JAK/STAT (Janus-cinasas-transductores de la señal y activadores de la transcripción), objetivo de señalización de un gran número de citoquinas inflamatorias como la IL-6. Este complejo está involucrado en el crecimiento y el desarrollo, además de en la transducción y transcripción de genes. JAK/STAT se presenta hiperactivado en modelos de isquemia reperfusión, y contribuye a transmitir señales de activación en el miocardio. El receptor MT2 y MT1 de la melatonina, que se expuso anteriormente, tiene la capacidad de inducir la producción de citoquinas, entre ellas IL-6, promoviendo a la fosforilación de STAT3. A su vez, se verá atenuada su fosforilación ante Luzindole, un antagonista no selectivo del receptor de melatonina, que atenúa también la supervivencia de los astrocitos. Esto demuestra la relación directa entre la citoprotección y la fosforilación de STAT y los receptores de melatonina. NOS es una molécula de señalización implicada en enfermedades inflamatorias y autoinmunes, además de en procesos fisiológicos como el control de la presión arterial o la defensa inmunitaria. Es producido por desde L-arginina por tres enzimas de síntesis, NOS neuronal, NOS endotelial, y NOS inducible. Su inhibición ha demostrado disminuir la zona infartada y otros efectos benéficos dependientes de la concentración, ya que una fuerte inhibición exacerbaría la lesión por isquemia reperfusión. Nrf2, es un factor de transcripción responsable de genes antioxidantes, cuya activación se ve inducida en los tratamientos con melatonina, ya que pasa de estar en el citoplasma a estar en el núcleo y activa la expresión de enzimas citoprotectoras como la HO-1, inhibiéndose la inflamación y la oxidación (Yang Y. y cols., 2014).

De los factores predisponentes a la lesión por isquemia reperfusión a nivel cardiovascular, hay que destacar el papel de la dislipemia. La influencia de la melatonina en el metabolismo lipídico influye también a este nivel, disminuyendo el riesgo de lesión por modificar la oxidación del colesterol de baja densidad (LDL), mejorando por tanto la enfermedad de dislipemia, tal y como se observó tratando durante 14 meses a pacientes con esteatosis hepática no alcohólica, que terminaron reduciendo tanto sus niveles de LDL como de triglicéridos. También posee la capacidad de reducir la apoptosis endotelial, porque evita la expresión y actividad de la quinasa de la cadena ligera de la miosina. En cambio la pérdida del receptor de la melatonina resultará en una aceleración del proceso aterosclerótico y aumento de la potencial lesión de isquemia reperfusión (Zhou H. y cols., 2018).

Así como los efectos de la melatonina en contra de la formación de la placa aterosclerótica han sido evidenciados, no se ha objetivado un beneficio semejante en la estabilización de la placa, papel que desempeñan las estatinas, ya que aumentan la calcificación de la placa, disminuyendo la proporción lipídica y haciéndola por ello menos susceptible a una ruptura (Zhou H. y cols., 2018).



Vías celulares por las cuales la melatonina protege al cardiomiocito de la lesión por isquemia reperfusion. MPTP: poro de transición de la permeabilidad mitocondrial. JAK 2: kinasa de Janus 2. STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3. TAC: capacidad antioxidante total (Yang Y. y cols., 2014).

La terapia basada en trasplante de células madre también se ve perjudicada por el ambiente inflamatorio y oxidativo presente en la zona infartada. Se ha visto que la melatonina mejora la supervivencia de las células progenitora cardiacas y que las células madre mesenquimales resisten mejor la hipoxia y la privación de flujo al ser tratadas con melatonina, a través de la activación de la vía de señalización de Sirt1, una enzima deacetilasa que contribuye a la regulación celular. Se ha estudiado el posible efecto sinérgico del empleo de melatonina junto con otros fármacos (Han D. y cols., 2016).

## 7.2 Aplicaciones clínicas de la melatonina en la enfermedad cerebrovascular

El infarto cerebral representa la mayor causa de muerte y discapacidad a largo plazo a nivel mundial, y en su patogenia y repercusión están implicados los radicales libres y la inflamación. La sobreproducción de radicales libres, juntos con la apoptosis de la zona infartada y la lesión por isquemia reperfusion ejercen un efecto nocivo al igual que en el resto de órganos en los que se observa este fenómeno. No se conocen en profundidad los potenciales efectos beneficiosos de la melatonina. Sin embargo, la circulación colateral que se forma ante neuronas dañadas, pero no necrosadas, ejerce una potencial diana en la que podría actuar la melatonina gracias a su acción antiinflamatoria y antiapoptótica, ya que esta zona denominada "zona de penumbra" tiene la característica de poder volver a ser reperfundida. El modelo más utilizado para demostrar la capacidad de la melatonina de limitar el daño producido por los radicales libres generados, es el que se origina por la obstrucción de la arteria cerebral media (Reiter RJ y cols.,

2010). Además de la oclusión de ésta, en los animales de experimentación se ocluyó también la arteria carótida primitiva por lo que la lesión no se circunscribe al hemisferio ipsilateral, sino que también afecta al contralateral, aumentando la expresión de TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , BAD y BAX en el hipocampo de ambos hemisferios. Tras el tratamiento con melatonina, los animales experimentaron un descenso significativo de estas sustancias en las áreas isquémicas del hipocampo (Muñoz P. y cols., 2017).

### **7.3 Aplicaciones clínicas de la melatonina en el trasplante de órganos**

En el trasplante de órganos, por un lado, se reconoce la implicación de la melatonina en la paliación de la lesión por isquemia reperfusion y además por otro lado, disminuye la toxicidad de algunos inmunosupresores. El rechazo del injerto ocurre cuando los antígenos del donante son reconocidos por el sistema inmune del receptor. Para ello, se utilizan fármacos inmunosupresores, que, si bien sirven para intentar evitar este rechazo, incrementan el riesgo de infecciones e incluso neoplasias.

En el hígado, la melatonina es capaz de incrementar la producción de bilis preservando la función del órgano, durante la isquemia reperfusion, reduciéndose la concentración de factor de TNF-  $\alpha$  e inhibiéndose la producción de óxido nítrico (Vairetti M. y cols., 2005). El examen de una mezcla farmacológica de pentoxifilina, glicina, deferoxamina, eritropoyetina, simvastatina y melatonina sirvió para demostrar efectos beneficiosos de ésta última. Se atenuó la infiltración leucocitaria hepática y la muerte celular, y los niveles de malondialdehído y de enzimas hepáticas disminuyeron también, y casi se recuperó la función excretora hepática (Moussavian MR y cols., 2011). Se ha investigado la posibilidad de aislar hepatocitos humanos como alternativa al trasplante hepático ortotópico, y como una vía para el desarrollo de hígados bioartificiales extracorpóreos. Sin embargo aún no ha sido resuelto el problema de la lesión isquémica reperfusion que derivaría de este proceso (Esteban-Zubero E. y cols., 2016). Un estudio llevado a cabo por Solanas y cols., comparó los resultados obtenidos usando melatonina frente a los usados con una solución de perfusión con 1% de dimetilsulfóxido, obteniendo resultados similares en la viabilidad celular, siendo sin embargo la melatonina mejor disminuyendo la peroxidación lipídica en los hepatocitos. Además la melatonina ejerce un efecto sinérgico con gentamicina o fenobarbital al ayudar al disminuir la hepatotoxicidad por ciclosporina (Solanas E. y cols., 2015). En estudios de hígados de ratas, se estudió la posibilidad de que la melatonina actuase protegiendo contra la lesión por reperfusion tras la preservación en frío del órgano, y se demostró que la melatonina impulsa la producción de bilis y de bilirrubina y los niveles de ATP tisulares (Vairetti M. y cols., 2005). También se ha demostrado en un modelo de isquemia caliente/reperfusion que la melatonina es capaz de incrementar la producción biliar, tras haber sido ocluidas la arteria hepática, la vena porta y el conducto biliar (Rodríguez-Reynoso S. y cols., 2001).

El trasplante de pulmón se ha convertido en una importante solución en enfermedades pulmonares en estadios avanzados. Sin embargo, la disfunción aguda del injerto se ha constituido un serio obstáculo para la viabilidad de este procedimiento. El aumento de las resistencias vasculares pulmonares, o de la permeabilidad capilar lleva a formación de edema con la

morbimortalidad que ello conlleva. Las células hipóxicas aumentarán su adhesión y la producción de citoquinas. En un estudio realizado por Inci y cols., usando un modelo de trasplante de un pulmón de rata, se constata el papel protector de la melatonina frente al daño oxidativo inducido por isquemia fría prolongada y dos horas de reperfusión. El resultado fue una mejor oxigenación del injerto, disminución de la peroxidación lipídica y de la actividad de la mieloperoxidasa en el grupo tratado con melatonina frente al no tratado (Inci I. y cols., 2002). Los efectos beneficiosos de la melatonina contra la lesión por isquemia reperfusión han sido comparados con otros antioxidantes, incluido el estradiol, induciendo este último complicaciones como edema moderado-severo (Esteban-Zubero E. y cols., 2016).

En el riñón también ha sido estudiada la melatonina además de con otros conocidos antioxidantes como la vitamina E y C, y el N-acetil-cisteína, obteniéndose que ésta confiere protección ante la nefrotoxicidad de inmunosupresores como ciclosporina y tacrolimus y modula el incremento de TNF- $\alpha$ , IL6, NO y mieloperoxidasa. En el trasplante renal de rata se ha observado una mayor supervivencia del injerto en el preacondicionamiento con melatonina, y de la lesión tubular posterior (Li y cols., 2009). Por otra parte, en el trasplante renal se ha observado también una desregulación de los ritmos circadiano y de la calidad del sueño, donde se observa un nivel reducido de melatonina y que podrían ser paliados con el suplemento de ésta. A su vez, los desórdenes del sueño se asocian a una función renal empeorada, por el desequilibrio entre agentes defensores y el incremento en la tasa de muerte celular por el incremento de los marcadores oxidativos (Ezzat H. y col., 2015).

En el trasplante óseo, la melatonina ha demostrado potenciar la proliferación y diferenciación de células osteogénicas e incluso incrementa la expresión génica de sialoproteínas y otros marcadores óseos, lo que lleva a la reducción del período de diferenciación del osteoblasto e interfiere con la actividad osteoclástica, acentuada por las acciones de los radicales libres. En un modelo de tibia de conejo, la melatonina mostró que proporcionaba una mejoría en la formación de hueso nuevo y en la longitud de la cortical, comparado con otro grupo de animales que no habían sido tratados con melatonina. Estos efectos fueron resultado de un aumento en la velocidad de diferenciación celular de la matriz osteoide en la zona peri implante (Esteban-Zubero E. y cols., 2016).

También se ha demostrado la eficacia de la melatonina en la lesión por isquemia reperfusión a nivel intestinal, hecho que resulta decisivo en la viabilidad de la anastomosis. Su administración previa a la isquemia sufrida por el tejido en la cirugía intestinal ha demostrado ser beneficiosa en la curación de la anastomosis en un modelo de rata con obstrucción de la arteria mesentérica superior (Özkan N. y cols., 2018).

Debido a los efectos beneficiosos de la melatonina, parece necesaria la investigación de ésta como tratamiento complementario de patologías tan prevalentes como las descritas. Es de esperar que ante los evidentes beneficios que aporta, las investigaciones y avances en el campo del trasplante de órganos y de las enfermedades cardiovasculares continúen descubriendo su potencial aplicación en la clínica, y que los estudios en que sus propiedades quedan demostradas sigan sucediéndose.

## 8.- CONCLUSIONES

**1.** En numerosos procesos fisiológicos como el envejecimiento y también en otros patológicos como la isquemia y la reperfusión aparece el estrés oxidativo, consecuencia de la liberación de radicales libres de oxígeno. Esta sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, se produce por un el desequilibrio de los mecanismos antioxidantes que en condiciones normales contrarrestan el estrés oxidativo.

**2.** La lesión por isquemia reperfusión supone un reto importante a la hora de garantizar la viabilidad de los órganos trasplantados, así como de asegurar el éxito en el tratamiento de patologías tan prevalentes como el síndrome coronario agudo. Por este motivo, es preciso atenuar los mecanismos que la desencadenan, como por ejemplo la excesiva respuesta inflamatoria o la sucesiva liberación de radicales libres.

**3.** La melatonina es una molécula sintetizada en la glándula pineal con propiedades beneficiosas a distintos niveles. En el sistema cardiovascular, ha demostrado ser de utilidad en la mitigación de la lesión por isquemia reperfusión, producida tras los síndromes coronarios agudos y tras el tratamiento de éstos con angioplastia coronaria transluminal percutánea. Asimismo, sus propiedades contra la aterosclerosis también pueden ser aprovechadas en esta prevalente patología, para evitar la progresión hacia el fallo cardíaco, o hacia el propio infarto agudo de miocardio.

**4.** En la lesión por isquemia-reperfusión en el trasplante de órganos, se ha evidenciado cómo las propiedades antioxidantes de la melatonina pueden mejorar la viabilidad del injerto. La melatonina ha demostrado poder disminuir la respuesta inflamatoria y la necrosis tubular aguda renal. También protege de la nefrotoxicidad de los inmunosupresores gracias a su papel inmunomodulador; favorece la producción biliar tras la oclusión del conducto biliar en el caso del trasplante hepático, y disminuye el edema pulmonar en el trasplante de pulmón.

## 9.- BIBLIOGRAFÍA

Apodaca G., (2001). Endocytic Traffic in Polarized Epithelial Cells: Role of the Actin and Microtubule Cytoskeleton. *Traffic*, 2(3), 149-159.

Baran K. W., Nguyen, M., McKendall, G. R., Lambrew, C. T., Dykstra, G., Palmeri, S. T., ... Limitation of Myocardial Infarction Following Thrombolysis in Acute Myocardial Infarction (LIMIT AMI) Study Group, K. (2001). Double-Blind, Randomized Trial of an Anti-CD18 Antibody in Conjunction With Recombinant Tissue Plasminogen Activator for Acute Myocardial Infarction: Limitation of Myocardial Infarction Following Thrombolysis in Acute Myocardial Infarction (LIMIT AMI) Stu. *Circulation*, 104(23), 2778-2783.

Becker, L. (2004). New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovascular Research*, 61(3), 461-470.

Benítez-King, G., Huerto-Delgadillo, L., & Antón-Tay, F. (1993). Binding of 3H-melatonin to calmodulin. *Life sciences*, 53(3), 201-207.

Bubenik G. A., Hacker, R., Brown, G. M., & Bartos, L. (1999). Melatonin concentrations in the luminal fluid, mucosa, and muscularis of the bovine and porcine gastrointestinal tract. *Journal of Pineal Research*, 26(1), 56-63.

Caldwell-Kenkel J. C., Thurman, R. G., & Lemasters J.J., J. J. (1988). Selective loss of nonparenchymal cell viability after cold ischemic storage of rat livers. *Transplantation*, 45(4), 834-837.

Carmody R. J., & Cotter, T. G. (2001). Signalling apoptosis: a radical approach. *Redox Report*, 6(2), 77-90.

Chen G., & Nuñez G., (2011). Sterile inflammation: sensing and reacting to damage.

Chen H.-M., Chen J.-C., Ng, C.-J., Chiu, D.-F., & Chen G., M.-F. (2006). Melatonin reduces pancreatic prostaglandin production and protects against caerulein-induced pancreatitis in rats. *Journal of Pineal Research*, 40(1), 34-39.

Cohen M. V., Yang, X.-M., & Downey, J. M. (2008). Acidosis, oxygen, and interference with mitochondrial permeability transition pore formation in the early minutes of reperfusion are critical to postconditioning's success. *Basic Research in Cardiology*, 103(5), 464-471.

Cowan C., Been M., & Gibb I., (1987). Lack of evidence of spontaneous reperfusion when ventricular fibrillation complicates early acute myocardial infarction. *The American Journal of Cardiology*, 59(15), 1419-1420.

Cunningham P.N., Dyanov, H. M., Park, P., Wang, J., Newell, K. A., & Quigg, R. J. (2002). Acute renal failure in endotoxemia is caused by TNF acting directly on TNF receptor-1 in kidney. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(11), 5817-5823.

de la Asuncion J. G., Millan, A., Pla, R., Bruseghini, L., Esteras, A., Pallardo, F. V., ... Viña, J. (1996). Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 10(2), 333-338.

de Teresa Galván C., Guisado Barrilao, R., García, M. C., Ochoa, J., & Ocaña Wilhelmi, J. (2008). Antioxidantes y ejercicio físico: funciones de la melatonina. *Revista Andaluza de Medicina del Deporte*, 1(2), 61-72.

Devarajan P., (2006). Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 17(6), 1503-1520.

Dhar D.K., Yamanoi, A., Ohmori, H., Nakashima, Y., Yamamoto, A., Osama, N. E.-A., ... Nagasue, N. (1998). Modulation of endothelin and nitric oxide: A rational approach to improve canine hepatic microcirculation. *Hepatology*, 28(3), 782-788.

Díaz G., (2012). *Percepción de la calidad de la Educación Física en los establecimientos educacionales*. *Revista Motricidad y Persona*, ISSN-e 0718-3151, N°. 13, 2013, págs. 45-60. Escuela de Pedagogía en Educación Física. Universidad Central de Chile.

Dominguez-Rodriguez, A., Abreu-Gonzalez P., de la Torre-Hernandez, J. M., Consuegra-Sanchez, L., Piccolo, R., Gonzalez-Gonzalez, J., ... Martinez, L. (2017). Usefulness of Early Treatment With Melatonin to Reduce Infarct Size in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction Receiving Percutaneous Coronary Intervention (From the Melatonin Adjunct in the Acute Myocardial Infarction Treated With Angiop. *The American Journal of Cardiology*, 120(4), 522-526.

Dominguez-Rodriguez A., Abreu-Gonzalez P., & Reiter R.J., (2012). Melatonina y enfermedad cardiovascular: ¿ mito o realidad? Melatonin and Cardiovascular Disease: Myth or Reality?

Domínguez-Rodríguez, A., Samimi-Fard, S., Abreu-González, P., & Carlos Kaski, J. (2009). Melatonina y aterosclerosis coronaria. *Clinica e Investigacion en Arteriosclerosis*, 21, 247-256.

Dubocovich, M. L., & Markowska, M. (2005). Functional MT1 and MT2 Melatonin Receptors in Mammals. *Endocrine*, 27(2), 101-110.

Eggert S., & Mikael Helweg, P. (2014). Melatonin Does Not Affect Oxidative/Inflammatory Biomarkers in a Closed-Chest Porcine Model of Acute Myocardial Infarction. *In Vivo*, 28(4), 483-488.

Eiserich J. P., Hristova, M., Cross, C. E., Jones, A. D., Freeman, B. A., Halliwell, B., & van der Vliet, A. (1998). Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature*, 391(6665), 393-397.

Esente, P., Giambartolomei, A., Gensini, G. G., & Dator, C. (1983). Coronary reperfusion and Bezold-Jarisch reflex (bradycardia and hypotension). *The American journal of cardiology*, 52(3), 221-224.

Esteban-Zubero E., E., García-Gil, F. A., López-Pingarrón, L., Alatorre-Jiménez, M. A., Iñigo-Gil, P., Tan, D.-X., ... Reiter R.J., R. J. (2016). Potential benefits of melatonin in organ transplantation: a review. *The Journal of endocrinology*, 229(3), R129-46.

Ezzat, H., & Mohab, A. (2015). Prevalence of sleep disorders among ESRD patients. *Renal Failure*, 37(6), 1013-1019. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2015.1044401>

Farmer D. G., Amersi, F., Kupiec-Weglinski, J., & Busuttil, R. W. (2000). Current status of ischemia and reperfusion injury in the liver. *Transplantation Reviews*, 14(2), 106-126.

Férez Santander S. , Márquez M. , Peña Duquea M. , Ocaranza Sánchez R., de la P. A. E. (2004). PROBLEMAS RELEVANTES EN CARDIOLOGÍA , 2003. *Rev Esp*



*Cardiol*, 57, 9-21.

Ferrari R. S., & Andrade, C. F. (2015). Oxidative Stress and Lung Ischemia-Reperfusion Injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 1-14.

Goldberg S., Greenspon, A. J., Urban, P. L., Muza, B., Berger, B., Walinsky, P., & Maroko, P. R. (1983). Reperfusion arrhythmia: a marker of restoration of antegrade flow during intracoronary thrombolysis for acute myocardial infarction. *American heart journal*, 105(1), 26-32. <https://doi.org/0>

Gunaratnam L., & Bonventre J.V., (2009). HIF in kidney disease and development. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 20(9), 1877-1887.

Gutteridge J. M. C., (1995). Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *CLIN. CHEM. European Beckman Conference CLINICAL CHEMISTRY*, 4112(12), 1819-1.

Hagar, J. M., Hale, S. L., & Kloner, R. A. (1991). Effect of preconditioning ischemia on reperfusion arrhythmias after coronary artery occlusion and reperfusion in the rat. *Circulation research*, 68(1), 61-68.

Hamm-Alvarez S.F., & Sheetz M. P., (1998). Microtubule-Dependent Vesicle Transport: Modulation of Channel and Transporter Activity in Liver and Kidney. *Physiological Reviews*, 78(4), 1109-1129.

Han, D., Huang, W., Li, X., Gao, L., Su, T., Li, X., ... Cao, F. (2016). Melatonin facilitates adipose-derived mesenchymal stem cells to repair the murine infarcted heart via the SIRT1 signaling pathway. *Journal of Pineal Research*, 60(2), 178-192. <https://doi.org/10.1111/jpi.12299>

Hao C-M., & Breyer, M. (2007). Physiologic and pathophysiologic roles of lipid mediators in the kidney. *Kidney International*, 71, 1105-1115.

Inci, I., Inci, D., Dutly, A., Boehler, A., & Weder, W. (2002). Melatonin Attenuates Posttransplant Lung Ischemia-Reperfusion Injury. *Ann Thorac Surg*, 73, 220-225.

Jaeschke H., H. (1996). Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences. *Journal of Hepatology*, 25, 774-780.

Jaeschke H., & Lemasters J.J., J. J. (2003). Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology*, 125(4), 1246-1257.

Jaeschke H., & Smith C.W., C. W. (1997). Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *Journal of Leukocyte Biology*, 61.

José, F., & Nácher, M. (2016). MELATONINA Y CALIDAD ESPERMÁTICA ESTUDIO IN VIVO E IN VITRO TESIS DOCTORAL.

Karg E., NEMETH, I., VIRAG, G., MESZAROS, T., BODA, D., & PINTER, S. (1997). Oxidative stress induced by bloodless limb surgery on humans. *European Journal of Clinical Investigation*, 27(12), 984-991.

Kim J.-S., He, L., Qian, T., & Lemasters J.J., J. J. (2003). Role of the Mitochondrial Permeability Transition in Apoptotic and Necrotic Death After Ischemia / Reperfusion Injury to Hepatocytes. *Current Molecular Medicine*, 3(6), 527-535.

Land W.G., (2005). The Role of Postischemic Reperfusion Injury and Other Nonantigen-Dependent Inflammatory Pathways in Transplantation. *Transplantation*,

79(5), 505-514.

Legrand M., Mik, E. G., Johannes, T., Payen, D., & Ince, C. (2008). Renal hypoxia and dysoxia after reperfusion of the ischemic kidney. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 14(7-8), 502-516.

Lemasters J.J., (2004). Rusty notions of cell injury. *Journal of Hepatology*, 40(4), 696-698.

Lentsch, A. B., Kato, A., Yoshidome, H., McMasters, K. M., & Edwards, M. J. (2000). Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology*, 32(2), 169-173.

Leong C-L., Anderson, W. P., O'Connor, P. M., & Evans, R. G. (2007). Evidence that renal arterial-venous oxygen shunting contributes to dynamic regulation of renal oxygenation. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 292(6), F1726-F1733.

Li, Z., Nickkholgh, A., Yi, X., Bruns, H., Gross, M. L., Hoffmann, K., ... Schemmer, P. (2009). Melatonin protects kidney grafts from ischemia/reperfusion injury through inhibition of NF- $\kappa$ B and apoptosis after experimental kidney transplantation. *Journal of Pineal Research*, 46(4), 365-372.

López Chicharro, J., & Fernández Vaquero, A. (2006). *Fisiología del ejercicio*. Médica Panamericana.

Mangino M. J., Tian, T., Ametani, M., Lindell, S., & Southard, J. H. (2008). Cytoskeletal Involvement in Hypothermic Renal Preservation Injury. *Transplantation*, 85(3), 427-436.

Martín, C. S., & Sánchez-Muniz, F. J. (2017). Cronodisrupción y desequilibrio entre cortisol y melatonina ¿Una antesala probable de las patologías crónicas degenerativas más prevalentes? *Journal of Negative and No Positive Results*, 2(11), 619-633.

Milani, M., Fischer, T. W., & Cutánea, M. (2014). Melatonina y fisiología capilar: razones y datos de eficacia clínica como tratamiento tópico de la alopecia androgénica Melatonin and hair physiology: reasons and clinical efficacy data as a topical treatment of androgenic alopecia. *Med Cutan Iber Lat Am*, 42(3), 30-36.

Moris, D., Spartalis, M., Spartalis, E., Karachaliou, G.-S., Karaolani, G. I., Tsourouflis, G., ... Theocharis, S. (2017). The role of reactive oxygen species in the pathophysiology of cardiovascular diseases and the clinical significance of myocardial redox. *Annals of translational medicine*, 5(16), 326. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.06.27>

Moussavian, M. R., Scheuer, C., Schmidt, M., Kollmar, O., Wagner, M., von Heesen, M., ... Menger, M. D. (2011). Multidrug donor preconditioning prevents cold liver preservation and reperfusion injury. *Langenbeck's Archives of Surgery*, 396(2), 231-241.

Muñoz Hoyos, A., & Molina Carballo, A. (1994). Melatonina: Interés cronobiológico y patológico. *Bol Pediatr*, 35, 115-126.

Muñoz, P., Bermudo, B., Shahani, P. M., García, I., Paredes, S. D., & Rancan, L. (2017). Efecto de la melatonina como tratamiento y prevención de las respuestas inflamatoria y apoptótica asociada a una lesión isquémica en cerebro inducidas por bloqueo de la arteria cerebral media. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 11(1), 101-106.

Mura, M., Andrade, C. F., Han, B., Seth, R., Zhang, Y., Bai, X.-H., ... Liu, M. (2007). INTESTINAL I/R-INDUCED ACUTE LUNG INJURY AND ONCOTIC CELL DEATH IN MULTIPLE

ORGANS. *Shock*, 1.

Nosjean, O., Ferro, M., Cogé, F., Beauverger, P., Henlin, J.-M., Lefoulon, F., ... Boutin, J. A. (2000). Identification of the Melatonin-binding Site MT 3 as the Quinone Reductase 2. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40), 31311-31317.

Opie, L. H. (1997). Preconditioning: We do not need more experiments, because our current knowledge already permits us to develop pharmacological agents. *Basic Research in Cardiology*, 92(2), 46-47.

Özkan, N., Ersoy, Ö. F., Özsoy, Z., & Çakır, E. (2018). Melatonin exhibits supportive effects on oxidants and anastomotic healing during intestinal ischemia/reperfusion injury.

Reiter R.J., Tan, D.-X., Fuentes-Broto, L., Paredes, S. D., Sanchez-Ba Rce-Lo, E., & Mediavilla, M. D. (2010). Melatonin Salvages Neural Tissue from Ischemia/Reperfusion Injury. *The Open Neuroendocrinology Journal*, 3, 112-120.

Rodriguez-Reynoso, S., Leal, C., Portilla, E., Olivares, N., & Muñiz, J. (2001). Effect of Exogenous Melatonin on Hepatic Energetic Status during Ischemia/Reperfusion: Possible Role of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Nitric Oxide. *Journal of Surgical Research*, 100(2), 141-149.

Sahna, E., Olmez, E., & Acet, A. (2002). Effects of physiological and pharmacological concentrations of melatonin on ischemia-reperfusion arrhythmias in rats: can the incidence of sudden cardiac death be reduced? *Journal of pineal research*, 32(3), 194-198.

Selzner, M., Rüdiger, H. A., Sindram, D., Madden, J., & Clavien, P.-A. (2000). Mechanisms of ischemic injury are different in the steatotic and normal rat liver. *Hepatology*, 32(6), 1280-1288.

Solanas, E., Sostres, C., Serrablo, A., García-Gil, A., García, J. J., Aranguren, F. J., ... Serrano, M. T. (2015). Effect of Dimethyl Sulfoxide and Melatonin on the Isolation of Human Primary Hepatocytes. *Cells, tissues, organs*, 200(5), 316-325.

Stadtman, E. R., & Oliver, C. N. (1991). Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *The Journal of biological chemistry*, 266(4), 2005-2008.

Sun, M.-S., Jin, H., Sun, X., Huang, S., Zhang, F.-L., Guo, Z.-N., & Yang, Y. (2018). Free Radical Damage in Ischemia-Reperfusion Injury: An Obstacle in Acute Ischemic Stroke after Revascularization Therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1-17. <https://doi.org/10.1155/2018/3804979>

Tan, D.-X., HardeLand W.G., R., Manchester, L. C., Paredes, S. D., Korkmaz, A., Sainz, R. M., ... Reiter R.J., R. J. (2009). The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biological Reviews*, 85(3), no-no.

Tan, D., Reiter R.J., R. J., Manchester, L. C., Yan, M., El-Sawi, M., Sainz, R. M., ... HardeLand W.G., R. (2002). Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Current topics in medicinal chemistry*, 2(2), 181-197.

Tani, M., & Neely, J. R. (1989). Role of intracellular Na<sup>+</sup> in Ca<sup>2+</sup> overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange. *Circulation research*, 65(4), 1045-1056.

Vairetti, M., Ferrigno, A., Bertone, R., Rizzo, V., Richelmi, P., Bertè, F., ... Freitas, I. (2005). Exogenous melatonin enhances bile flow and ATP levels after cold storage and reperfusion in rat liver: implications for liver transplantation. *Journal of Pineal Research*, 38(4), 223-230.

Wanner, G. A., Ertel, W., Müller, P., Höfer, Y., Leiderer, R., Menger, M. D., & Messmer, K. (1996). LIVER ISCHEMIA AND REPERFUSION INDUCES A SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE THROUGH KUPFFER CELL ACTIVATION. *Shock*, 5(1).

Yang, Y., Sun, Y., Yi, W., Li, Y., Fan, C., Xin, Z., ... Yi, D. (2014). A review of melatonin as a suitable antioxidant against myocardial ischemia-reperfusion injury and clinical heart diseases. *Journal of Pineal Research*, 57(4), 357-366.

Zaouali, M. A., Abdennebi, H. Ben, Padriisa-Altés, S., Mahfoudh-Boussaid, A., & Roselló-Catafau, J. (2010). Pharmacological strategies against cold ischemia reperfusion injury. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 11(4), 537-555.

Zhou, H., Ma, Q., Zhu, P., Ren, J., Reiter R.J., R. J., & Chen G., Y. (2018). Protective role of melatonin in cardiac ischemia-reperfusion injury: from pathogenesis to targeted therapy. *Journal of Pineal Research*, e12471.

Zweier, J., & Talukder, M. (2006). The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, 70(2), 181-190.