

Eduardo Esteban Zubero

Actividad protectora de la  
melatonina en las membranas  
celulares y mitocondriales durante  
la isquemia y reperfusión hepática

Director/es

García García, José Joaquín  
López Pingarrón, Laura

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

ACTIVIDAD PROTECTORA DE LA MELATONINA  
EN LAS MEMBRANAS CELULARES Y  
MITOCONDRIALES DURANTE LA ISQUEMIA Y  
REPERFUSIÓN HEPÁTICA

Autor

Eduardo Esteban Zubero

Director/es

García García, José Joaquín  
López Pingarrón, Laura

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
**Escuela de Doctorado**

Programa de Doctorado en Medicina

2021



# UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

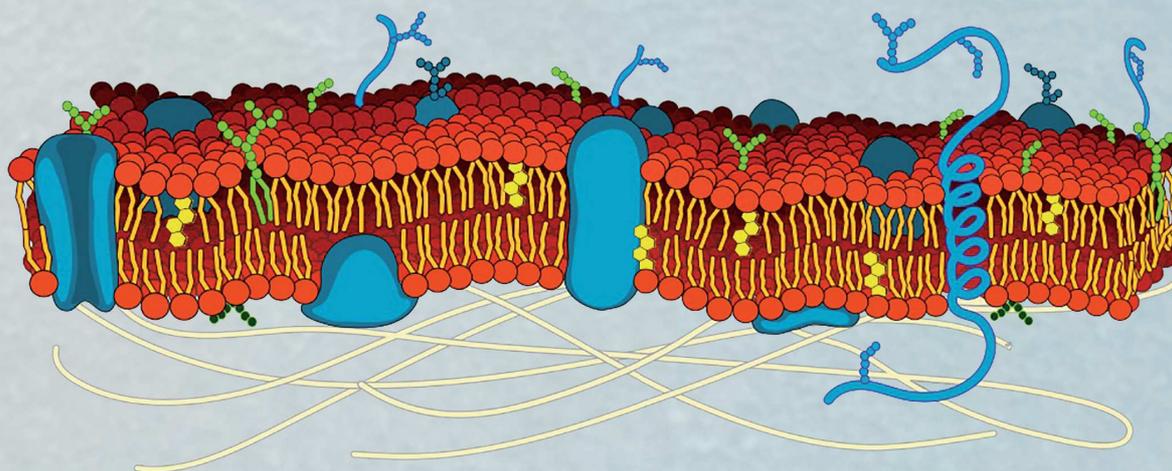
Facultad de Medicina

Departamento de Farmacología, Fisiología  
y Medicina Legal y Forense



## Tesis Doctoral

Para optar al grado de Doctor Internacional



## ACTIVIDAD PROTECTORA DE LA MELATONINA EN LAS MEMBRANAS CELULARES Y MITOCONDRIALES DURANTE LA ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN HEPÁTICA

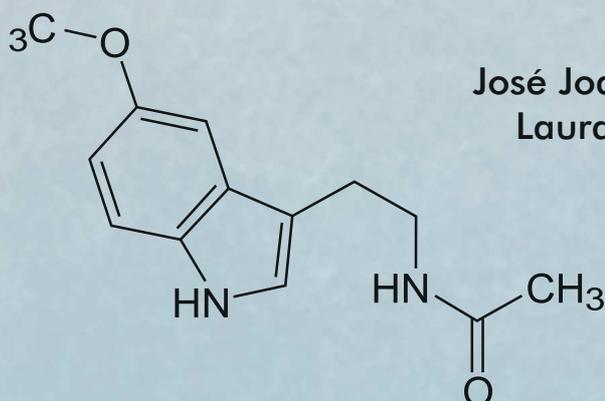
### Doctorando:

Eduardo Esteban Zubero

### Directores:

José Joaquín García García

Laura López Pingarrón



**EDUARDO ESTEBAN ZUBERO**  
Zaragoza

**ACTIVIDAD PROTECTORA DE LA MELATONINA  
EN LAS MEMBRANAS CELULARES Y  
MITOCONDRIALES DURANTE LA ISQUEMIA Y  
REPERFUSIÓN HEPÁTICA**



**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Farmacología, Fisiología y Medicina**

**Legal y Forense**

**Doctorando:**

Eduardo Esteban Zubero

**Directores:**

José Joaquín García García

Laura López Pingarrón

**TESIS DOCTORAL PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**INTERNACIONAL**

**Zaragoza, 2021**

# AGRADECIMIENTOS

Todas las historias o tramas de interés tienen personajes y momentos buenos y malos. Por suerte, en la mía, solo hay de los primeros. Recuerdo como si fuera ayer el día en el que inicié mi contacto con el “mundo de la melatonina”. Era 2014 y, para ser sinceros no era muy ducho en el tema (y eso que mi madre había realizado su proyecto doctoral acerca de la capacidad antioxidante de la indolamina en los tumores a nivel del sistema nervioso). La verdad es que, llegado este momento, puedo decir que ha sido un recorrido bonito y muy gratificante tanto a nivel humano como formativo e investigador, solo arrepintiéndome de no haber extraído mucha más información y conocimientos de todas las personas que me he cruzado en el camino. Pese a ello, espero que eso no sea un problema y que el presente trabajo sea solo el primer peldaño de un largo tramo de escaleras juntos.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a los directores de esta trama: el profesor Joaquín García y la profesora Laura López. Desde el primer momento me han ido allanando el camino en cada paso que dábamos en dirección a nuestro objetivo. Su conocimiento, empatía y ganas de trabajar son envidiables, por no hablar de la calidad humana que atesoran. Ha sido un gusto y un privilegio, y espero que nuestros caminos no se separen y me sigan adentrando como hasta ahora en el mundo de la docencia y la investigación en el Departamento de Farmacología, Fisiología y Medicina Legal y Forense, en especial, en el grupo de investigación “Envejecimiento y del estrés oxidativo” (B37\_17D). Os considero más que mis tutores, mis amigos. No me querría olvidar del resto de miembros del departamento y del grupo, en especial de Marcos César Reyes por ayudarme en mis primeros pasos en el laboratorio. Su paciencia para enseñarme y su disponibilidad no tuvieron límites.

Thanks to profesor Russel J. Reiter, the greatest expert about melatonin in the world, who accepted take in me for three months in his laboratory at the University of Texas Health Science Center in San Antonio. This was a sincere honor for me. Thanks to Dr. Tan and Dr. Manchester, they were very kind with me and they introduced me in USA culture. This period of time would not be the same without my great support and

friend Moisés Alejandro Alatorre. Fate united us in that stay and I can consider him one of my biggest confidants today.

La película de mi tesis no se comprendería sin mi “vida paralela”: la de residente de Medicina Familiar y Comunitaria en el Centro de Salud Delicias Sur, el Hospital Clínico Universitario y mi desempeño actual en el Servicio de Urgencias del Hospital San Pedro de Logroño. En cada uno de los Servicios que he rotado he sentido un apoyo constante, en especial en el Servicio de Urgencias, donde personas como el doctor Francisco José Ruiz me han ayudado de manera mas marcada en mi camino como médico de Urgencias. No querría olvidarme de la persona más importante en este periodo, la doctora Purificación Ochoa, la cual me ha mostrado el lado más humano de la medicina a través de una empatía con los pacientes en la enfermedad y problemáticas personales de una manera extraordinaria (a la par que sus conocimientos). Si algún día desempeño mi especialidad médica “madre”, trataré de seguir todas sus enseñanzas. Para concluir este apartado, me gustaría dar las gracias a la Unidad Docente de Medicina Familiar y Comunitaria por todo el interés mostrado en mi carrera investigadora, dando soporte a compaginar la vida laboral e investigadora en todo momento.

Finalmente, querría acordarme de los que iniciaron hace ya casi 33 años esta historia, mis padres (María José y José Antonio). Si me he convertido en la persona que soy ahora es gracias a ellos, por todos los valores y apoyo que me han brindado a lo largo de la vida. Nunca me ha faltado su aliento y cariño en cualquier momento en mi vida, y eso es lo que un hijo quiere de sus padres (y lo que espero transmitir en un futuro). Lo mismo que con mi hermano (Daniel), con el cual tengo recuerdos muy bonitos durante toda mi vida, mi abuela Carmen y mis tíos. No menos importantes son los que ya no están para ver esto, los cuales estoy seguro que estarían orgullosos de mí. Y para el final, una vez recordados los seres de “mi sangre”, dar las gracias a la persona que me acompaña en el día a día: Cristina. Desde que te conocí me has dado alegría y sentido a mi vida. No me imagino a otra persona con la que construir un proyecto juntos y espero que sigamos como hasta ahora, sumando momentos únicos y buenos recuerdos a nuestra historia.



***A mi familia y seres queridos.***

***Gracias por estar siempre ahí.***



*“La mente que se abre a una nueva idea jamás vuelve a su tamaño original”*

**Albert Einstein**

*“Todo hombre puede ser, si se lo propone, escultor de su propio cerebro”*

**Santiago Ramón y Cajal**

*“El buen médico trata la enfermedad; el gran médico trata al paciente que tiene la enfermedad”*

**William Osler**

*“Donde la medicina no llega, nadie puede. Pero la esperanza puede ser terapéutica”*

**Francis Castel**



## ABREVIATURAS

AA: aminoácidos.	ERNs: especies reactivas dependientes del nitrógeno.
AC: adenilato ciclasa.	EROs: especies reactivas dependientes del oxígeno.
ADN: ácido desoxirribonucleico.	ET: endotelina.
AFMK: N <sub>1</sub> -acetil-N <sub>2</sub> -formil-5-metoxikinurenamina.	FAD: flavín adenín dinucleótido (oxidado).
ALT: alanina aminotransferasa.	FADH <sub>2</sub> : flavín adenín dinucleótido (reducido).
AMK: N <sub>1</sub> -acetil-5- metoxikinurenamina.	FMN: flavín mononucleótido.
AMPc: adenosín monofosfato cíclico.	g: gramos.
Arg: L-arginina.	Gly: glicina.
ARN: ácido ribonucleico.	GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.
AST: aspartato aminotransferasa.	GMPc: guanosina-3,5-monofosfato cíclico.
ATP: adenosín trifosfato.	GPx: glutatión peroxidasa.
BH <sub>2</sub> : dihidrobiopterina.	GTP: guanosina 5-trifosfato.
BH <sub>4</sub> : (6R)-5,6,7,8,-tetrahidro-L-biopterina.	H·LOH: radical hidroxilipídico.
BSA: albúmina bovina.	H <sup>+</sup> : ión hidrogenión.
°C: grados centígrados.	H <sub>2</sub> O: agua.
Ca <sup>2+</sup> : ión calcio.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : peróxido de hidrógeno.
CAT: catalasa.	HCl: ácido clorhídrico.
CH <sub>2</sub> O: formaldehido.	HClO: ácido hipocloroso.
CINC-1: molécula quimioatrayente de neutrófilos inducidos por citoquinas-1.	4-HDA: 4-hidroxialquenos.
Cit: L-citrulina.	HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazina-1-etanosulfónico.
ClNa: cloruro sódico.	HIF-1α: factor inhibidor de la hipoxia-1α.
CREB: Proteína de unión a elemento de respuesta del AMP cíclico ( <i>cAMP response element binding</i> ).	HIOMT: hidroxindol-O-metil transferasa.
CTE: cadena transportadora de electrones.	HMGB1: grupo de alta movilidad box-1.
Cu: ión cobre.	HO-1: hemo oxigenasa-1.
DAMP: patrones moleculares asociados a peligro.	HO <sub>2</sub> ·: radical perhidroxilo.
DNPH: 2,4-Dinitrofenilhidrazina.	HONO <sub>2</sub> : ácido peroxinitroso.
DQ: diquat (herbicida).	HSC: células estrelladas hepáticas.
DUOX: oxidasas duales.	I-R: isquemia-reperfusión.
ecSOD: superóxido dismutasa extracelular.	IFN-γ: interferón gamma.
EDTA-Na <sub>2</sub> : etilendiaminotetraacético disódico.	IL: interleuquina.
ENA-78: proteína de activación de neutrófilos epiteliales-78.	iNOS: óxido nítrico sintasa inducible.
eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial.	IR: radiación ionizante.
ERK: proteín-cinasa regulada por señal extracelular.	JNK: cinasa c-Jun-N-terminal.
	K <sup>+</sup> : ión potasio.
	KC: células de Kupffer.
	KCl: cloruro potásico.

KIR3: canales rectificadores internos.  
KLF2: factor de transcripción Kruppel-like.  
L: radical lipídico.  
LH: lípido (ácido graso insaturado).  
LO: radical alcoxilo.  
LOO: radical peroxilo.  
LOOH: hidroperóxido lipídico.  
LPO: peroxidación lipídica.  
LSEC: células endoteliales sinusoidales hepáticas.  
M: mol.  
MAPK: proteín-cinasa activada por mitógeno.  
MDA: malondialdehído.  
MEK1/2: proteín-quinasa activadas por mitógenos.  
MEL: melatonina.  
MIP-2: proteína inflamatoria de macrófago-2.  
mg: miligramos.  
mL: mililitros.  
mM: milimoles.  
Mn: ión manganeso.  
MPO: mieloperoxidasa.  
MT: receptor de membrana para la melatonina.  
MyD88: gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide-88.  
 $\mu\text{M}$ : micromolar.  
 $\text{Na}^+$ : ión sodio.  
 $\text{NAD}^+$ : nicotinamida adenina dinucleótido (oxidado).  
NADH: nicotinamida adenina dinucleótido (reducido).  
 $\text{NADP}^+$ : nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (oxidado).  
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducido).  
NAT: serotonina-N-acetil transferasa.  
NF-kB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

nm: nanomoles.  
nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal.  
NO: óxido nítrico.  
 $\text{NO}_2$ : dióxido de nitrógeno.  
NOS: óxido nítrico sintasa.  
NOX: complejos multiproteicos.  
NPS: Sodio nitroprusiato dihidrato.  
 $\text{O}_2$ : oxígeno.  
 $^1\text{O}_2$ : oxígeno singulete.  
 $\cdot\text{O}_2^-$ : radical anión superóxido.  
 $\cdot\text{OH}$ : radical hidroxilo.  
 $\text{ONOO}^-$ : anión peroxinitrito.  
P: polarización.  
p-450: citocromo P-450.  
PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos.  
PDG: glutaminasa dependiente de fosfato.  
PMN: leucocitos polimorfonucleares.  
PTPm: poro de transición de permeabilidad mitocondrial.  
QR2: enzima quinona reductasa 2.  
RL: radical libre.  
Sar: sarcosina (N-metil glicina).  
SNC: sistema nervioso central.  
SOD: superóxido dismutasa.  
TCA: Tricloroacético.  
 $\text{TGF-}\beta$ : factor de crecimiento transformante beta.  
THF: tetrahidrofurano.  
TMA-DPH: 1-(4-trimetilamoniofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno-*p*-tolueno-sulfonato.  
 $\text{TNF-}\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa.  
 $\text{TNF-}\beta$ : factor de necrosis tumoral beta.  
TLR: receptores Toll-like.  
TRIS: Tris(hidrometil)aminometano.  
Vit C: vitamina C.  
Vit E: vitamina E o tocoferol.  
Zn: ión zinc.



# ÍNDICE

	<i>Página</i>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Melatonina</b>	<b>4</b>
1.1.1 Biosíntesis	4
1.1.2 Distribución	6
1.1.3 Metabolismo	7
1.1.4 Mecanismos de acción	7
1.1.4.1 Interacción con receptores de membrana	8
1.1.4.2 Interacción con receptores nucleares	9
1.1.4.3 Interacción con proteínas intracelulares	10
1.1.4.4 Depuración de radicales libres	10
1.1.5 Funciones de la melatonina	12
1.1.5.1 Regulación de ritmos circadianos	12
1.1.5.2 Regulación de la reproducción	12
1.1.5.3 Neuroinmunomodulación	13
1.1.5.4 Otros efectos pleiotrópicos	15
<b>1.2 Radicales libres y estrés oxidativo</b>	<b>16</b>
1.2.1 Concepto de radical libre y especies reactivas	16
1.2.1.1 Dependientes del oxígeno	17
1.2.1.2 Dependientes del nitrógeno	21
1.2.2 Fuentes de radicales libres en los seres vivos	22
1.2.2.1 Cadena transportadora de electrones mitocondrial	23
1.2.2.2 Citocromo p450	25
1.2.2.3 Oxidasas	25
1.2.2.4 Óxido nítrico sintasa	25
1.2.2.5 $\beta$ -oxidación de ácidos grasos	26
1.2.2.6 Otras enzimas	26
1.2.2.7 Fuentes exógenas de radicales libres	27
1.2.3 Mecanismos de protección	27
1.2.3.1 Antioxidantes	27
1.2.3.2 Sistemas reparadores	29
1.2.4 Concepto de estrés oxidativo	29
1.2.4.1 Peroxidación lipídica	30
1.2.4.2 Daño oxidativo a proteínas	31
1.2.4.3 Efecto del estrés oxidativo sobre la fluidez de la membrana	32
<b>1.3 Fisiopatología de la Isquemia-reperfusión</b>	<b>36</b>
1.3.1 Daño por isquemia	36
1.3.2 Daño por reperfusión	38
1.3.3 Papel del estrés oxidativo en la isquemia-reperfusión	39
1.3.3.1 Mecanismo de inducción del sistema xantina oxidasa	40
1.3.3.2 Mecanismo de inducción del sistema NADPH oxidasa	41
1.3.3.3 Mecanismo de inducción de NOS	42
1.3.4 Isquemia-reperfusión hepática	43

1.4 <u>Utilidad de la melatonina en el daño por Isquemia-reperfusión</u>	48
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>52</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>55</b>
<b>3. OBJECTIVES</b>	<b>56</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>57</b>
4.1 <u>Material utilizado</u>	57
4.1.1 Material biológico	57
4.1.2 Material de laboratorio	57
4.1.3 Reactivos químicos	58
4.2 <u>Diseño experimental</u>	59
4.2.1 <b>Modelo de isquemia-reperfusión hepática</b>	59
4.2.1.1 Anatomía hepática de la rata	59
4.2.1.2 Grupos de estudio	61
4.2.1.3 Procedimiento experimental	61
4.2.1.4 Obtención y procesado de las muestras tisulares	64
4.2.2 <b>Efecto protector de la melatonina en las membranas celulares y mitocondriales hepáticas expuestas a nitroprusiato sódico</b>	65
4.3 <u>Métodos analíticos</u>	67
4.3.1 Aislamiento de membranas	67
4.3.2 Determinación de la concentración de proteínas	68
4.3.3 Fluidez de las membranas celulares	70
4.3.4 Peroxidación lipídica	71
4.3.5 Carbonilación proteica	73
4.4 <u>Métodos estadísticos</u>	75
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>77</b>
5.1 <u>Efecto hepatoprotector de la melatonina en el modelo de isquemia-reperfusión <i>in vivo</i></u>	77
5.1.1 Fluidez de membrana celular	77
5.1.2 Fluidez de membrana mitocondrial	78
5.1.3 Peroxidación lipídica	78
5.1.4 Carbonilación proteica	79
5.2 <u>Efecto de la melatonina en las membranas celulares y mitocondriales hepáticas expuestas a nitroprusiato sódico</u>	80
5.2.1 Estudios cinéticos del modelo oxidativo	80
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>87</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>98</b>
<b>7. CONCLUSIONS</b>	<b>100</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>102</b>



# 1. INTRODUCCIÓN

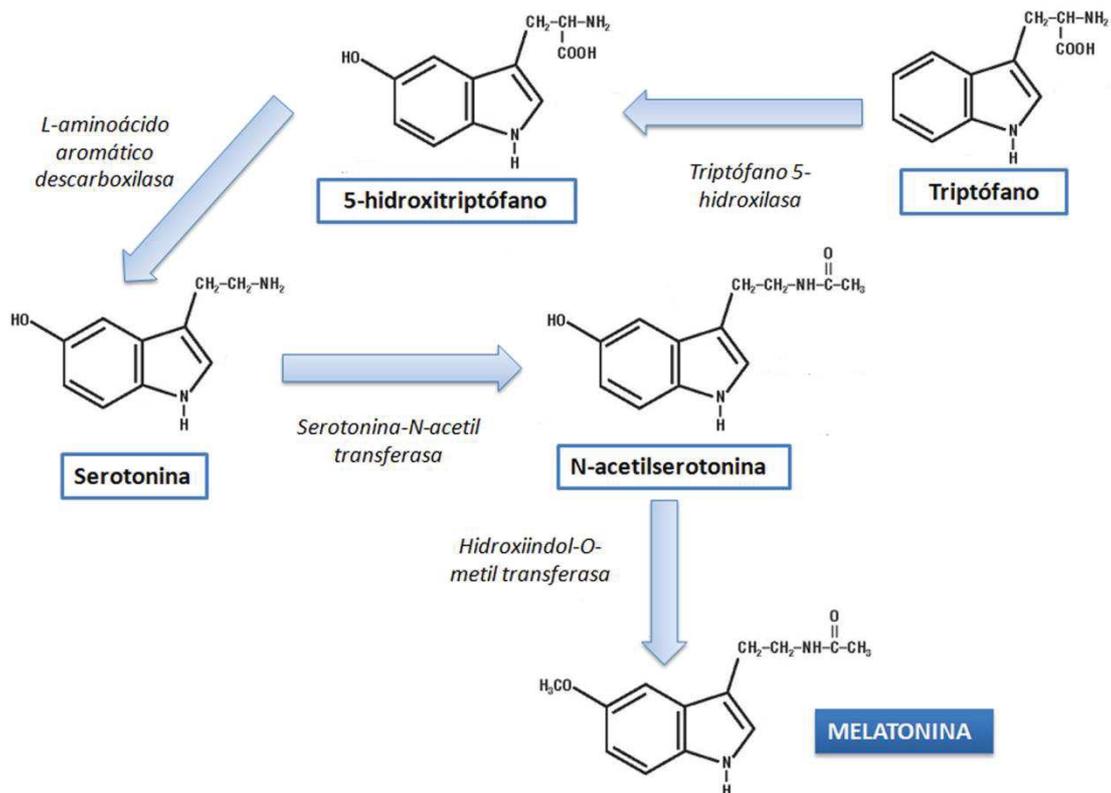
## 1.1 MELATONINA

---

Cuando McCord y Allen (1917) estudiaron el efecto que producía la administración de extractos de glándula pineal bovina en la diferenciación de los renacuajos, evidenciaron un aclaramiento en la piel de las ranas tratadas. Sin embargo, la melatonina no se aisló hasta 1958 (Lerner et al. 1958). Esta indolamina aparece de forma muy temprana en la evolución. Está presente en bacterias, organismos unicelulares eucariotas, algas, plantas, hongos, invertebrados y vertebrados. Consecuentemente, se ha aislado melatonina en multitud de alimentos como verduras, frutas, especias y semillas (Hardeland y Poeggeler 2003). Aunque clásicamente se ha postulado que la melatonina se produce y secreta principalmente en la glándula pineal, se han detectado tanto la indolamina como las enzimas implicadas en su síntesis en numerosos tejidos: retina, intestino, piel, placenta, ovario, testículo, hígado, médula ósea y células del sistema inmune (Tan et al. 1999; Acuña-Castroviejo et al. 2014; Zhang y Zhang 2014; Manchester et al. 2015).

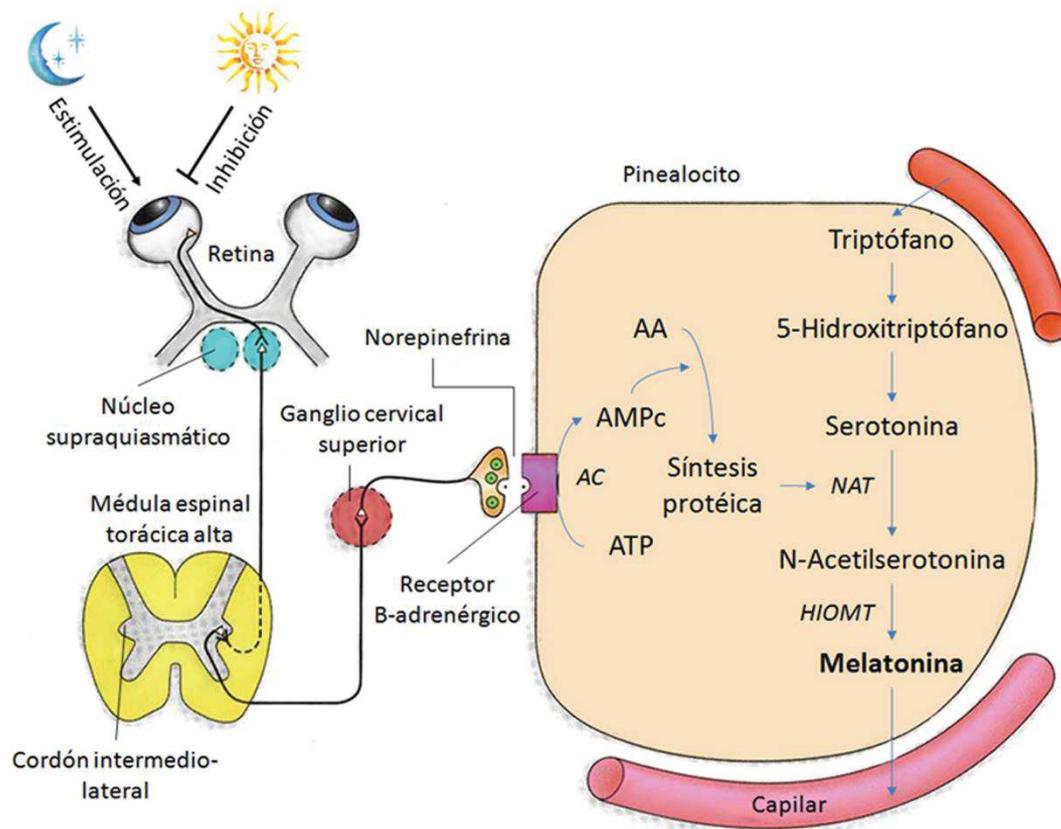
### 1.1.1 BIOSÍNTESIS

En los mamíferos, la melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina, se sintetiza a partir del aminoácido aromático esencial triptófano, tras la acción de cuatro enzimas: triptófano 5-hidroxilasa, L-aminoácido aromático descarboxilasa, serotonina-N-acetil transferasa (NAT) e hidroxindol-O-metil transferasa (HIOMT) (Tan et al. 2015) (Figura 1).



**Figura 1.** Biosíntesis de melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) a partir del aminoácido triptófano.

La secreción a nivel de la glándula pineal sigue un patrón circadiano, regulado por los periodos de luz y oscuridad. La enzima que rige el ciclo es la NAT (Tan et al. 2015). La expresión de esta enzima se regula a través de una vía que comienza en la retina donde, en ausencia de luz, se generan potenciales de acción en las células fotorreceptoras que llegan al núcleo supraquiasmático del hipotálamo. Desde allí, el estímulo alcanza la médula espinal torácica, por el cordón intermedio lateral, y se produce una nueva sinapsis para llegar al ganglio cervical superior, desde donde parten fibras adrenérgicas postganglionares hasta la membrana del pinealocito que liberan norepinefrina, que interactúa con receptores  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  adrenérgicos que elevan la concentración citoplasmática de adenosín monofosfato cíclico (AMPC), aumentando la expresión y actividad de la NAT, enzima que favorece la conversión de serotonina en N-acetilserotonina. Esta indolamina, por la acción de la HIOMT, se transformará en melatonina (Tan et al. 2015) (Figura 2). Por el contrario, el estímulo lumínico mantiene hiperpolarizados los fotorreceptores retinianos, por lo que no se inicia esta vía nerviosa.



**Figura 2.** Vía nerviosa de regulación de la síntesis de melatonina en el pinealocito. AA: aminoácidos; ATP: adenosín trifosfato; AMPc: adenosín monofosfato cíclico; AC: adenilato ciclasa; NAT: Serotonina-N-acetil transferasa; HIOMT: hidroxiindol-O-metil transferasa.

### 1.1.2 DISTRIBUCIÓN

La melatonina es una molécula lipofílica que atraviesa fácilmente la membrana celular del pinealocito por difusión, a través de la bicapa y alcanza la sangre, donde se transporta unida a la albúmina, en un 70% del total circulante, y de forma libre el 30% restante. Su vida media, en el plasma, es de 20 a 40 minutos (Vakkuri et al. 1985).

Dada esta gran capacidad de difusión simple, la melatonina se distribuye por todo el organismo, llegando así a todos los compartimentos subcelulares, especialmente la mitocondria, donde alcanza las mayores concentraciones (Acuña-Castroviejo et al. 2014). Los niveles plasmáticos de melatonina están condicionados por la duración de los ciclos luz/oscuridad, alcanzando la concentración más alta en el adulto joven sano por la noche (80-150 pg/mL) con un pico máximo en la mitad de la noche y la más baja durante el día (5-20 pg/mL) (Dziegiel et al. 2008). Este ritmo de secreción implica una de sus principales funciones: el control de los biorritmos y la regulación del sueño, induciendo, además, respuestas fotoperiódicas que sirven tanto

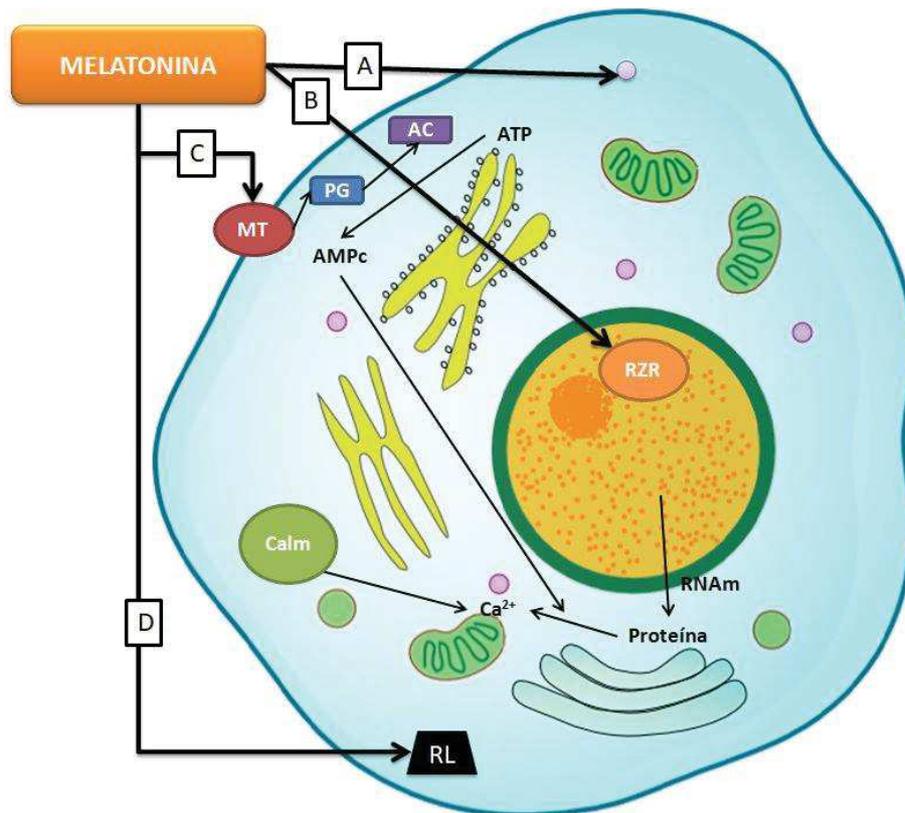
para biorritmos diarios como estacionales (Reiter 1993). Además, se ha observado que la edad influye en el ritmo circadiano de la melatonina. En la primera infancia, los niveles plasmáticos son los más altos, aunque hasta el final del primer año no se establece un patrón diferenciado diurno/nocturno (Waldhauser et al. 1993). Durante la pubertad, hay una caída en la secreción diurna de melatonina que se recupera, con un patrón día/noche, hasta la edad adulta. A partir de los 45 años, las diferencias entre las concentraciones sanguíneas día/noche van disminuyendo progresivamente, hasta que en los ancianos son prácticamente indistinguibles (Reiter 1995a).

### **1.1.3 METABOLISMO**

La melatonina se cataboliza en el hígado mediante el sistema de la citocromo p450 (Ma et al. 2005), transformándose en 6-hidroximelatonina y, al hacerse más hidrosoluble al combinarse con anión sulfato o con ácido glucurónico, es eliminada por la orina. Otras rutas catabólicas son: la desacetilación y desaminación, que se produce en retina e hígado (Galzin et al. 1988; Grace et al. 1991); la transformación en kinureninas que ocurre en el cerebro y la glándula pineal en presencia de la enzima indolamina 2,3- dioxigenasa (Hirata et al. 1974); la formación de compuestos tricíclicos de la familia de las  $\beta$ -carbolinas mediante la condensación de una indolamina y un aldehído, a través de la denominada ruta de Pictet-Spengler; o de forma no enzimática, mediante la reacción con el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), el superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) o con el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Golubev et al. 2017).

### **1.1.4 MECANISMOS DE ACCIÓN**

Los mecanismos responsables de los efectos pleiotrópicos de la melatonina se pueden agrupar en dos categorías: la interacción con receptores, ya sean de membrana asociados a proteínas G y nucleares, y los independientes a los receptores, como son la interacción con proteínas intracelulares o la actividad antioxidante (Slominski et al. 2012) (Figura 3).



**Figura 3.** Mecanismos de acción de la melatonina. A: interacción con proteínas intracelulares; B: interacción con receptores nucleares; C: Interacción con receptores de membrana; D: depuración de radicales libres. MT: receptor transmembrana. PG: proteína G. AC: adenilato ciclasa. RZR: receptor intranuclear de la superfamilia de receptores del ácido retinoico.

#### 1.1.4.1 INTERACCIÓN CON RECEPTORES DE MEMBRANA

Los receptores de membrana para la melatonina se distribuyen en todos los órganos y en la mayoría de las células de los mamíferos (Dubocovich y Markowska 2005). Pueden dividirse según su afinidad en 2 tipos: receptores de alta afinidad ( $MT_1$  y  $MT_2$ ) y receptores de baja afinidad ( $MT_3$ ) (Dubocovich et al. 2003).

Los  $MT_1$  se expresan en muchas regiones del sistema nervioso central (SNC), incluyendo el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, el hipocampo, la sustancia negra, el cerebelo, las vías centrales dopaminérgicas y el núcleo *accumbens* (Witt-Enderby et al. 2003). También se localizan en la retina, el ovario, el testículo, las glándulas mamarias, los vasos coronarios y la aorta, la vesícula biliar, el hígado, el riñón, la piel y el sistema inmune. Por otro lado, los  $MT_2$  se expresan principalmente en el SNC, el pulmón, el corazón, la aorta y los vasos coronarios, el miometrio, el duodeno, los adipocitos y las células del sistema inmune (Pandi-Perumal et al. 2008).

Los receptores MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub> son receptores de membrana acoplados a proteínas G con siete dominios transmembrana. En dependencia de la estirpe celular, la melatonina activa diferentes cascadas de segundos mensajeros: 1) Inhibe la adenilato ciclasa, disminuyendo la concentración de AMPc intracelular. Esto reduce la actividad de la proteínquinasa A y la fosforilación del “cAMP response element binding” (CREB), una proteína que actúa como factor de transcripción uniéndose a fragmentos de ADN sensibles al AMPc (Ross et al. 1996). 2) Activa la fosfolipasa C-β que eleva la concentración de inositol-(1,4,5)- trifosfato y 1,2-diacilglicerol y, en último término, la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Roka et al. 1999). 3) Estimula la fosforilación de proteín-quinatas activadas por mitógenos (MEK1/2) así como quinatas reguladas por señales extracelulares por estimulación de MT<sub>1</sub> (Witt-Enderby et al. 2000). 4) Estimulación de la proteínquinasa C (Roka et al. 1999). 5) Aumento de la conductancia del potasio por los canales rectificadores internos (KIR3), englobados dentro de los canales de K<sup>+</sup>, por estímulo de MT<sub>1</sub> (Nelson et al. 1996). 6) Inhibición del guanosina-3,5-monofosfato cíclico (GMPc) y síntesis de ADN (Roka et al. 1999).

Los receptores MT<sub>3</sub> no parece claro que cumplan todos los criterios de receptor acoplado a proteína G ya que su activación estimula la hidrólisis de fosfoinositol (Dubocovich et al. 2003). La enzima quinona reductasa 2 (QR2) ha sido identificada como el tercer receptor de membrana (MT<sub>3</sub>) (Slominski et al. 2012).

#### 1.1.4.2 INTERACCIÓN CON RECEPTORES NUCLEARES

Los receptores nucleares son proteínas localizadas en el interior del núcleo, capaces de unirse a la región reguladora de algunos genes (Acuña-Castroviejo et al. 1994). Cuando se unen a su ligando, regulan la actividad de la ARN polimerasa II, necesaria para la expresión génica. Los sitios de unión de la melatonina, en el núcleo, pertenecen a la superfamilia de receptores del ácido retinoico e incluyen RORα1, RORα2, RZRα y RZRβ (Carlberg 2000).

Dentro de las acciones que se generan por la interacción de la melatonina con los receptores nucleares se encuentra la inhibición de la inflamación y el estímulo de la expresión de genes antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), que facilita el paso del ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Además, estimula la acción de la catalasa (CAT) y la glutatión

peroxidasa (GPx), que metabolizan el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tomás-Zapico y Coto-Montes 2005; Carrillo-Vico et al. 2005).

#### 1.1.4.3 INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS INTRACELULARES

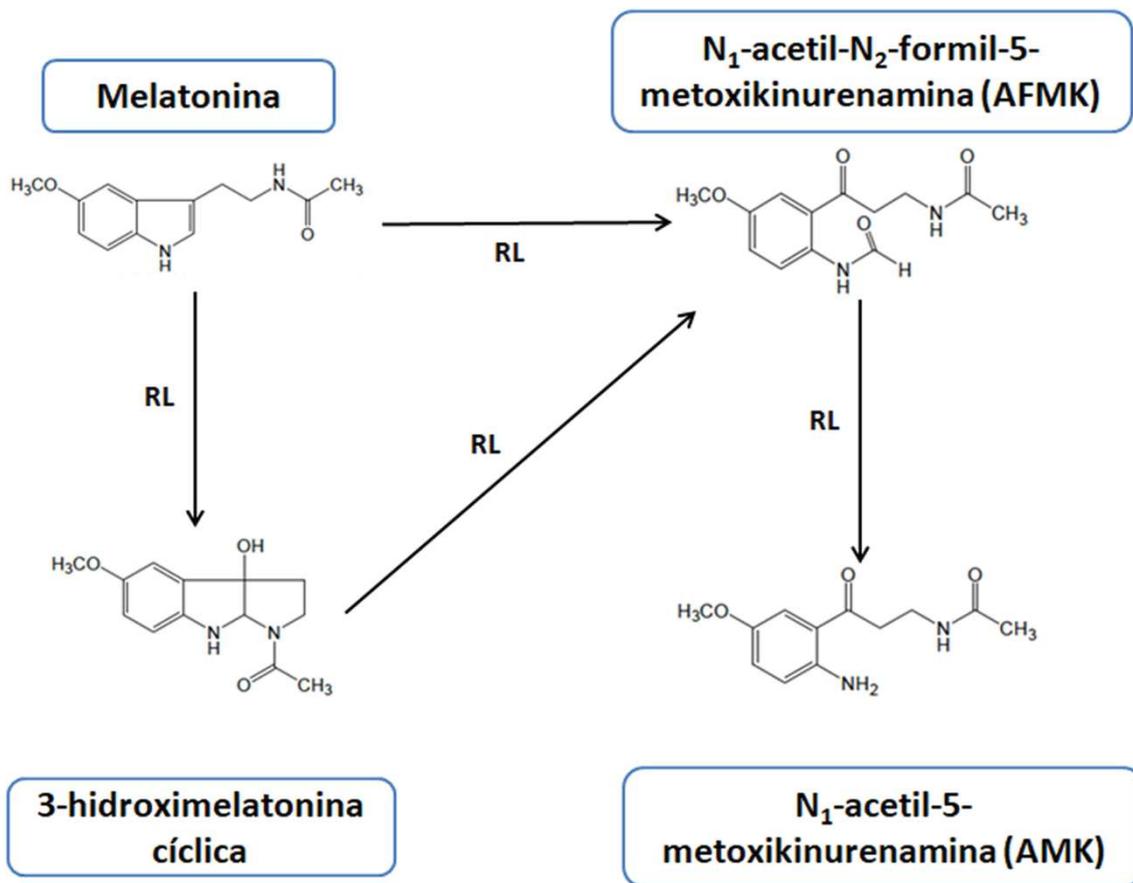
Se ha descrito la unión de la melatonina con proteínas intracelulares como la calmodulina, calreticulina y tubulina, y enzimas como la PKC y la QR2 (antiguo MT<sub>3</sub>) (León et al. 2000; Macías et al. 2003; Pandi-Perumal et al. 2008).

La interacción más relevante, a este nivel, es con la calmodulina, una proteína ubicua cuya función principal es actuar como quelante del calcio, lo que le permite modular la actividad de muchas enzimas, principalmente proteínquinasas, la fosfodiesterasa y la adenilato ciclasa. Cuando la melatonina interactúa con la calmodulina, inhibe la actividad de la fosfodiesterasa de forma concentración-dependiente, lo que le permite regular directamente las señales intracelulares de calcio (Ouyang y Vogel 1998; Fukunaga et al. 2002).

#### 1.1.4.4 DEPURACIÓN DE RADICALES LIBRES

Esta acción sucede en todos los compartimentos del organismo. El mecanismo por el cual la melatonina detoxifica radicales libres es mediante la donación de electrones (Tan et al. 2002). En la literatura, se observan multitud de modelos experimentales que evidencian que la melatonina es un potente depurador directo, “scavenger”, de radicales derivados del oxígeno y del nitrógeno, incluyendo los radicales ·OH, el ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>, el oxígeno singulete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el óxido nítrico (NO·), el anión peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), e incluso el ácido hipocloroso (HClO) (Tan et al. 1993; Allegra et al. 2003; Reiter et al. 2009).

Al igual que la melatonina, sus principales catabolitos poseen importantes propiedades antioxidantes, conformando así la conocida “cascada antioxidante de la melatonina” (Tan et al. 2001; Ressmeyer et al. 2003; Mayo et al. 2005). Entre los catabolitos, que se forman como resultado de la depuración de radicales libres por la melatonina, destacan la N<sub>1</sub>-acetil-N<sub>2</sub>-formil-5-metoxikinurenamina (AFMK), la N<sub>1</sub>-acetil-5-metoxikinurenamina (AMK) y la 3-hidroximelatonina cíclica (Figura 4).



**Figura 4.** Cascada antioxidante de la melatonina. Cuando la melatonina interactúa con un radical libre (RL) genera N<sub>1</sub>-acetil-N<sub>2</sub>-formil-5-metoxikinurenamina (AFMK) y 3-hidroximelatonina cíclica, para después al volver a reaccionar con otro radical, y forma la N<sub>1</sub>-acetil-5-metoxikinurenamina (AMK). Todos estos catabolitos tienen actividad antioxidante.

Una acción indirecta de la melatonina es la activación de enzimas antioxidantes endógenas. Esta acción se explicó inicialmente por su interacción con receptores nucleares ROR $\alpha$  (Tomás-Zapico y Coto-Montes 2005), aunque actualmente hay evidencias de que dosis altas de melatonina también activan la producción de ARNm a través de receptores MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub> en el hígado de la rata (Venegas et al. 2013).

La melatonina también actúa a nivel mitocondrial optimizando el flujo de electrones en la cadena transportadora de electrones (CTE), reduciendo así la formación de radicales libres. Otro hecho destacado es que la melatonina posee una acción estimulante de los complejos I y IV de la CTE, promoviendo la producción de adenosin trifosfato (ATP) y reduciendo el daño oxidativo al ADN mitocondrial (Acuña-Castroviejo et al. 2001; Reiter et al. 2002b).

### 1.1.5 FUNCIONES DE LA MELATONINA

Además de la función antioxidante, la melatonina desempeña otras funciones, entre las que cabe destacar la regulación de ritmos circadianos, la reproducción en especies animales y la inmunomodulación.

#### 1.1.5.1 REGULACIÓN DE RITMOS CIRCADIANOS

Los primeros estudios que relacionaron la melatonina con los ciclos sueño-vigilia datan de los años 60, cuando se evidenció el ritmo circadiano de su concentración plasmática (Lerner y Case 1960). Posteriormente, se propuso que reducía el tiempo de conciliación del sueño a la vez que mejoraba su calidad y duración (Lieberman et al. 1984).

Los efectos cronobióticos de la melatonina están mediados por los receptores  $MT_1$  y  $MT_2$  (Dubocovich y Markowska 2005). En el núcleo supraquiasmático, la melatonina afecta a la fase y amplitud de la variación circadiana. Dado que la glándula pineal está bajo el control del núcleo supraquiasmático, su acción en el reloj biológico circadiano representa un mecanismo de retroalimentación implicado en el reajuste del oscilador (Hardeland 2008).

El efecto de la melatonina sobre los ritmos circadianos también se ha descrito en personas que realizan viajes transoceánicos (Tresguerres et al. 2001; Takahashi et al. 2002), en personas que trabajan en turnos de noche (Yoon y Song 2002; Ulhôa et al. 2015) y en pacientes con ceguera causada por destrucción de la retina (Lewy y Newsome 1983).

#### 1.1.5.2 REGULACIÓN DE LA REPRODUCCIÓN

La duración del pico nocturno de las concentraciones plasmáticas de melatonina es inversamente proporcional a las horas de exposición a la luz. Los cambios estacionales en los patrones de secreción de melatonina constituyen una señal esencial para las fluctuaciones anuales de la capacidad reproductora en animales mantenidos bajo condiciones fotoperiódicas naturales. En algunos animales de reproducción estacional, la melatonina regula el tamaño de los órganos sexuales y la secreción de hormonas asociadas con la fisiología reproductora (Reiter 1993; Moore 1999).

La administración de melatonina modula, en diversas especies, la actividad del eje gonadal a diferentes niveles, incluyendo la secreción hipotalámica del factor liberador de gonadotropinas, la respuesta de las gonadotropinas hipofisarias y prolactina, la síntesis de esteroides gonadales o la respuesta de los órganos diana periféricos. Aunque los efectos más comúnmente observados son de carácter inhibitor, dependen en gran medida de la especie y de la pauta temporal de administración (Díaz et al. 1999). Muchos mamíferos tienen ciclos anuales de fertilidad y, es en estas especies, donde la melatonina tiene una función reguladora más clara. Estas pautas garantizan que el nacimiento de las crías se produzca en la época del año en la que las condiciones ambientales y la disponibilidad de alimento sean las óptimas para la supervivencia de los nuevos individuos. En estas especies, la pinealectomía bloquea los efectos del fotoperiodo y, la administración de melatonina en los animales pinealectomizados es capaz de recuperar dicho efecto (Dardes et al. 2000).

En la industria ganadera, se utilizan miniimplantes subcutáneos liberadores de melatonina, que provocan una señal que el animal interpreta como un ciclo de días cortos (Malpoux et al. 1997), estimulando su actividad sexual y consiguiendo así sincronizar los partos en la época deseada (Forcada et al. 2007).

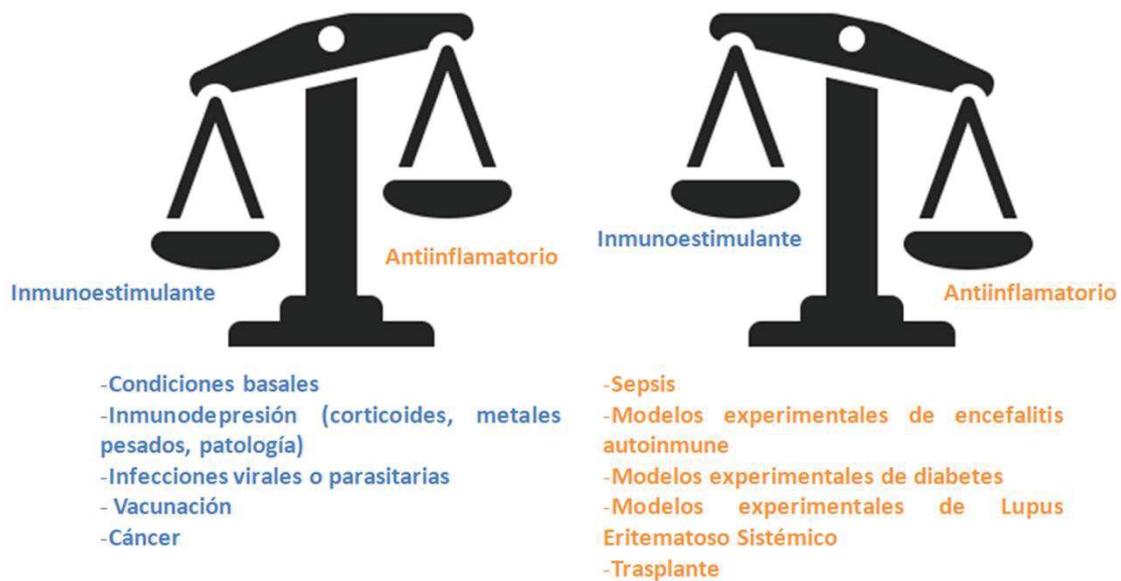
En la especie humana, hay descritos casos de pubertad precoz asociada a tumores destructores de pinealocitos y, por el contrario, retrasos puberales relacionados con tumores pineales parenquimatosos que cursan con hipersecreción de melatonina (Reiter 1998; Macchi y Bruce 2004).

### 1.1.5.3 NEUROINMUNOMODULACIÓN

Existen múltiples conexiones entre los sistemas nervioso, endocrino e inmunológico. La glándula pineal y su principal producto, la melatonina, como parte de esta red de interacciones, está en íntima relación con la inmunidad, hasta el punto de documentarse la pérdida de tamaño, peso y función en órganos linfoides en varios modelos animales tras la pinealectomía (Carrillo-Vico et al. 2005, 2006). Por otra parte, un estado inflamatorio mantenido puede suprimir el pico nocturno de melatonina, como se puede observar en situaciones proinflamatorias como las mastitis, tras una cesárea, insuficiencia renal o alteraciones temporomandibulares, observando en todos los casos una reducción del pico nocturno de melatonina y un aumento del factor de

necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Pontes et al. 2006 y 2007; Pinto et al. 2015; Park y Chung 2016). Además, varias células del sistema inmune sintetizan melatonina, y se han encontrado receptores de membrana y nucleares en una gran variedad de tejidos linfoides en muchas especies animales, incluida la humana (Carrillo-Vico et al. 2013). Esto confiere a la melatonina un importante papel más allá de su función cronobiótica (Tan et al. 2003; Acuña-Castroviejo et al. 2014).

Se ha propuesto que la melatonina actúa como amortiguador del sistema inmune ya que sus principales acciones varían en función del estado inmunológico (Figura 5). La indolamina actúa como inmunoestimulador en sujetos con un sistema inmunológico sano. En las inmunodeficiencias, produce una mayor respuesta a la agresión de gérmenes como virus o parásitos. Además, actúa como un inmunosupresor en situaciones de respuesta inmunitaria exagerada, como la sepsis, pudiendo considerarse como una molécula antiinflamatoria (Carrillo-Vico et al. 2013).



**Figura 5.** Esquema sobre la homeostasis inmunitaria propuesta para la melatonina.

La melatonina modula algunos componentes celulares de la respuesta inmune innata. Así, en ratas sanas alimentadas con suplementos de melatonina hay un aumento de la población de células natural killer en la médula ósea (Currier et al. 2000). Además se ha demostrado que la melatonina aumenta *in vitro* el índice de quimiotaxis de los neutrófilos humanos (Peña et al. 2007), lo que sugiere que la indolamina pudiera desempeñar un importante papel en la infiltración leucocitaria de

los tejidos. Un marcador temprano de inflamación es la cascada productora de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 por los macrófagos activados. En varios diseños experimentales, la melatonina ha conseguido revertir estados de inmunosupresión con niveles bajos de IL-1 e IL-6 (Arias et al. 2003). Por el contrario, en situaciones de inflamación alterada, como en modelos experimentales de distrés respiratorio (Lin et al. 2011; Chen et al. 2011) y pancreatitis (Jaworek et al. 2012), la melatonina redujo la producción de mediadores inflamatorios y la infiltración tisular por los neutrófilos.

En la respuesta inmune específica, la melatonina incrementa los niveles de IgG1 e IgM (Akbulut et al. 2001), así como el número y actividad de los linfocitos CD4+ en situaciones de inmunosupresión inducidas por fármacos o por la edad (Kim et al. 2000). Además, la melatonina aumenta la producción de citoquinas como el IFN- $\gamma$  y la IL-2 en los linfocitos Th1 (García-Mauriño et al. 1997, 1999). Sin embargo, en situaciones de inflamación crónica como la hipersensibilidad por contacto, la melatonina disminuye los niveles de IFN- $\gamma$  e IL-12 (Majewska et al. 2007). También se inhibe la respuesta de los linfocitos Th1 en modelos de reflujo esofágico (Konturek et al. 2013), trasplante de ovario (Hemadi et al. 2012) y de páncreas (Lin et al. 2009).

Las citoquinas, la NOS inducible (iNOS) y COX-2 están codificadas por genes regulados por NF-kB. La melatonina reduce la activación de NF-kB en el hígado y en otros tejidos (Mohan et al. 1995; Chuang et al. 1996; Bruck et al. 2004). También puede alterar la activación de la proteína proapoptótica mitocondrial Bax e induce una relocalización fuerte de Bcl-2, el principal antagonista de Bax, mediante la interacción de la melatonina con los receptores de membrana plasmática MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub> y la activación de la proteín-cinasa regulada por señal extracelular (ERK) y la proteín-cinasa activada por mitógeno (MAPK).

#### 1.1.5.4 OTROS EFECTOS PLEIOTRÓPICOS

Se ha descrito que la melatonina posee un efecto antitumoral por la protección que confiere al ADN contra el estrés oxidativo, la activación de apoptosis de células tumorales y la acción anti-metastásica por la expresión de moléculas de adhesión de superficie (Reiter et al. 2010a). En este sentido, se ha propuesto que la pérdida del pico de las concentraciones plasmáticas de melatonina en trabajadores de turno nocturno

podría relacionarse con una mayor tasa de incidencia de cáncer de mama en estos sujetos (Hill et al. 2015).

Otros efectos descritos de la melatonina son la reducción de la presión arterial como consecuencia de una reducción de las catecolaminas circulantes, la relajación de la pared de músculo liso y sus propiedades antioxidantes (Tengattini et al. 2008); la hipotermia (Deacon y Arendt 1995), por lo que se cree que la melatonina regula la variación circadiana de la temperatura corporal (Koster-van Hoffen et al. 1993); y la antiviral, ya que se ha propuesto a la melatonina como coadyuvante en el tratamiento de infecciones virales, como el virus del Ébola y el Coronavirus, debido a su efecto sobre la alteración endotelial y la coagulación vascular diseminada (Tan et al. 2014; Reiter et al. 2020).

## **1.2 RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO**

---

### **1.2.1 CONCEPTO DE RADICAL LIBRE Y ESPECIES REACTIVAS**

El átomo consta de un núcleo y una corteza. El núcleo incluye protones y neutrones, mientras que la corteza está compuesta por electrones que se mueven alrededor del núcleo en los denominados orbitales, que son la región del espacio donde hay mayor probabilidad de encontrar los electrones. Existen diferentes tipos de orbitales, donde se distribuyen los electrones, según su nivel de energía. En cada uno, hay parejas de electrones, por ser la configuración energética más estable, que giran sobre su propio eje produciendo un momento de giro angular determinado por el número cuántico de *spin*, con dos valores fijos ( $+\frac{1}{2}$  ó  $-\frac{1}{2}$ ) posibles según el sentido de su giro horario o antihorario, respectivamente. Es decir, los electrones del par tienen sentidos de giro opuesto en cada orbital, por lo que sus *spines* o campos magnéticos se anulan, denominándose a ese átomo o molécula diamagnética (Boveris 1998).

Los radicales libres son átomos, moléculas o partes de éstas con uno o varios electrones desapareados en su orbital más externo. El electrón solitario no se encuentra apareado, teniendo su momento magnético o *spin* descompensado. Se denominan paramagnéticos. Los electrones desapareados generan una situación inestable, con una gran reactividad y, por lo tanto, con una vida media corta, lo que determina que los radicales libres interaccionen con moléculas contiguas,

rápidamente, a las que ceden o de las que captan un electrón para alcanzar una mayor estabilidad electrónica. La molécula o átomo afectado puede convertirse, a su vez, en otro radical libre, propagando así el daño que causan los radicales libres. La principal fuente de radicales libres en nuestro metabolismo aeróbico es el oxígeno ( $O_2$ ), del que derivan, asimismo, las especies reactivas dependientes del oxígeno, aunque también se pueden producir radicales libres derivados de otros elementos, como el nitrógeno y, en menor medida, el carbono y el azufre (Matsuzaki et al. 2009).

#### 1.2.1.1 DEPENDIENTES DEL OXÍGENO

El  $O_2$  es uno de los gases más importantes de la Tierra. Constituye el 21% de la atmósfera, el 89% del peso del agua de mar y, al menos, el 47% del peso de la corteza terrestre. De éste derivan las especies reactivas dependientes del oxígeno (EROs), que es un concepto más amplio que el de radical libre, ya que incluye a éstos y a sus precursores inmediatos, electrónicamente estables, pero que fácilmente pueden derivar en la formación de radicales libres (Lushchak 2014).

Las EROs se producen como resultado de las perturbaciones que sufre el  $O_2$  al interactuar con el ambiente, incluyendo temperaturas extremas, radiación, toxinas o patógenos, y como consecuencia del metabolismo fisiológico en la célula, fundamentalmente en la mitocondria, aunque también se genera una pequeña cantidad en los peroxisomas, mediante la activación de células fagocíticas y a través de la acción de ciertos sistemas enzimáticos. Aproximadamente, entre el 1% y el 3% del oxígeno mitocondrial deriva en la producción de especies reactivas, lo cual hace que dicha organela sea la responsable de generar el 90% de las EROs intracelulares (Richter et al. 1995; Sohal 2002), fundamentalmente el  $\cdot O_2^-$ . Además, la mitocondria es rica en iones metálicos como el hierro y el cobre, favoreciendo que se formen radicales  $\cdot OH$ , a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Shi y Dalal 1993) (Tabla I).

Tabla I. Vida media de los principales radicales libres y del oxígeno molecular.		
Especie	Fórmula	Vida media a 37°C (s)
Superóxido	$\cdot\text{O}_2^-$	$1 \times 10^{-6}$
Hidroxilo	$\cdot\text{OH}$	$1 \times 10^{-9}$
Alcoxilo	$\text{LO}\cdot$	$1 \times 10^{-6}$
Peroxilo	$\text{LOO}\cdot$	$1 \times 10^{-2}$
Oxígeno singlete	$^1\text{O}_2$	$1 \times 10^{-6}$
Oxígeno molecular	$\text{O}_2$	$>10^2$

- Oxígeno molecular

Cada átomo de la molécula de  $\text{O}_2$  posee un electrón desapareado en su orbital más externo (Figura 6). Esos dos electrones tienen el mismo número de *spin* y sólo interactuarán con moléculas o átomos cuyos electrones desapareados tengan *spines* complementarios, fenómeno que se denomina restricción del *spin*. Esta característica implica que la reactividad del  $\text{O}_2$  sea baja en comparación con las otras EROs, lo que se traduce en una mayor vida media (Tabla I).

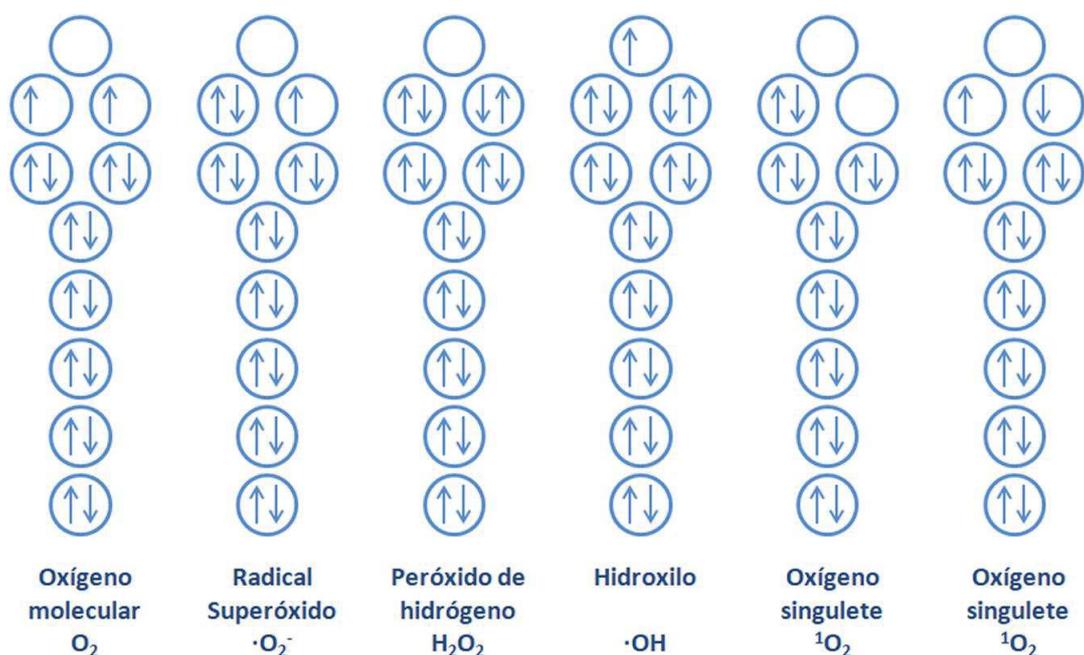


Figura 6. Configuración electrónica de las principales especies reactivas dependientes del oxígeno.

- Oxígeno singlete

Esta especie reactiva no es directamente un radical libre como tal dado que no tiene electrones desapareados en su última capa (Figura 6). Es una variante del oxígeno molecular con otra configuración en su último orbital, presentando una

asimetría al configurarse con *spines* opuestos. El  $^1\text{O}_2$  se origina a partir del  $\text{O}_2$  mediante la absorción de energía electromagnética fundamentalmente por reacciones fotodinámicas (Castell et al. 1994; Boscá et al. 2001). La energía absorbida hace que uno de los electrones del último orbital cambie el sentido de su *spin* (Figura 6). Esta excitación favorece que reaccione con otras moléculas transfiriendo su energía. Se ha observado que la capacidad del  $^1\text{O}_2$  para sustraer un átomo de hidrógeno (hidrogenión  $\text{H}^+$ ) de un ácido graso insaturado inicia el proceso de peroxidación lipídica (LPO) (Gutteridge 1995).

- Radical superóxido

El  $\cdot\text{O}_2^-$  se produce por la reducción de una molécula de  $\text{O}_2$  que gana un electrón. Esta reacción se observa en la mitocondria y en el retículo endoplásmico de todas las células eucariotas animales (Turrens 2003). También se genera durante el denominado estallido respiratorio de las células fagocíticas: sistema monocito-macrófago y granulocitos, favoreciendo la lisis bacteriana en el fagosoma generado tras la fagocitosis. Asimismo, la autooxidación de moléculas como las xantinas, catecolaminas, compuestos tiólicos, flavinas y hemoproteínas en presencia de metales también forman  $\cdot\text{O}_2^-$  (Valko et al. 2005).

Aunque el  $\cdot\text{OH}$  es mucho más reactivo y tóxico que el  $\cdot\text{O}_2^-$ , éste último, generado en la mitocondria puede dañar las proteínas de la cadena respiratoria y el ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial (Keyer et al. 1995). Esto puede estar influenciado por el hecho de que el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el precursor del  $\cdot\text{OH}$ , se genera a partir de  $\cdot\text{O}_2^-$ . Además, el radical superóxido puede reaccionar con especies reactivas dependientes del nitrógeno (ERNs) como el radical óxido nítrico  $\cdot\text{NO}$ , formando así el  $\text{ONOO}^-$ , una molécula muy reactiva y, por lo tanto, tóxica (Messner e Imlay 2002; Valez et al. 2013).

- Peróxido de hidrógeno

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  no es un radical libre como tal, constituyendo una de las EROs menos reactivas (Figura 6). Se genera durante el metabolismo del oxígeno, a través de la captación de dos electrones. A nivel celular, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  no es tóxico a concentraciones fisiológicas, gracias a la acción depuradora de las enzimas peroxidasa y catalasa pero,

en presencia de metales de transición, puede derivar en la formación de  $\cdot\text{OH}$  mediante la reacción de Fenton (Winterbourn 1995) o la de Haber-Weiss (Koppenol 2001). Además, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es capaz de atravesar las membranas biológicas, produciendo así daño en puntos alejados al lugar de su formación (van der Vliet y Janssen-Heininger 2014).

- Radical hidroxilo

Con una vida media de apenas un nanosegundo (Tabla I), es el más inestable y agresivo de todos los radicales libres (Figura 6). Fruto de ello, es capaz de interactuar con cualquier molécula circundante: ácidos nucleicos, proteínas o lípidos. Además, no se conoce ninguna enzima capaz de detoxificarlo directamente, lo que incrementa su capacidad de daño (Attri et al. 2015).

El  $\cdot\text{OH}$  se genera a través de varios mecanismos en el ser humano: a) la fisión homolítica del agua, un proceso infrecuente secundario a la exposición de ésta a radiaciones de alta energía, como rayos X y rayos  $\gamma$ ; b) la ruptura fotolítica del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en dos  $\cdot\text{OH}$ , mediada por la exposición a la luz ultravioleta; c) la reacción de Fenton, basada en la descomposición de la molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en un  $\cdot\text{OH}$  y un anión hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) en presencia de un átomo de hierro o cobre para la transferencia de electrones; d) la reacción de Haber-Weiss, en la que una molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  reacciona con una molécula de  $\cdot\text{O}_2^-$ , u otro agente reductor, para producir un  $\text{OH}^-$ , un  $\cdot\text{OH}$  y  $\text{O}_2$  (Lloyd et al 1997; Kehrer 2000; Attri et al. 2015).

- Radicales alcoxilo y peroxilo

Los radicales alcoxilo ( $\text{LO}\cdot$ ) y peroxilo ( $\text{LOO}\cdot$ ) son especies reactivas fruto de la LPO. Se generan como consecuencia del ataque de radicales libres sobre las colas de los ácidos grasos de los fosfolípidos que integran las membranas celulares. Una vez producidas, estas especies pueden iniciar y propagar la reacción de peroxidación por toda la membrana celular (Gutteridge y Halliwell, 1990).

- Radical perhidroxilo

El radical perhidroxilo ( $\text{HO}_2\cdot$ ) se produce a partir del  $\cdot\text{O}_2^-$ . Tiene una gran liposolubilidad, lo que le hace facilitador de procesos de peroxidación en membranas biológicas (Gutteridge y Halliwell, 1990).

#### 1.2.1.2 DEPENDIENTES DEL NITRÓGENO

Engloban a los radicales libres dependientes del nitrógeno y a sus especies precursoras. Los más relevantes son el  $\cdot\text{NO}$ , el  $\text{ONOO}^-$ , y el dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2$ ).

- Óxido nítrico

El  $\cdot\text{NO}$  es una especie gaseosa con una vida media de entre 3 y 5 segundos. Se genera durante la conversión de L-arginina en L-citrulina, la cual es catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) (Grisham et al. 1999).

Este radical posee múltiples funciones en el organismo, incluyendo la regulación del flujo sanguíneo local, antiagregante plaquetario, segundo mensajero, y mediador del neurotransmisor excitador glutamato (Figura 7). El exceso de este gas facilita su interacción con proteínas intracelulares, principalmente mitocondriales y aquellas que poseen hierro (Grisham et al. 1999), así como con ácidos nucleicos, pudiendo producir mutaciones, rotura de ADN y fenómenos apoptóticos. Incluso, el  $\cdot\text{NO}$  puede reaccionar con el  $\cdot\text{O}_2^-$  y formar  $\text{ONOO}^-$ , una molécula altamente tóxica y responsable en gran parte de la toxicidad generada por el  $\cdot\text{NO}$  (Valez et al. 2013).



**Figura 7.** Efectos reguladores, protectores y deletéreos del óxido nítrico (NO).

- Anión peroxinitrito

Implica la eliminación del  $\cdot\text{O}_2^-$  sin la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pero puede derivar en la formación de ácido peroxinitroso ( $\text{HONO}_2$ ), que se descompone fácilmente en 2 radicales tóxicos, el  $\cdot\text{OH}$  y el  $\text{NO}_2$  (Janssen et al. 1993). Por otra parte, el  $\text{ONOO}^-$  induce el proceso de LPO, tiene capacidad para nitrar e hidroxilar los residuos aromáticos de aminoácidos, y para reaccionar con restos sulfhidrilo, proteínas y ADN (Radi et al. 1991).

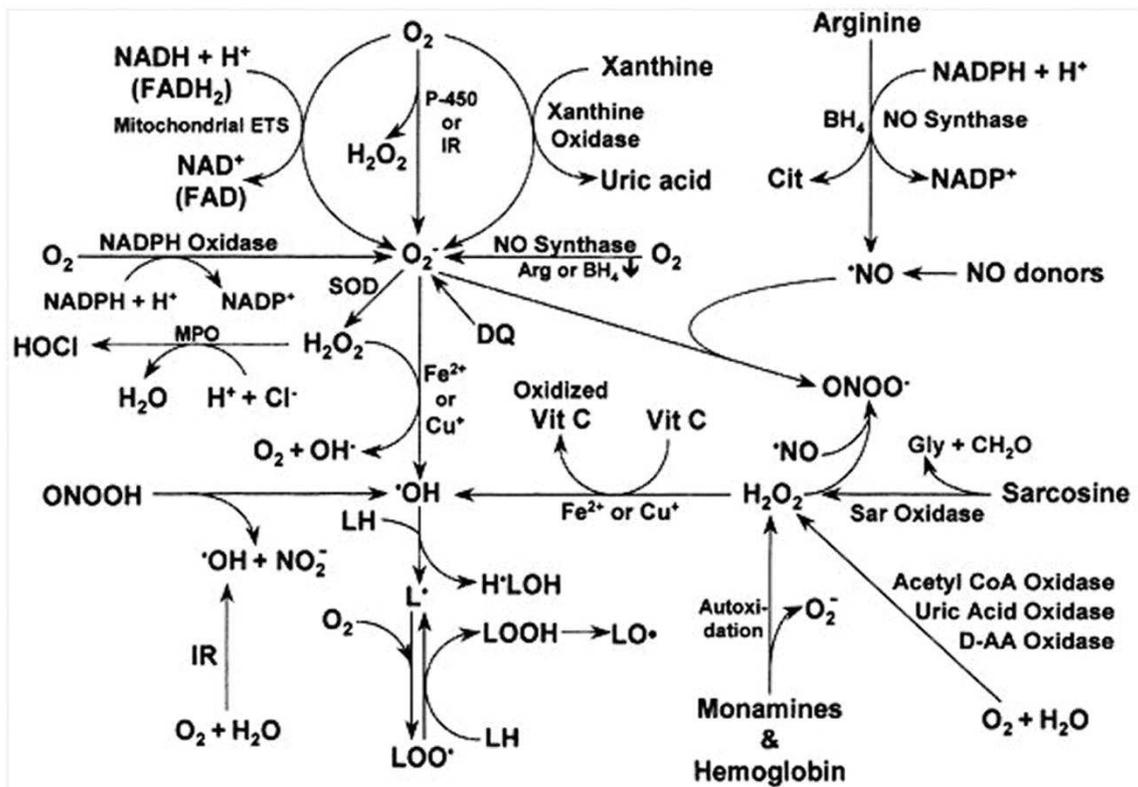
- Dióxido de nitrógeno

El  $\text{NO}_2$  es un radical libre tóxico que se genera a partir de la oxidación del  $\cdot\text{NO}$  atmosférico. Su daño se basa en su capacidad de iniciar el proceso de LPO (Persinger et al. 2002).

### 1.2.2 FUENTES DE RADICALES LIBRES EN LOS SERES VIVOS

Los radicales libres que afectan al ser humano pueden ser de origen endógeno y exógeno. Mientras que los generados exógenamente se deben a agentes externos, como la exposición a radiaciones ionizantes y ultravioleta, contaminantes, etc; los

producidos endógenamente son el resultado de múltiples rutas metabólicas fisiológicas o toxicológicas enmarcadas en un proceso de óxido-reducción en el que se genera energía (Fang et al. 2002) (Figura 8).



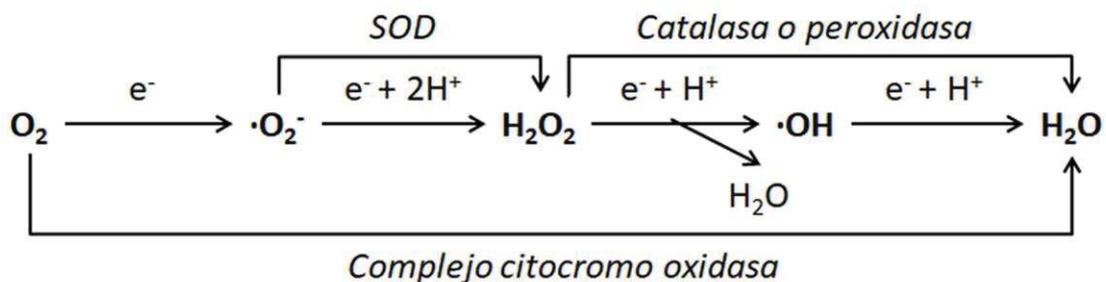
**Figura 8.** Principales vías de formación de radicales libres en el ser humano. AA: aminoácido; Arg: L-arginina; BH<sub>4</sub>: (6R)-5,6,7,8,-tetrahydro-L-biopterina; CH<sub>2</sub>O: formaldehído; Cit: L-citrulina; DQ: diquat (herbicida); ETS: cadena transportadora de electrones; FAD: flavín adenín dinucleótido (oxidado); FADH<sub>2</sub>: flavín adenín dinucleótido (reducido); Gly: glicina; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno; HOCl: ácido hipocloroso; H•LOH: radical hidroxilipídico; IR: radiación ionizante; L•: radical lipídico; LH: lípido (ácido graso insaturado); LO•: radical alcoxilo; LOO•: radical lipídico peroxilo; LOOH: hidropéroxido lipídico; MPO: mieloperoxidasa; NAD<sup>+</sup>: nicotinamida adenina dinucleótido (oxidado); NADH: nicotinamida adenina dinucleótido (reducido); NADP<sup>+</sup>: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (oxidado); NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducido); •NO: óxido nítrico; •O<sub>2</sub><sup>-</sup>: radical anión superóxido; •OH: radical hidroxilo; ONOO<sup>-</sup>: peroxinitrito; P-450: citocromo P-450; PDG: glutaminasa dependiente de fosfato; Sar: sarcosina (N-metil glicina); SOD: superóxido dismutasa; Vit C: vitamina C; Vit E: vitamina E o tocoferol.

### 1.2.2.1 CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES MITOCONDRIAL

El proceso de fosforilación oxidativa o respiración mitocondrial tiene como fin la generación de energía para la síntesis de ATP. Se produce en la membrana interna mitocondrial, en la denominada cadena respiratoria, un sistema formado por complejos enzimáticos que catalizan reacciones de óxido-reducción acopladas,

transfiriendo electrones de la nicotinamida adenín dinucleótido (NADH) y la flavín adenín-dinucleótido (FADH<sub>2</sub>). El receptor final de los electrones es el oxígeno. Como consecuencia de este proceso se forman radicales libres, generando así “la paradoja del oxígeno”, ya que la misma molécula imprescindible para la vida de los organismos aerobios, puede comprometerla. Por lo tanto, la principal fuente de radicales libres en las células eucariotas es la mitocondria (Yu 1994), donde podemos encontrar: ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ·OH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ·NO y ONOO<sup>-</sup>.

Cada uno de los complejos enzimáticos que forman la cadena de transporte electrónico se nombran del I al IV, aunque la enzima ATP-sintasa a veces se denomina complejo V. Dentro de la cadena, existen elementos capaces de transferir un electrón directamente al O<sub>2</sub>, como son los complejos I y III (Figura 9). Durante esta cesión, es cuando pueden generarse radicales libres como el ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Cross y Jones 1991).



**Figura 9.** Reducciones del oxígeno hasta formar agua en la mitocondria. SOD: superóxido dismutasa; O<sub>2</sub>: oxígeno; ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>: anión superóxido; H<sup>+</sup>: hidrogenión; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno; ·OH: radical hidroxilo.

En el proceso de reducción del oxígeno se generan tres compuestos intermedios. El primero es el ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>, que resulta de la reducción del oxígeno molecular con un electrón; el segundo es el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, producto del aporte de otro electrón y dos protones; y el tercero es el ·OH, resultado final de la suma de un tercer electrón y un protón. La reducción completa finaliza con el cuarto electrón y otro protón para generar una molécula de agua (Figura 9). En esta cadena, el ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> puede generar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a través de una reacción catalizada por la SOD, pudiendo atravesar las membranas y alcanzar el citoplasma para reaccionar con otras especies formando diversos tipos de radicales libres (Boveris et al. 1972).

#### 1.2.2.2 CITOCROMO P450

El citocromo P450 es una amplia familia de enzimas muy similares, de las que se conocen multitud de isoformas. Cada una de ellas tiene una especificidad de sustrato diferente a las demás. Se localizan principalmente en el retículo endoplásmico y a nivel mitocondrial de células del hígado e intestino. Producen  $\cdot\text{O}_2^-$ , mediante la reducción directa del  $\text{O}_2$  en reacciones de monooxigenación e hidroxilación de diversos sustratos endógenos y exógenos, consiguiendo que muchas sustancias tóxicas sean más hidrosolubles y facilitando, así, su eliminación por orina. El NADPH se utiliza como cofactor por el citocromo P450 (Manoj et al. 2010).

#### 1.2.2.3 OXIDASAS

Las células de nuestro sistema inmune producen radicales libres, como respuesta a la agresión de diferentes agentes infecciosos, mediante un fenómeno conocido como “estallido respiratorio”. El complejo enzimático responsable de este mecanismo es la NADPH oxidasa que, mediante un aumento del consumo de  $\text{O}_2$ , acepta electrones del NADH y reduce sustanciasceptoras como los tioles proteicos; aunque el mayor aceptor fisiológico es el  $\text{O}_2$ , cuya reducción conlleva la formación de  $\cdot\text{O}_2^-$  (de Grey 2003; Zhu et al. 2017). Asimismo, como ya se explicó antes, la enzima SOD puede reducir el  $\cdot\text{O}_2^-$  hasta  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Finalmente, la mieloperoxidasa (MPO) incrementa de forma ostensible la actividad microbicida del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , dado que, en presencia de cloruro, se oxida para formar HClO. Los fagocitos activados forman  $\cdot\text{OH}$  y HClO frente a los microorganismos. Este mecanismo defensivo cobra especial relevancia, ya que si se sobreexpresa, puede contribuir a la etiopatogenia de enfermedades con base inmunológica (Forman y Thomas 1986).

#### 1.2.2.4 ÓXIDO NÍTRICO SINTASA

El  $\text{NO}\cdot$  es generado durante la conversión de L-arginina a L-citrulina por tres isoformas diferentes de NOS: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e inducible (iNOS) (Hines et al. 2002; Hsu et al. 2002). eNOS y nNOS son reguladas de manera calcio-dependiente, expresándose constitutivamente en el sistema nervioso y a nivel del endotelio. Por el contrario, la iNOS, que produce la mayor parte de NO, está regulada por endotoxinas y citoquinas proinflamatorias, sin depender de los niveles de calcio

(Moncada et al. 1991). La eNOS juega un papel importante en la vasodilatación, dado que el óxido nítrico producido por las células endoteliales se difunde a las células del músculo liso para activar la guanilato ciclasa soluble y, al hacerlo, produce la relajación vascular (Moncada 1999). En condiciones fisiológicas, el NO previene la agregación plaquetaria, la proliferación de la célula muscular lisa y la adhesión de los leucocitos al endotelio (Benavides Trujillo y Pinzón Tovar 2008). Por otro lado, cabe destacar la implicación de la iNOS en periodos de isquemia, incrementando los niveles de NO· de manera excesiva, contribuyendo a la disfunción endotelial, excesiva vasodilatación, la fuga vascular y el daño tisular. Ésta se produce a nivel de la microglía y otras células inflamatorias durante las primeras 24 horas tras el cese del aporte del flujo sanguíneo (Benavides Trujillo y Pinzón Tovar 2008). Dicha alteración se puede observar en los cardiomiocitos en situaciones de shock séptico, miocarditis, isquemia, miocardiopatía dilatada e insuficiencia cardíaca (Tsutsui et al. 2009). A nivel hepático, el NO· es generado principalmente por la eNOS y la iNOS (McNaughton et al. 2002). Mientras que la eNOS se distribuye de forma uniforme en los hepatocitos y en el endotelio de las arterias hepáticas, vénulas hepáticas terminales, sinusoides y en el epitelio biliar del hígado sano, la iNOS se expresa principalmente en la zona periportal del acino hepático. Además, en presencia de alteraciones tales como la cirrosis, se observa un incremento de la expresión de iNOS en todas las áreas, apreciándose una translocación de la eNOS al núcleo celular (McNaughton et al. 2002).

#### 1.2.2.5 $\beta$ -OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

La metabolización o  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos con una longitud de cadena de 24 o más átomos de carbono requiere la presencia de O<sub>2</sub> y genera grandes cantidades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los microsomas y, sobre todo, en los peroxisomas hepáticos. Este mismo proceso se observa en la metabolización de fenoles, formaldehídos y alcoholes (Boveris et al. 1972; Beckman y Ames 1998).

#### 1.2.2.6 OTRAS ENZIMAS

La lipooxigenasa y la ciclooxigenasa son enzimas asociadas a la membrana plasmática que participan en el metabolismo del ácido araquidónico, generando radicales libres durante su catálisis, principalmente ·OH (Frei 1994).

### 1.2.2.7 FUENTES EXÓGENAS DE RADICALES LIBRES

Las radiaciones, así como otros factores ambientales como los contaminantes aéreos, la hiperoxia, pesticidas, humo del tabaco, solventes, anestésicos o hidrocarburos aromáticos, generan radicales libres. Muchos agentes antineoplásicos, tales como adriamicina o bleomicina, y algunos antibióticos, también son fuentes de radicales libres. Algunos de los efectos de estos fármacos se han atribuido a su capacidad para reducir oxígeno a  $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Esteban-Zubero et al. 2016a).

### 1.2.3 MECANISMOS DE PROTECCIÓN

Hace 2500 millones de años tuvo lugar uno de los hechos más relevantes de la evolución: la adaptación de los seres vivos a una atmósfera rica en oxígeno. Esto tuvo lugar debido a que las algas microscópicas cianofíceas, hoy conocidas como cianobacterias, comenzaron a expulsar grandes cantidades de  $\text{O}_2$  a la atmósfera, iniciando así el denominado proceso fotosintético. La forma reducida del oxígeno es uno de los mayores tóxicos conocidos. Esta característica del oxígeno de ser vital para los seres vivos aerobios y a la vez tan dañino en su forma reducida se conoce como la paradoja de la aerobiosis. Para minimizar este daño, los organismos aerobios han desarrollado los sistemas de defensa antioxidante (Lushchak 2014).

#### 1.2.3.1 ANTIOXIDANTES

Se define un antioxidante como cualquier sustancia que retrase, prevenga o elimine el daño producido a una molécula mediado por las especies reactivas producido a una molécula (Fang et al. 2002). Desde un punto de vista funcional, los antioxidantes se clasifican en enzimáticos y no enzimáticos. Estos últimos reaccionan con los radicales libres y, los primeros, disminuyen el daño oxidativo catalizando reacciones químicas. El grupo de antioxidantes no enzimáticos es más amplio, e incluye, entre otros, el glutatión, vitaminas (A, C y E), la melatonina, etc (Tabla II). Por otro lado, las principales enzimas antioxidantes son: la SOD, la CAT y la GPx, a las que se asocian otras enzimas que intervienen en la homeostasis del glutatión (Tabla III).

Tabla II. Principales antioxidantes no enzimáticos.		
Antioxidante	Localización	Acción
Glutati3n	Intracelular	Sustrato de la GPx, reacciona con $\cdot\text{OH}$ , $\cdot\text{O}_2^-$ y radicales libres orgánicos, regenera la vitamina C
Vitamina C	Medios celulares hidrofílicos	Depura $^1\text{O}_2$ , $\text{H}_2\text{O}_2$ , $\cdot\text{OH}$ , $\cdot\text{O}_2^-$ y $\cdot\text{NO}$ , regenera vitamina E. Puede ser prooxidante al reducir metales
Vitamina E	Membranas lipídicas y lipoproteínas	Depura $^1\text{O}_2$ , $\cdot\text{OH}$ , $\cdot\text{O}_2^-$ y $\cdot\text{NO}$ y $\text{LOO}\cdot$
Vitamina A	Membranas celulares	Depura $^1\text{O}_2$ , $\cdot\text{O}_2^-$ y $\text{LOO}\cdot$
Coenzima Q	Cadena de transporte electrónico mitocondrial	Reduce la peroxidaci3n lipídica, regenera vitamina E
Quelantes	End3genos y ex3genos	Unen metales de transici3n
Flavonoides	Ex3genos	Reaccionan con $\text{LOO}\cdot$ , $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{O}_2^-$
Ácido úrico	Amplia distribuci3n	Depura $^1\text{O}_2$ , $\cdot\text{OH}$ , $\text{HClO}$ y $\text{LOO}\cdot$ , quela metales
Glucosa	Amplia distribuci3n	Depura $\cdot\text{OH}$
Bilirrubina	Plasma, tejidos	Reacciona con $\text{LOO}\cdot$
Cisteína	Amplia distribuci3n	Dona electrones del sulfhidrilo
Melatonina	Amplia distribuci3n intra y extracelular	Depura $\text{H}_2\text{O}_2$ , $\cdot\text{OH}$ , $\cdot\text{O}_2^-$ , $\cdot\text{NO}$ , $\text{HOCl}$ y $\text{ONOO}^-$ , activa enzimas antioxidantes e inhibe enzimas prooxidantes

GPx: glutati3n peroxidasa;  $\cdot\text{OH}$ : radical hidroxilo;  $\cdot\text{O}_2^-$ : anión superóxido;  $^1\text{O}_2$ : oxígeno singulete;  $\cdot\text{NO}$ : óxido nítrico;  $\text{LOO}\cdot$ : radical peroxilo;  $\text{HOCl}$ : ácido hipocloroso;  $\text{ONOO}^-$ : anión peroxinitrito.

Tabla III. Principales antioxidantes enzimáticos.		
Enzima	Localización	Acción
SOD	Citosol y lisosomas (Cu/Zn SOD) Mitocondria (Mn SOD) Plasma	Elimina $\cdot\text{O}_2^-$ convirtiéndolo en $\text{H}_2\text{O}_2$
Catalasa	Peroxisomas y citosol	Descompone $\text{H}_2\text{O}_2$ en $\text{O}_2$ y $\text{H}_2\text{O}$
Glutati3n peroxidasa	Intracelular	Reduce $\text{H}_2\text{O}_2$ utilizando glutati3n
Glutati3n reductasa	Intracelular	Regenera el glutati3n oxidado
Cisteína-glutamato sintasa	Intracelular	Estimula la síntesis de glutati3n

SOD: superóxido dismutasa;  $\cdot\text{O}_2^-$ : anión superóxido;  $\text{H}_2\text{O}_2$ : peróxido de hidrógeno;  $\text{O}_2$ : oxígeno;  $\text{H}_2\text{O}$ : agua.

### 1.2.3.2 SISTEMAS REPARADORES

Hay enzimas que no intervienen directamente en la eliminación de radicales libres, sino que forman parte de procesos de reparación de los tejidos lesionados por el estrés oxidativo. En este sentido, la fosfolipasa A<sub>2</sub> estimulada durante la LPO, utiliza como principal sustrato las formas oxidadas de los fosfolípidos (Gutteridge 1995). Asimismo, hay enzimas proteolíticas que promueven la degradación de proteínas oxidadas (Martínez-Sánchez et al. 2005) evitando así su acumulación, ya que ésta podría resultar perjudicial para el correcto funcionamiento celular (Stadtman 2006).

### 1.2.4 CONCEPTO DE ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes a favor de las primeras, lo que genera un daño en las biomoléculas, incluidos ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos. En condiciones normales, la producción de radicales libres está contrarrestada por los mecanismos de defensa antioxidante. Entre las causas responsables del desequilibrio cabe reseñar un exceso de elementos prooxidantes, como los fenómenos de isquemia-reperusión, los traumatismos, el ejercicio físico, las toxinas, las infecciones, la exposición a radiaciones ionizantes y ultravioleta, el estrés psicológico, y numerosas patologías. También causa estrés oxidativo la deficiencia de agentes antioxidantes producida durante el curso de las enfermedades, la desnutrición y el envejecimiento. La lesión tisular dependerá de la intensidad y duración con la que actúa el estrés oxidativo y del tipo de biomolécula que se dañe (Marseglia et al. 2014; Sies 2015; Sinning et al. 2017).

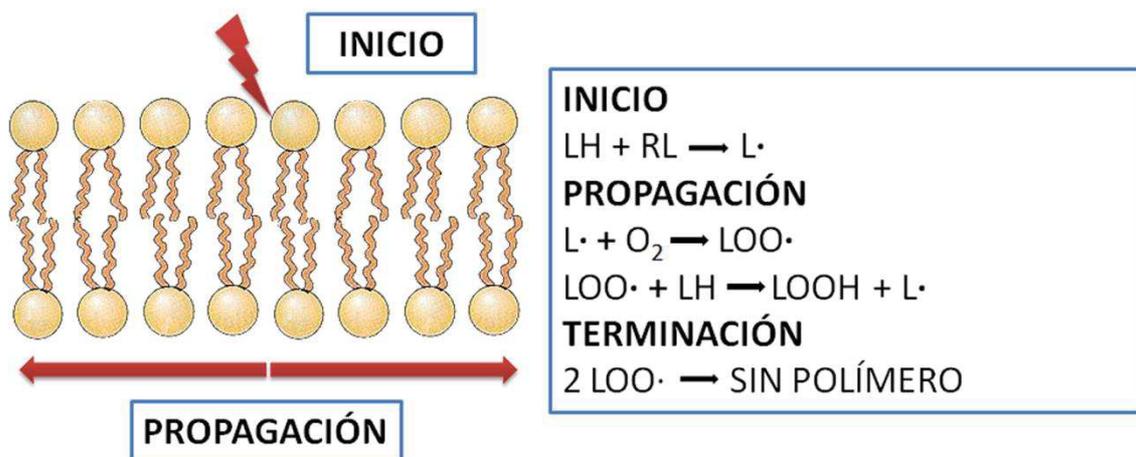
El proceso de estrés oxidativo a nivel de los lípidos de las membranas celulares se denomina LPO. Entre sus principales consecuencias destacan la alteración de la estructura de la bicapa lipídica y la disminución de la fluidez de membrana. Este fenómeno se inicia a partir de la exposición a radicales libres, LPO no enzimática, o a enzimas, LPO enzimática. Estas lesiones tienen como consecuencia la alteración de la función celular, e incluso conllevar a su muerte (Gutteridge y Halliwell 1990; Gutteridge 1995; García et al. 1997). Además, la oxidación de proteínas produce su fragmentación y la modificación de sus centros activos, lo que implica una reducción o

cese de su función. El daño oxidativo del ADN da lugar a aberraciones cromosómicas y mutaciones (Valko et al. 2007).

#### 1.2.4.1 PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Los fosfolípidos constituyen el componente estructural más abundante de las membranas biológicas. Son moléculas muy susceptibles a la oxidación, especialmente los formados por ácidos grasos poliinsaturados, ya que poseen un mayor número de dobles enlaces (Gutteridge 1995).

El proceso de LPO se divide en 3 fases: inicio, propagación y terminación (Figura 10) (Catalá 2006). La reacción comienza cuando un radical libre, ya sea  $\cdot\text{OH}$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{LO}\cdot$  y  $\text{LOO}\cdot$  ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso y le extrae un átomo de hidrógeno (Kanner et al. 1987). Esto sucede principalmente en los carbonos contiguos a los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados, y conducirá a la formación de un radical lipídico ( $\text{L}\cdot$ ), el cual interacciona con  $\text{O}_2$  generando un  $\text{LOO}\cdot$ . Éste es capaz, a su vez, de extraer otro átomo de hidrógeno de un fosfolípido adyacente formando hidroperóxido lipídico ( $\text{LOOH}$ ) y un segundo  $\text{L}\cdot$ , propagando así una reacción en cadena que se extiende por toda la membrana.  $\text{LOOH}$  puede sufrir una reducción por metales como el hierro, lo cual produce un  $\text{LO}\cdot$ , que también propaga la reacción (Buettner 1993; Catalá 2006).



**Figura 10.** Proceso de la peroxidación lipídica en una membrana biológica. LH: lípido (ácido graso insaturado); RL: radical libre;  $\text{L}\cdot$ : radical lipídico;  $\text{O}_2$ : oxígeno;  $\text{LOO}\cdot$ : radical lipídico peroxilo;  $\text{LOOH}$ : hidroperóxido lipídico.

El malondialdehído (MDA) y los 4-hidroxiálquenos (4-HDA) se producen durante la LPO y son indicadores del daño tisular dependiente de EROs. El MDA promueve la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-κB), a través de un proceso inflamatorio, el cual regula la expresión de citoquinas proinflamatorias. Los 4-HDA son factores quimiotácticos que atraen a los neutrófilos al foco de lesión (Jaeschke 1996).

La reacción sólo termina cuando los radicales libres son neutralizados por moléculas antioxidantes o bien, por el agotamiento del sustrato, lo que implica la rotura de la membrana y la muerte celular (Catalá 2006).

#### 1.2.4.2 DAÑO OXIDATIVO A PROTEÍNAS

El estrés oxidativo genera un daño considerable a nivel de las proteínas. Todos los aminoácidos que las conforman son susceptibles de lesión oxidativa, si bien los aminoácidos más sensibles son el triptófano, la histidina, la tirosina y la cisteína (Davies et al 1987a).

Dentro de las alteraciones bioquímicas que los radicales libres producen en las proteínas se incluyen la fragmentación de sus cadenas peptídicas, la formación de enlaces cruzados entre proteínas, la modificación de los puentes disulfuro y los enlaces no covalentes, como los de hidrógeno, los cambios de conformación, las oxidaciones en las cadenas laterales, la alteración de la hidrofobicidad y la adquisición de otros grupos reactivos, por ejemplo, la 3,4-dihidroxi-fenilalanina, los hidroperóxidos y los carbonilos (Dean et al. 1997; Davies 2003; Martínez-Sánchez et al. 2005). La reacción de las proteínas con los radicales libres no se puede considerar como una reacción en cadena como la LPO, aunque también se producen una serie de reacciones sucesivas (Headlam y Davies 2003).

En los procesos de daño oxidativo a proteínas se forman grupos carbonilo, que se emplean habitualmente como un indicador de daño oxidativo a las mismas. En este proceso de carbonilación proteica, se afectan principalmente algunos aminoácidos, tales como la lisina, prolina y arginina (Stadtman 2006).

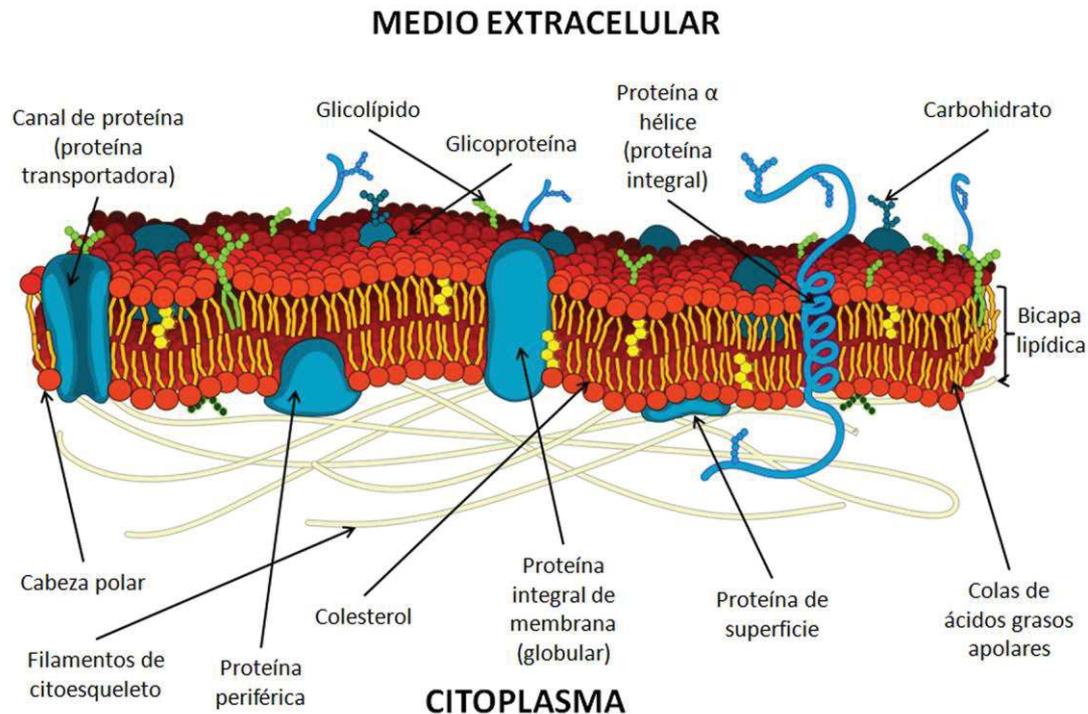
Asimismo, durante la LPO, la permeabilidad de la membrana mitocondrial aumenta debido a la pérdida de la integridad mitocondrial. Esto ocurre como resultado del agotamiento de los niveles de ATP y un aumento en las concentraciones celulares

de  $\text{Ca}^{2+}$ , que promueven una sobrecarga en el  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial. Esta disfunción da como resultado la liberación de citocromo C en el citoplasma, la posterior activación de la actividad de la caspasa y el inicio de la muerte celular apoptótica (Crompton 1999). Los cambios en la permeabilidad en la membrana mitocondrial están mediados por miembros proapoptóticos activados de la familia de proteínas Bcl-2, incluyendo Bax o Bak (Reed 1994), o es secundaria a la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm) (Baines et al. 2005; Green, 2005).

#### 1.2.4.3 EFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE LA FLUIDEZ DE LA MEMBRANA

Todas las células eucariotas animales están rodeadas por una membrana plasmática que separa el medio intracelular del exterior. Además, muchas organelas están delimitadas por membranas que, a su vez, forman multitud de compartimientos dentro de la célula. En estas membranas, tienen lugar numerosos procesos bioquímicos como la fosforilación oxidativa o la unión de ligandos con su receptor, pero su función más importante es la de servir de barrera selectiva al paso de moléculas.

Todas las membranas están formadas por una bicapa lipídica con proteínas insertadas. Los lípidos de membrana pueden dividirse en 3 categorías: 1) fosfolípidos como la fosfatidilcolina, la fosfatidilserina, la fosfatidiletanolamina, la esfingomiélin y el fosfatidilinositol; 2) esfingolípidos; y 3) esteroides. El principal constituyente de las membranas celulares son los fosfolípidos (Lingwood y Simons 2010) (Figura 11).



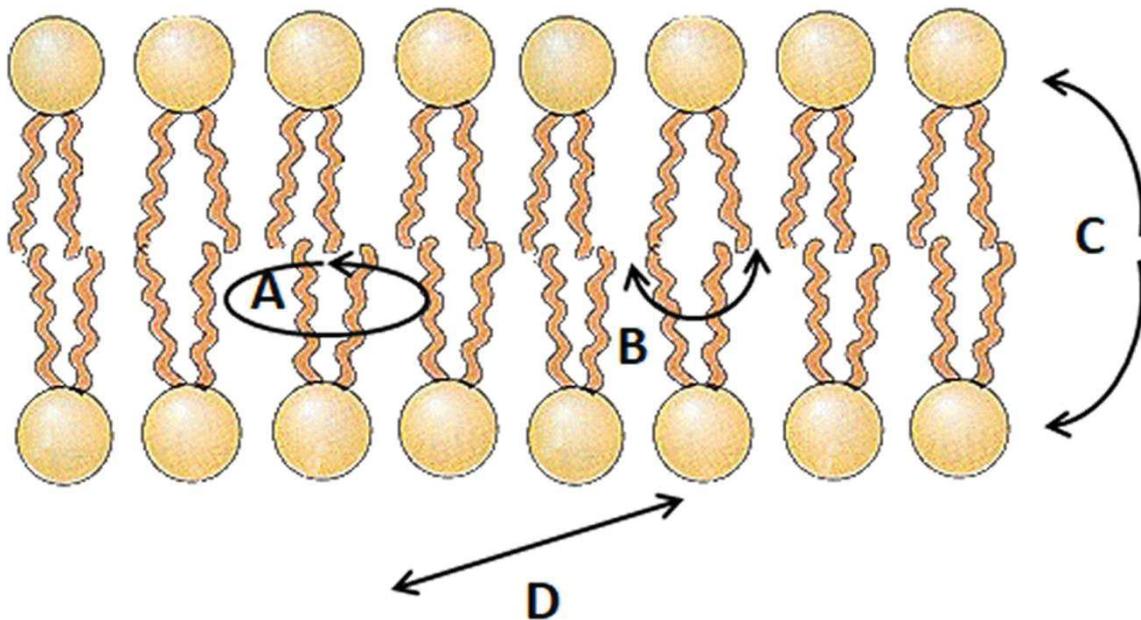
**Figura 11.** Representación esquemática de la membrana celular y sus componentes.

Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas compuestas por una zona polar o hidrofílica y otra zona no polar o hidrofóbica. Las regiones polares están orientadas hacia las superficies de las membranas como consecuencia de su atracción hacia los medios acuosos intracelular o citosol y extracelular. Por otro lado, las zonas no polares están engranadas dentro de la bicapa lipídica. Los fosfolípidos no se distribuyen de forma uniforme en la bicapa, existe una asimetría entre la hemicapa interna y la externa. Además, las membranas plasmáticas contienen gran cantidad de colesterol, mientras que las membranas de los orgánulos intracelulares contienen menos (Simons y Sampaio 2011).

La bicapa también sirve de matriz para las proteínas de membrana, cuyas funciones son, entre otras, la de transporte, constituir canales iónicos, sistemas de receptor-efector para hormonas y neurotransmisores, etc. La proporción de proteínas-lípidos varía enormemente entre las diferentes membranas celulares y tejidos. Por ejemplo, la capa interna de la membrana mitocondrial está compuesta por un 75% de proteínas mientras que las membranas miélicas de las neuronas tan sólo por un 18% (Reiter et al. 2010b). Otros elementos que forman las membranas celulares son las glicoproteínas y los glicolípidos. La parte glucídica unida de forma covalente, protruye

más allá de la bicapa y posee importantes funciones celulares, como la regulación de la inmunidad, el tono vascular, la hemostasia, etc. (van Meer et al. 2008).

Desde un punto de vista físico, la fluidez en una membrana se define como la facilidad de movimiento de sus componentes de la membrana y representa el estado de viscosidad de la misma. Los fosfolípidos constituyentes de las membranas celulares pueden desplazarse a través de la membrana, realizar giros, e incluso movimientos de una hemicapa a la otra, denominados de “flip-flop” (Figura 12). Sin embargo, otros componentes de la membrana, sobre todo aquellos con una gran parte hidrofílica, son incapaces de realizar estos movimientos (Tsuda y Nishio 2003).



**Figura 12.** Tipos de movimientos de los fosfolípidos en la bicapa lipídica. A: rotación sobre su propio eje; B: flexo-extensión de las cadenas hidrocarbonadas; C: “flip-flop” o migración de una monocapa a la otra; D: difusión lateral en el mismo plano.

La fluidez en una membrana está modulada por muchos factores, entre los que se encuentran: 1) la longitud de las cadenas de ácidos grasos: los lípidos de cadena corta son menos rígidos y más susceptibles a cambios en su energía cinética, debido a su menor peso molecular y su menor contacto con cadenas hidrófobas contiguas; 2) el grado de saturación en las cadenas de ácidos grasos: las cadenas lipídicas con uno o varios dobles enlaces son más fluidas que los lípidos saturados (Chapman 1988); 3) la concentración de colesterol en la bicapa lipídica; 4) la densidad molecular de las

proteínas en la bicapa lipídica; 5) la naturaleza de las cabezas polares: la incorporación de esfingomielinina en la membrana lipídica incrementa la rigidez de membrana (Islas 2014); 6) la temperatura: cuando los lípidos incrementan su temperatura se vuelven más móviles y, por ello, aumentan su fluidez en la membrana, mientras que, por el contrario, las bajas temperaturas incrementan la rigidez; 7) la presión; y 8) la presencia de algunas moléculas en la membrana como esteroides, vitaminas, anestésicos o barbitúricos (Hegner 1980; Shinitzky 1984).

La peroxidación lipídica de las membranas biológicas produce una gran variedad de especies oxidadas, donde la más importante es LOOH. Estos compuestos pueden degradarse a su vez en hidrocarburos, alcoholes, éteres, epóxidos y aldehídos, destacando entre estos últimos el MDA, un indicador ampliamente utilizado como marcador de estrés oxidativo en la membrana celular por su facilidad de reacción con el ácido tiobarbitúrico (Esterbauer y Cheeseman 1990). Debido a esto, el MDA es uno de los marcadores más utilizados para valorar la LPO (Zelzer et al. 2013).

Está bien demostrado que una de las consecuencias de la LPO a nivel de las membranas biológicas es el descenso de su fluidez (Curtis et al. 1984; Chen y Yu 1994). Se han propuesto diversas razones estructurales para explicar este hecho. La primera es la disminución de la proporción de ácidos grasos poliinsaturados frente a los saturados, ya que los radicales libres tienen especial afinidad por los primeros debido a que tienen un mayor número de enlaces covalentes ricos en electrones (Curtis et al. 1984; Gutteridge 1995). Otra es la formación de uniones cruzadas entre las moléculas estructurales que componen la membrana, lo que limita su movilidad y contribuye a la rigidez (Bruch y Thayer 1983; Chen y Yu 1994; De Castro et al 2007; Blair 2008). Por último, se ha observado que la oxidación de las proteínas de membrana también favorece el descenso de la fluidez de membrana (García et al. 2014). Incluso pequeños cambios en la fluidez de la membrana pueden causar aberraciones en la función celular e inducir procesos patológicos (Miana-Mena et al. 2011; Pytel et al. 2013).

## **1.3 FISIOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN**

---

La lesión por isquemia-reperfusión (I-R) es una causa importante de daño orgánico durante los procedimientos quirúrgicos, las patologías vasculares como el infarto de miocardio y los accidentes cerebrovasculares, las lesiones agudas de órganos y el shock sistémico (Esteban-Zubero et al. 2016b; Wu et al. 2018). Sin embargo, también se produce isquemia-reperfusión en circunstancias fisiológicas como la que sufre el feto en el momento del parto, la erección o la hibernación de algunos animales (Tan et al. 2005). El fenómeno de I-R se caracteriza por una restricción inicial del flujo sanguíneo a un órgano, que causa hipoxia, seguida de su restauración, que es responsable de la reoxigenación del tejido hipóxico. El último proceso produce una exacerbación del daño tisular y un aumento de la respuesta inflamatoria (Yellon y Hausenloy 2007).

La I-R desencadena una cascada de eventos, independientes de la respuesta específica a antígenos, que incluyen una disfunción microcirculatoria, que causa el fallo de la perfusión vascular y celular, la liberación de mediadores quimiotácticos proinflamatorios, que producen un infiltrado leucocitario en los tejidos, y la muerte celular por necrosis y apoptosis (Jang y Rabb 2009; Zaouali et al. 2010). La fisiopatología de la I-R también involucra al estrés oxidativo, el cual surge del desequilibrio entre la sobreproducción de radicales libres y la deficiente capacidad de defensa antioxidante (Land 2005). En este sentido se ha propuesto que los defectos en la cadena de transferencia de electrones en las mitocondrias, la activación de la xantina oxidorreductasa y el exacerbado estallido respiratorio de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) que acuden por quimiotaxis al área dañada, desempeñan papeles importantes en la generación excesiva de radicales libres (Casillas-Ramírez et al. 2006; Zaouali et al. 2010; García-Gil et al 2011).

### **1.3.1 DAÑO POR ISQUEMIA**

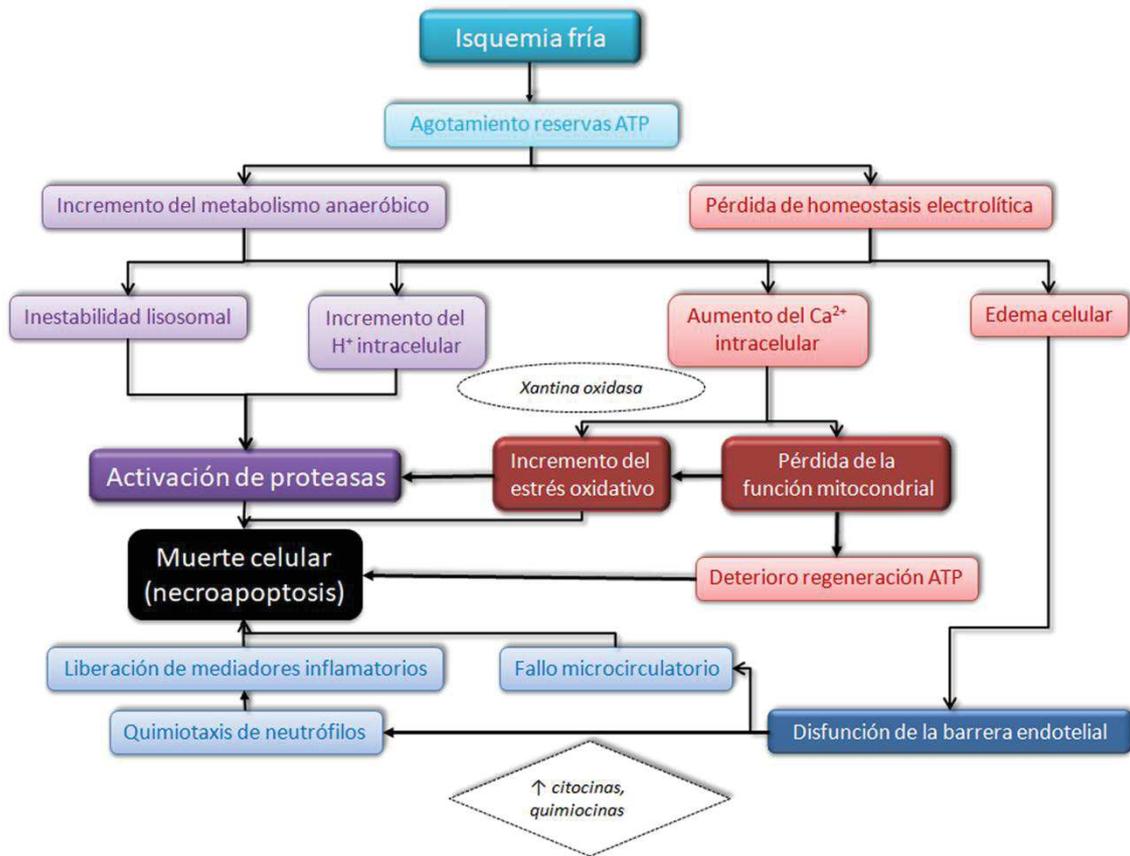
La obstrucción del flujo arterial implica el cese del aporte de oxígeno y del curso de la fosforilación oxidativa, lo que conduce a la disfunción de la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias. Como consecuencia, la disminución de la producción predominante de ATP mitocondrial potencia la anaerobiosis. El

metabolismo anaeróbico genera una acidificación por el acúmulo de metabolitos como el ácido láctico. El descenso de los niveles de ATP también hace que la adenosina se degrade, acumulándose hipoxantina y xantina oxidasa (Teoh 2011; Zhai et al. 2011; Kanoria et al. 2012). Además, se alteran los mecanismos de transporte transmembrana, lo que modifica la homeostasis electrolítica celular. Al detenerse la bomba sodio-potasio por falta de ATP, se acumula sodio en el interior de la célula que arrastra agua para alcanzar el equilibrio osmótico, lo que produce edema intracelular. Asimismo, un nivel más alto de sodio en las células disminuye la actividad de las bombas intercambiadoras de sodio-hidrógeno, exacerbando la acidosis intracelular. La alteración en la permeabilidad de la membrana también aumenta el calcio intracelular. La introducción de calcio en la célula se ve favorecida, además, por la alteración de la bomba  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico, que intenta compensar el aumento de  $\text{Na}^+$  intercambiándolo por  $\text{Ca}^{2+}$  del exterior. El exceso de calcio activa las fosfolipasas, cuya acción sumada a las anteriores producen necrosis celular. Además, la acidosis altera la actividad enzimática y produce aglutinación de la cromatina nuclear. La falta de ATP produce disfunción de los ribosomas y, por ello, disminuye la síntesis de proteínas (Kanoria et al. 2012; Ornellas et al. 2017; Wu et al. 2018). Sin embargo, otras células mueren por apoptosis inducida por la isquemia. Ésta se inicia por mecanismos tales como la interacción entre ligandos y receptores, el propio estrés oxidativo, la presencia de factores de crecimiento, la disfunción mitocondrial y las alteraciones de la matriz celular. En este sentido, se ha descrito la presencia de múltiples proteínas proapoptóticas en el espacio intermembranal de las mitocondrias hepáticas, y la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, que produce la isquemia-reperfusión, lleva a la secreción de estos mediadores en la célula. En cualquier caso, para poner en marcha los fenómenos apoptóticos es necesario un umbral de concentración de ATP, si existe una depleción total o infraumbral, la muerte de la célula se produce por necrosis (Zaouali et al. 2010).

Finalmente, el descenso o cese en la perfusión vascular generado produce hemoconcentración intravascular y un desequilibrio entre los mediadores vasoactivos endotelina (ET) y  $\text{NO}\cdot$ , generándose un efecto vasoconstrictor, proliferación de células del músculo liso vascular y trombosis (Scheinichen et al. 2003; Ramalho et al. 2006).

### 1.3.2 DAÑO POR REPERFUSIÓN

El restablecimiento del flujo sanguíneo aporta de nuevo el oxígeno al órgano hipóxico, a la vez que favorece la movilización de los metabolitos tóxicos acumulados, lo que puede producir daño tisular a distancia del injerto (Lo et al. 2009). La lesión por reperfusión implica mecanismos citotóxicos directos e indirectos que incluyen la activación de la respuesta inmune causada por la liberación de mediadores inflamatorios. Hay un aumento de la producción de prostaglandinas, liberación de factor de TNF- $\alpha$ , interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), interleucinas, leucotrieno B y factor activador de los trombocitos, que favorecen la quimiotaxis de los neutrófilos y aumentan su adherencia al endotelio vascular, produciendo alteraciones de la microcirculación por taponamiento, que se suman a la disfunción endotelial causada por el aumento en la producción de NO $\cdot$  por la iNOS, favoreciendo la excesiva dilatación, la fuga vascular y el daño tisular (Turina et al. 2006; Lutz et al. 2010; Zhai et al. 2011; Ornellas et al. 2017). En paralelo, prevalecen las EROs debido a una menor concentración de los mecanismos antioxidantes en las células isquémicas, la activación de la xantina oxidasa por acúmulo de los productos de degradación del ATP y la acidificación del medio. Las EROs ( $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $^1\text{O}_2$ ) causan estrés oxidativo que promueve la disfunción endotelial, daño en el ADN y respuestas inflamatorias locales (Figura 13). Asimismo, inician el proceso de oxidación lipídica y proteica, por lo que se puede alterar la fluidez y permeabilidad de las membranas celulares normales causando edema celular, sobrecarga masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  y lisis celular (Korkmaz et al., 2009; Negre-Salvayre et al., 2010).



**Figura 13.** Fisiopatología del daño por isquemia-reperfusión. La isquemia fría induce la depleción de ATP celular que ha tenido lugar como consecuencia de la pérdida de la homeostasis electrolítica y aumenta el metabolismo anaeróbico promoviendo la acumulación intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{H}^+$  y la inestabilidad lisosómica. Estos eventos inhiben la fosforilación oxidativa mitocondrial, reduciendo así la síntesis de ATP y activando las proteasas. La perturbación de la homeostasis electrolítica genera edema celular, que da como resultado el fallo microcirculatorio a través de la disfunción de la barrera endotelial. Estas alteraciones también contribuyen a la acumulación de neutrófilos mediante la inducción de quimiotaxis de neutrófilos y moléculas de adhesión. La extravasación de neutrófilos genera lesión parenquimatosa debido a la producción de EROs. Finalmente, la muerte celular culmina en la necrosis y apoptosis, dependiendo de la disminución del ATP celular.

### 1.3.3 PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

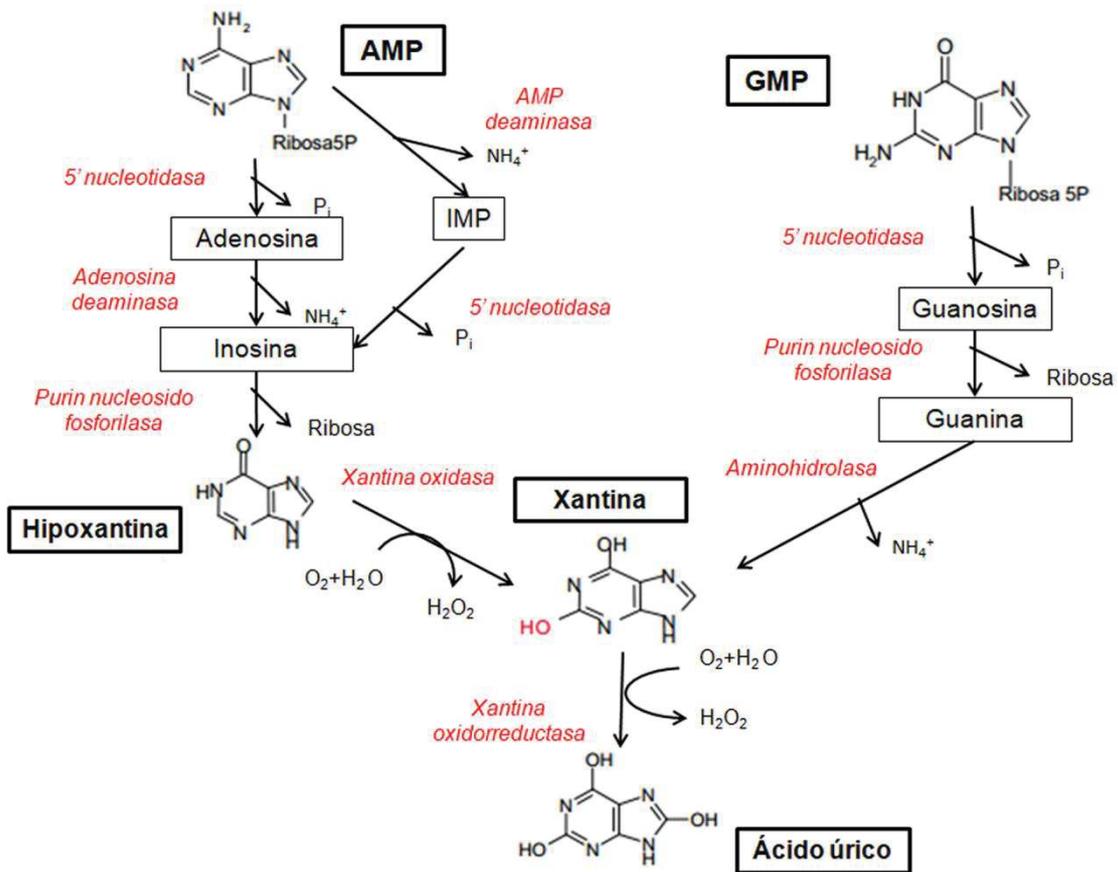
El estrés oxidativo se puede producir a partir de fuentes enzimáticas y no enzimáticas. Las primeras incluyen el sistema xantina oxidasa, el de la NADPH oxidasa, la cadena de transporte de electrones mitocondrial y el sistema de la NOS. Estos sistemas se encuentran ampliamente distribuidos en el organismo, incluyendo el intestino, pulmón, corazón, cerebro, músculo, hígado, páncreas, corazón, aorta y células endoteliales (Moens et al. 2008; Perkins et al. 2012; De Pascali et al. 2014; Granger y Kvietys 2015). Por otro lado, las fuentes no enzimáticas son una causa

menor de estrés oxidativo en la I-R e incluyen la hemoglobina y la mioglobina, especialmente en el daño extremo (Wu et al. 2018).

#### 1.3.3.1 MECANISMOS DE INDUCCIÓN DEL SISTEMA XANTINA OXIDASA

Las xantinas oxidorreductasas son molibdo-flavoenzimas complejas que desempeñan un papel clave en el catabolismo de las purinas. Estas enzimas, que incluyen la xantina deshidrogenasa y la xantina oxidasa, oxidan la hipoxantina en xantina y ésta en ácido úrico, respectivamente. En las células sanas, el metabolismo de las purinas puede iniciarse por dos vías principales. En la primera, el ATP, una purina importante para muchas reacciones enzimáticas que requieren energía, puede convertirse desde su forma adenosín monofosfato (AMP), en inosín monofosfato por acción de la adenosina deaminasa y formar inosina después de la desfosforilación. La purina puede convertirse en adenosina, perdiendo un grupo fosfato, y también en inosina. Posteriormente, la inosina es transformada en hipoxantina y oxidada en xantina. La xantina también puede ser sintetizada por una segunda vía, a partir de la guanina, que se genera a partir del monofosfato de guanosina. Finalmente, a través de la actividad de xantina oxidorreductasa, la xantina se convierte en ácido úrico (Figura 14). En el metabolismo de las purinas, hay muchas enzimas involucradas en la conversión a ácido úrico. Las xantinas oxidasas son particularmente importantes, ya que su actividad está relacionada con la producción de EROs. Estas enzimas tienen dos formas: la xantina deshidrogenasa, que preferentemente utiliza nicotinamida adenina dinucleótido ( $\text{NAD}^+$ ) como aceptor de electrones, y la xantina oxidasa, que tiene al  $\text{O}_2$  como aceptor. Durante la oxidación de la hipoxantina en xantina en las células sanas, hay una reducción simultánea de  $\text{NAD}^+$  u  $\text{O}_2$ , y producción de NADH por la xantina deshidrogenasa (Chung et al. 1997). En la isquemia, la xantina deshidrogenasa se desplaza a xantina oxidasa debido a un nivel de ATP más bajo, la oxidación de importantes cisteínas y/o la limitada proteólisis. Cuando el flujo sanguíneo se restablece en el tejido isquémico, la xantina oxidasa interactúa con  $\text{O}_2$  para inducir a la hipoxantina para formar xantina y ácido úrico, usando oxígeno como el aceptor de electrones. Durante la formación de xantina y ácido úrico, se genera  $\cdot\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , los cuales incrementan el estrés oxidativo. Las EROs producidas por la xantina oxidorreductasa generan cascadas de citoquinas y condiciones patológicas a través de

la expresión de proteínas de adhesión, como la P-selectina y la molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1) (Lee et al. 2014).



**Figura 14.** Mecanismo de formación del ácido úrico a partir de AMP y GMP. El AMP se convierte en inosina por 2 vías diferentes. Ambas se caracterizan por una desfosforilación y la acción de una enzima deaminasa (la adenosina deaminasa cuando se genera adenosina como sustrato intermedio o la AMP deaminasa cuando es IMP). Una vez formada la inosina, se convierte en hipoxantina y, gracias a la acción de la xantina oxidasa, se genera xantina. Por otro lado, la xantina puede formarse a partir de GMP. En este proceso, se forma guanina a partir de guanosina mediante un proceso desfosforilativo. Una vez generada la xantina por cualquiera de estas 2 vías, ésta se transforma en ácido úrico a través de la acción de la enzima xantina oxidoreductasa. AMP: adenosín monofosfato; IMP: inosín monofosfato;  $\text{NH}_4^+$ : amonio;  $\text{P}_i$ : fósforo;  $\text{O}_2$ : oxígeno;  $\text{H}_2\text{O}$ : agua;  $\text{H}_2\text{O}_2$ : peróxido de hidrógeno.

### 1.3.3.2 MECANISMO DE INDUCCIÓN DEL SISTEMA NADPH OXIDASA

La familia NOX/DUOX de las NADPH oxidasas, compuesta de complejos multiproteicos (NOX-1, NOX-2, NOX-3, NOX-4 y NOX-5) y oxidasas duales (DUOX-1 y DUOX-2), producen EROs durante la I-R (Bedard y Krause 2007; Nakagiri et al. 2007; Yokota et al. 2011; Simone et al. 2014; Ma et al. 2017). Estructuralmente, las enzimas NOX están formadas por seis dominios transmembrana con dos histidinas en los dominios III y V que abarcan dos grupos hemo (Brandes et al. 2014). Los dominios de

unión de la flavín adenín dinucleótido (FAD) y NADPH están localizados en el extremo terminal citoplasmático -COOH de las enzimas NOX (Bedard y Krause 2007). El aceptor final de estas enzimas es el oxígeno, y el proceso se realiza a través de la NADPH, FAD y grupos hemo (Sedeek et al. 2013).

Las enzimas NOX producen  $\cdot\text{O}_2^-$ , que posteriormente se transforma en  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El anión superóxido cruza las membranas a través de los poros de los canales de aniones e interacciona con la tirosina y con el NO para formar el ONOO $\cdot$ . También reduce los centros de hierro dentro de la aconitasa y alcaliniza los orgánulos intracelulares. Por otro lado, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  pasa a través de la membrana para oxidar la cisteína, inactivar las tirosín-fosfatasas y la calcineurina, causando toxicidad celular (Bedard y Krause 2007). La hipoxia también induce el factor inhibidor de la hipoxia-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) para promover activación de las enzimas NOX. El estrés oxidativo incrementa la producción de HIF-1 $\alpha$  para establecer un ciclo de retroalimentación positiva. Además, tras la reperfusión, las células liberan mediadores químicos que activan el sistema NADPH oxidasa, incluyendo la fosfolipasa A $_2$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  y angiotensina II. La liberación de la fosfolipasa A $_2$  promueve la producción del factor activador de plaquetas, con lo que aumentan los niveles tisulares de tromboxano y leucotrienos, y aparece la inflamación local (Carden y Granger 2000; Fraser 2011). Las EROs derivadas de las enzimas NOX en el tejido post-isquemia pueden causar la acumulación de células inflamatorias, originando la lesión por reperfusión en una gran variedad de órganos, incluyendo el corazón, cerebro, intestino, estómago, pulmón y músculo esquelético (Mousa et al. 1990; Linas et al. 1995; Yoshida et al. 1995). Además, las citoquinas producidas por los macrófagos y los mastocitos promueven la sobreexpresión de la NADPH oxidasa (Barth et al. 2009). A su vez, su expresión también se ve incrementada por la angiotensina II, lo que da como resultado una lesión por isquemia-reperfusión a través de la enzima convertidora de angiotensina (Nakagiri et al. 2010).

### 1.3.3.3 MECANISMO DE INDUCCIÓN DE NOS

Todos los tipos de NOS producen NO $\cdot$  por la conversión de L-arginina en L-citrulina. NO $\cdot$  también juega un papel protector a través de sus funciones antioxidante y antiinflamatoria (Albrecht et al. 2003; Shah y Kamath 2003). Sin embargo, durante la hipoxia, la NOS se desacopla y produce EROs, responsables de la lesión por I-R. La

estructura de la NOS consiste en una oxigenasa que contiene un grupo hemo y tetrahidrobiopterina (BH4) unidas a arginina, y un dominio reductasa, que contiene flavinas: FAD y flavín mononucleótido (FMN), que se unen a NADPH. La BH4 es un cofactor sintetizado a partir de guanosina 5-trifosfato (GTP) a través de la vía GTP ciclohidrolasa I, dihidrobiopterina (BH2), y sepiapterina reductasa (Tatham et al. 2009; Crabtree y Channon 2011; Kietadisorn et al. 2012). La concentración de BH4 juega un papel crítico en la producción de NO· al regular la actividad de eNOS. Sin embargo, en la lesión por isquemia-reperfusión, el estrés oxidativo oxida BH4 disminuyendo así sus niveles tisulares. La disminución de la relación BH4/NOS causa desacoplamiento de la NOS y genera  $\cdot O_2^-$ , lo que puede dar como resultado la muerte celular.

En el hígado, eNOS libera pequeñas cantidades de NO· y se encuentra sólo en las células endoteliales de los sinusoides hepáticos y su actividad está regulada por la concentración intracelular de calcio. Por otro lado, iNOS sintetiza grandes cantidades de NO· y su producción está regulada en todas las células hepáticas y se genera en respuesta al incremento de los mediadores inflamatorios. Además, se ha sugerido que eNOS es un importante factor protector contra la fisiopatología del endotelio vascular y se sugiere que iNOS promueve la lesión isquémica al aumentar la formación de radicales libres. Esto es así dado que el NO· derivado de eNOS se genera de forma temprana y puede anular el daño por estrés al injerto y durante la reperfusión. Por el contrario, el NO· derivado de iNOS se genera varias horas después de la estimulación, debido a que los requisitos de inducción transcripcional de esta isoforma y su producción no son beneficiosas en este momento tardío (Albrecht et al. 2003; Shah y Kamath 2003).

#### **1.3.4 ISQUEMIA-REPERFUSIÓN HEPÁTICA**

La isquemia vascular puede ser de dos tipos: caliente o fría. La primera, a nivel hepático, se debe a la deficiencia de oxígeno causada por oclusión vascular o secundaria a un shock hemorrágico. La isquemia fría se observa durante el trasplante de hígado en el cual el injerto se somete a ambos tipos de isquemia, debido a la resección hepática tras la oclusión y la preservación posterior en medio frío, seguido de una fase de reperfusión caliente durante el implante del órgano en el receptor (Jaescke y Woolbright 2012; Cursio et al. 2015). Los mecanismos fisiopatológicos de

ambos modelos de I-R difieren. Mientras que en el modelo de I-R caliente el daño primario se produce en los hepatocitos, en la I-R fría la lesión principal reside en las células del revestimiento sinusoidal. De hecho, en la I-R fría, la mayoría de los hepatocitos son viables tras las primeras 48 horas de isquemia fría, mientras que a nivel de las células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSEC) se establece un daño severo que afecta hasta el 50% de estas células, siendo consideradas como no viables (Caldwell-Kenkel et al. 1989). Es importante tener en cuenta que la lesión por I-R representa la razón principal de disfunción del injerto hepático postrasplante, independientemente de las características basales del hígado (Mendes-Braz et al. 2012).

Hay dos factores clave que afectan a la severidad de la lesión hepática por I-R: el tiempo de exposición a la isquemia y el porcentaje de isquemia aplicada, es decir, la duración de la isquemia y si se realiza una isquemia total o parcial (Hasselgren et al. 1982; Clemens et al. 1985). En la isquemia parcial, se produce el denominado "fenómeno de robo". Éste consiste en que, a diferencia de la isquemia total, si la isquemia afecta sólo a los lóbulos izquierdo y mediano, un 70% de la isquemia total, el flujo hepático se desvía totalmente a través de los lóbulos derechos, incluso tras retirar el clampaje vascular, lo que supone que una cantidad significativa del flujo sanguíneo sigue desviado o "robado" por los lóbulos derechos. Este fenómeno finaliza cuando la resistencia vascular de los lóbulos post-isquémicos disminuye, y es debido a que la sangre fluye con más facilidad a través del lecho vascular con menor resistencia. Por lo tanto, la recuperación del flujo sanguíneo hepático tras la reperfusión de los lóbulos post-isquémicos es mucho más tardía en el caso de la isquemia hepática parcial (Anderson et al. 1984).

Los hepatocitos se ven muy afectados durante la I-R, especialmente cuando la isquemia es caliente. La gravedad del daño depende del tiempo de duración de la isquemia. Los períodos cortos de isquemia, inferiores a 90 minutos, dan como resultados una lesión celular reversible en la que el consumo de oxígeno hepático se restablece completamente a niveles normales tras la reperfusión. Sin embargo, la reperfusión tras periodos más prolongados de isquemia, 90-180 minutos, conllevan a la aparición de lesiones irreversibles. Por lo tanto, se considera que 90 minutos de isquemia caliente es el límite de tiempo estimado para la supervivencia de los

hepatocitos (González-Flecha et al. 1993). En la isquemia fría, aunque hay modelos *in vitro* que proponen que la viabilidad de los hepatocitos es posible incluso hasta 72 horas después de su inicio (Pazo et al. 2002), en modelos de trasplante hepático se considera que periodos de isquemia fría superiores a las 24 horas ya pueden provocar la inviabilidad del injerto (Fernández et al. 2002).

La mayoría de los cambios tempranos en los hepatocitos anóxicos ocurren a nivel mitocondrial. La falta de O<sub>2</sub> genera un descenso funcional de la cadena respiratoria. Dado que las mitocondrias no son capaces de aceptar electrones, se produce una reducción en los nucleótidos de piridina, lo que resulta en un aumento en la relación intracelular NADH/NAD<sup>+</sup>. El cese de la fosforilación oxidativa conlleva al descenso de los niveles de ATP celulares, la aceleración de la glucólisis, el aumento del lactato y las alteraciones en la homeostasis de H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, y Ca<sup>2+</sup>, que inducen graves daños a los hepatocitos (Caraceni et al. 2005).

Las LSEC son unas células aplanadas que carecen de una membrana basal organizada y están perforadas por fenestraciones abiertas que forman cúmulos llamados placas de tamiz, haciendo que el hígado posea un endotelio microvascular discontinuo (Peralta et al. 2013). Estas células desempeñan un papel protector esencial al controlar la homeostasis vascular, la inflamación, el tono vascular y la eliminación de tóxicos. Caldwell-Kenkel et al. (1988) postularon la teoría de que las LSEC son particularmente vulnerables a las lesiones generadas durante la I-R fría. Actualmente se sabe que el daño endotelial hepático producido durante la preservación fría representa el factor inicial que conduce a la lesión por I-R hepática, determinando una mala microcirculación del injerto, activación plaquetaria, vasoconstricción persistente, activación de las moléculas de adhesión, estrés oxidativo, activación de las células de Kupffer (KC), infiltración de neutrófilos y, finalmente, muerte hepatocelular (Peralta et al. 2013). Estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado que la viabilidad de las LSEC se compromete de forma significativa tras 8-16 horas de preservación fría (Reinders et al. 1996; Russo et al. 2012). Además, dada la estrecha relación funcional que tienen con los hepatocitos, se ha observado que la prevención del daño mediado por I-R en las LSEC mejora la actividad de los hepatocitos (Kukan y Haddad 2001; Vajdová et al. 2002).

Durante la isquemia, la falta de sustrato energético interfiere con el transporte transmembrana, generando edema en las KC y LSEC (Vollmar et al. 1994). Este hecho, junto con el desequilibrio generado entre la baja biodisponibilidad de NO y la producción exacerbada de ET y tromboxano A<sub>2</sub>, contribuye al estrechamiento de la luz sinusoidal y, por lo tanto, a la disfunción a nivel de la microcirculación. La disminución de los niveles de NO en el hígado durante la I-R es consecuencia de su conversión en ONOO<sup>-</sup> tras su combinación con ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> así como a los niveles elevados de EROs, lo que modula la intensidad de la lesión por I-R a través de la regulación de la adhesión de neutrófilos, la agregación plaquetaria y la disminución de los adipocitos o células estrelladas hepáticas (HSC) (Clemens 1999; Serracino-Inglott et al. 2001). Estudios recientes han demostrado que durante la preservación fría, la falta de estímulos biomecánicos deteriora notablemente la capacidad protectora de las LSEC debido al descenso de la expresión del factor de transcripción Kruppel-like 2 (KLF2), el cual dirige la transcripción de una variedad de genes protectores, incluyendo eNOS, la trombomodulina antitrombótica y el factor de transcripción antioxidante Nrf2 (Gracia-Sancho et al. 2010).

Concomitantemente a la disregulación de las LSEC, las KC sufren un proceso de activación debido a las señales de estrés endógeno promovidas por los hepatocitos contiguos denominadas patrones moleculares asociados a peligro (DAMP), liberadas por el daño isquémico y, en condiciones de sepsis o endotoxemia, también debida a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) (Van Bossuyt y Wisse 1988; Huang et al. 2011). Las KC activadas incrementan significativamente la liberación de EROs y citoquinas proinflamatorias, incluyendo TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12, e IFN- $\gamma$  (Lentsch et al. 2000). TNF- $\alpha$  e IL-1 incrementan la actividad del receptor Mac-1 (CD11b/D18) en las proteínas de adhesión de neutrófilos e inducen la síntesis de IL-8, lo que promueve aún más la quimiotaxis de neutrófilos dentro del parénquima (Witthaut et al. 1994). Además, IL-1 tiene la capacidad para estimular la liberación de EROs por los neutrófilos, lo que incrementa la síntesis de TNF- $\alpha$  por las KC (Perry et al. 2011). TNF- $\alpha$  estimula la expresión de ICAM-1 y P-selectina en las LSEC, lo que induce el reclutamiento de neutrófilos (Peralta et al. 2001; Perry et al. 2011), y la expresión de la IL-6, la proteína inflamatoria de macrófago-2 (MIP-2), la proteína de activación de neutrófilos epiteliales-78 (ENA-78) y de la molécula quimioatrayente de neutrófilos

inducidos por citoquinas-1 (CINC-1). Además, IL-1 y TNF- $\alpha$  reclutan y activan a los linfocitos T CD4+, que producen el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), IFN- $\gamma$  y el factor de necrosis tumoral beta (TNF- $\beta$ ). Estas citoquinas amplifican la activación de las KC y promueven el reclutamiento de neutrófilos y la adherencia a los sinusoides hepáticos (Teoh y Farrell 2003; Casillas-Ramírez et al. 2006).

Los receptores Toll-like (TLR) son una familia de receptores transmembrana que desempeñan un papel crítico en la respuesta inmune innata durante el daño por I-R hepática (Akira et al. 2006). TLR4 se ha observado que reduce los niveles de aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) sérica, TNF- $\alpha$  y mieloperoxidasa (MPO), un marcador de la acumulación de neutrófilos. Además, TLR4 limita la lesión hepatocelular histológica y reduce la expresión de la actividad de genes proinflamatorios después del daño por I-R en ratones mutados con defecto en la señalización de TLR4 (Wu et al. 2004; Zhai et al. 2004; Tsung et al. 2005). La hemo oxigenasa (HO) es la enzima limitante de la velocidad en la degradación del grupo hemo, que da como resultado la formación de monóxido de carbono, biliverdina y liberación de hierro. HO-1 es la forma inducible de la enzima y juega un papel protector significativo contra los procesos inflamatorios y la lesión oxidativa del tejido a través de sus funciones antioxidantes y antiinflamatorias. Se ha observado que TLR4 es un represor de HO-1 en el daño por I-R hepático no infeccioso (Shen et al. 2003; Zhu et al. 2011).

El grupo de alta movilidad box-1 (HMGB1) es un DAMP endógeno secretado durante procesos hipóxicos o inflamatorios que activan los TLR hepáticos durante la I-R (Tsung et al. 2007). Como resultado, las EROs liberadas por las KC en la matriz extracelular reclutan linfocitos T CD4+ que atraen CD154 al sitio de la lesión. CD154 puede activar recíprocamente a las KC de una manera dependiente de CD40, lo que conduce a un aumento adicional en la producción de EROs (Hanschen et al. 2008, Quesnelle et al. 2015). Además, se ha demostrado que el gen de respuesta primaria de diferenciación mielóide-88 (MyD88) genera un daño hepatocelular mediado por TLR4 debido a la activación de KC y células dendríticas por DAMP en la fase temprana de daño hepático a través del efecto citotóxico directo de la TNF- $\alpha$  soluble (Cavassani et al. 2008).

La cinasa c-Jun-N-terminal (JNK) participa en la regulación del metabolismo y las respuestas inflamatorias e inmunitarias. Se ha sugerido que su alteración es un factor importante en la patología del daño por I-R (Johnson y Nakamura 2007; Huang et al. 2009). La JNK está relacionada con la I-R hepática mediada por TLR4 (Wang et al. 2007). Además, las EROs pueden activar la JNK y promover la muerte celular de los hepatocitos mediante la producción de citocinas proinflamatorias (Fan et al. 2004).

Por último, las plaquetas también juegan un papel importante en el daño por I-R hepática. De hecho, en respuesta a esta lesión, las plaquetas sintetizan y liberan varios factores que intervienen durante el trasplante y la regeneración hepática (Lesurtel et al. 2006). Estos incluyen el factor activador de plaquetas, citocinas, y factores de crecimiento tales como NO, factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), serotonina y calpaína. El factor activador de plaquetas, que también puede ser producido por las KC y las LSEC, aumenta la capacidad de los neutrófilos para la generación de EROs y la liberación de leucotrieno B<sub>4</sub>, amplificando así la respuesta de los neutrófilos (Jaeschke, 2003). Además, las plaquetas también pueden adherirse a los sinusoides hepáticos e inducir apoptosis de las LSEC a través de la producción de NO $\cdot$  y ONOO $^-$  (Sindram et al. 2000).

## 1.4 UTILIDAD DE LA MELATONINA EN EL DAÑO POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

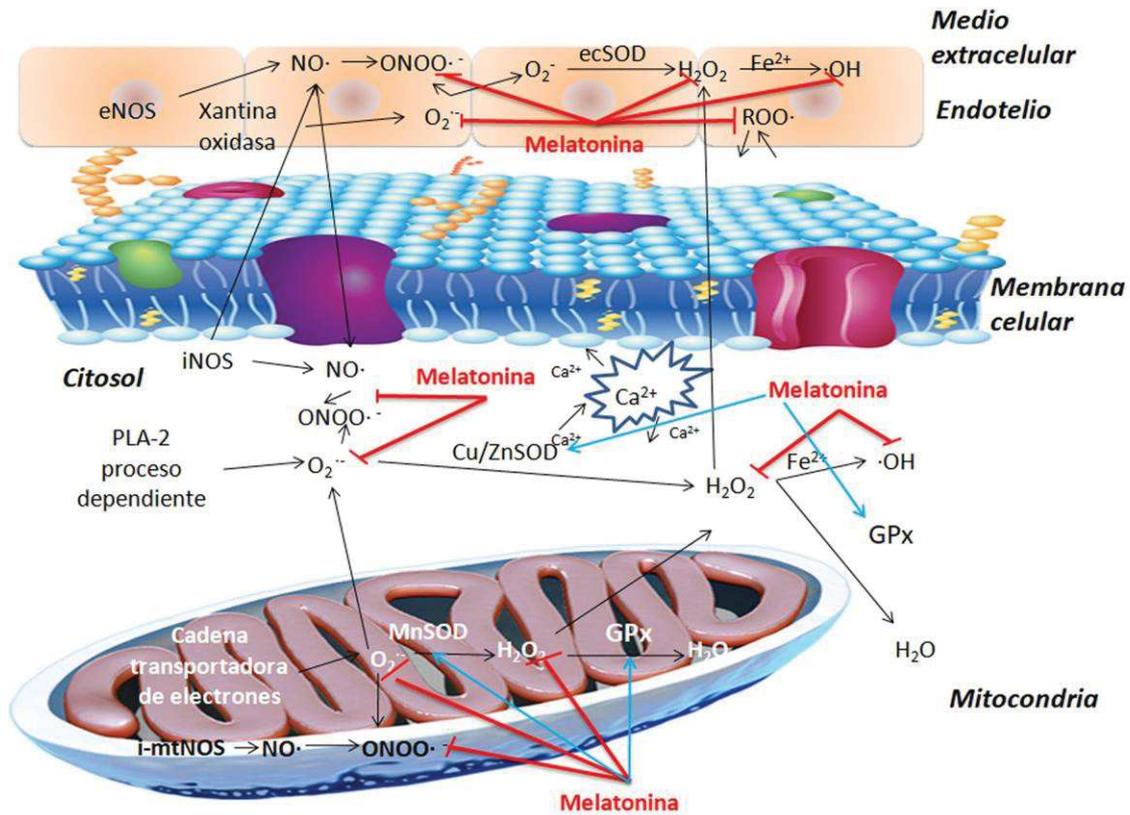
---

La melatonina tiene capacidad antioxidante mediante mecanismos directos e indirectos. Estos efectos pueden apreciarse a nivel endotelial, mitocondrial, del citosol y del medio extracelular. A nivel endotelial, la xantina oxidasa genera  $\cdot\text{O}_2^-$ , degradando la xantina a hipoxantina, siendo la melatonina un neutralizador directo (Karabulut-Bulan et al. 2015). Por otro lado, en el medio extracelular y a nivel mitocondrial, la melatonina elimina ONOO $^-$ , generado como resultado de la unión de  $\cdot\text{NO}$  con  $\cdot\text{O}_2^-$  (Hardeland 2017). Además, el  $\cdot\text{O}_2^-$  reacciona con la superóxido dismutasa extracelular (ecSOD) y da lugar a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que sufre una reducción con Fe<sup>2+</sup> generando  $\cdot\text{OH}$ , el cual es neutralizado de forma directa por la melatonina. La melatonina también tiene un efecto antioxidante indirecto al aumentar las actividades de SOD y GPx. Procesos similares se observan en el citosol y las mitocondrias con la actividad de otras SOD,

como la MnSOD y la Cu/ZnSOD (Hardeland 2017; Arora y Bhatla 2017). Otra acción indirecta de la indolamina, es la capacidad de estimulación de la GPx, la cual reduce el  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$  (Swiderska-Kořacz et al. 2006).

La indolamina también preserva el estado funcional y energético de las células durante la I-R al reducir las concentraciones de  $\text{TNF-}\alpha$  e inhibir la expresión de iNOS y la producción de  $\text{NO}\cdot$ . Concretamente, aumenta los niveles de ARNm de eNOS, mientras que reduce la elevación de los niveles de ARNm de iNOS (Rodríguez-Reynoso et al. 2001; Kilic et al. 2005; Wang et al. 2005). Esto es importante porque se ha sugerido que, el  $\text{NO}\cdot$  derivado de eNOS, es un factor de protección importante contra la lesión del endotelio vascular por su capacidad de regulación del diámetro sinusoidal, la prevención de la adhesión de neutrófilos, la inhibición de la agregación y adhesión de plaquetas, y la eliminación de especies reactivas de oxígeno. Además, el  $\text{NO}\cdot$  derivado de eNOS atenúa el descenso de perfusión sinusoidal, mejorando la oxigenación del tejido hepático y contrarrestando los efectos vasoconstrictores transitorios de las endotelinas sintetizadas durante las primeras etapas de la reperfusión (Ramalho et al. 2006). Por otro lado, iNOS promueve la lesión isquémica generando cambios en el tono vascular sistémico y la reactividad que conducen a hipotensión y shock circulatorio. Además, la generación de peroxinitrito, un potente oxidante, formado por la reacción de  $\text{NO}\cdot$  con el anión superóxido, también podría causar daño celular a través de la peroxidación lipídica, la inhibición directa de las enzimas mitocondriales de la cadena respiratoria, la inhibición de la actividad de la membrana ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , y la modificación oxidativa de proteínas como la formación de nitrotirosina. Además, durante el daño por I-R, se produce un agotamiento del ATP y se produce un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  celular que aumenta el estrés oxidativo y la pérdida de la función mitocondrial (Glantzounis et al. 2005).

La figura 15 resume algunos de los principales procesos en los que la melatonina puede actuar protegiendo frente a la I-R.



**Figura 15.** Efectos directos de melatonina (rojo) e indirectos (azul). Las acciones directas son debidas a su capacidad “scavenger” de radicales libres. Por otro lado, sus acciones indirectas se basan en la estimulación de enzimas antioxidantes como la SOD (incluyendo sus diferentes isoformas MnSOD, Cu/ZnSOD) y la glutatión peroxidasa (GPx), la cual reduce el  $H_2O_2$  a  $H_2O$  y  $O_2$ .

$\cdot O_2^-$ : radical superóxido;  $\cdot OH$ : radical hidroxilo;  $H_2O_2$ : peróxido de hidrógeno;  $\cdot NO$ : óxido nítrico;  $ROO\cdot$ : radical alquil peroxilo;  $ONOO\cdot$ : peroxinitrito; eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial; i-mtNOS: óxido nítrico sintasa inducible mitocondrial; iNOS: óxido nítrico sintasa inducible; PLA-2: fosfolipasa  $A_2$ .

Fuente figura: Esteban-Zubero et al. 2016c.

El efecto protector de la melatonina por el daño por I-R también ha sido estudiado en modelos de hígado graso, en los que se aplicó 35 minutos de isquemia caliente y 36 horas de reperfusión (Kireev et al. 2013). Se observó que la melatonina disminuyó la lesión hepática preservando los niveles de transaminasas hepáticas y ATP hepático así como disminuyendo los marcadores de apoptosis y estrés oxidativo, por lo que concluyeron que la indolamina podría mejorar los resultados en pacientes sometidos a trasplante de hígado que reciben un injerto de hígado graso.

En modelos animales, se ha observado que 0,5 mg/kg/día de melatonina fueron hepatoprotectores contra la lesión secundaria a la ligadura aguda del conducto biliar al disminuir varios indicadores de colestasis (Montilla et al. 2001). En otros modelos de

hígado de rata, utilizando la melatonina en un medio de preconditionamiento multidrogas, se evitó el daño por I-R tras isquemia fría disminuyendo los niveles de MDA, la acumulación de EROs y el infiltrado leucocitario (Moussavian et al. 2011; von Heesen et al. 2012). Similares efectos se observaron al añadir melatonina a los medios de preservación, obteniendo unos niveles análogos a los del grupo control de ATP, lactato dehidrogenasa y GSH (Freitas et al. 2006).

Finalmente, analizando la utilidad de la melatonina en la respuesta inmune activada durante el daño por I-R, se ha observado que ésta incrementa la actividad de la enzima antioxidante hemo oxigenasa-1 (HO-1) y la expresión de ARNm así como atenúa la sobreexpresión inducida de TLR4 y sus proteínas adaptadoras TRIF y MyD88 por el daño causado por I-R. También suprime las interacciones entre TLR4/TRIF y TLR4/MyD88 (Kang et al. 2012) y tiene capacidad de inhibir la actividad de JNK y c-Jun, lo que limita la necrosis de los hepatocitos y mejora la supervivencia después de la I-R caliente y la resección hepática (Uehara et al. 2005).

## 2. JUSTIFICACIÓN

El daño por isquemia-reperusión en diferentes órganos ha sido ampliamente analizado en la literatura científica tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*. En todos esos trabajos, se ha observado que, durante la isquemia, se generan alteraciones en los niveles de ATP, así como en la cadena de transporte de electrones mitocondrial y se pierde funcionalidad en las membranas. Además, la alteración en los mecanismos antioxidantes intracelulares y el cese del aporte de oxígeno, conllevan a una situación de muerte celular por apoptosis y necrosis. A nivel hepático, se describen diversos mecanismos para impedir el aporte sanguíneo hepático, entre los que destaca la maniobra de Pringle por el menor número de complicaciones. Dicha técnica fue descrita por J. Hogarth Pringle a principios del siglo XX, y consiste en el clampaje del pedículo hepático así como del conducto biliar, siendo el tiempo recomendado de entre 20 y 30 minutos (Buell et al. 2001). Por otro lado, el restablecimiento del flujo sanguíneo a esos tejidos isquémicos favorece la movilización de los metabolitos tóxicos acumulados y la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, causando estrés oxidativo que promueve la disfunción endotelial, el daño en el ADN y las respuestas inflamatorias locales.

La I-R esta implicada en la fisiopatología de enfermedades como la sepsis y el shock, las intoxicaciones, los procedimientos quirúrgicos y, quizá, la mayor expresión de I-R sea el trasplante de órganos. En el año 2018, se realizaron un total de 139.024 trasplantes de órganos en todo el mundo. De éstos, 90.306 fueron de riñón, 32.348 de hígado (19% de donante vivo), 7.881 de corazón, 6.084 de pulmón, 2.243 de páncreas y 162 de intestino. España, desde hace 2 décadas, lidera la lista de países en órganos donados así como la de trasplantes realizados. El creciente número de intervenciones y la acuciante necesidad de órganos (la Organización Mundial de la Salud indica que estas cifras sólo representan el 10% de las necesidades reales), exigen la necesidad de perfeccionar no sólo las técnicas quirúrgicas, sino la función y la preservación de los tejidos de forma óptima para así disminuir las posibilidades de rechazo del injerto. Dentro de estos estudios cobran especial interés los métodos antioxidantes, ya que, en términos generales, son fáciles de aplicar y aportan grandes beneficios para el

paciente. En este contexto, en este estudio, se plantea el potencial uso beneficioso de la melatonina en el trasplante de órganos.

El diseño experimental de este trabajo de investigación se enmarca en esta línea de investigación prioritaria, ya que permite profundizar de manera sistemática, en el conocimiento de las propiedades antioxidantes de la melatonina en la isquemia-reperfusión. En primera instancia, se decide la utilización de un modelo *in vivo*, para analizar los efectos del daño por isquemia-reperfusión en las membranas celulares y mitocondriales del tejido hepático y relacionarlo con dos indicadores biológicos de lesión oxidativa, uno que valora el daño en los lípidos, las concentraciones de MDA+4-HDA, y otro más específico de las proteínas, el grado de su carbonilación.

La valoración funcional de las membranas aisladas del tejido hepático se realiza mediante la determinación de su fluidez por espectroscopía de fluorescencia. Se trata de un parámetro dinámico que refleja el grado de movilidad de los fosfolípidos de la bicapa y sus niveles óptimos se asocian con la homeostasis de numerosas funciones celulares. Está bien establecido que el daño mediado por radicales libres conlleva a la pérdida de la fluidez, es decir, rigidez en las membranas biológicas. Dado que estas estructuras celulares están constituidas casi exclusivamente por lípidos y proteínas, se decide utilizar las concentraciones de MDA+4-HDA y la incorporación de restos carbonilo en las proteínas. De esta manera, se puede asociar los cambios en la fluidez provocada por la isquemia-reperfusión con el grado de lesión oxidativa en los lípidos y proteínas, así como analizar los efectos beneficiosos de la melatonina en este modelo de daño hepático.

A fin de profundizar en los mecanismos moleculares por los que la melatonina puede ejercer su acción beneficiosa frente a la lesión hepática por I-R *in vivo*, se plantea utilizar un modelo *in vitro* de daño oxidativo basado en la exposición al nitroprusiato sódico, un donante de óxido nítrico. Aunque inicialmente éste se identifica como un factor vasodilatador producido en el endotelio, su exceso, en presencia de  $\cdot\text{O}_2^-$ , forma  $\text{ONOO}^-$ , una especie reactiva muy tóxica que agrava la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo celular producidos durante la I-R. En este estudio, al igual que en el estudio *in vivo*, se pueden valorar los efectos de la melatonina sobre la fluidez de las membranas celulares y mitocondriales aisladas así

como la peroxidación lipídica, valorando las concentraciones de MDA+4-HDA, y el daño oxidativo en las proteínas, mediante la determinación de la carbonilación proteica.

### 3. OBJETIVOS

- PRIMERO: Analizar los efectos que se producen como consecuencia de la isquemia hepática a nivel de la fluidez de las membranas celulares y mitocondriales, al aplicar la maniobra de Pringle, durante 20 minutos, seguida de 30 minutos de reperfusión vascular.
- SEGUNDO: Relacionar los cambios producidos por las condiciones anteriores de isquemia y reperfusión en la fluidez de las membranas hepáticas con el grado de estrés oxidativo lipídico y proteico.
- TERCERO: Valorar la efectividad de la melatonina como tratamiento para reducir la rigidez de membrana celular y mitocondrial, así como para minimizar el daño por lesión oxidativa a nivel de los lípidos y proteínas del tejido hepático sometido a isquemia-reperfusión.
- CUARTO: Establecer las condiciones *in vitro* del daño oxidativo máximo que el nitroprusiato sódico, donante de óxido nítrico, produce sobre la fluidez de las membranas celulares y mitocondriales hepáticas, y correlacionar la rigidez de las mismas con los indicadores de lesión oxidativa en los principales constituyentes lipídicos y proteicos de las membranas biológicas.
- QUINTO: Bajo las condiciones experimentales de daño oxidativo que se definen en el objetivo anterior, determinar *in vitro* los efectos protectores de la melatonina frente a la exposición de las membranas hepáticas al nitroprusiato sódico.

### 3. OBJECTIVES

- FIRST: To analyze the effects that occur as a consequence of hepatic ischemia at the level of fluidity of cell and mitochondrial membranes, by applying the Pringle maneuver, for 20 minutes, followed by 30 minutes of vascular reperfusion.
- SECOND: To relate the changes produced by the previous conditions of ischemia and reperfusion injury in the membrane fluidity of the liver regarding the degree of lipid and protein oxidative stress.
- THIRD: To assess the effectiveness of melatonin as a treatment to reduce the rigidity of the cell and mitochondrial membranes, as well as to minimize the damage caused by oxidative damage to the lipids and proteins of the liver tissue subjected to ischemia-reperfusion.
- FOURTH: To establish the *in vitro* conditions of the maximum oxidative damage that sodium nitroprusside, a donor of nitric oxide, produces on the fluidity of cellular and hepatic mitochondrial membranes, and to correlate their rigidity with the indicators of oxidative damage in the main lipid constituents and proteins of biological membranes.
- FIFTH: Under the experimental conditions of oxidative damage defined in the previous objective, determine *in vitro* the protective effects of melatonin against exposure of liver membranes to sodium nitroprusside.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL UTILIZADO

---

#### 4.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Todos los experimentos se realizaron cumpliendo estrictamente la normativa europea (Directiva 86/609/CEE), española (Real Decreto 1201/2005) y autonómica (Ley 11/2003) vigentes. Se utilizaron ratas macho de la raza Sprague-Dawley adquiridas en Harlan-Ibérica (Barcelona, España) con un peso medio de  $200 \pm 15$  g, de 3 meses de edad. En este trabajo sólo se incluyeron ratas machos para evitar cualquier distorsión en la respuesta mediada por el ciclo ovárico. Los animales se estabularon en las instalaciones del Servicio de Apoyo a la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza, permaneciendo 2 ratas en cada jaula, con la temperatura ambiental regulada automáticamente a  $22 \pm 1$  °C y bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas, iniciando la fase oscura a las 08:00 h y la fase de luz a las 20:00 h. Tuvieron disponibilidad de agua y alimentación, dieta de mantenimiento para roedores, Harlan-Ibérica, tipo RMM, *ad libitum*.

Todas las manipulaciones animales y el procedimiento experimental se realizaron por la mañana en una habitación aislada termorregulada.

#### 4.1.2 MATERIAL DE LABORATORIO

El trabajo experimental se realizó en los laboratorios del grupo de investigación consolidado del Gobierno de Aragón “Envejecimiento y Estrés Oxidativo (B37\_17D)”, situados en el Área de Fisiología del Departamento de Farmacología y Fisiología, Medicina Legal y Forense, en la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza. Están equipados con el siguiente utillaje empleado en el transcurso de esta investigación:

- Agitadores: vórtex Velp Scientifica® Zx3 y vórtex Heidolph® REAX 2000.
- Balanzas de precisión Cobos® CBH-300J y A-220 CB.
- Baño termostatzado con agitación Bunsen® BTG-1.

- 2 centrifugas Beckman® Avanti 30TM, refrigeradas y equipadas con dos rotores: F1010 para 10 tubos de 10 mL, y F3602 para 36 tubos Eppendorf de 1'5 y 2 mL.
- Espectrofotómetro Beckman-Coulter® DU800, con dos tipos de cubetas: desechables de plástico para medir en el rango visible, y de cuarzo para medir en el rango UV.
- Espectroscopio de fluorescencia Perkin-Elmer® LS-55, equipado con un accesorio de polarización con cubetas de cuarzo y un accesorio de microagitación de la muestra presente en la cubeta. Este aparato va acompañado de un baño recirculante Selecta® Frigiterm.
- Homogeneizador de teflón acoplado a un rotor Heidolph® RZR 2020.
- Homogeneizador Ultra-Turrax Janke & Kunkel® T25.
- pHmetro Crison® micro pH 2001, equipado con sonda de temperatura.
- Dos juegos de pipetas de precisión: Gilson® (P-20, P-200, P-1000 y P-5000) y Eppendorf® (0'5-10, 10-100 y 100-1000 µL).
- Pipeta multidispensadora BibbyStep® con puntas Eppendorf® de 2,5, 5 y 50 mL.
- Sistemas de agua de Millipore®: destilada MilliRX y ultrapura MilliQ.
- Frigorífico con nevera (4 °C) y congelador (-20 °C) Liebherr® Premium.
- Ultracongelador (-80 °C) Sanyo® MDF-U5386S.
- Máquina automática pica-hielo Bar Line®.
- Material quirúrgico diverso para la extracción de tejidos: guantes, bisturí, tijeras, pinzas.
- Otros materiales de tipo fungible, suero fisiológico, viales, papel de filtro, etc.

#### 4.1.3 REACTIVOS QUÍMICOS

Todos los reactivos químicos utilizados en esta investigación se obtuvieron con la mayor pureza disponible a partir de fuentes comerciales acreditadas. Se conservaron atendiendo a las recomendaciones indicadas por el fabricante. Los reactivos, las marcas comerciales proveedoras, y sus números de catálogo se indican a continuación:

- Acetato de etilo (Sigma-Aldrich®, 270520)
- Acetonitrilo (Panreac®, 221831)

- Ácido clorhídrico (HCl) 37 % (Panreac®, 131020)
- Ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazina-1-etanosulfónico (HEPES) (Sigma-Aldrich®, H-3375)
- Ácido metanosulfónico (Sigma-Aldrich®, 47135-6)
- Albúmina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich®, A-7848)
- Cloruro potásico (KCl) (Sigma-Aldrich®, P-9333)
- Cloruro sódico (NaCl) (Panreac®, 131659)
- 2,4-Dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Sigma-Aldrich®, D-2630)
- Nitroprusiato de sodio dihidrato (NPS) (Merck®, 106541)
- Etanol absoluto (Panreac®, 131086)
- Etilendiaminotetraacético disódico (EDTA-Na<sub>2</sub>) (Panreac®, 131669)
- Guanidina (Sigma-Aldrich®, 17725-3)
- Melatonina (Sigma-Aldrich®, M-5250)
- Metanol (Panreac®, 131091)
- NaOH (Merck®, 6498)
- Reactivo de Bradford (Bio-rad®, 500-0006)
- Tetrahidrofurano (THF) (Sigma-Aldrich®, 27038-5)
- 1-(4-trimetilamoniofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno-*p*-tolueno-sulfonato (TMA-DPH) (Molecular Probes®, T-204)
- Tricloroacético (TCA) (Sigma-Aldrich®, T-6399)
- Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) (Sigma-Aldrich®, T-1503)

## 4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

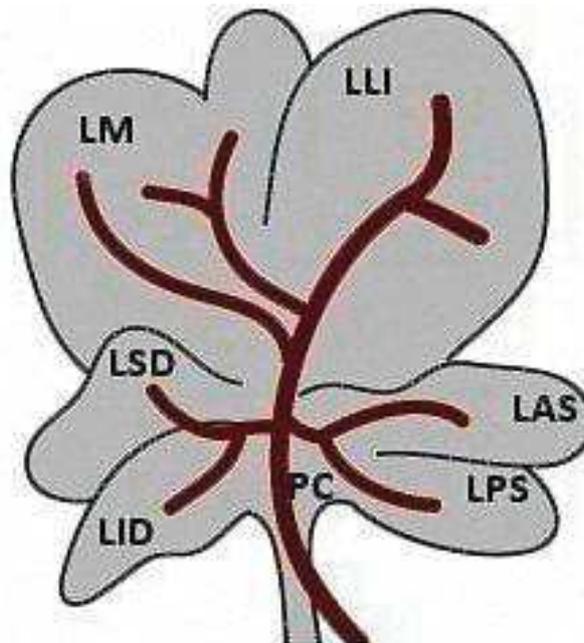
---

### 4.2.1 MODELO DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN HEPÁTICA

#### 4.2.1.1 ANATOMÍA HEPÁTICA DE LA RATA

El hígado de la rata está compuesto por cinco lóbulos. El lóbulo medial o lóbulo cístico, que representa el 70% del volumen hepático, está subdividido en los lóbulos centrales derecho e izquierdo por una cisura mediana. El lóbulo caudado o de Spiegel se encuentra alrededor del esófago y se interpone entre éste y el estómago. Los lóbulos lateral derecho y triangular nacen de una base común. El lóbulo triangular, envuelve prácticamente en toda su circunferencia a la vena cava inferior infrahepática

y cubre el polo superior del riñón derecho, se une con el lóbulo caudado por detrás de la vena porta. La figura 16 muestra la anatomía hepática. Los medios de fijación son el ligamento falciforme, el ligamento lateral izquierdo, las adherencias con el retroperitoneo y fundamentalmente los pedículos vasculares.



**Figura 16.** Anatomía hepática. LM: lóbulo medio; LLI: lóbulo lateral izquierdo; LSD: lóbulo superior derecho; LID: lóbulo inferior derecho; PC: proceso caudado; LAS: lóbulo anterior de Spiegel; LPS: lóbulo posterior de Spiegel.

El hígado en la rata posee un doble sistema circulatorio, recibe sangre oxigenada a través de la arteria hepática y sangre venosa de la región esplácnica a través de la vena porta. La arteria hepática, rama terminal de la arteria hepática común tras emitir la arteria gastroduodenal, discurre de forma paralela a la vena porta, hacia su lado izquierdo en el ligamento hepatoduodenal, para finalmente dividirse en las diferentes arterias lobares. La vena porta se divide en una rama derecha e izquierda. La rama derecha irriga al lóbulo medial y lateral derechos, al lóbulo triangular y al lóbulo caudado, mientras que la rama izquierda irriga al lóbulo medial y lateral izquierdo.

Las venas hepáticas reciben sangre de las venas centrales de los lobulillos hepáticos y convergen en la vena cava inferior suprahepática justo por debajo del diafragma. La vena cava infrahepática recibe a las venas suprarrenales derechas y discurre por el tejido hepático por la cara posterior del hígado, recolectando las

tributarias hepáticas. Los conductos biliares de cada lóbulo convergen para formar el conducto biliar común, que transcurre en el hilio sobre la vena porta, cubriendo a la arteria hepática en el borde libre del ligamento hepatoduodenal. El conducto biliar común converge con el conducto pancreático a 1 cm por debajo del hígado. La rata no posee vesícula biliar. El bajo tono del esfínter de Oddi impide el almacenamiento de la bilis, produciendo un flujo de bilis continuo hacia la porción descendente del duodeno aproximadamente a 2,5 cm del píloro.

#### 4.2.1.2 GRUPOS DE ESTUDIO

Se establecieron 4 grupos de trabajo con 10 animales distribuidos por cada grupo: Grupo 1: control; Grupo 2: isquemia durante 20 minutos; Grupo 3: isquemia durante 20 minutos con reperfusión posterior de 30 minutos; Grupo 4: isquemia durante 20 minutos con reperfusión posterior de 30 minutos habiendo administrado, 20 minutos antes del inicio de la isquemia, melatonina intraperitonealmente (dosis de 50 mg/kg).

#### 4.2.1.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Se colocó al animal en decúbito dorsal sobre una tablilla operatoria con manta térmica y se fijaron las extremidades con cinta adhesiva. A continuación, se anestesió mediante la administración intraperitoneal de tiopentato de sodio (50 mg/Kg de peso).

Se realizó una laparotomía mediante una incisión subcostal bilateral a aproximadamente 2 cm del reborde costal (Figura 17). Se retrajo el cartílago xifoides con una pinza hemostática. Se lateralizaron hacia la izquierda las asas intestinales protegiéndolas con gasas húmedas con solución fisiológica a 38 °C, y se disecó el ligamento falciforme. Para que quedara expuesto el pedículo hepático, se elevaron los lóbulos derecho y central (Figura 18), y se seccionó el ligamento gastrohepático para la identificación del paquete integrado por el conducto biliar, la vena porta y la arteria hepática. Las maniobras de disección se realizaron con instrumental de microcirugía y con la ayuda de hisopos húmedos con solución fisiológica, a fin de minimizar el daño tisular. A continuación, se realizó la maniobra de Pringle, consistente en la oclusión vascular intermitente de la vena porta y de la arteria hepática, mediante la colocación de un miniclamp vascular (Figuras 19 y 20a). Esta técnica fue aplicada por primera vez

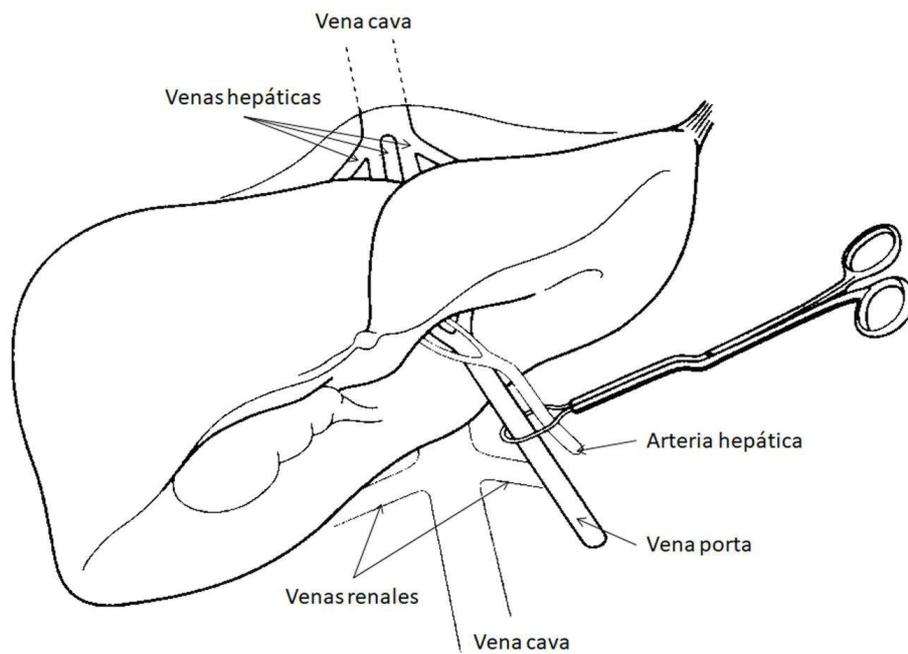
por J. Hogarth Pringle a principios del siglo XX fruto de los problemas de sangrado que había en las cirugías hepáticas. El primer experimento consistió en la intervención de 4 conejos sedados con cloroformo, en los que, una vez aplicada esta técnica, se observó ausencia de sangrado en la manipulación y corte del tejido hepático. Además, no se apreciaron complicaciones a nivel intestinal ni en el postoperatorio (Pringle 1908). Dichos resultados se han hallado comparando esta maniobra con otras técnicas de isquemia hepática, incluyendo el clampaje de Longmire y el aislamiento total vascular (Buell et al. 2001). El tiempo de isquemia se mantuvo durante 20 minutos (Frich et al. 2006). Transcurrido este tiempo de isquemia, se retiró el miniclamp a fin de restaurar el flujo vascular hepático (fase de reperfusión, figura 20b). Tras el tiempo de isquemia y/o reperfusión, se tomaron las muestras para cada uno de los grupos de estudio. A continuación, se reintrodujeron las vísceras en la cavidad abdominal y se procedió al cierre de la laparotomía, utilizando grapas quirúrgicas. Además, durante el procedimiento quirúrgico se administraron vía subcutánea 1,5 mL de solución fisiológica a 37 °C a fin de reponer los fluidos perdidos.



**Figura 17.** Laparotomía media mediante una incisión subcostal bilateral a aproximadamente 2 cm por debajo del reborde costal.

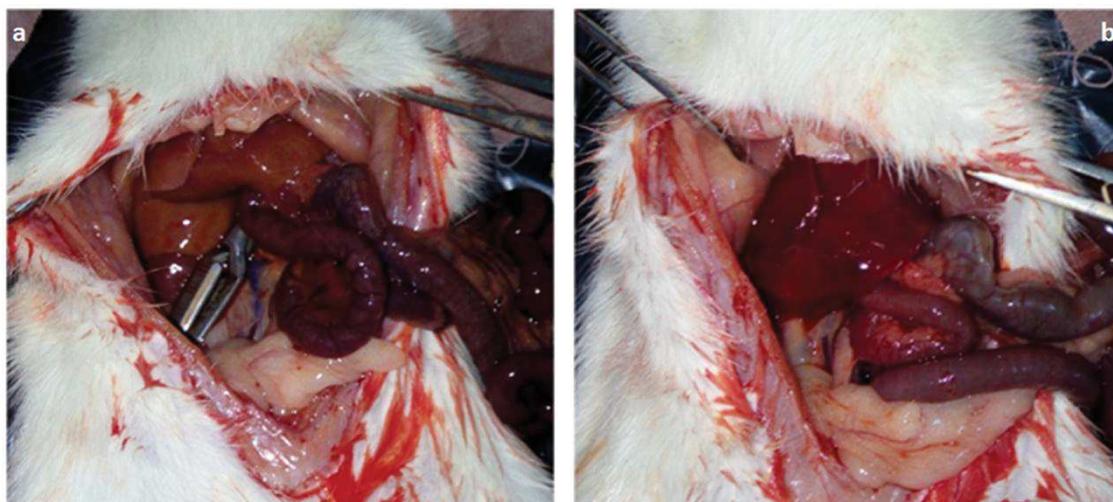


**Figura 18.** Identificación del conducto biliar, vena porta y arteria hepática tras elevarse los lóbulos derecho y central exponiendo el pedículo hepático. Se seccionó el ligamento gastrohepático para una mejor visualización.



**Figura 19.** La maniobra de Pringle consiste en impedir la circulación hepática, recibida a través de la arteria hepática y la vena porta, mediante la colocación de un miniclamp vascular.

Fuente figura: Buell et al. 2001.



**Figura 20.** Diferentes procesos de la intervención. a) Isquemia de 20 minutos tras maniobra de Pringle impidiendo así la circulación de los tres elementos del pedículo (arteria hepática, vena porta y vía biliar) mediante la colocación de un miniclamp tipo bulldog. Se aprecia una coloración hepática más tenue en relación a la isquemia así como una congestión intestinal. b) Transcurrido el tiempo estipulado de isquemia, se retira el miniclamp a fin de permitir la reperfusion hepática durante 30 minutos. En este segundo momento, se observa una reinstauración del flujo. Las imágenes corresponden a un caso del grupo 3 (isquemia-reperfusion sin melatonina).

#### 4.2.1.4 OBTENCIÓN Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS TISULARES

Para evitar la posible influencia del ritmo circadiano, a la hora de valorar el nivel de estrés oxidativo, todas las extracciones tisulares se realizaron entre las 10 y las 12 h de la mañana. Para facilitar la comparación de los resultados entre los grupos en todos los animales se utilizó el lóbulo medial hepático. En el procedimiento quirúrgico del grupo 1 (Control), no hubo una exposición real a la isquemia, al no producir clampaje tras la disección del pedículo vascular. Las muestras tisulares analizadas para el grupo 2 (Isquemia) se obtuvieron inmediatamente al finalizar el minuto 20 de isquemia, provocada mediante el clampaje vascular del hilio hepático (maniobra de Pringle). En los grupos 3 y 4, la obtención de las muestras se realizó inmediatamente al finalizar el minuto 30 tras el inicio de la reperfusion vascular. La diferencia entre los grupos 3 y 4 fue que este último recibió tratamiento con melatonina (50 mg/kg peso) 30 minutos antes de la isquemia, mientras que al grupo 3 se le administró sólo el vehículo de disolución de la melatonina. Las ratas se sacrificaron inmediatamente después de la técnica quirúrgica con una sobredosis anestésica. Todas las muestras tisulares fueron lavadas con suero fisiológico a 4 °C. Los tejidos a procesar se secaron en papel de filtro

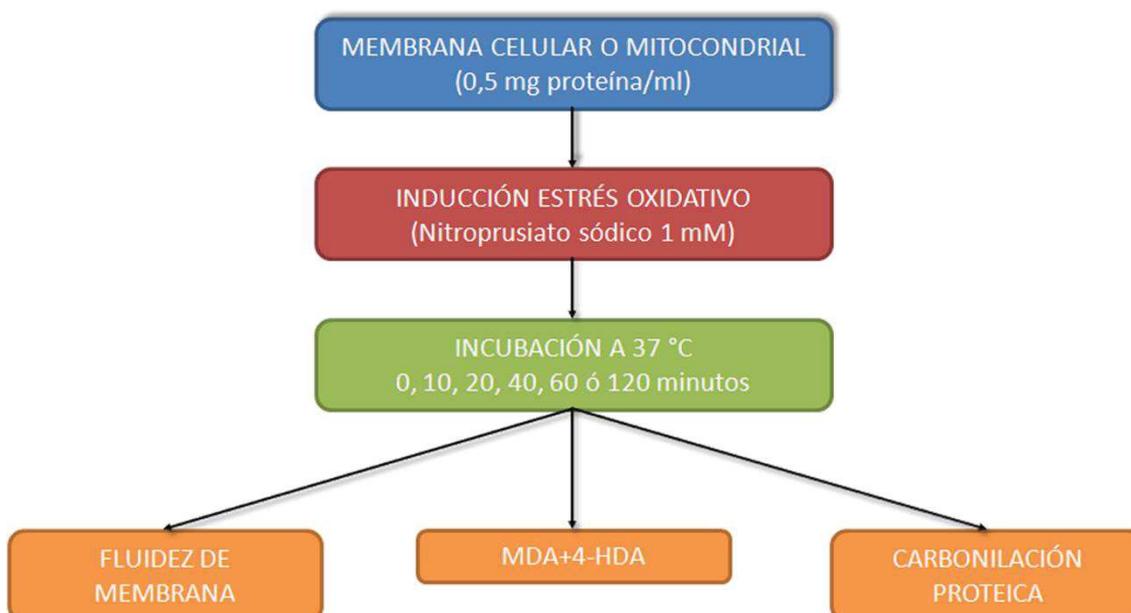
para eliminar el suero fisiológico de lavado y, a continuación, se almacenaron a -80 °C hasta el día del análisis.

#### 4.2.2 EFECTO PROTECTOR DE LA MELATONINA EN LAS MEMBRANAS CELULARES Y MITOCONDRIALES HEPÁTICAS EXPUESTAS A NITROPRUSIATO SÓDICO

Se utilizaron los hígados de 10 ratas sacrificadas tras ser anestesiadas con tiopental (50 mg/kg peso). A continuación, se extrajeron los hígados, de la forma más rápida posible, se lavaron con suero fisiológico a 4 °C y se conservaron a -80 °C hasta la obtención de sus membranas celulares y mitocondriales.

El daño oxidativo a las membranas se indujo utilizando el nitroprusiato sódico (NPS), un sistema *in vitro* generador de  $\cdot\text{NO}$ . Para ello, se consideró como punto inicial los procedimientos propuestos por Nakamura et al. (1977) así como las experiencias previas de nuestro grupo (Piñol-Ripoll et al. 2006). De acuerdo a estas observaciones, el NPS se diluyó en TRIS 50 mM pH=7,40 con una concentración final de 1 mM.

La duración de la incubación con NPS fue determinada mediante cinéticas de tiempo. Para ello, las alícuotas de membrana (0,5 mg proteína/mL) se incubaron a 37 °C durante 0, 10, 20, 40, 60 y 120 minutos en presencia de NPS 1 mM (Figura 21). Transcurrido ese tiempo se midieron: la fluidez en las membranas, las concentraciones de MDA+4-HDA y la carbonilación proteica.



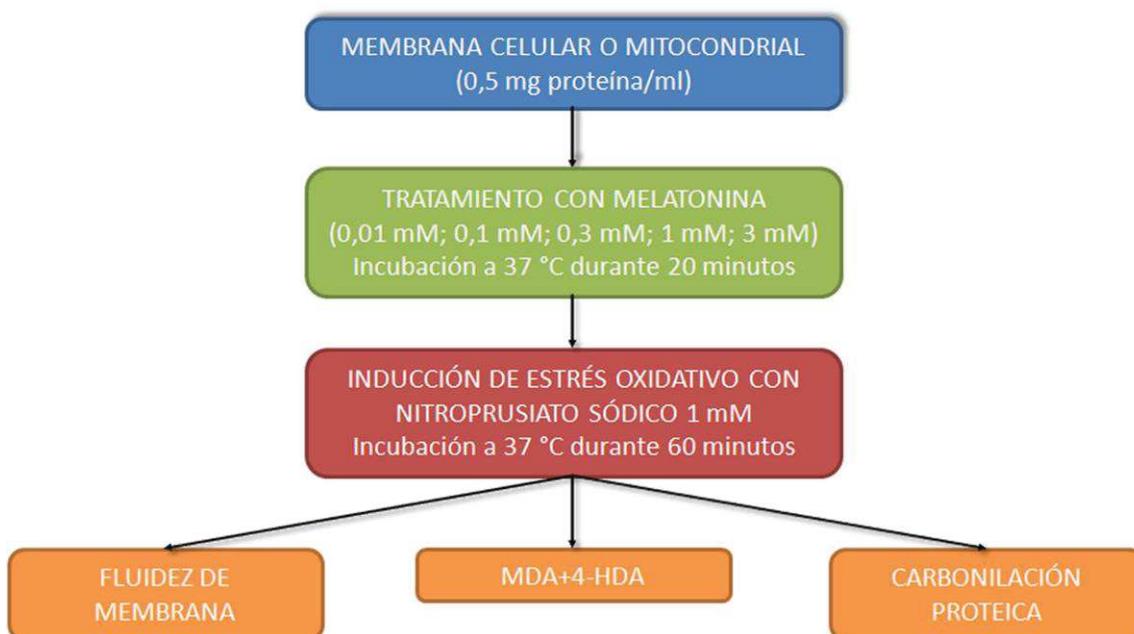
**Figura 21.** Diseño experimental de la cinética de tiempo del nitroprusiato sódico 1 mM. MDA+4-HDA:

Malondialdehído + 4-hidroxiálquenos.

Finalmente, se estudió el efecto protector de la melatonina a concentraciones crecientes de 0,01 mM; 0,1 mM; 0,3 mM; 1 mM; 3 mM, frente a la toxicidad de NPS (Figura 22). En este estudio se definió la IC<sub>50</sub> como la concentración de melatonina necesaria para inhibir al 50% la rigidez en la membrana, la peroxidación lipídica y la carbonilación proteica debida al NPS 1 mM. Este parámetro se calculó gráficamente tras la representación de los porcentajes de inhibición en la formación de los tres marcadores de lesión oxidativa para cada una de las 5 concentraciones de melatonina establecidas. Para ello se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%inhibición = \frac{X_1 - X_2}{X_1 - X_0} \cdot 100$$

Donde X<sub>0</sub> es la fluidez, o la concentración de MDA+4-HDA, o la carbonilación en las muestras en ausencia de NPS (controles); X<sub>1</sub> es la fluidez, la concentración de MDA+4-HDA o de restos carbonilos en las muestras incubadas con NPS 1 mM; X<sub>2</sub> es el valor de fluidez, MDA+4-HDA o resto carbonilo en las muestras incubadas con NPS y previamente con melatonina a distintas concentraciones.



**Figura 22.** Planificación de los experimentos destinados a evaluar la acción antioxidante de la melatonina frente a la toxicidad del nitroprusiato sódico. MDA+4-HDA: Malondialdehído + 4-hidroxialquenos.

## 4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

---

### 4.3.1 AISLAMIENTO DE MEMBRANAS

Previamente a la determinación de la fluidez de membrana, fue necesario proceder al aislamiento de las membranas celulares y mitocondriales del tejido hepático. Para ello se utilizó la metodología descrita por Graham (1997) con ligeras modificaciones. Este método se fundamenta en centrifugaciones sucesivas a distintas velocidades y tiempos.

En primer lugar, se extrajo 1 g de muestra hepática con bisturí, y se depositó sobre una placa de Petri situada en hielo y a continuación se introdujo con tampón HEPES 0,02 M – KCl 0,14 M (pH 7,4) en un homogeneizador de vidrio con teflón acoplado a un rotor Heidolph® RZR 2020 y se homogeneizaron a 300 rpm. Todo este proceso se realizó en frío.

El homogeneizado se centrifugó a 1000  $xg$  durante 10 min a 4 °C para eliminar los restos de tejido no homogeneizados y los núcleos celulares. A continuación, el sobrenadante se centrifugó a 50000  $xg$  durante 20 min a 4 °C. El precipitado, que contenía las membranas, se resuspendió en HEPES y se volvió a centrifugar a 10000  $xg$  durante 10 min a 4 °C. Tras esta centrifugación, se procedió de la siguiente manera: 1) el sobrenadante y el buffy coat se resuspendieron en TRIS 50 mM (pH 7,4) y se centrifugaron a 50000  $xg$  durante 20 min a 4 °C, para obtener las membranas plasmáticas; y 2) el precipitado se resuspendió en HEPES y se centrifugó a 10000  $xg$  durante 10 min a 4 °C, para obtener las mitocondrias. Ambos precipitados finales, membranas celulares y mitocondriales, se resuspendieron en TRIS 0,05 M (pH 7,4), se distribuyeron en alícuotas y se almacenaron a -80 °C hasta la realización de los ensayos. La figura 23 ilustra este procedimiento.

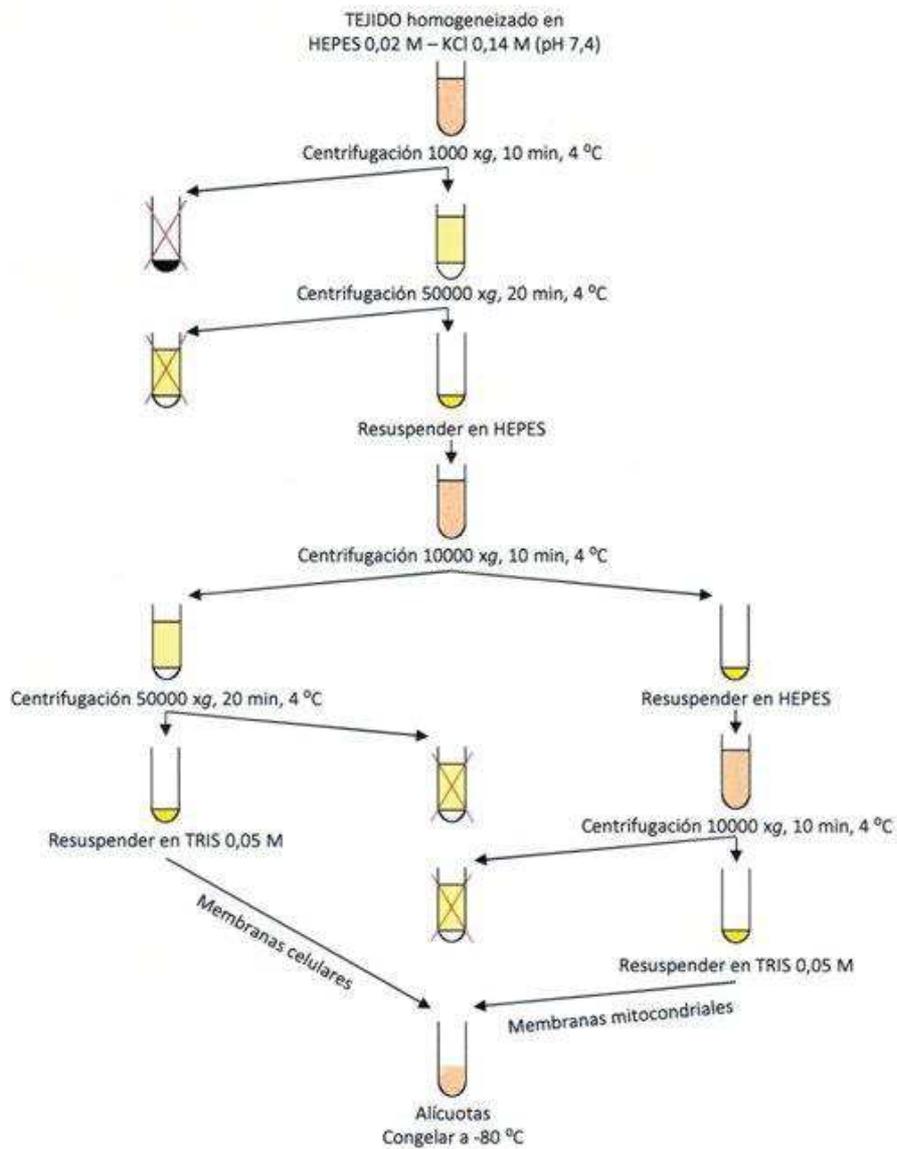


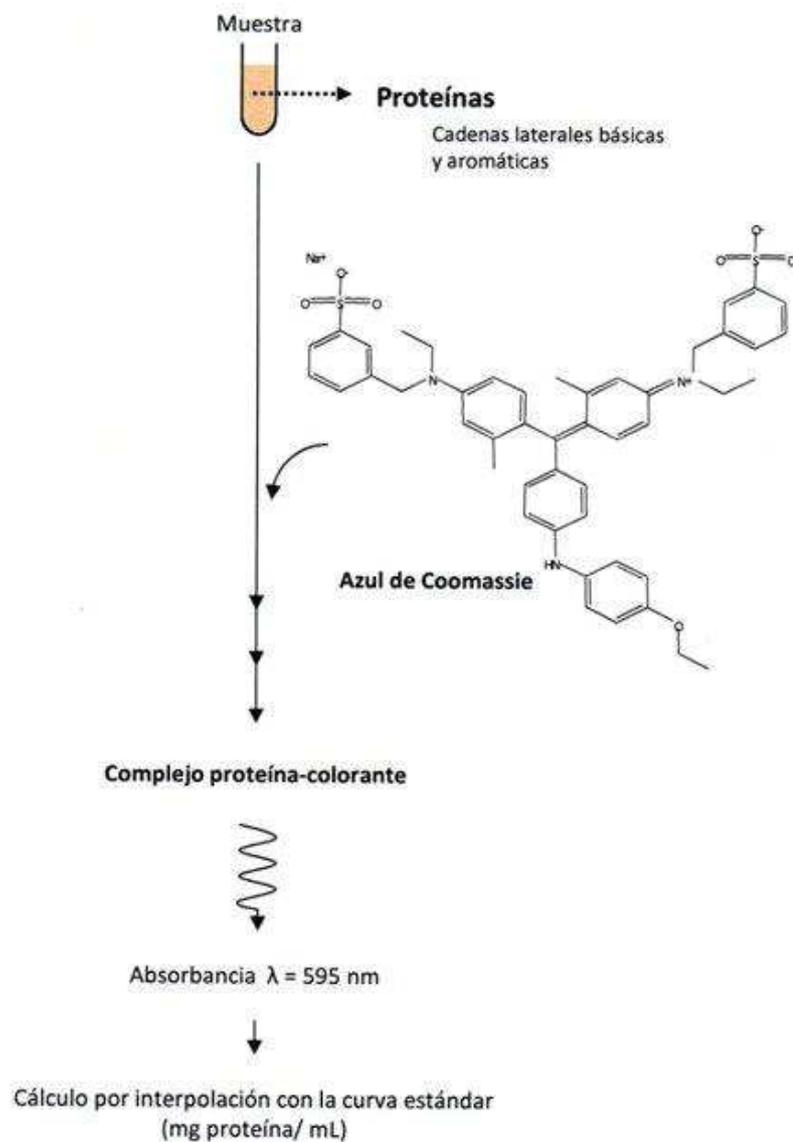
Figura 23. Protocolo de aislamiento de las membranas celulares y mitocondriales

#### 4.3.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Se utilizó el método de Bradford (1976), basado en la reacción entre el azul de Coomassie y los aminoácidos básicos, principalmente arginina, lisina e histidina. Esta reacción produce cambios de absorbancia a 595 nm que son directamente proporcionales a la concentración total de proteínas (Figura 24). En este método, la cantidad de proteínas totales de la muestra problema se obtuvo interpolando su valor de absorbancia en una curva patrón de albúmina. Los valores de concentración de proteínas se expresaron en mg/mL. El programa utilizado fue Assay 4.0 (Biosoft®).

El protocolo utilizado consta de los siguientes pasos:

1. Dispensar alícuotas de 4  $\mu\text{L}$  del homogeneizado o del purificado de membranas.
2. Añadir TRIS 0,05 M hasta completar 800  $\mu\text{L}$ .
3. Dispensar 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford de Bio-Rad® (Azul brillante de Coomassie G-250 al 0'01%, etanol al 4,7%, ácido ortofosfórico al 8,5% diluido en agua destilada).
4. Agitar e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Leer la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro.



**Figura 24.** Fundamento de la cuantificación de proteínas según el método de Bradford.

### 4.3.3 FLUIDEZ DE LAS MEMBRANAS CELULARES

La fluidez de las membranas celulares y mitocondriales se monitorizó por triplicado mediante espectroscopía de fluorescencia, usando TMA-DPH como marcador fluorescente (Yu et al. 1992). El método (Figura 25) se basa en la inclusión de esta molécula en las membranas, intercalándose entre los fosfolípidos de la bicapa y reflejando, de forma indirecta, la dinámica lipídica, ya que, cuando es iluminado, emite una señal fluorescente (Zimmer et al. 1993). El protocolo es el siguiente:

1. En un tubo se dispensan 0,5 mg/mL de proteína de membranas suspendidas en TRIS 50 mM.
2. Añadir 8 µL de TMA-DPH 25 µM.
3. Añadir tampón TRIS 0'05 M hasta completar 3 mL/tubo y agitar vigorosamente.
4. Incubar durante 30 min a 37 °C con agitación.
5. Colocar los tubos en baño de agua a temperatura ambiente hasta su lectura.
6. Agitar para resuspender las membranas.
7. Lectura en el espectroscopio de fluorescencia a 360 nm de excitación y 430 nm de emisión.
8. Calcular la polarización (P) según la ecuación:

$$P = \frac{IV_V - GIV_H}{IV_V + GIV_H}$$

Donde I es la intensidad de emisión de la luz polarizada verticalmente, medida por un detector orientado en paralelo ( $IV_V$ ) o perpendicular ( $IV_H$ ) al plano de excitación, y G es un factor de corrección para el sistema óptico.

El resultado se calculó por la media aritmética de 30 mediciones independientes y la fluidez de las membranas se expresó como el inverso de la polarización (1/P) (Yu et al. 1992).

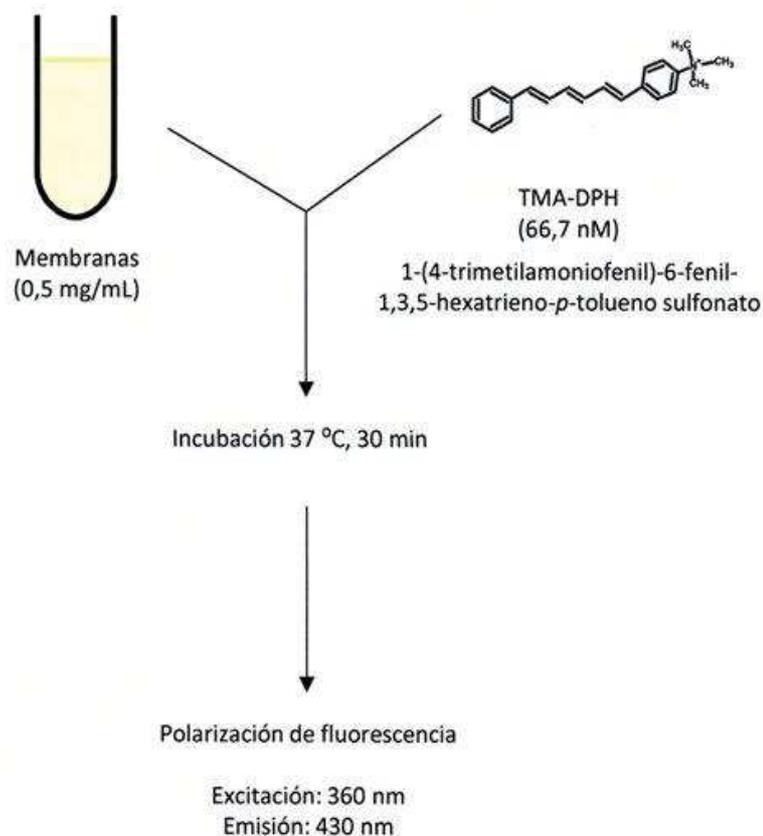


Figura 25. Protocolo de medición de la polarización en las membranas.

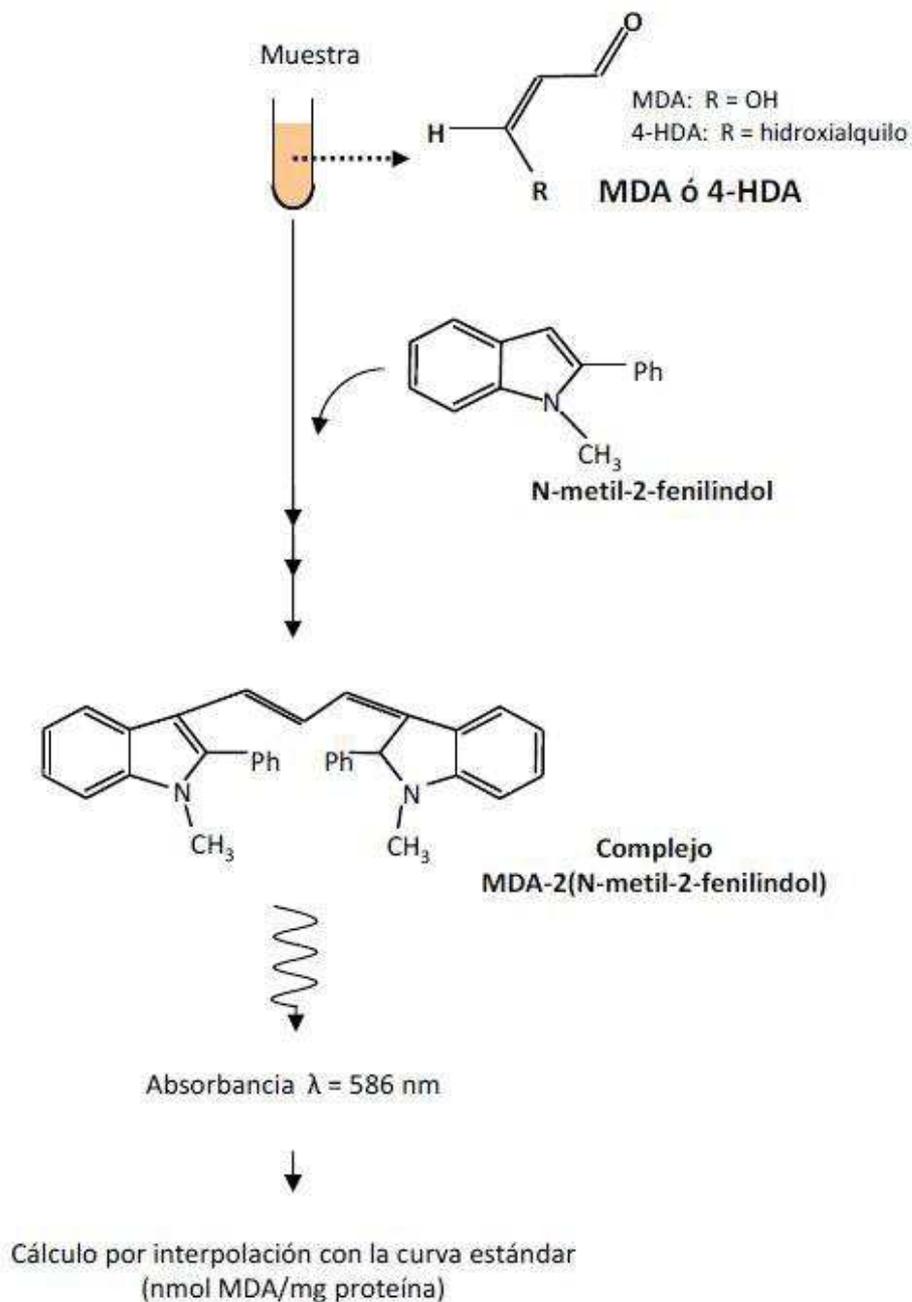
#### 4.3.4 PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Es el resultado de la acción de los radicales libres sobre los lípidos, fundamentalmente los ácidos grasos poliinsaturados, que forman las membranas biológicas. Los productos finales son aldehídos, gases hidrocarbonados y varios residuos químicos, siendo mayoritarios el MDA y los 4-HDA. Por tanto, las concentraciones de MDA+4-HDA son buenos indicadores del grado de LPO en las membranas biológicas (Janero 1990). Se determinaron por un método colorimétrico (Esterbauer y Cheeseman 1990), basado en la reacción de un reactivo cromógeno, el N-metil-2-fenilindol, con el MDA o con los 4-HDA. La condensación de una molécula de MDA ó 4-HDA con dos moléculas de N-metil-2-fenilindol produce un cromóforo estable que, en presencia del ácido metanosulfónico, presenta una absorbancia máxima de 586 nm (Figura 26).

Para obtener la recta de calibrado, se utilizaron diluciones de concentración conocida (0-10  $\mu\text{M}$ ), a partir de una disolución de 1,1,3,3-tetrametoxipropano 0,01 M en tampón TRIS 0,02 M. Al hidrolizarse, el 1,1,3,3-tetrametoxipropano libera MDA de forma estequiométrica (Nielsen et al. 1997). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

El protocolo utilizado consta de los siguientes pasos:

1. Homogeneizar las muestras tisulares en tampón TRIS 0,05 M en una preparación 1/10, peso/volumen.
2. Centrifugar el homogeneizado a 3000  $xg$  durante 10 min a 4 °C.
3. Dispensar 2 alícuotas de 200  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y añadir 650  $\mu\text{L}$  de N-metil-2-fenilindol 10,3 mM disuelto en acetonitrilo y metanol, con relación 3:1, volumen/volumen.
4. Dispensar 150  $\mu\text{L}$  de ácido metanosulfónico 15,4 M y agitar.
5. Incubar los tubos durante 40 min a 45 °C.
6. Centrifugar a 3000  $xg$  durante 10 min a 4 °C.
7. Incubar a temperatura ambiente durante 10 min.
8. Medir la absorbancia a 586 nm en el espectrofotómetro.



**Figura 26.** Cuantificación de MDA+4-HDA. MDA: Malondialdehído; 4-HDA: 4-hidroxialquenes.

#### 4.3.5 CARBONILACIÓN PROTEICA

Para valorar el daño oxidativo a las proteínas de los homogeneizados, se utilizó la determinación de los restos carbonilo de las proteínas (Davies y Goldberg 1987b; Dean et al. 1997). Este método está basado en la reacción de los restos carbonilo de las proteínas con la DNPH, formándose un derivado que presenta máxima absorbancia en el rango de 360-390 nm (Levine et al. 1994). Durante el procedimiento se utilizaron sucesivamente el TCA para la precipitación de las proteínas, los lavados para la

eliminación del exceso de DNPH que no ha reaccionado con los restos carbonilo, y la guanidina, para redissolver las proteínas y, así, poder realizar la lectura en el espectrofotómetro (Figura 27).

La concentración de restos carbonilo se calculó a partir de la absorbancia obtenida aplicando la Ley de Beer-Lambert y el coeficiente de absorción molar de la DNPH ( $\epsilon=22000 \cdot M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ). Se utilizó como blanco una disolución de guanidina 6M. Finalmente, tras la determinación de las proteínas totales, los resultados se expresaron en nmol de restos carbonilo/mg de proteínas totales.

El protocolo utilizado consta de los siguientes pasos:

1. 0,2 g de tejido se homogeneizaron en 2,4 mL de TRIS 0,5 M (pH 7,4).
2. A 1 mL de los homogeneizados, añadir 100  $\mu$ L de tampón TRIS 0'02 M (pH 7,4) y 200  $\mu$ L de DNPH 0,01 M.
3. Agitar e incubar durante 1 h a 37 °C.
4. Dispensar 325  $\mu$ L de TCA 50% frío e incubar en hielo durante 10 min.
5. Centrifugar a 3000  $xg$  durante 10 min a 4 °C.
6. Lavar el precipitado tres veces, resuspendiendo con 1 mL de etanol: acetato de etilo 1:1, v/v, y centrifugando a 11000  $xg$  durante 3 min a 4 °C. Disolver el precipitado final en 700  $\mu$ L de guanidina-HCl 6 M (pH 2,0).
7. Agitar e incubar durante 15 min a 37 °C.
8. Centrifugar a 12000  $xg$  durante 10 min a 4 °C.
9. Leer la absorbancia del sobrenadante a 375 nm.

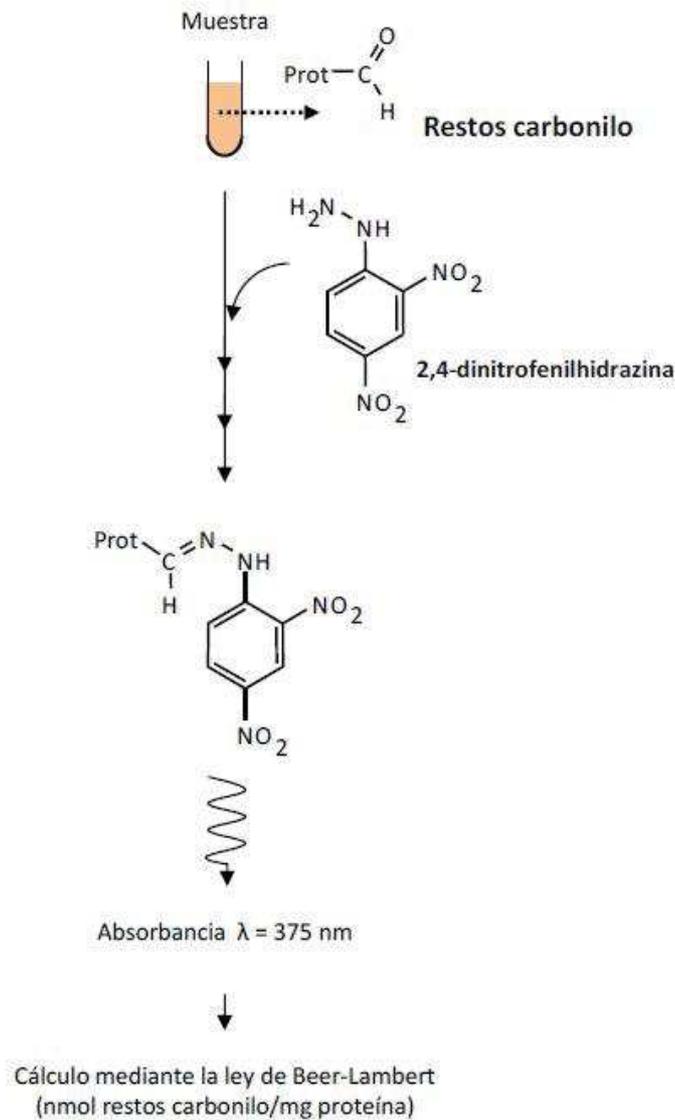


Figura 27. Cuantificación de los restos carbonilo de las proteínas.

## 4.4 MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Los resultados obtenidos fueron tratados estadísticamente con el programa SPSS 22.

Se realizaron dos estudios estadísticos, el primero consistió en la descripción de cada variable. Estas fueron definidas mediante dos descriptores básicos, la media aritmética como medida de la tendencia central, y el error estándar como una medida de la dispersión. Por ello, los resultados se expresaron siempre como media  $\pm$  error estándar.

Posteriormente y una vez comprobado por el test de Kolmogorov-Smirnov que los valores de las variables seguían una distribución normal, se realizó un estudio inferencial para valorar si las diferencias entre las medias de los grupos eran estadísticamente significativas, lo que se logró aplicando el test de la  $t$  de Student para datos pareados o no, con un nivel de significación aceptado en  $p \leq 0,05$ .

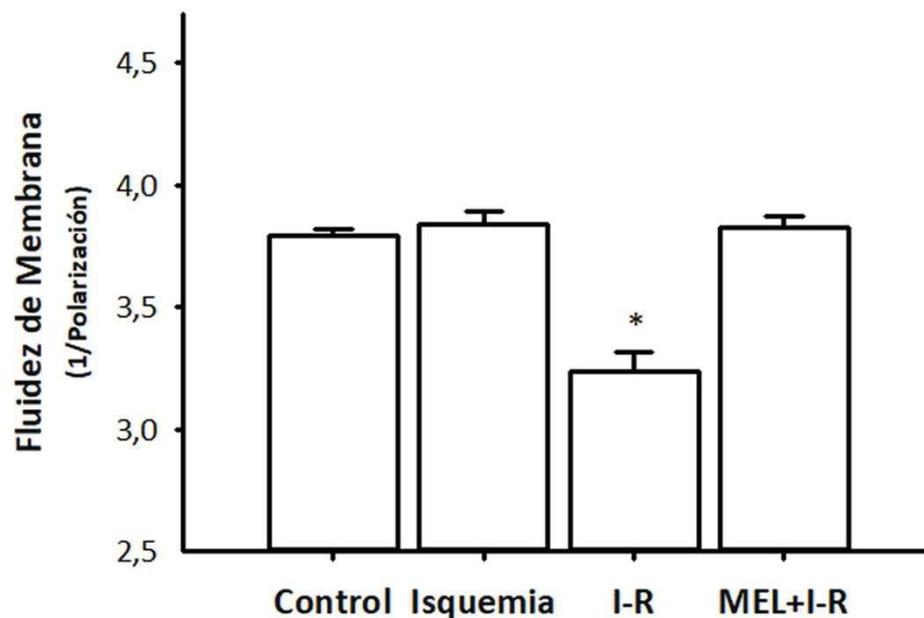
Todas las gráficas se elaboraron mediante el uso del programa informático Sigma Plot, versión 13.0.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 EFECTO HEPATOPROTECTOR DE LA MELATONINA EN EL MODELO DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN *IN VIVO*

#### 5.1.1 FLUIDEZ DE MEMBRANA CELULAR

Los efectos de la isquemia-reperfusión en la fluidez de la membrana celular hepática se ilustran en la figura 28. Tras 20 minutos de isquemia, la fluidez de la membrana fue similar ( $3,83 \pm 0,06$ ) a la obtenida en el grupo control ( $3,79 \pm 0,03$ ). Tras la perfusión durante 30 minutos existió una clara reducción ( $3,23 \pm 0,08$ ) en la fluidez que se previno completamente con el tratamiento con melatonina ( $3,83 \pm 0,04$ ). Los niveles tan bajos tras la isquemia-reperfusión fueron estadísticamente significativos ( $p \leq 0,0001$ ) al compararlos con los otros grupos del estudio.

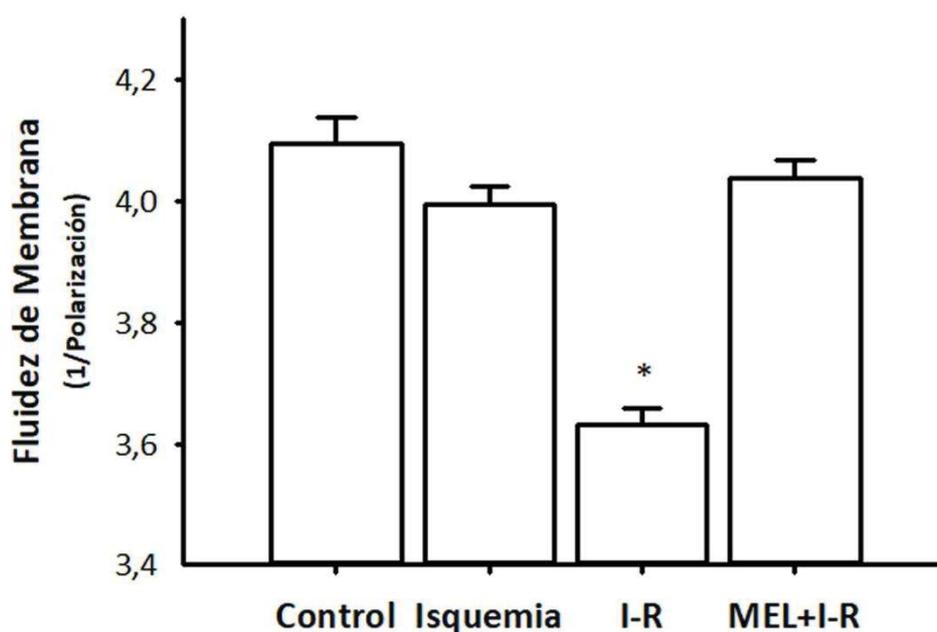


**Figura 28.** Efecto de la administración intraperitoneal de melatonina (MEL) en dosis de 50 mg/kg a nivel de la fluidez de la membrana celular (1/Polarización) en ratas expuestas o no a isquemia o a isquemia-reperfusión (I-R). Los niveles máximos de rigidez se alcanzaron 30 minutos después de la perfusión vascular. El tratamiento con melatonina previno completamente la rigidez causada por la perfusión. Los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar de 8-10 ratas por grupo. \* $p < 0,0001$  vs grupos control, isquemia y MEL+I-R.

### 5.1.2 FLUIDEZ DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

El daño hepático por isquemia-reperfusión también fue valorado a nivel mitocondrial. Tras 20 minutos de isquemia, la fluidez de la membrana mitocondrial ( $3,99 \pm 0,12$ ) fue similar a los datos obtenidos en los animales del grupo control ( $4,09 \pm 0,12$ ). Después de 30 minutos de reperfusión vascular, la fluidez de membrana disminuyó ( $3,63 \pm 0,10$ ;  $p \leq 0,0001$ ), es decir, aumentó la rigidez de la membrana mitocondrial, comparado con el grupo control (Figura 29).

Cuando las ratas fueron tratadas con melatonina antes de la isquemia ( $4,04 \pm 0,10$ ), la indolamina previno ( $p \leq 0,0001$ ) la rigidez de la membrana mitocondrial en un 87'91%, y no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las ratas tratadas con melatonina y los animales pertenecientes al grupo control (Figura 29).

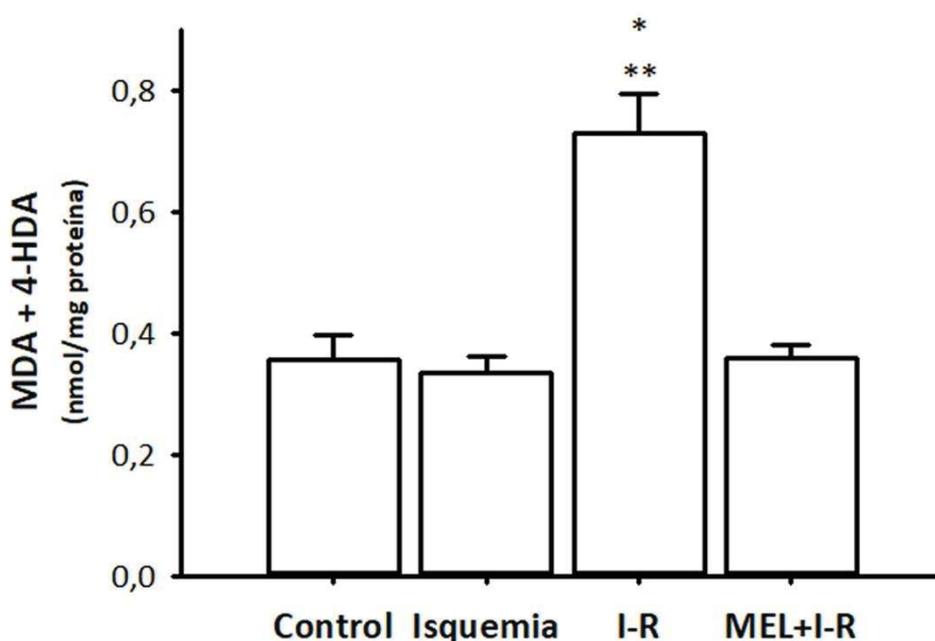


**Figura 29.** Efectos de la melatonina (50 mg/kg) en la fluidez de la membrana mitocondrial (1/Polarización). Las ratas no expuestas (control), se compararon con las expuestas a isquemia durante 20 minutos, o a isquemia seguida de 30 minutos de reperfusión (I-R), y las tratadas con melatonina al inicio de la MEL+I-R. Los resultados se expresan como media  $\pm$  error estándar de 8-10 ratas por grupo. \* $p < 0,0001$  vs control, isquemia y MEL+I-R.

### 5.1.3 PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

La figura 30 compendia los resultados de la peroxidación lipídica. Las concentraciones de MDA+4-HDA en el grupo de animales a los que se les practicó la intervención quirúrgica simulada fue  $0,36 \pm 0,04$  nmol/mg proteína, muy similares a los que se obtuvieron en las ratas sometidas a 20 minutos de isquemia ( $0,33 \pm 0,03$

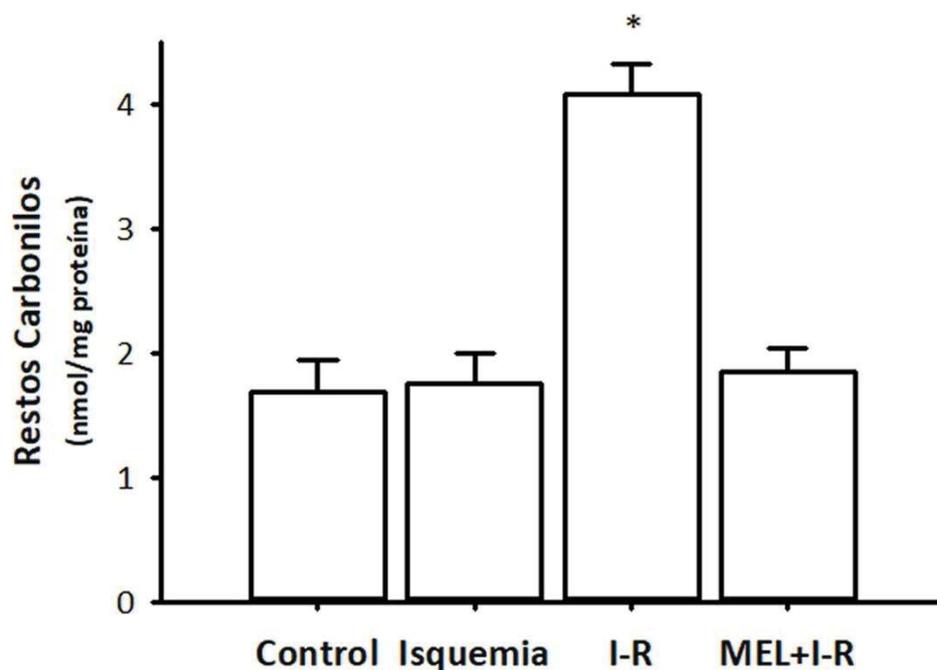
nmol/mg proteína). Sin embargo, tras 30 minutos de la reperfusión vascular se observó un aumento del daño oxidativo lipídico ( $0,73 \pm 0,06$  nmol/mg proteína), que se evitó cuando además de la reperfusión vascular se administró previamente melatonina ( $0,36 \pm 0,02$  nmol/mg proteína). Al igual que sucedió con la rigidez de las membranas celulares y mitocondriales, la peroxidación lipídica inducida por la reperfusión fue estadísticamente significativa ( $p \leq 0,001$  vs grupo control y  $p \leq 0,0001$  vs isquemia e isquemia-reperfusión tratados con melatonina) al comparar con los otros grupos de animales.



**Figura 30.** Concentraciones de malondialdehído (MDA) y 4-hidroxiálquenos (4-HDA) en homogeneizados hepáticos de ratas controles expuestas o no a isquemia (I), isquemia+reperfusión (I-R), o tratados con melatonina (MEL) antes del inicio de la isquemia. Las barras representan los valores que se expresan como media  $\pm$  error estándar de 8-10 ratas por grupo. \* $p < 0,001$  vs grupo control. \*\* $p < 0,0001$  vs isquemia y MEL+I-R.

#### 5.1.4 CARBONILACIÓN PROTEICA

Atendiendo a la concentración de los restos carbonilos proteicos como índice de oxidación proteica de los casos control ( $1,69 \pm 0,25$ ), post-isquemia de 20 minutos ( $1,75 \pm 0,25$ ), e isquemia-reperfusión tratados con melatonina ( $1,84 \pm 0,19$ ). En el grupo de isquemia seguido de 30 minutos de reperfusión hubo un aumento marcado ( $4,08 \pm 0,24$ ) respecto a los otros grupos ( $p \leq 0,0001$ ) (Figura 31).



**Figura 31.** Carbonilación proteica, como índice de daño oxidativo a proteínas, en los homogeneizados hepáticos en el grupo control, ratas expuestas a 20 minutos de isquemia y ratas sometidas a isquemia y posterior reperusión vascular durante 30 minutos (I-R), y tratadas con melatonina (MEL) previamente al inicio de la I-R (MEL+I-R). Los valores se expresan como media±error estándar de 8-10 ratas por grupo.

\*p <0,0001 vs grupo control, isquemia, o MEL+I-R.

## 5.2 EFECTO DE LA MELATONINA EN LAS MEMBRANAS CELULARES Y MITOCONDRIALES HEPÁTICAS EXPUESTAS A NITROPRUSIATO SÓDICO

### 5.2.1 ESTUDIOS CINÉTICOS DEL MODELO OXIDATIVO

Antes de evaluar la actividad antioxidante de la melatonina y para establecer las condiciones óptimas del modelo generador de NO· se realizó un estudio de cinética de tiempo. En él se determinaron las modificaciones en la fluidez de membrana celular y mitocondrial, y las concentraciones de MDA+4-HDA y de restos carbonilo en proteínas en la suspensión de membranas aisladas del tejido hepático de rata, expuestas o no a nitroprusiato sódico 1 mM, manteniendo una temperatura de incubación constante de 37 °C y modificando el tiempo de incubación.

En las tablas IV y V se detallan los resultados que se obtuvieron. La adición de NPS disminuyó la fluidez y aumentó los otros indicadores bioquímicos de lesión

oxidativa. En los tres casos las modificaciones fueron tiempo-dependientes de forma significativa. En las figuras 32 y 33 se ilustran estos resultados incluyendo el estudio estadístico inferencial.

**Tabla IV. El nitroprusiato sódico 1 mM disminuyó la fluidez y aumentó las concentraciones de MDA+4-HDA y restos carbonilo de forma tiempo dependiente en membranas celulares de hepatocitos de rata.**

Tiempo (minutos)	Fluidez de membrana (1/Polarización)	MDA+4-HDA (nmol/mg proteína)	Restos carbonilo (nmol/mg proteína)
<b>Control</b>	3,803±0,037	0,062±0,002	0,212±0,018
<b>0</b>	3,800±0,044	0,068±0,007	0,218±0,023
<b>10</b>	3,770±0,017	0,088±0,009	0,245±0,017
<b>20</b>	3,723±0,069	0,1±0,001*	0,268±0,018
<b>40</b>	3,612±0,040*	0,131±0,003*	0,288±0,013
<b>60</b>	3,558±0,023*	0,155±0,002*	0,343±0,034*
<b>120</b>	3,490±0,027*	0,215±0,036*	0,360±0,021*

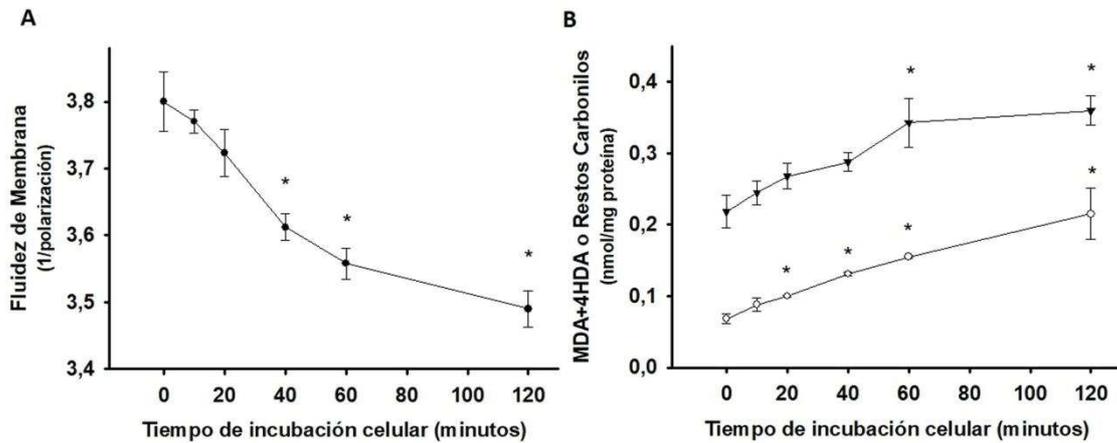
N=10. \*p ≤0,05 vs membranas control. MDA: Malondialdehído; 4-HDA: 4-hidroxiacetonales.

**Tabla V. Efecto del nitroprusiato sódico 1 mM en las membranas mitocondriales aisladas del hígado de rata.**

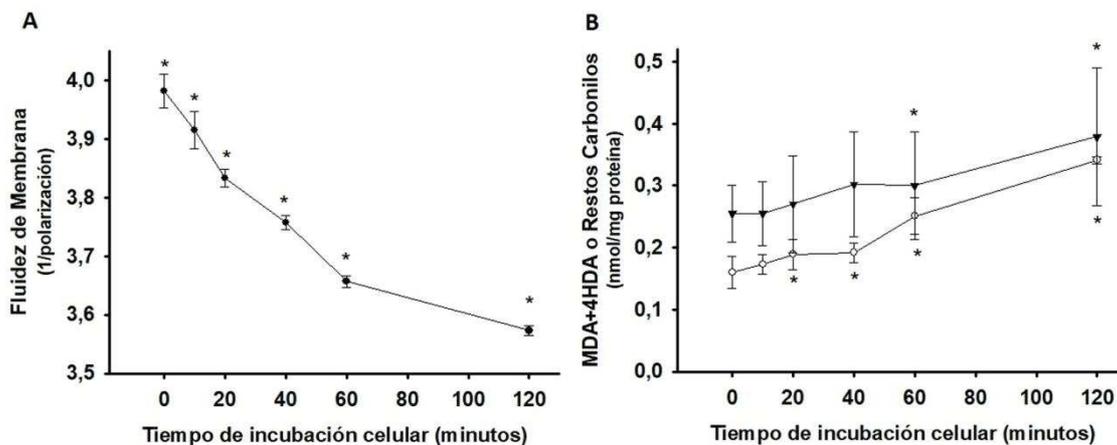
Tiempo (minutos)	Fluidez de membrana (1/Polarización)	MDA+4-HDA (nmol/mg proteína)	Restos carbonilo (nmol/mg proteína)
<b>Control</b>	4,063±0,042	0,143±0,10	0,203±0,079
<b>0</b>	3,982±0,029*	0,160±0,026	0,255±0,046
<b>10</b>	3,915±0,032*	0,173±0,016	0,255±0,052
<b>20</b>	3,833±0,015*	0,189±0,024	0,270±0,078*
<b>40</b>	3,757±0,012*	0,192±0,016	0,302±0,085*
<b>60</b>	3,657±0,010*	0,251±0,029*	0,300±0,087*
<b>120</b>	3,573±0,08*	0,341±0,06*	0,379±0,111*

Los resultados se expresaron como media±error estándar de 10 observaciones independientes. N=10.

\*p ≤0,05 vs control. MDA: Malondialdehído; 4-HDA: 4-hidroxiacetonales.



**Figura 32.** A: Valores de fluidez de membrana celular (●); B: malondialdehído y 4-hidroxiálquenos (MDA+4-HDA) (○) y restos carbonilos (▲) de los homogeneizados hepáticos incubados con nitroprusiato sódico 1 mM durante 0, 10, 20, 40, 60, y 120 minutos. Los resultados reflejaron que 60 minutos eran necesarios para generar daño oxidativo en las membranas celulares hepáticas. Los valores se expresan como media±error estándar. \*p <0,05 vs tiempo 0.



**Figura 33.** A: El nitroprusiato sódico 1 mM produjo rigidez en las membranas mitocondriales (●); B: a la vez que aumentó las concentraciones de malondialdehído y 4-hidroxiálquenos (MDA+4-HDA) (○) y la carbonilación proteica (▲) de forma tiempo dependiente. Los valores se expresan como media±error estándar.

\*p <0,05 vs tiempo 0.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los estudios cinéticos, se decidió utilizar un tiempo de incubación con NPS de 60 minutos para los siguientes experimentos. Este tiempo fue elegido dado que hubo diferencias estadísticamente significativas en los tres parámetros analizados tanto a nivel mitocondrial como celular en relación al grupo control.

La melatonina fue evaluada como molécula activa frente a la toxicidad del NPS 1 mM en las membranas en un rango de concentraciones de 0,01 a 3 mM. Los resultados de fluidez de membrana, MDA+4-HDA y restos carbonilo obtenidos en las membranas de los hepatocitos se compendian en las tablas VI y VII.

**Tabla VI. Efectos de las concentraciones crecientes de melatonina (MEL) sobre el estrés oxidativo inducido por nitroprusiato sódico (NPS) 1 mM en la fluidez de membrana celular, la peroxidación lipídica y la carbonilación proteica en membranas aisladas del tejido hepático.**

Concentraciones de NPS y de melatonina	Fluidez de membrana (1/Polarización)	MDA+4-HDA (nmol/mg proteína)	Restos carbonilo (nmol/mg proteína)
Control	4,148±0,043	0,139±0,016	0,151±0,011
NPS 1 mM	3,795±0,042	0,283±0,014	0,268±0,007
+MEL 0,01 mM	3,773±0,06	0,255±0,007	0,263±0,004
+MEL 0,1 mM	3,827±0,014	0,229±0,018	0,258±0,004
+MEL 0,3 mM	3,947±0,024*	0,214±0,015*	0,201±0,003*
+MEL 1 mM	4,190±0,033*	0,180±0,018*	0,167±0,005*
+MEL 3 mM	4,363±0,31*	0,166±0,016*	0,141±0,007*

Los resultados se expresan como media ± error estándar. \*p ≤0,05 vs membranas expuestas a NPS.

NPS: Nitroprusiato sódico; MEL: Melatonina; MDA: Malondialdehído; 4-HDA: 4-hidroxiálquenos.

**Tabla VII. La melatonina (MEL) inhibió la aparición de rigidez en la membrana mitocondrial así como la peroxidación lipídica y la formación de restos carbonilo causada por nitroprusiato sódico (NPS) 1 mM.**

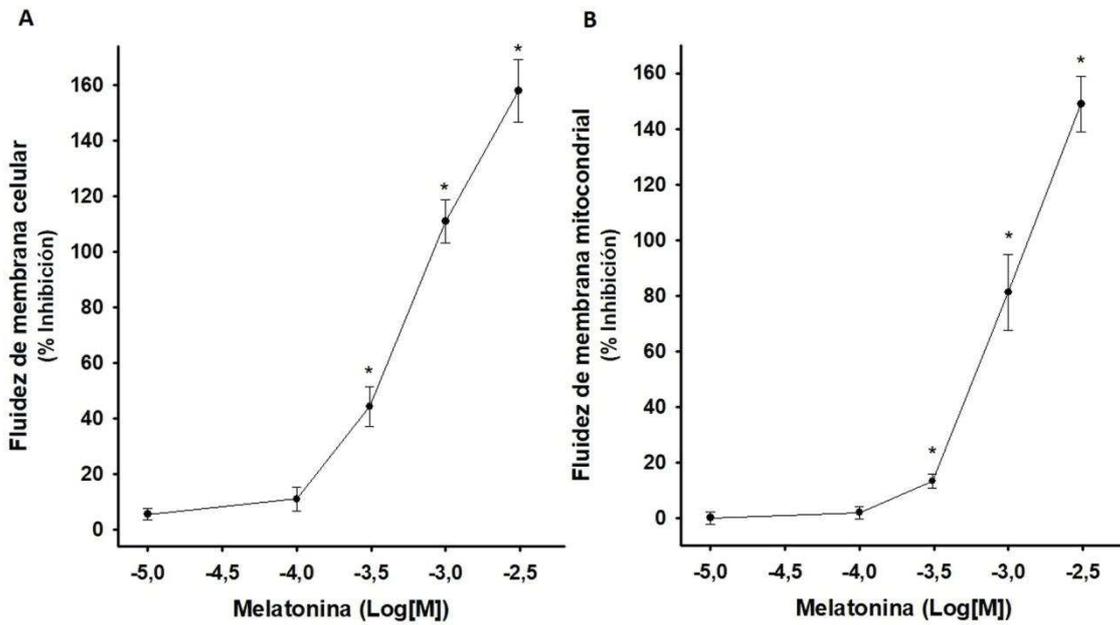
Concentraciones de NPS y de melatonina	Fluidez de membrana (1/Polarización)	MDA+4-HDA (nmol/mg proteína)	Restos carbonilo (nmol/mg proteína)
Control	4,346±0,077	0,164±0,001	0,230±0,025
NPS 1 mM	3,818±0,018	0,355±0,008	0,432±0,023
+MEL 0,01 mM	3,812±0,015	0,336±0,009	0,408±0,007
+MEL 0,1 mM	3,832±0,012	0,327±0,021	0,390±0,005
+MEL 0,3 mM	3,892±0,021*	0,294±0,017*	0,354±0,007*
+MEL 1 mM	4,250±0,026*	0,195±0,028*	0,276±0,011*
+MEL 3 mM	4,608±0,064*	0,161±0,09*	0,258±0,006*

Los resultados se expresan como media ± error estándar. \*p ≤0,05 vs membranas incubadas con NPS.

NPS: Nitroprusiato sódico; MEL: Melatonina; MDA: Malondialdehído; 4-HDA: 4-hidroxiálquenos.

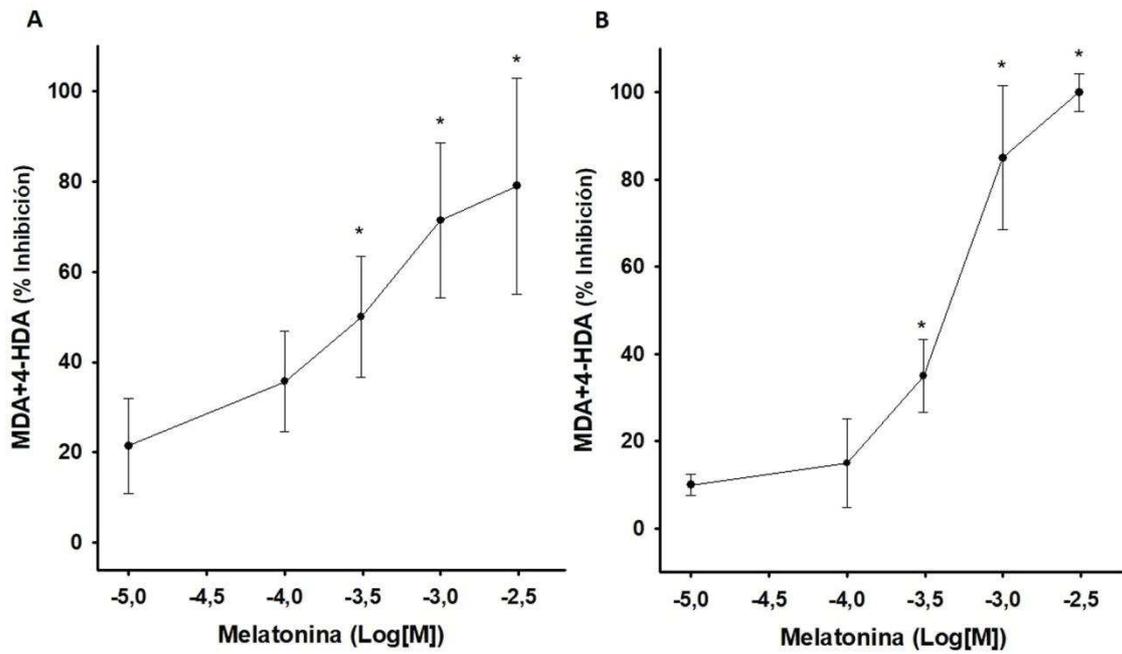
Tanto a nivel celular como mitocondrial, la melatonina redujo la rigidez de la membrana, causada por NPS, de manera concentración-dependiente y de forma significativa (p≤0,05) a las concentraciones de 0,3, 1, y 3 mM (Figura 34). Análogamente, se evidenció una acción antioxidante en los lípidos de las membranas a

las mismas concentraciones, demostrada por la reducción de la formación de MDA+4-HDA (Figura 35). También se presentó un efecto protector en la carbonilación de las proteínas, con significación estadística a partir de 0,3 mM (Figura 36).

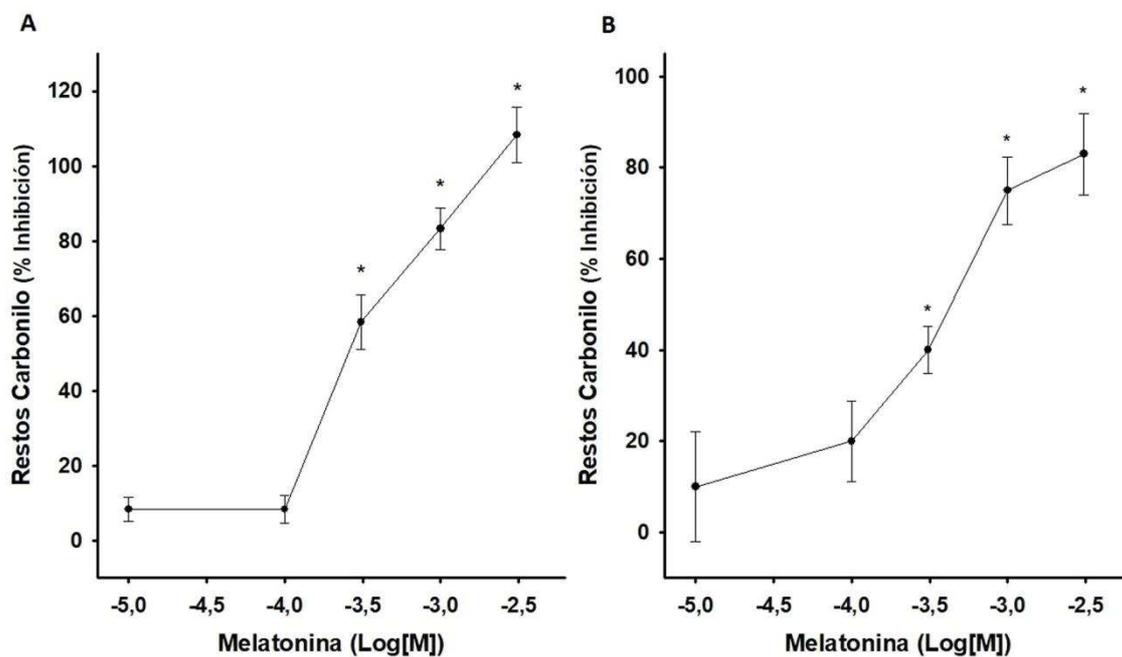


**Figura 34.** Efecto de la administración de melatonina en la fluidez en membranas celulares (A) y mitocondriales (B) expuestas a nitroprusiato sódico (NPS) 1 mM durante 60 minutos. Concentraciones de melatonina  $\geq 0,3$  mM previnieron significativamente ( $p \leq 0,05$ ) la rigidez. Los resultados se expresan como media  $\pm$  error estándar. N=10.

\*p  $\leq 0,05$  comparado con el grupo expuesto sólo a NPS 1 mM.



**Figura 35.** La melatonina redujo la peroxidación lipídica inducida por nitroprusiato sódico (NPS) 1 mM en membranas celulares (A) y mitocondriales (B) aisladas del tejido hepático sano. N=10. \*p ≤0,05 vs control oxidado con NPS 1 mM.



**Figura 36.** Cinética de la melatonina en la oxidación de proteínas inducida por nitroprusiato sódico (NPS) 1 mM en membranas celulares (A) y mitocondriales (B) aisladas de hígados sanos de rata. Los valores son las medias ± error estándar de 10 observaciones independientes. \*p ≤0,05 vs NPS 1 mM.

Los valores de  $IC_{50}$  calculados en la membrana celular fueron 0,365 mM, 0,3 mM y 0,267 mM para inhibir la rigidez de la membrana, la formación de MDA+4-HDA y la aparición de restos carbonilo en las proteínas, respectivamente. Utilizando las membranas mitocondriales, las concentraciones de melatonina que redujeron el 50% de la rigidez en las membranas y de la oxidación de lípidos y proteínas fueron mayores, concretamente 0,678 mM, 0,512 mM y 0,509 mM, respectivamente.

## 6. DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra que el pretratamiento con melatonina atenúa significativamente la rigidez de la membrana celular y mitocondrial, así como la peroxidación lipídica y la oxidación de proteínas desencadenadas por estrés oxidativo. Estos resultados se observan tanto *in vivo* en el estudio experimental que indujo el daño hepático por I-R en la rata como *in vitro* usando NPS como agente causal del daño hepático en las membranas.

Según nuestros resultados, la isquemia causada por la maniobra de Pringle, que impide el flujo sanguíneo en la triada portal del lóbulo hepático, no altera los marcadores de estrés oxidativo, como ya se describió previamente en la literatura (Okatani et al. 2002; Kang et al. 2014), si bien se cree que la aparición de daño hepático puede depender del tiempo de isquemia y de la localización, es decir, de los lóbulos hepáticos afectados. En modelos de isquemia parcial se apreció una recuperación del flujo sanguíneo en los lóbulos post-isquémicos mucho más tardía debido a un “fenómeno de robo” (Karatzas et al. 2014). Esta hipótesis está en consonancia con los resultados de Zaouali *et al.* (2011 y 2013) en relación al trasplante de hígado y el papel de la preservación de fluidos en la prevención del estrés oxidativo. Estos autores observaron un ligero aumento en los niveles de transaminasas tras 24 h de isquemia fría, especialmente en hígados esteatósicos. Otros (Kang et al. 2014) han informado resultados similares pero, a diferencia de los estudios mencionados, la alteración de los niveles de transaminasas no fueron estadísticamente significativos.

La respuesta a la I-R hepática sigue un patrón bifásico con dos fases: aguda y subaguda. La primera, aguda, aparece en la etapa temprana de reperfusión hepática (menos de 6 h), y se caracteriza por una lesión hepatocelular causada por los radicales libres y por la activación de linfocitos T y células de Kupffer. Sin embargo, la fase subaguda alcanza su punto máximo 18-24 h después del inicio de la reperfusión, y se caracteriza por una infiltración masiva de neutrófilos. Varios estudios han sugerido que las EROs generadas por las células de Kupffer en la fase temprana de reperfusión pueden conducir a un proceso que resulte en la destrucción de las membranas celulares de los hepatocitos periportales cercanos (Eum et al. 2007).

En la fase temprana de la lesión isquémica, la acidosis protege a los hepatocitos contra la necrosis celular. Sin embargo, cuando la lesión por isquemia persiste, este mecanismo de protección es insuficiente para evitar la cascada de eventos que finalmente conducen a la muerte celular parenquimatosa (Teoh y Farrell 2003). Se produce una disfunción de la bomba sodio-potasio, lo que eleva la concentración de sodio intracelular, con el consiguiente edema por arrastre de agua. Esto conlleva una alteración en la función de las bombas intercambiadoras de sodio-hidrógeno y sodio-calcio, lo que incrementa las concentraciones intracelulares de  $H^+$  y  $Ca^{2+}$ . El calcio activa las fosfolipasas, cuya acción, sumada a las anteriores, produce la necrosis celular. Además, la retención de hidrógeno disminuye el pH celular, lo que lleva a una alteración de la actividad enzimática y la aglutinación de la cromatina nuclear. La disfunción de los ribosomas disminuye la síntesis de proteínas (Kanoria et al. 2012; Ornellas et al. 2017; Wu et al. 2018). Además, se produce el agotamiento del ATP, al igual que su degradación en metabolitos como la adenosina, inosina e hipoxantina, especialmente a nivel mitocondrial por disfunción de la cadena de transporte de electrones (Peralta et al. 2013). Todo esto es debido al cese del aporte de oxígeno así como al proceso de fosforilación oxidativa (Teoh 2011; Zhai et al. 2011; Kanoria et al. 2012). Asimismo, los niveles de  $NO\cdot$  también caen debido a la disminución de la actividad de NOS por la falta de oxígeno generada durante el proceso de isquemia secundario a la hemoconcentración intravascular y al desequilibrio entre los mediadores vasoactivos ET y  $NO\cdot$  (Scheinichen et al. 2003; Ramalho et al. 2006, Lee et al. 2016).

Durante la reperfusión, se restablece el pH, acelerando así la muerte celular por la respuesta inmune inflamatoria. La hipoxantina, acumulada durante la isquemia, se convierte en EROs, que promueven la LPO (Jaeschke y Woolbright 2012). Las EROs aumentan la producción de prostaglandinas, liberación de  $TNF-\alpha$ ,  $IFN-\gamma$ , interleucinas, leucotrienos B y factor activador de los trombocitos, por lo que favorecen la quimiotaxis de neutrófilos y aumentan su adherencia al endotelio vascular aumentando el daño y produciendo alteraciones de la microcirculación por taponamiento (Lutz et al. 2010, Zhai et al. 2007; Ornellas et al. 2017). La secreción de  $TNF-\alpha$  e IL estimula las células de Kupffer, lo que incrementa sus niveles (Perry et al. 2011; Karatzas et al. 2014; Lu et al, 2016). La LPO conduce a una sobrecarga masiva de

concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$ . Además, en las células endoteliales sinusoidales y en los hepatocitos, hay descargas de citocromo C al citoplasma desde la mitocondria debido a la interrupción de la fluidez y la permeabilidad de la membrana celular (Perry et al. 2011; Karatzas et al. 2014; Lu et al, 2016). La sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  da como resultado la apertura de los PTPm (Crompton 1999). Finalmente, mientras que la isquemia reduce los niveles de  $\text{NO}\cdot$ , la reperusión genera grandes cantidades de ERNs debido a la regulación positiva de iNOS en todas las células hepáticas en respuesta a mediadores inflamatorios (Serracino-Inglott et al. 2001). En paralelo, se generan EROs debido a una menor concentración de agentes antioxidantes en las células isquémicas, la activación de la xantina oxidasa por acúmulo de los productos de degradación del ATP, y la acidificación del medio. Las EROs ( $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $^1\text{O}_2$ ) causan estrés oxidativo que promueve la disfunción endotelial, daño en el ADN y respuestas inflamatorias locales (Korkmaz et al. 2009, Negre-Salvayre et al. 2010).

El estrés oxidativo reduce la libertad de movimiento de las moléculas que conforman las membranas biológicas (Chen y Yu 1994; García et al. 2014). Está bien estudiado que uno de las consecuencias de la LPO a nivel de las membranas biológicas es el descenso de su fluidez (Curtis et al. 1984; Chen y Yu 1994). Se han propuesto diversas razones estructurales para explicar este hecho. La primera es la disminución de la proporción de ácidos grasos poliinsaturados frente a los saturados ya que los radicales libres tienen especial afinidad por los primeros debido a que tienen un mayor número de enlaces covalentes ricos en electrones (Curtis et al. 1984; Gutteridge 1995). Por otra parte, la oxidación de los ácidos grasos que forman las membranas celulares genera la formación de uniones cruzadas bien entre fosfolípidos o bien entre fosfolípidos y proteínas estructurales (Bruch y Thayer 1983; Curtis et al. 1984). Por último, se ha observado que la oxidación de las proteínas de membrana también favorece el descenso de la fluidez de membrana (García et al. 2014).

Estas alteraciones son las principales responsables de la aparición de rigidez en las membranas biológicas cuando éstas son expuestas a radicales libres y, por tanto, determinan la pérdida de su función (Bruch y Thayer 1983; Chen y Yu 1994; De Castro et al 2007; Blair 2008). Incluso pequeños cambios en la fluidez de la membrana pueden causar aberraciones en la función celular e inducir procesos patológicos (Miana-Mena et al. 2011; Pytel et al. 2013).

La actividad antioxidante de la melatonina contra el estrés oxidativo ha sido bien documentada en una amplia variedad de condiciones experimentales tanto *in vitro* como *in vivo*. La indolamina previene la formación de EROs durante la reperfusión lo que preserva el ATP, mejora la expresión desequilibrada de los genes de estrés vascular durante el daño por I-R hepático y aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes (Freitas et al. 2006; Park et al. 2007; Kim y Lee 2008; Kireev et al. 2012 y 2013). La melatonina mitiga la expresión de genes proinflamatorios y proapoptóticos en el hígado junto con el aumento de EROs y ERNs después de 36 h de la reperfusión, y conserva los niveles de ATP, la capacidad antioxidante del hígado y el contenido de ARNm. Este modelo se usa para valorar los efectos de la I-R porque la rata tiene un contenido de antioxidantes significativamente menor (Soltys et al. 2001). Deng y col. (2016) obtuvieron resultados similares tras 2, 4, 8 y 24 h de reperfusión, confirmando la hipótesis de que la melatonina puede promover la conversión de los radicales libres de oxígeno en sustancias no tóxicas o de baja toxicidad. Además, la indolamina aumentó la actividad de las enzimas antioxidantes, en especial la SOD, de una manera dependiente del tiempo.

La melatonina previene el daño por I-R gracias a sus acciones directas como “scavenger” de radicales libres así como por sus efectos indirectos estimulando el sistema de defensa antioxidante celular, es decir, al aumentar los niveles de ARNm y las actividades de varias enzimas antioxidantes importantes (Barlow-Walden et al. 1995; Pablos et al. 1998); estos incluyen SOD (que cataliza la conversión de  $\cdot\text{O}_2^-$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), GPx, glutatión reductasa (GRd) y glutamilo-cisteína sintasa (también conocida como glutamato-cisteína ligasa), que promueve la síntesis de otro importante antioxidante intracelular, el glutatión (GSH) (Reiter et al. 2000; Rodríguez et al. 2004; Hardeland 2005; Tan et al. 2015; Reiter et al. 2016). Además de actuar directamente contra las EROs y ERNs, las cuales se generan durante el daño por I-R (Korkmaz et al. 2009; Reiter et al. 2010a), reduce la actividad de la mieloperoxidasa (Lee et al. 2002). Asimismo, inhibe otras enzimas que promueven la formación de especies reactivas, como la NOS, una enzima clave en la fisiopatología de la I-R y en la formación de  $\text{NO}\cdot$  (Pozo et al. 1997). En comparación con otros antioxidantes, la melatonina ejerce su acción en todos los compartimentos celulares: membrana, citosol y núcleo, lo que sugiere su presencia en todas estas ubicaciones subcelulares (Reiter 1995b).

Varios estudios han obtenido resultados que demuestran que la melatonina protege contra el deterioro inducido por I-R en la respiración mitocondrial, la síntesis de ATP, la inflamación mitocondrial y la LPO (Okatani et al. 2003a y 2003b; Kireev et al. 2013). La melatonina también reduce las fugas de electrones de la cadena respiratoria, lo que limita la generación de radicales libres y aumenta la expresión de la proteína desacopladora, hecho que previene la generación de  $\cdot\text{O}_2^-$  mitocondrial al aumentar el flujo de protones en la matriz (Pappolla et al. 1999; Jiménez-Aranda et al. 2013).

La indolamina preserva el estado funcional y energético de las células durante la I-R al reducir las concentraciones de TNF- $\alpha$  e inhibir la expresión de iNOS y la producción de NO $\cdot$ . En este sentido, aumenta los niveles de ARNm de la eNOS y reduce la elevación de la iNOS (Rodríguez-Reynoso et al. 2001; Kilic et al. 2005; Wang et al. 2005). La importancia de estos efectos radican en que el NO $\cdot$  derivado de la eNOS es un factor de protección frente a la fisiopatología del endotelio vascular porque se genera de forma temprana y reduce el estrés microcirculatorio del injerto y el daño por reperfusión. Por el contrario, el derivado de la iNOS promueve la lesión isquémica al aumentar la formación de radicales libres, ya que se genera varias horas después de finalizar la isquemia, por lo que su producción tardía es perjudicial desde el punto de vista de la regulación del flujo sanguíneo (Albrecht et al. 2003; Shah y Kamath 2003).

Atendiendo a la acción de la melatonina en el daño por I-R, la indolamina disminuye los niveles de TNF- $\alpha$ , los productos de LPO, la expresión de la iNOS y el NO $\cdot$ , a la vez que preserva la funcionalidad del órgano (Rodríguez-Reynoso et al. 2001).

Nuestros resultados indican que el daño por reperfusión disminuye la fluidez de la membrana celular y mitocondrial en comparación con los animales control. Sin embargo, la administración de melatonina previene completamente la rigidez de la membrana, obteniendo así una fluidez similar a la de las ratas control. Estos resultados confirman estudios previos *in vitro* en los cuales la indolamina evitó cambios en la fluidez de la membrana microsómica durante la peroxidación lipídica inducida con FeCl $_3$  en microsomas hepáticos de rata (García et al. 1997 y 1998). Un efecto que se correlaciona muy bien con la actividad de la melatonina para eliminar radicales libres. También se obtuvieron resultados en el mismo sentido en un modelo *in vivo* oxidativo inducido por tetracloruro de carbono *in vitro* en hígado de rata (Aranda et al. 2010).

Nuestros resultados obtenidos en el modelo de I-R *in vivo* concuerdan con los de estos estudios previos y demuestran una estrecha relación con la actividad antioxidante de la melatonina, ya que preserva tanto los niveles de MDA como la carbonilación obtenidos después de 30 minutos de reperfusión, que son similares a los de los animales control. Hallazgos similares se han obtenido en otros modelos de I-R en otros tejidos. Así, en ratas sometidas a I-R testicular aumentaron tanto la oxidación de lípidos como de proteínas después de 1, 3 y 24 h de reperfusión, y la melatonina redujo eficazmente la peroxidación lipídica y proteica testicular inducida por la reperfusión (Kurcer et al. 2008).

Una consideración sobre los efectos de la melatonina en las membranas es que en modelos artificiales de liposomas multilamelares de dipalmitoil fosfatidilcolina, dimiristoil fosfatidilcolina y dipalmitoil fosfatidilglicerol, la indolamina incrementó la dinámica de los lípidos aumentando su fluidez (Saija et al. 2002; Severcan et al. 2005; Sahin et al. 2007). La capacidad de la melatonina para elevar la fluidez en estas membranas artificiales podría ser considerada como otro mecanismo cooperativo mediante el cual la melatonina protege las membranas biológicas contra la peroxidación lipídica. El mecanismo preciso que subyace al efecto de la melatonina en estas vesículas lipídicas es desconocido. Se ha sugerido de forma general que la melatonina se localiza y orienta principalmente en el nanodominio constituido por los grupos hidrófilos de colesterol y lecitina (Bongiorno et al. 2005). Esto apoya la teoría de su ubicación preferente en la zona superficial de la bicapa lipídica cerca de la cabeza polar (Ceraulo et al. 1999; de Lima et al. 2010; Drolle et al. 2013). Esto pudiera ser beneficioso ya que se ha propuesto que trastornos importantes en los fosfolípidos de membrana hacen que las interacciones de los antioxidantes con los radicales lipídicos sean más eficientes y, por lo tanto, pueden reducir los efectos nocivos de la peroxidación lipídica (Ceraulo et al. 1999). Asimismo, algunos autores sugieren que el efecto de la melatonina no se genera por su ubicación en el núcleo hidrofílico, sino en la zona hidrofóbica (Costa et al. 1997).

El daño por I-R también ha sido estudiado en hígados grasos sometidos a 35 minutos de isquemia caliente y 36 horas de reperfusión (Kireev et al. 2013). En este modelo, el tratamiento con la melatonina fue eficaz al disminuir la lesión hepática, preservando los niveles de transaminasas hepáticas, el ATP hepático y disminuyendo

los marcadores de apoptosis y estrés oxidativo, algo que tiene gran interés clínico porque la melatonina podría mejorar los resultados obtenidos en pacientes sometidos a trasplante de hígado que reciben un injerto de hígado graso.

Todo lo anteriormente expuesto se resume en que el daño por I-R está implicado en una cascada de daño por estrés oxidativo con un aumento de mediadores inflamatorios, reclutamiento de leucocitos, agotamiento de ATP, la generación posterior de EROs y aumento de ERNs debido a la interrupción de la actividad de NOS. En consecuencia, la LPO contribuye a destruir los lípidos, a producir edema celular y a la alteración de la fluidez normal de la membrana celular. Además, un proceso de oxidación de proteínas está involucrado en la promoción de la apoptosis y la muerte celular. Nuestros resultados indican que la melatonina es una molécula muy efectiva para prevenir el aumento de MDA+4-HDA y de los restos carbonilo al tiempo que preserva la fluidez de la membrana, lo que posibilita que pueda ser utilizada en la prevención de las lesiones mediadas por I-R que se producen en una gran variedad de situaciones clínicas.

Se ha analizado que la melatonina también regula la actividad de la glutamato deshidrogenasa mitocondrial (GDH), un marcador de la integridad de la membrana mitocondrial que disminuye durante la I-R (Kang et al. 2016), y estabiliza las membranas microsómicas, lo que les permite resistir la rigidez inducida por el ataque de radicales libres (García et al. 2014). Además, la melatonina suprime el citocromo c liberado en el citoplasma debido a la hinchazón mitocondrial (Kim y Lee 2008). De hecho, la administración crónica de melatonina redujo la rigidez en las membranas mitocondriales aisladas del sistema nervioso central de ratones con envejecimiento acelerado (García et al. 2011). La capacidad de la melatonina para prevenir la rigidez de la membrana causada por el envejecimiento se proporciona a través de su capacidad para disminuir el daño de LPO (García et al. 2011), así como por su capacidad para competir con el colesterol para unirse a la lecitina, desplazando el colesterol de la bicapa como consecuencia (Bongiorno et al. 2005). Finalmente, la melatonina previno eficientemente la rigidez en la membrana eritrocitaria y la LPO de pacientes sometidos a una intervención quirúrgica de bypass cardiopulmonar (Ochoa et al. 2003).

Dado que el  $\text{NO}\cdot$  desempeña un papel esencial en el desarrollo fisiopatológico de la lesión por I-R, y una vez que confirmamos el efecto beneficioso de la melatonina frente al daño en las membranas celulares y mitocondriales causado por la I-R, nos propusimos valorar la actividad protectora de la melatonina en las membranas biológicas frente a la toxicidad del  $\text{NO}\cdot$ . Para ello, decidimos utilizar un modelo *in vitro* bien establecido basado en la exposición de muestras tisulares al NPS, un compuesto que se comporta como un donante exógeno de  $\text{NO}\cdot$  al medio y, por lo tanto, responsable de causar una sobreexposición a esta especie reactiva dependiente del nitrógeno (Ibrahim et al. 2012). Los efectos tóxicos de NPS se han demostrado previamente en varios órganos, incluido el hígado (Sani et al. 2015; Wróbel et al. 2017). Además, se conoce que la citotoxicidad de NPS aumenta la producción de EROs, promoviendo como consecuencia una disminución en los niveles de antioxidantes (Sokołowska et al. 2003). La concentración de NPS (1 mM) utilizada en nuestro estudio fue similar a la usada en estudios anteriores (Paul y Ekambaram 2005; Sani et al. 2015).

$\text{NO}\cdot$  es un potente inductor de LPO bien conocido. Su combinación con el  $\cdot\text{O}_2^-$  forma  $\text{ONOO}^-$ , que también es un oxidante poderoso (Ródenas et al. 2000). La toxicidad del  $\text{ONOO}^-$  se debe a su capacidad de interactuar directamente con nitratos e hidroxilar los anillos aromáticos de los residuos de aminoácidos, reaccionar con sulfhidrilos, con restos de zinciolato, así como con lípidos, proteínas y ADN (Squadrito y Pryor 1998; Piñol-Ripoll et al. 2006). Además,  $\text{ONOO}^-$  reduce la respiración mitocondrial, inhibe la función de las bombas de membrana, agota el GSH celular y daña el ADN, lo que conduce a la activación de la poli (ADP-ribosa) sintasa, que causa el agotamiento de la energía celular (Pryor y Squadrito 1995).

Nuestros resultados son los primeros que demuestran que la exposición al NPS de las membranas celulares y mitocondriales aisladas de tejido hepático sano de rata reduce su fluidez, a la vez que eleva de forma marcada las concentraciones de MDA+4-HDA y la carbonilación proteica, dos parámetros que evidencian la existencia de estrés oxidativo tanto a los lípidos como a las proteínas, principales componentes estructurales de las membranas biológicas.

Como anteriormente se ha discutido, el estrés oxidativo en esta ocasión producido por el NPS 1 mM restringió la libertad de movimiento de lípidos y proteínas en las membranas biológicas (Reiter et al. 2010a y 2016). Un efecto que se debe a la

reducción en la relación de ácidos grasos poliinsaturados/saturados en la membrana, siendo los primeros muy susceptibles al ataque por los radicales libres debido a la afinidad de éstos por los límites covalentes insaturados ricos en electrones (Rezin et al. 2009), y por la formación de uniones cruzadas entre los restos lipídicos de membrana (Reiter et al. 2010b). La LPO también conduce a una sobrecarga masiva de las concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  y, en las células endoteliales sinusoidales y los hepatocitos, se reduce la fluidez y la permeabilidad de la membrana celular como consecuencia de las descargas del citocromo C al citoplasma desde la mitocondria (Karatzas et al. 2014; Lu et al. 2016). La sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  también dará como resultado la apertura permeable en la mitocondria de los poros de transición (Crompton 1999).

También se observó un efecto protector de la melatonina reduciendo la generación de MDA+4-HDA y la carbonilación en homogenados cerebrales expuestos a NPS 1 mM como agente causante de estrés oxidativo (Escames et al. 1997; Piñol-Ripoll et al. 2006).

Las primeras demostraciones de que la melatonina puede estabilizar membranas frente al estrés oxidativo se realizaron en microsomas hepáticos aislados de rata utilizando un modelo *in vitro* que combinaba el  $\text{FeCl}_3$  con el ADP y el NADPH (García et al. 1997 y 1998). En estas experiencias las concentraciones de melatonina necesarias para inhibir el 50% de la rigidez de la membrana microsómica y prevenir la LPO ( $\text{IC}_{50}$ ) fueron muy similares (1,5 y 2,5 mM, respectivamente). La estrecha relación entre el grado de fluidez en las membranas y la formación de MDA+4-HDA permitieron concluir que la melatonina podía estabilizar membranas gracias a su potente actividad antioxidante (García et al. 1997).

Otra consideración es que en nuestro modelo con NPS los valores de  $\text{IC}_{50}$  para producir la rigidez y las concentraciones de los indicadores de estrés oxidativo también fueron similares, con unos valores, en términos generales, próximos a la mitad de los que se requirieron en el modelo  $\text{FeCl}_3/\text{ADP}/\text{NADPH}$  en microsomas hepáticos. Estas diferencias podrían explicarse bien porque la melatonina sea más potente neutralizando el  $\text{NO}\cdot$  que el  $\cdot\text{OH}$  y  $\text{ROO}\cdot$ , bien por cuestiones metodológicas debidas a las diferentes condiciones experimentales de los dos modelos (tanto concentración como tiempo de incubación), o al tipo de membrana, que en este trabajo fue celular y

mitocondrial. La capacidad de la melatonina para preservar la fluidez de las membranas biológicas expuestas a estrés oxidativo también se ha demostrado *in vivo*. La exposición de ratas a radiaciones ionizantes produjo rigidez en membranas microsómicas hepáticas a la vez que aumentó la concentración de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, un indicador de daño en el ADN nuclear de los hepatocitos. La administración de melatonina antes de la irradiación previno completamente tanto la rigidez en las membranas como los aumentos de la base mutada (Karbownik et al. 2000a). También la administración *in vivo* de hepatotoxinas como el ácido  $\delta$ -aminolevulínico, la fenilhidracina, el  $\alpha$ -naftiltiosiocianato y el tetracloruro de carbono, produjeron alteraciones en la dinámica de los fosfolípidos en membranas biológicas caracterizadas por la rigidez que se asocian a aumentos de LPO, las transaminasas y la carbonilación proteica. El tratamiento con melatonina redujo los efectos deletéreos de estas cuatro hepatotoxinas (Karbownik et al. 2000a y 2000b; Calvo et al. 2001; Aranda et al. 2010).

Otro grupo de evidencias del papel protector de la melatonina en las membranas biológicas se han obtenido en modelos de envejecimiento. En condiciones fisiológicas hay una disminución con la edad de la cantidad diaria de melatonina secretada (Reiter 1981; Sohal 2002), lo que, además, se ha correlacionado con un aumento en diversos indicadores de estrés oxidativo. En consecuencia, se ha propuesto que la pérdida de la indolamina contribuye a la acumulación de daño por radicales libres que ocurre en las últimas etapas de la vida (Hardeland et al. 2013). Además, el envejecimiento también aumenta el contenido de colesterol en las membranas (Vorbeck et al. 1982), lo que influye negativamente en la permeabilidad, la fluidez y las propiedades mecánicas de las bicapas lipídicas (Kucerka et al. 2007).

Apoyando esta hipótesis, el envejecimiento de ratas de 28 meses de edad causó descensos de la fluidez de la membrana microsómica hepática y aumentó las concentraciones de MDA+4-HDA y la carbonilación proteica en homogeneizados hepáticos al compararlos con ratas de 2 meses. Además, la falta de melatonina desde el primer mes de vida secundaria a una pinealectomía agravó estos cambios (Reiter et al. 1999).

Por todo esto, el presente trabajo demuestra que, el daño por reperusión, genera rigidez en las membranas celulares y mitocondriales así como estrés oxidativo

secundario a la peroxidación lipídica y daño a proteínas. Todo esto es debido al daño por radicales libres, siendo la melatonina capaz de prevenir dichos incrementos de lesión oxidativa así como de preservar la fluidez de membrana. Además, dentro de los radicales libres y el daño oxidativo, cabe destacar el NO·, el cual es generado por sustancias tales como el NPS, un potente donador de NO· que genera en nuestro modelo *in vitro* daños similares a los observados en el modelo de I-R. Al igual que en el estudio *in vivo*, la melatonina muestra su capacidad antioxidante a nivel del daño oxidativo a proteínas, lípidos y de las membranas celulares y mitocondriales de forma concentración dependiente. Por todo ello, se requiere seguir estudiando la capacidad de la indolamina como agente protector ante el daño por I-R, pudiendo tener especial relevancia en el ámbito clínico en situaciones tales como el trasplante de órganos.

## 7. CONCLUSIONES

Tras el análisis de los resultados obtenidos y su discusión, podemos establecer las siguientes conclusiones:

PRIMERA: El daño hepático ocasionado al aplicar durante un periodo de 30 minutos de isquemia no produjo alteraciones en la dinámica lipídica en las membranas celulares y mitocondriales. Tampoco se observaron signos de lesión oxidativa en los lípidos y proteínas del tejido hepático causado por la isquemia.

SEGUNDA: La reperfusión vascular del tejido hepático, durante 30 minutos después de cesar la maniobra de Pringle, causó una marcada caída de la fluidez en las membranas celulares y mitocondriales. Los aumentos de los marcadores de lesión oxidativa en lípidos y proteínas sugieren que los radicales libres pueden ser los responsables, al menos parcialmente, de la rigidez en las membranas hepáticas aisladas.

TERCERA: El tratamiento previo, antes del inicio de la isquemia hepática, con un potente antioxidante como es la melatonina, no sólo preservó el nivel basal de fluidez en las membranas, sino que también previno la oxidación de los lípidos y proteínas, causada por la reperfusión.

CUARTA: La exposición *in vitro* de las membranas celulares y mitocondriales aisladas del tejido hepático de la rata al nitroprusiato sódico produjo rigidez en las mismas, a la vez que oxidación de sus constituyentes lipídicos y proteicos, lo que sugiere que ambos fenómenos están relacionados.

QUINTA: La melatonina redujo de forma concentración dependiente tanto la rigidez en las membranas celulares y mitocondriales como la oxidación de lípidos y proteínas hepáticas provocados por el nitroprusiato sódico.

SEXTA: Las acciones protectoras de la melatonina frente a la lesión oxidativa causada *in vivo* por la isquemia-reperfusión hepática, e *in vitro* por el nitroprusiato sódico, refuerza la necesidad de evaluar el potencial uso terapéutico de la melatonina en los procesos que cursan con isquemia-reperfusión, como en las patologías vasculares, y, en especial, en el trasplante de órganos.

## 7. CONCLUSIONS

After analyzing the results obtained and discussing them, we can conclude that:

FIRST: The liver damage caused by applying a 30-minute period of ischemia did not cause alterations in lipid dynamics in cell and mitochondrial membranes. There were also no signs of oxidative lesion in the lipids and proteins of liver tissue caused by ischemia.

SECOND: Vascular reperfusion of liver tissue for 30 minutes after cessation of the Pringle maneuver caused a marked decrease in fluidity in cell and mitochondrial membranes. Increases in the markers of oxidative lesion in lipids and proteins suggest that free radicals may be responsible, at least partially, of membrane rigidity in the membranes isolated from liver tissue.

THIRD: Previous treatment before the onset of liver ischemia, with a powerful antioxidant such as melatonin, not only preserved the basal level of fluidity in the membranes, but also prevented the oxidation of lipids and proteins, caused by reperfusion.

FOURTH: *In vitro* exposure of the cell and mitochondrial membranes isolated from the liver tissue of the rat to sodium nitroprusside produced rigidity in them, as well as oxidation of their lipid and protein constituents, suggesting that both phenomena are related.

FIFTH: Melatonin reduced in concentration dependent manner membrane rigidity at cellular and mitochondrial levels as well as the oxidation of hepatic lipids and proteins caused by sodium nitroprusside.

SIXTH: The protective actions of melatonin against oxidative damage caused *in vivo* by hepatic ischemia-reperfusion, and *in vitro* by sodium nitroprusside, reinforces the need to evaluate the potential therapeutic use of melatonin in processes that are associated with ischemia-reperfusion, including vascular pathologies and, especially, in organ transplantation.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ, Menéndez-Peláez A, Pablos MI, Burgos A. Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J Pineal Res.* 1994;16(2):100-12. doi: 10.1111/j.1600-079x.1994.tb00089.x.
2. Acuña-Castroviejo D, Martín M, Macías M, Escames G, León J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J Pineal Res.* 2001;30(2):65-74. doi: 10.1034/j.1600-079x.2001.300201.x.
3. Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Díaz-Casado ME, Lima-Cabello E, López LC, Rosales-Corral S, Tan DX, Reiter RJ. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71:2997-3025. doi: 10.1007/s00018-014-1579-2.
4. Akbulut KG, Gönül B, Akbulut H. The effects of melatonin on humoral immune responses of young and aged rats. *Immunol Invest.* 2001;30(1):17-20. doi: 10.1081/imm-100103687.
5. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006;124(4):783-801. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015.
6. Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol.* 2003;199(1):8-17. doi: 10.1002/path.1250.
7. Allegra M, Reiter RJ, Tan DX, Gentile C, Tesoriere L, Livrea MA. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res.* 2003;34(1):1-10. doi: 10.1034/j.1600-079x.2003.02112.x.
8. Anderson MD, Garrison RN, Ratcliffe DJ, Fry DE. Hepatic "no reflow" following transient ischemia. *Circ Shock* 1984;13:103.
9. Aranda M, Albendea CD, Lostalé F, López-Pingarrón L, Fuentes-Broto L, Martínez-Ballarín E, Reiter RJ, Pérez-Castejón MC, García JJ. In vivo hepatic oxidative stress because of carbon tetrachloride toxicity: protection by melatonin and pinoline. *J Pineal Res* 2010;49:78-85.

- doi: 10.1111/j.1600-079X.2010.00769.x.
10. Arias J, Melean E, Valero N, Pons H, Chacín-Bonilla L, Larreal Y, Bonilla E. [Effect of melatonin on lymphocyte proliferation and production of interleukin-2 (IL-2) and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in mice splenocytes]. *Invest Clin.* 2003;44(1):41-50.
  11. Arora D, Bhatla SC. Melatonin and nitric oxide regulate sunflower seedling growth under salt stress accompanying differential expression of Cu/Zn SOD and Mn SOD. *Free Radic Biol Med.* 2017;106:315-328. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.042.
  12. Attri P, Kim YH, Park DH, Park JH, Hong YJ, Uhm HS, Kim KN, Fridman A, Choi EH. Generation mechanism of hydroxyl radical species and its lifetime prediction during the plasma-initiated ultraviolet (UV) photolysis. *Sci Rep.* 2015;5:9332. doi: 10.1038/srep09332.
  13. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, Molkentin JD. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature.* 2005;434(7033):658-62. doi: 10.1038/nature03434.
  14. Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Menendez-Pelaez A, Chen LD, Poeggeler B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int.* 1995;26(5):497-502. doi: 10.1016/0197-0186(94)00154-m.
  15. Barth BM, Stewart-Smeets S, Kuhn TB. Proinflammatory cytokines provoke oxidative damage to actin in neuronal cells mediated by Rac1 and NADPH oxidase. *Mol Cell Neurosci.* 2009;41(2):274-85. doi: 10.1016/j.mcn.2009.03.007.
  16. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* 1998;78(2):547-81. doi: 10.1152/physrev.1998.78.2.547.
  17. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007;87(1):245-313. doi: 10.1152/physrev.00044.2005.
  18. Benavides Trujillo MC, Pinzón Tovar A. Oxido nítrico: implicaciones fisiopatológicas. *Rev. colomb. anesthesiol.* 2008;36(1):45-52.
  19. Blair IA. DNA adducts with lipid peroxidation products. *J Biol Chem.*

- 2008;283(23):15545-9. doi: 10.1074/jbc.R700051200.
20. Bongiorno D, Ceraulo L, Ferrugia M, Filizzola F, Ruggirello A, Liveri VT. Localization and interactions of melatonin in dry cholesterol/lecithin mixed reversed micelles used as cell membrane models. *J Pineal Res.* 2005;38(4):292-8. doi: 10.1111/j.1600-079X.2005.00211.x.
  21. Boscá F, Marín ML, Miranda MA. Photoreactivity of the nonsteroidal anti-inflammatory 2-arylpropionic acids with photosensitizing side effects. *Photochem Photobiol.* 2001;74(5):637-55. doi: 10.1562/0031-8655(2001)074<0637:potnai>2.0.co;2.
  22. Boveris A, Oshino N, Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 1972;128(3):617-30. doi: 10.1042/bj1280617.
  23. Boveris A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina (B Aires).* 1998;58(4):350-6.
  24. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54. doi: 10.1006/abio.1976.9999.
  25. Brandes RP, Weissmann N, Schröder K. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radic Biol Med.* 2014;76:208-26. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.046.
  26. Bruch RC, Thayer WS. Differential effect of lipid peroxidation on membrane fluidity as determined by electron spin resonance probes. *Biochim Biophys Acta.* 1983;733(2):216-22. doi: 10.1016/0005-2736(83)90525-4.
  27. Bruck R, Aeed H, Avni Y, Shirin H, Matas Z, Shahmurov M, Avinoach I, Zozulya G, Weizman N, Hochman A. Melatonin inhibits nuclear factor kappa B activation and oxidative stress and protects against thioacetamide induced liver damage in rats. *J Hepatol.* 2004;40:86-93. doi: 10.1016/s0168-8278(03)00504-x.
  28. Buell JF, Koffron A, Yoshida A, Hanaway M, Lo A, Layman R, Cronin DC, Posner MC, Millis JM. Is any method of vascular control superior in hepatic resection of metastatic cancers? Longmire clamping, pringle

- maneuver, and total vascular isolation. *Arch Surg*. 2001;136(5):569-575. doi: 10.1001/archsurg.136.5.569.
29. Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys*. 1993;300(2):535-43. doi: 10.1006/abbi.1993.1074.
30. Caldwell-Kenkel JC, Thurman RG, Lemasters JJ. Selective loss of nonparenchymal cell viability after cold ischemic storage of rat livers. *Transplantation*. 1988;45(4):834-7.
31. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Reperfusion injury to endothelial cells following cold ischemic storage of rat livers. *Hepatology*. 1989;10(3):292-9. doi: 10.1002/hep.1840100307.
32. Calvo JR, Reiter RJ, García JJ, Ortiz GG, Tan DX, Karbownik M. Characterization of the protective effects of melatonin and related indoles against alpha-naphthylisothiocyanate-induced liver injury in rats. *J Cell Biochem*. 2001;80(4):461-70. doi: 10.1002/1097-4644(20010315)80:4<461::aid-jcb1000>3.0.co;2-p.
33. Caraceni P, Domenicali M, Vendemiale G, Grattagliano I, Pertosa A, Nardo B, Morselli-Labate AM, Trevisani F, Palasciano G, Altomare E, Bernardi M. The reduced tolerance of rat fatty liver to ischemia reperfusion is associated with mitochondrial oxidative injury. *J Surg Res*. 2005;124(2):160-8. doi: 10.1016/j.jss.2004.10.007.
34. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*. 2000;190(3):255-66. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(200002)190:3<255::AID-PATH526>3.0.CO;2-6.
35. Carlberg C. Gene regulation by melatonin. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;917:387-96. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05403.x.
36. Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine*. 2005;27(2):189-200. doi: 10.1385/ENDO:27:2:189.
37. Carrillo-Vico A, Reiter RJ, Lardone PJ, Herrera JL, Fernández-Montesinos R,

- Guerrero JM, Pozo D. The modulatory role of melatonin on immune responsiveness. *Curr Opin Investig Drugs*. 2006;7(5):423-31.
38. Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Alvarez-Sánchez N, Rodríguez-Rodríguez A, Guerrero JM. Melatonin: buffering the immune system. *Int J Mol Sci*. 2013;14(4):8638-83. doi: 10.3390/ijms14048638.
39. Casillas-Ramírez A, Mosbah IB, Ramalho F, Roselló-Catafau J, Peralta C. Past and future approaches to ischemia-reperfusion lesion associated with liver transplantation. *Life Sci*. 2006;79:1881-94. doi: 10.1016/j.lfs.2006.06.024
40. Castell JV, Gomez-Lechon MJ, Grassa C, Martinez LA, Miranda MA, Tarrega P. Photodynamic lipid peroxidation by the photosensitizing nonsteroidal antiinflammatory drugs suprofen and tiaprofenic acid. *Photochem Photobiol*. 1994;59(1):35-9. doi: 10.1111/j.1751-1097.1994.tb04998.x.
41. Catalá A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(9):1482-
95. doi: 10.1016/j.biocel.2006.02.010.
42. Cavassani KA, Ishii M, Wen H, Schaller MA, Lincoln PM, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL. TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. *J Exp Med*. 2008;205(11):2609-21. doi: 10.1084/jem.20081370.
43. Ceraulo L, Ferrugia M, Tesoriere L, Segreto S, Livrea MA, Turco Liveri V. Interactions of melatonin with membrane models: portioning of melatonin in AOT and lecithin reversed micelles. *J Pineal Res*. 1999;26(2):108-12. doi: 10.1111/j.1600-079x.1999.tb00570.x.
44. Chapman D. Biomembranes: structure of biomembranes and their models. *Adv Exp Med Biol*. 1988;238:13-20. doi: 10.1007/978-1-4684-7908-9\_2.
45. Chen JJ, Yu BP. Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. *Free Radic Biol Med*. 1994;17(5):411-8. doi: 10.1016/0891-5849(94)90167-8.
46. Chen CF, Wang D, Reiter RJ, Yeh DY. Oral melatonin attenuates lung inflammation and airway

- hyperreactivity induced by inhalation of aerosolized pancreatic fluid in rats. *J Pineal Res.* 2011;50(1):46-53. doi: 10.1111/j.1600-079X.2010.00808.x.
47. Chuang JI, Mohan N, Meltz ML, Reiter RJ. Effect of melatonin on NF-kappa-B DNA-binding activity in the rat spleen. *Cell Biol Int.* 1996;20:687-92. doi: 10.1006/cbir.1996.0091.
48. Chung HY, Baek BS, Song SH, Kim MS, Huh JI, Shim KH, Kim KW, Lee KH. Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress. *Age (Omaha).* 1997;20(3):127-40. doi: 10.1007/s11357-997-0012-2.
49. Clemens MG, McDonagh PF, Chaudry IH, Baue AE. Hepatic microcirculatory failure after ischemia and reperfusion: improvement with ATP-MgCl<sub>2</sub> treatment. *Am J Physiol.* 1985;248(6 Pt 2):H804-11. doi: 10.1152/ajpheart.1985.248.6.H804.
50. Clemens MG. Nitric oxide in liver injury. *Hepatology.* 1999;30(1):1-5. doi: 10.1002/hep.510300148.
51. Costa EJ, Shida CS, Biaggi MH, Ito AS, Lamy-Freund MT. How melatonin interacts with lipid bilayers: a study by fluorescence and ESR spectroscopies. *FEBS Lett.* 1997;416(1):103-6. doi: 10.1016/s0014-5793(97)01178-2.
52. Crabtree MJ, Channon KM. Synthesis and recycling of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Nitric Oxide.* 2011;25(2):81-8. doi: 10.1016/j.niox.2011.04.004.
53. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J.* 1999;341 (Pt 2):233-49.
54. Cross AR, Jones OT. Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1057(3):281-98. doi: 10.1016/s0005-2728(05)80140-9.
55. Currier NL, Sun LZ, Miller SC. Exogenous melatonin: quantitative enhancement in vivo of cells mediating non-specific immunity. *J Neuroimmunol.* 2000;104(2):101-8. doi: 10.1016/s0165-5728(99)00271-4.
56. Cursio R, Colosetti P, Gugenheim J. Autophagy and liver ischemia-reperfusion injury. *Biomed Res Int.* 2015;2015:417590. doi: 10.1155/2015/417590.
57. Curtis MT, Gilfor D, Farber JL. Lipid peroxidation increases the molecular order of microsomal

- membranes. *Arch Biochem Biophys*. 1984;235(2):644-9. doi: 10.1016/0003-9861(84)90239-x
58. Dardes RC, Baracat EC, Simões MJ. Modulation of estrous cycle and LH, FSH and melatonin levels by pinealectomy and sham-pinealectomy in female rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2000;24(3):441-53. doi: 10.1016/s0278-5846(99)00110-4.
59. Davies KJ, Delsignore ME, Lin SW. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J Biol Chem*. 1987a;262(20):9902-7.
60. Davies KJ, Goldberg AL. Proteins Damaged by Oxygen Radicals Are Rapidly Degraded in Extracts of Red Blood Cells. *J Biol Chem*. 1987b;262(17): 8227-34.
61. Davies MJ. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;305(3):761-70. doi: 10.1016/s0006-291x(03)00817-9.
62. De Castro J, Hernández-Hernández A, Rodríguez MC, Sardina JL, Llanillo M, Sánchez-Yagüe J. Comparison of changes in erythrocyte and platelet phospholipid and fatty acid composition and protein oxidation in chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Platelets*. 2007;18(1):43-51. doi: 10.1080/09537100600800776.
63. de Grey AD. A hypothesis for the minimal overall structure of the mammalian plasma membrane redox system. *Protoplasma*. 2003;221(1-2):3-9. doi: 10.1007/s00709-002-0061-4.
64. de Lima VR, Caro MS, Munford ML, Desbat B, Dufourc E, Pasa AA, Creczynski-Pasa TB. Influence of melatonin on the order of phosphatidylcholine-based membranes. *J Pineal Res*. 2010;49(2):169-75. doi: 10.1111/j.1600-079X.2010.00782.x.
65. De Pascali F, Hemann C, Samons K, Chen CA, Zweier JL. Hypoxia and reoxygenation induce endothelial nitric oxide synthase uncoupling in endothelial cells through tetrahydrobiopterin depletion and S-glutathionylation. *Biochemistry*. 2014;53(22):3679-88. doi: 10.1021/bi500076r.
66. Deacon S, Arendt J. Melatonin-induced temperature suppression and its acute phase-shifting effects correlate in a dose-dependent manner in humans. *Brain Res*.

- 1995;688(1-2):77-85. doi:  
10.1016/0006-8993(95)96872-i.
67. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 1997;324 (Pt 1):1-18. doi: 10.1042/bj3240001.
68. Deng WS, Xu Q, Liu YE, Jiang CH, Zhou H, Gu L. Effects of melatonin on liver function and lipid peroxidation in a rat model of hepatic ischemia/reperfusion injury. *Exp Ther Med* 2016;11:1955-60. doi: 10.3892/etm.2016.3160
69. Díaz E, Fernández C, Castrillón PO, Esquifino AI, Marín B, Díaz López B. Effect of exogenous melatonin on neuroendocrine-reproductive function of middle-aged female rats. *J Reprod Fertil.* 1999;117(2):331-7. doi: 10.1530/jrf.0.1170331.
70. Drolle E, Kučerka N, Hoopes MI, Choi Y, Katsaras J, Karttunen M, Leonenko Z. Effect of melatonin and cholesterol on the structure of DOPC and DPPC membranes. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1828(9):2247-54. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.05.015.
71. Dubocovich ML, Rivera-Bermudez MA, Gerdin MJ, Masana MI. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci.* 2003;8:1093-108. doi: 10.2741/1089.
72. Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine.* 2005;27(2):101-10. doi: 10.1385/ENDO:27:2:101.
73. Dziegiel P, Podhorska-Okolow M, Zabel M. Melatonin: adjuvant therapy of malignant tumors. *Med Sci Monit.* 2008;14(5):64-70.
74. Escames G, Guerrero JM, Reiter RJ, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A, Ortiz GG, Oh CS. Melatonin and vitamin E limit nitric oxide-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates. *Neurosci Lett.* 1997;230(3):147-50. doi: 10.1016/s0304-3940(97)00498-9.
75. Esteban-Zubero E, Alatorre-Jiménez MA, López-Pingarrón L, Reyes-Gonzales MC, Almeida-Souza P, Cantín-Golet A, Ruiz-Ruiz FJ, Tan DX, García JJ, Reiter RJ. Melatonin's role in preventing toxin-related and sepsis-mediated hepatic damage: A review. *Pharmacol Res.* 2016a;105:108-20. doi: 10.1016/j.phrs.2016.01.018.

76. Esteban-Zubero E, García-Gil FA, López-Pingarrón L, Alatorre-Jiménez MA, Ramírez JM, Tan DX, García JJ, Reiter RJ. Melatonin role preventing steatohepatitis and improving liver transplantation results. *Cell Mol Life Sci.* 2016b;73(15):2911-27. doi: 10.1007/s00018-016-2185-2.
77. Esteban-Zubero E, García-Gil FA, López-Pingarrón L, Alatorre-Jiménez MA, Iñigo-Gil P, Tan DX, García JJ, Reiter RJ. Potential benefits of melatonin in organ transplantation: a review. *J Endocrinol.* 2016c;229(3):R129-R146. doi: 10.1530/JOE-16-0117.
78. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990;186:407-21. doi: 10.1016/0076-6879(90)86134-h.
79. Eum HA, Cha YN, Lee SM. Necrosis and apoptosis: sequence of liver damage following reperfusion after 60 min ischemia in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;358:500-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.04.153.
80. Fan C, Li Q, Zhang Y, Liu X, Luo M, Abbott D, Zhou W, Engelhardt JF. IkappaBalpha and IkappaBbeta possess injury context-specific functions that uniquely influence hepatic NF-kappaB induction and inflammation. *J Clin Invest.* 2004;113:746-55. doi: 10.1172/JCI17337.
81. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.* 2002(10):872-9. doi: 10.1016/s0899-9007(02)00916-4.
82. Fernández L, Heredia N, Grande L, Gómez G, Rimola A, Marco A, Gelpí E, Roselló-Catafau J, Peralta C. Preconditioning protects liver and lung damage in rat liver transplantation: role of xanthine/xanthine oxidase. *Hepatology.* 2002;36(3):562-72. doi: 10.1053/jhep.2002.34616.
83. Forcada F, Abecia JA, Casao A, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T, Palacín I. Effects of ageing and exogenous melatonin on pituitary responsiveness to GnRH in ewes during anestrus and the reproductive season. *Theriogenology.* 2007;67(4):855-62. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.11.002.
84. Forman HJ, Thomas MJ. Oxidant production and bactericidal activity

- of phagocytes. *Annu Rev Physiol.* 1986;48:669-80. doi: 10.1146/annurev.ph.48.030186.003321.
85. Fraser PA. The role of free radical generation in increasing cerebrovascular permeability. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(5):967-77. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.003.
86. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med.* 1994;97(3A):5S-13S; discussion 22S-28S. doi: 10.1016/0002-9343(94)90292-5.
87. Freitas I, Bertone V, Guarnaschelli C, Ferrigno A, Boncompagni E, Rizzo V, Reiter RJ, Barni S, Vairetti M. In situ demonstration of improvement of liver mitochondrial function by melatonin after cold ischemia. *In Vivo.* 2006;20:229-37.
88. Frich L, Mala T, Gladhaug IP. Hepatic radiofrequency ablation using perfusion electrodes in a pig model: Effect of the Pringle manoeuvre. *Eur J Surg Oncol* 2006;32:527-32. doi: 10.1016/j.ejso.2006.02.021.
89. Fukunaga K, Horikawa K, Shibata S, Takeuchi Y, Miyamoto E. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent long-term potentiation in the rat suprachiasmatic nucleus and its inhibition by melatonin. *J Neurosci Res.* 2002;70(6):799-807. doi: 10.1002/jnr.10400.
90. Galzin AM, Eon MT, Esnaud H, Lee CR, Pévet P, Langer SZ. Day-night rhythm of 5-methoxytryptamine biosynthesis in the pineal gland of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Endocrinol.* 1988;118(3):389-97. doi: 10.1677/joe.0.1180389.
91. García JJ, Reiter RJ, Guerrero JM, Escames G, Yu BP, Oh CS, Muñoz-Hoyos A. Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. *FEBS Lett.* 1997;408(3):297-300. doi: 10.1016/s0014-5793(97)00447-x.
92. García JJ, Reiter RJ, Ortiz GG, Oh CS, Tang L, Yu BP, Escames G. Melatonin enhances tamoxifen's ability to prevent the reduction in microsomal membrane fluidity induced by lipid peroxidation. *J Membr Biol.* 1998;162:59-65. doi: 10.1007/s002329900342.
93. García JJ, Piñol-Ripoll G, Martínez-Ballarín E, Fuentes-Broto L, Miana-

- Mena FJ, Venegas C, Caballero B, Escames G, Coto-Montes A, Acuña-Castroviejo D. Melatonin reduces membrane rigidity and oxidative damage in the brain of SAMP8 mice. *Neurobiol Aging* 2011;32:2045-54. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.12.013.
94. García JJ, López-Pingarrón L, Almeida-Souza P, Tres A, Escudero P, García-Gil FA, Tan DX, Reiter RJ, Ramírez JM, Bernal-Pérez M. Protective effects of melatonin in reducing oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes: a review. *J Pineal Res.* 2014;56(3):225-37. doi: 10.1111/jpi.12128.
95. García-Gil FA, Albendea CD, Escartín J, Lampreave F, Fuentes-Broto L, Roselló-Catafau J, López-Pingarrón L, Reiter RJ, Alvarez-Alegret R, García JJ. Melatonin prolongs graft survival of pancreas allotransplants in pigs. *J Pineal Res.* 2011;51(4):445-53. doi: 10.1111/j.1600-079X.2011.00908.x.
96. Garcia-Mauriño S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, Rafii-El-Idrissi M, Sanchez-Margalet V, Goberna R, Guerrero JM. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol.* 1997;159:574-81.
97. García-Mauriño S, Pozo D, Carrillo-Vico A, Calvo JR, Guerrero JM. Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. *Life Sci.* 1999;65:2143-50. doi: 10.1016/s0024-3205(99)00479-8.
98. Glantzounis GK, Salacinski HJ, Yang W, Davidson BR, Seifalian AM. The contemporary role of antioxidant therapy in attenuating liver ischemia-reperfusion injury: a review. *Liver Transpl.* 2005;11(9):1031-47. doi: 10.1002/lt.20504.
99. Golubev A, Hanson AD, Gladyshev VN. Non-enzymatic molecular damage as a prototypic driver of aging. *J Biol Chem.* 2017;292(15):6029-6038. doi: 10.1074/jbc.R116.751164.
100. González-Flecha B, Cutrin JC, Boveris A. Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion. *J*

- Clin Invest. 1993;91(2):456-64. doi: 10.1172/JCI116223.
101. Grace MS, Cahill GM, Besharse JC. Melatonin Deacetylation: Retinal vertebrate class Distribution and *Xenopus laevis* tissue distribution. Brain Res. 1991;559(1):56-63. doi: 10.1016/0006-8993(91)90286-5.
102. Gracia-Sancho J, Villarreal G Jr, Zhang Y, Yu JX, Liu Y, Tullius SG, García-Cardena G. Flow cessation triggers endothelial dysfunction during organocold storage conditions: strategies for pharmacologic intervention. Transplantation. 2010;90(2):142-9. doi: 10.1097/TP.0b013e3181e228db.
103. Graham JM. Homogenization of tissues and cells. En: Graham JM, Rickwood D (editores). Suncellular fractionation: A practical approach. Oxford, UK, Oxford University Press (IRL Press imprint);1997:1-29.
104. Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. Redox Biol. 2015;6:524-51. doi: 10.1016/j.redox.2015.08.020.
105. Green DR. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. Cell. 2005;121(5):671-4. doi: 10.1016/j.cell.2005.05.019.
106. Grisham MB, Jourdain D, Wink DA. Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. Am J Physiol. 1999;276(2 Pt 1):G315-21. doi: 10.1152/ajpgi.1999.276.2.G315.
107. Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. Trends Biochem Sci. 1990;15(4):129-35. doi: 10.1016/0968-0004(90)90206-q.
108. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem. 1995;41(12 Pt 2):1819-28.
109. Hanschen M, Zahler S, Krombach F, Khandoga A. Reciprocal activation between CD4+ T cells and Kupffer cells during hepatic ischemia-reperfusion. Transplantation. 2008;86(5):710-8. doi: 10.1097/TP.0b013e3181821aa7.
110. Hardeland R, Poeggeler B. Non-Vertebrate Melatonin. J Pineal Res. 2003;34(4):233-41. doi: 10.1034/j.1600-079x.2003.00040.x.
111. Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical

- detoxification to radical avoidance. *Endocrine*. 2005;27(2):119-30. doi: 10.1385/endo:27:2:119.
112. Hardeland R. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(13):2001-18. doi: 10.1007/s00018-008-8001-x.
113. Hardeland R. Melatonin and the theories of aging: a critical appraisal of melatonin's role in antiaging mechanisms. *J Pineal Res*. 2013;55(4):325-56. doi: 10.1111/jpi.12090.
114. Hardeland R. Melatonin and the electron transport chain. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(21):3883-96. doi: 10.1007/s00018-017-2615-9.
115. Hasselgren PO, Jennische E, Fornander J, Hellman A. No beneficial effect of ATP-MgCl<sub>2</sub> on impaired transmembrane potential and protein synthesis in liver ischemia. *Acta Chir Scand*. 1982;148(7):601-7.
116. Headlam HA, Davies MJ. Cell-mediated reduction of protein and peptide hydroperoxides to reactive free radicals. *Free Radic Biol Med*. 2003;34(1):44-55. doi: 10.1016/s0891-5849(02)01181-4.
117. Hegner D. Age-dependence of molecular and functional changes in biological membrane properties. *Mech Ageing Dev*. 1980;14(1-2):101-18. doi: 10.1016/0047-6374(80)90109-8.
118. Hemadi M, Shokri S, Pourmatroud E, Moramezi F, Khodadai A. Follicular dynamic and immunoreactions of the vitrified ovarian graft after host treatment with variable regimens of melatonin. *Am J Reprod Immunol*. 2012;67(5):401-12. doi: 10.1111/j.1600-0897.2011.01087.x.
119. Hill SM, Belancio VP, Dauchy RT, Xiang S, Brimer S, Mao L, Hauch A, Lundberg PW, Summers W, Yuan L, Frasch T, Blask DE. Melatonin: an inhibitor of breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2015;22(3):R183-204. doi: 10.1530/ERC-15-0030.
120. Hines IN, Kawachi S, Harada H, Pavlick KP, Hoffman JM, Bharwani S, Wolf RE, Grisham MB. Role of nitric oxide in liver ischemia and reperfusion injury. *Mol Cell Biochem*. 2002;234-235(1-2):229-37.
121. Hirata F, Hayaishi O, Tokuyama T, Seno S. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of

- melatonin. *J Biol Chem.* 1974;249(4):1311-3.
122. Hsu CM, Wang JS, Liu CH, Chen LW. Kupffer cells protect liver from ischemia-reperfusion injury by an inducible nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Shock.* 2002;17(4):280-5. doi: 10.1097/00024382-200204000-00007.
123. Huang G, Shi LZ, Chi H. Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: signal integration, propagation and termination. *Cytokine.* 2009;48(3):161-9. doi: 10.1016/j.cyto.2009.08.002.
124. Huang H, Evankovich J, Yan W, Nace G, Zhang L, Ross M, Liao X, Billiar T, Xu J, Esmon CT, Tsung A. Endogenous histones function as alarmins in sterile inflammatory liver injury through Toll-like receptor 9 in mice. *Hepatology.* 2011;54(3):999-1008. doi: 10.1002/hep.24501.
125. Ibrahim M, Hassan W, Anwar J, Nogueira CW, Teixeira Rocha JB. Fe(II) and sodium nitroprusside induce oxidative stress: a comparative study of diphenyldiselenide and diphenyl ditelluride with their naphthyl analog. *Drug Chem Toxicol.* 2012;35(1):48-56. doi: 10.3109/01480545.2011.588711.
126. Islas LD. Thermal effects and sensitivity of biological membranes. *Curr Top Membr.* 2014;74:1-17. doi: 10.1016/B978-0-12-800181-3.00001-4.
127. Jaeschke H. Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences. *J Hepatol.* 1996;25(5):774-80. doi: 10.1016/s0168-8278(96)80253-4.
128. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;284(1):G15-26. doi: 10.1152/ajpgi.00342.2002.
129. Jaeschke H, Woolbright BL. Current strategies to minimize hepatic ischemia-reperfusion injury by targeting reactive oxygen species. *Transplant Rev (Orlando).* 2012;26(2):103-14. doi: 10.1016/j.trre.2011.10.006.
130. Janero DR. Malondialdehyde and Thiobarbituric Acid-Reactivity as Diagnostic Indices of Lipid Peroxidation and Peroxidative Tissue Injury. *Free Radic Biol Med.*

- 1990;9(6):515-40. doi:  
10.1016/0891-5849(90)90131-2.
131. Jang HR, Rabb H. The innate immune response in ischemic acute kidney injury. *Clin Immunol* 2009;130:41-50. doi:  
10.1016/j.clim.2008.08.016.
132. Janssen YM, Van Houten B, Borm PJ, Mossman BT. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest.* 1993;69(3):261-74.
133. Jaworek J, Szklarczyk J, Jaworek AK, Nawrot-Porąbka K, Leja-Szpak A, Bonior J, Kot M. Protective effect of melatonin on acute pancreatitis. *Int J Inflam.* 2012;2012:173675. doi:  
10.1155/2012/173675.
134. Jiménez-Aranda A, Fernández-Vázquez G, Campos D, Tassi M, Velasco-Perez L, Tan DX, Reiter RJ, Agil A. Melatonin induces browning of inguinal white adipose tissue in Zucker diabetic fatty rats. *J Pineal Res.* 2013;55(4):416-23. doi:  
10.1111/jpi.12089.
135. Johnson GL, Nakamura K. The c-Jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773:1341-8. doi:  
10.1016/j.bbamcr.2006.12.009.
136. Kang JW, Lee SM. Melatonin inhibits type 1 interferon signaling of toll-like receptor 4 via heme oxygenase 1 induction in hepatic ischemia/reperfusion. *J Pineal Res.* 2012;53(1):67-76. doi:  
10.1111/j.1600-079X.2012.00972.x.
137. Kang JW, Cho HI, Lee SM. Melatonin inhibits mTOR-dependent autophagy during liver ischemia/reperfusion. *Cell Physiol Biochem* 2014;33:23-36. doi:  
10.1159/000356647.
138. Kang JW, Hong JM, Lee SM. Melatonin enhances mitophagy and mitochondrial biogenesis in rats with carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. *J Pineal Res.* 2016;60(4):383-93. doi:  
10.1111/jpi.12319.
139. Kanner J, German JB, Kinsella JE. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1987;25(4):317-64. doi:  
10.1080/10408398709527457.
140. Kanoria S, Glantzounis G, Quaglia A, Dinesh S, Fusai G, Davidson BR, Seifalian AM. Remote preconditioning improves hepatic oxygenation after ischaemia reperfusion injury. *Transpl Int.*

- 2012;25(7):783-91. doi:  
10.1111/j.1432-2277.2012.01481.x.
141. Karabulut-Bulan O, Bayrak BB, Arda-Pirincci P, Sarikaya-Unal G, Us H, Yanardag R. Role of Exogenous Melatonin on Cell Proliferation and Oxidant/Antioxidant System in Aluminum-Induced Renal Toxicity. *Biol Trace Elem Res*. 2015;168(1):141-9. doi: 10.1007/s12011-015-0320-9.
142. Karatzas T, Neri AA, Baibaki ME, Dontas IA. Rodent models of hepatic ischemia-reperfusion injury: time and percentage-related pathophysiological mechanisms. *J Surg Res* 2014;191:399-412. doi: 10.1016/j.jss.2014.06.024.
143. Karbownik M, Reiter RJ, Garcia JJ, Tan DX, Qi W, Manchester LC. Melatonin reduces rat hepatic macromolecular damage due to oxidative stress caused by delta-aminolevulinic acid. *Biochim Biophys Acta*. 2000a;1523(2-3):140-6. doi: 10.1016/s0304-4165(00)00110-0.
144. Karbownik M, Reiter RJ, Garcia JJ, Tan D. Melatonin reduces phenylhydrazine-induced oxidative damage to cellular membranes: evidence for the involvement of iron. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000b;32(10):1045-54. doi: 10.1016/s1357-2725(00)00056-x.
145. Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*. 2000;149(1):43-50. doi: 10.1016/s0300-483x(00)00231-6.
146. Keyer K, Gort AS, Imlay JA. Superoxide and the production of oxidative DNA damage. *J Bacteriol*. 1995;177(23):6782-90. doi: 10.1128/jb.177.23.6782-6790.1995.
147. Kietadisorn R, Juni RP, Moens AL. Tackling endothelial dysfunction by modulating NOS uncoupling: new insights into its pathogenesis and therapeutic possibilities. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012;302(5):E481-95. doi: 10.1152/ajpendo.00540.2011.
148. Kilic U, Kilic E, Reiter RJ, Bassetti CL, Hermann DM. Signal transduction pathways involved in melatonin-induced neuroprotection after focal cerebral ischemia in mice. *J Pineal Res*. 2005;38(1):67-71. doi: 10.1111/j.1600-079X.2004.00178.x.
149. Kim SH, Lee SM. Cytoprotective effects of melatonin against necrosis and apoptosis induced by ischemia/reperfusion injury in rat liver. *J Pineal Res*. 2008;44(2):165-

71. doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00504.x.
150. Kim YO, Pyo MY, Kim JH. Influence of melatonin on immunotoxicity of lead. *Int J Immunopharmacol.* 2000;22(10):821-32. doi: 10.1016/s0192-0561(00)00043-6.
151. Kireev RA, Cuesta S, Ibarrola C, Bela T, Moreno Gonzalez E, Vara E, Tresguerres JA. Age-related differences in hepatic ischemia/reperfusion: gene activation, liver injury, and protective effect of melatonin. *J Surg Res* 2012;178:922-34. doi: 10.1016/j.jss.2012.04.060.
152. Kireev R, Bitoun S, Cuesta S, Tejerina A, Ibarrola C, Moreno E, Vara E, Tresguerres JA. Melatonin treatment protects liver of Zucker rats after ischemia/reperfusion by diminishing oxidative stress and apoptosis. *Eur J Pharmacol.* 2013;701(1-3):185-93. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.11.038.
153. Konturek PC, Brzozowska I, Targosz A, Pawlik M, Kania J, Hess T, Kwiecien S, Konturek SJ, Reiter RJ, Brzozowski T. Esophagoprotection mediated by exogenous and endogenous melatonin in an experimental model of reflux esophagitis. *J Pineal Res.* 2013;55(1):46-57. doi: 10.1111/jpi.12048.
154. Koppenol WH. The Haber-Weiss cycle--70 years later. *Redox Rep.* 2001;6(4):229-34. doi: 10.1179/135100001101536373.
155. Korkmaz A, Reiter RJ, Topal T, Manchester LC, Oter S, Tan DX. Melatonin: an established antioxidant worthy of use in clinical trials. *Mol Med.* 2009;15(1-2):43-50. doi: 10.2119/molmed.2008.00117.
156. Koster-van Hoffen GC, Mirmiran M, Bos NP, Witting W, Delagrangé P, Guardiola-Lemaitre B. Effects of a novel melatonin analog on circadian rhythms of body temperature and activity in young, middle-aged, and old rats. *Neurobiol Aging.* 1993;14(6):565-9. doi: 10.1016/0197-4580(93)90040-i.
157. Kucerka N, Pencer J, Nieh MP, Katsaras J. Influence of cholesterol on the bilayer properties of monounsaturated phosphatidylcholine unilamellar vesicles. *Eur Phys J E Soft Matter.* 2007;23(3):247-54. doi: 10.1140/epje/i2007-10202-8.

158. Kukan M, Haddad PS. Role of hepatocytes and bile duct cells in preservation-reperfusion injury of liver grafts. *Liver Transpl.* 2001;7(5):381-400. doi: 10.1053/jlts.2001.23913.
159. Kurcer Z, Oguz E, Ozbilge H, Baba F, Aksoy N, Celik N. Effect of melatonin on testicular ischemia/reperfusion injury in rats: is this effect related to the proinflammatory cytokines? *Fertil Steril* 2008;89:1468-73. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.04.065.
160. Land WG. The role of postischemic reperfusion injury and other nonantigen-dependent inflammatory pathways in transplantation. *Transplantation* 2005;79:505-14. doi: 10.1097/01.tp.0000153160.82975.86.
161. Lee YM, Chen HR, Hsiao G, Sheu JR, Wang JJ, Yen MH. Protective effects of melatonin on myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo. *J Pineal Res.* 2002;33(2):72-80. doi: 10.1034/j.1600-079x.2002.01869.x.
162. Lee MC, Velayutham M, Komatsu T, Hille R, Zweier JL. Measurement and characterization of superoxide generation from xanthine dehydrogenase: a redox-regulated pathway of radical generation in ischemic tissues. *Biochemistry.* 2014;53(41):6615-23. doi: 10.1021/bi500582r.
163. Lee J, Bae EH, Ma SK, Kim SW. Altered nitric oxide system in cardiovascular and renal diseases. *Chonnam Med J* 2016;52:81-90. doi: 10.4068/cmj.2016.52.2.81.
164. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology.* 2000;32(2):169-73. doi: 10.1053/jhep.2000.9323.
165. León J, Macías M, Escames G, Camacho E, Khaldy H, Martín M, Espinosa A, Gallo MA, Acuña-Castroviejo D. Structure-related inhibition of calmodulin-dependent neuronal nitric-oxide synthase activity by melatonin and synthetic kynurenes. *Mol Pharmacol.* 2000;58(5):967-75. doi: 10.1124/mol.58.5.967.
166. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes 1. *J Am*

- Chem Soc. 1958;80(10):2587. doi: 10.1021/ja01543a060.
167. Lerner AB, Case JD. Melatonin. Federation Proc. 1960;32:211-21.
168. Lesurtel M, Graf R, Aleil B, Walther DJ, Tian Y, Jochum W, Gachet C, Bader M, Clavien PA. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. Science. 2006;312(5770):104-7. doi: 10.1126/science.1123842.
169. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl Assays for Determination of Oxidatively Modified Proteins. Methods Enzymol. 1994;233:346-57. doi: 10.1016/s0076-6879(94)33040-9.
170. Lewy AJ, Newsome DA. Different types of melatonin circadian secretory rhythms in some blind subjects. J Clin Endocrinol Metab. 1983;56(6):1103-7. doi: 10.1210/jcem-56-6-1103.
171. Lieberman HR, Waldhauser F, Garfield G, Lynch HJ, Wurtman RJ. Effects of melatonin on human mood and performance. Brain Res. 1984;323(2):201-7. doi: 10.1016/0006-8993(84)90290-7.
172. Lin GJ, Huang SH, Chen YW, Hueng DY, Chien MW, Chia WT, Chang DM, Sytwu HK. Melatonin prolongs islet graft survival in diabetic NOD mice. J of Pineal Res. 2009;47:284-92. doi: 10.1111/j.1600-079X.2009.00712.x.
173. Lin XJ, Mei GP, Liu J, Li YL, Zuo D, Liu SJ, Zhao TB, Lin MT. Therapeutic effects of melatonin on heat stroke-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. J Pineal Res. 2011;50(4):436-44. doi: 10.1111/j.1600-079X.2011.00863.x.
174. Linas SL, Whittenburg D, Parsons PE, Repine JE. Ischemia increases neutrophil retention and worsens acute renal failure: role of oxygen metabolites and ICAM 1. Kidney Int. 1995;48(5):1584-91. doi: 10.1038/ki.1995.451.
175. Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. Science. 2010;327(5961):46-50. doi: 10.1126/science.1174621.
176. Lloyd RV, Hanna PM, Mason RP. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. Free Radic Biol Med. 1997;22(5):885-8. doi: 10.1016/s0891-5849(96)00432-7.
177. Lo HA, Sun LN, Chen CF, Wang D, Zhang HP. Ischemia-reperfusion

- of the pancreas induced hyperresponsiveness of the airways in rats. *Transplant Proc.* 2009;41(1):63-6. doi: 10.1016/j.transproceed.2008.08.156 .
178. Lu L, Zhou H, Ni M, Wang X, Busuttill R, Kupiec-Weglinski J, Zhai Y. Innate immune regulations and liver ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 2016;100:2601-10. doi: 10.1097/TP.0000000000001411.
179. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact.* 2014;224:164-75. doi: 10.1016/j.cbi.2014.10.016.
180. Lutz J, Thürmel K, Heemann U. Anti-inflammatory treatment strategies for ischemia/reperfusion injury in transplantation. *J Inflamm (Lond).* 2010;7:27. doi: 10.1186/1476-9255-7-27.
181. Ma MW, Wang J, Zhang Q, Wang R, Dhandapani KM, Vadlamudi RK, Brann DW. NADPH oxidase in brain injury and neurodegenerative disorders. *Mol Neurodegener.* 2017;12(1):7. doi: 10.1186/s13024-017-0150-7.
182. Ma X, Idle JR, Krausz KW, Gonzalez FJ. Metabolism of melatonin by human cytochromes p450. *Drug Metab Dispos.* 2005;33(4):489-94. doi: 10.1124/dmd.104.002410.
183. Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol.* 2004;25(3-4):177-95. doi: 10.1016/j.yfrne.2004.08.001
184. Macías M, Escames G, Leon J, Coto A, Sbihi Y, Osuna A, Acuña-Castroviejo D. Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *Eur J Biochem.* 2003;270(5):832-40. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03430.x.
185. Majewska M, Zajac K, Zemelka M, Szczepanik M. Influence of melatonin and its precursor L-tryptophan on Th1 dependent contact hypersensitivity. *J Physiol Pharmacol.* 2007;58 Suppl 6:125-32.
186. Malpoux B, Vigié C, Skinner DC, Thiéry JC, Chemineau P. Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. *Brain Res Bull.* 1997;44(4):431-8. doi: 10.1016/s0361-9230(97)00223-2.

187. Manchester LC, Coto-Montes A, Boga JA, Andersen LP, Zhou Z, Galano A, Vriend J, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. *J Pineal Res.* 2015;59(4):403-19. doi: 10.1111/jpi.12267.
188. Manoj KM, Gade SK, Mathew L. Cytochrome P450 reductase: a harbinger of diffusible reduced oxygen species. *PLoS One.* 2010;5(10):e13272. doi: 10.1371/journal.pone.0013272.
189. Marseglia L, D'Angelo G, Manti S, Arrigo T, Barberi I, Reiter RJ, Gitto E. Oxidative stress-mediated aging during the fetal and perinatal periods. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:358375. doi: 10.1155/2014/358375.
190. Martínez-Sánchez G, Giuliani A, Pérez-Davison G, León-Fernández OS. Oxidized proteins and their contribution to redox homeostasis. *Redox Rep.* 2005;10(4):175-85. doi: 10.1179/135100005X57382.
191. Matsuzaki S, Szweda PA, Szweda LI, Humphries KM. Regulated Production of Free Radicals by the Mitochondrial Electron Transport Chain: Cardiac Ischemic Preconditioning. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61(14):1324-31. doi: 10.1016/j.addr.2009.05.008.
192. Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Hardeland R, Leon J, Rodriguez C, Reiter RJ. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J Neuroimmunol.* 2005;165(1-2):139-49. doi: 10.1016/j.jneuroim.2005.05.002.
193. McCord CP, Allen FP. Evidences Associating Pineal Gland Function with Alterations in Pigmentation. *J Exp Zool.* 1917;23(1):207-24. doi: 10.1002/jez.1400230108.
194. McNaughton L, Puttagunta L, Martinez-Cuesta MA, Kneteman N, Mayers I, Moqbel R, Hamid Q, Radomski MW. Distribution of nitric oxide synthase in normal and cirrhotic human liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(26):17161-6. doi: 10.1073/pnas.0134112100.
195. Mendes-Braz M, Elias-Miró M, Jiménez-Castro MB, Casillas-Ramírez A, Ramalho FS, Peralta C. The current state of knowledge of hepatic ischemia-reperfusioninjury

- based on its study in experimental models. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:298657. doi: 10.1155/2012/298657.
196. Messner KR, Imlay JA. Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase. *J Biol Chem.* 2002;277(45):42563-71. doi: 10.1074/jbc.M204958200.
197. Miana-Mena FJ, Piedrafita E, González-Mingot C, Larrodé P, Muñoz MJ, Martínez-Ballarín E, Reiter RJ, Osta R, García JJ. Levels of membrane fluidity in the spinal cord and the brain in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Bioenerg Biomembr.* 2011;43(2):181-6. doi: 10.1007/s10863-011-9348-5.
198. Moens AL, Champion HC, Claeys MJ, Tavazzi B, Kaminski PM, Wolin MS, Borgonjon DJ, Van Nassauw L, Haile A, Zviman M, Bedja D, Wuyts FL, Elsaesser RS, Cos P, Gabrielson KL, Lazzarino G, Paolocci N, Timmermans JP, Vrints CJ, Kass DA. High-dose folic acid pretreatment blunts cardiac dysfunction during ischemia coupled to maintenance of high-energy phosphates and reduces postreperfusion injury. *Circulation.* 2008;117(14):1810-9. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.725481.
199. Mohan N, Sadeghi K, Reiter RJ, Meltz ML. The neurohormone melatonin inhibits cytokine, mitogen and ionizing radiation induced NF-kappa B. *Biochem Mol Biol Int.* 1995;37:1063-70.
200. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43(2):109-42.
201. Moncada S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J R Soc Med.* 1999;92(4):164-9. doi: 10.1177/014107689909200402.
202. Montilla P, Cruz A, Padillo FJ, Túnez I, Gascon F, Muñoz MC, Gómez M, Pera C. Melatonin versus vitamin E as protective treatment against oxidative stress after extra-hepatic bile duct ligation in rats. *J Pineal Res.* 2001;31:138-44. doi: 10.1034/j.1600-079x.2001.310207.x.
203. Moore RY. A clock for the ages. *Science.* 1999;284(5423):2102-3. doi: 10.1126/science.284.5423.2102.

204. Mousa SA, Brown R, Thoolen MJ, Smith RD. Evaluation of the effect of azapropazone on neutrophil migration in regional myocardial ischaemia/reperfusion injury in rabbits. *Br J Pharmacol.* 1990;100(2):379-82. doi: 10.1111/j.1476-5381.1990.tb15813.x.
205. Moussavian MR, Scheuer C, Schmidt M, Kollmar O, Wagner M, von Heesen M, Schilling MK, Menger MD. Multidrug donor preconditioning prevents cold liver preservation and reperfusion injury. *Langenbecks Arch Surg.* 2011;396(2):231-41. doi: 10.1007/s00423-010-0668-4.
206. Nakagiri A, Sunamoto M, Murakami M. NADPH oxidase is involved in ischaemia/reperfusion-induced damage in rat gastric mucosa via ROS production--role of NADPH oxidase in rat stomachs. *Inflammopharmacology.* 2007;15(6):278-81. doi: 10.1007/s10787-007-1587-z.
207. Nakagiri A, Sunamoto M, Takeuchi K, Murakami M. Evidence for the involvement of NADPH oxidase in ischemia/reperfusion-induced gastric damage via angiotensin II. *J Physiol Pharmacol.* 2010;61(2):171-9.
208. Nakamura S, Shin T, Hirokata Y, Shigematsu A. Inhibition of mitochondrial respiration by sodium nitroprusside and the mechanism of cyanide liberation. *Br J Anaesth.* 1977;49(12):1239-44. doi: 10.1093/bja/49.12.1239.
209. Negre-Salvayre A, Auge N, Ayala V, Basaga H, Boada J, Brenke R, Chapple S, Cohen G, Feher J, Grune T, Lengyel G, Mann GE, Pamplona R, Poli G, Portero-Otin M, Riahi Y, Salvayre R, Sasson S, Serrano J, Shamni O, Siems W, Siow RC, Wiswedel I, Zarkovic K, Zarkovic N. Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radic Res.* 2010;44(10):1125-71. doi: 10.3109/10715762.2010.498478.
210. Nelson CS, Marino JL, Allen CN. Melatonin receptors activate heteromeric G-protein coupled Kir3 channels. *Neuroreport.* 1996;7(3):717-20. doi: 10.1097/00001756-199602290-00009.
211. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma Malondialdehyde as Biomarker for Oxidative Stress:

- Reference Interval and Effects of Life-Style Factors. *Clin Chem.* 1997;43(7):1209-14.
212. Ochoa JJ, Vílchez MJ, Palacios MA, García JJ, Reiter RJ, Muñoz-Hoyos A. Melatonin protects against lipid peroxidation and membrane rigidity in erythrocytes from patients undergoing cardiopulmonary bypass surgery. *J Pineal Res.* 2003;35(2):104-8. doi: 10.1034/j.1600-079x.2003.00061.x.
213. Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ. Melatonin protects hepatic mitochondrial respiratory chain activity in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res.* 2002;32:143-8. doi: 10.1034/j.1600-079x.2002.1o106.x.
214. Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, Enzan H, Miyahara Y. Protective effect of melatonin against mitochondrial injury induced by ischemia and reperfusion of rat liver. *Eur J Pharmacol.* 2003a;469(1-3):145-52. doi: 10.1016/s0014-2999(03)01643-1.
215. Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, Miyahara Y. Acutely administered melatonin restores hepatic mitochondrial physiology in old mice. *Int J Biochem Cell Biol* 2003b;35:367-75. doi: 10.1016/s1357-2725(02)00260-1.
216. Ornellas FM, Ornellas DS, Martini SV, Castiglione RC, Ventura GM, Rocco PR, Gutfilen B, de Souza SA, Takiya CM, Morales MM1. Bone Marrow-Derived Mononuclear Cell Therapy Accelerates Renal Ischemia-Reperfusion Injury Recovery by Modulating Inflammatory, Antioxidant and Apoptotic Related Molecules. *Cell Physiol Biochem.* 2017;41(5):1736-1752. doi: 10.1159/000471866.
217. Ouyang H, Vogel HJ. Melatonin and serotonin interactions with calmodulin: NMR, spectroscopic and biochemical studies. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1383(1):37-47. doi: 10.1016/s0167-4838(97)00157-x.
218. Pablos MI, Reiter RJ, Ortiz GG, Guerrero JM, Agapito MT, Chuang JI, Sewerynek E. Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. *Neurochem Int.* 1998;32(1):69-75. doi: 10.1016/s0197-0186(97)00043-0.
219. Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni

- GJ, Zisapel N, Cardinali DP. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol.* 2008;85(3):335-53. doi: 10.1016/j.pneurobio.2008.04.001.
220. Pappolla MA, Chyan YJ, Poeggeler B, Bozner P, Ghiso J, LeDoux SP, Wilson GL. Alzheimer beta protein mediated oxidative damage of mitochondrial DNA: prevention by melatonin. *J Pineal Res.* 1999;27(4):226-9. doi: 10.1111/j.1600-079x.1999.tb00619.x.
221. Park SW, Choi SM, Lee SM. Effect of melatonin on altered expression of vasoregulatory genes during hepatic ischemia/reperfusion. *Arch Pharm Res* 2007;30:1619-24. doi: 10.1007/bf02977332.
222. Park JW, Chung JW. Inflammatory Cytokines and Sleep Disturbance in Patients with Temporomandibular Disorders. *J Oral Facial Pain Headache.* 2016 Winter;30(1):27-33. doi: 10.11607/ofph.1367.
223. Paul V, Ekambaram P. Effects of sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, on gamma-aminobutyric acid concentration in the brain and on picrotoxin-induced convulsions in combination with phenobarbitone in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005;80(3):363-70. doi: 10.1016/j.pbb.2004.08.022.
224. Pazo JA, Rodriguez ME, Vega F, De la Cruz L, Guilbert EE, Mediavilla MG, Furno G, Rodríguez JV. Primary culture of rat hepatocytes after cold storage in the university of wisconsin solution: a tool to study the effects of hypothermic preservation. *Cell Preservation Technol.* 2002;1:189-99. doi: 10.1089/153834402765035626.
225. Peña C, Rincon J, Pedreanez A, Viera N, Mosquera J. Chemotactic effect of melatonin on leukocytes. *J Pineal Res.* 2007;43(3):263-9. doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00471.x.
226. Peralta C, Fernández L, Panés J, Prats N, Sans M, Piqué JM, Gelpí E, Roselló-Catafau J. Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat. *Hepatology.* 2001;33(1):100-13. doi: 10.1053/jhep.2001.20529.
227. Peralta C, Jiménez-Castro MB, Gracia-Sancho J. Hepatic ischemia

- and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu. *J Hepatol.* 2013;59(5):1094-106. doi: 10.1016/j.jhep.2013.06.017.
228. Perkins KA, Pershad S, Chen Q, McGraw S, Adams JS, Zambrano C, Krass S, Emrich J, Bell B, Iyamu M, Prince C, Kay H, Teng JC, Young LH. The effects of modulating eNOS activity and coupling in ischemia/reperfusion (I/R). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2012;385(1):27-38. doi: 10.1007/s00210-011-0693-z.
229. Perry BC, Soltys D, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH. Tumor necrosis factor- $\alpha$  in liver ischemia/reperfusion injury. *J Invest Surg.* 2011;24:178-88. doi: 10.3109/08941939.2011.568594.
230. Persinger RL, Poynter ME, Ckless K, Janssen-Heininger YM. Molecular mechanisms of nitrogen dioxide induced epithelial injury in the lung. *Mol Cell Biochem.* 2002;234-235(1-2):71-80.
231. Pinto AR, da Silva NC, Pinato L. Analyses of melatonin, cytokines, and sleep in chronic renal failure. *Sleep Breath.* 2016;20(1):339-44. doi: 10.1007/s11325-015-1240-9.
232. Piñol-Ripoll G, Fuentes-Broto L, Millán-Plano S, Reyes-González M, Mauri JA, Martínez-Ballarín E, Reiter RJ, García JJ. Protective effect of melatonin and pinoline on nitric oxide-induced lipid and protein peroxidation in rat brain homogenates. *Neurosci Lett.* 2006;405(1-2):89-93. doi: 10.1016/j.neulet.2006.06.031.
233. Pontes GN, Cardoso EC, Carneiro-Sampaio MM, Markus RP. Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) - melatonin in human colostrums and colostrum phagocytes. *J Pineal Res.* 2006;41(2):136-41. doi: 10.1111/j.1600-079X.2006.00345.x.
234. Pontes GN, Cardoso EC, Carneiro-Sampaio MM, Markus RP. Pineal melatonin and the innate immune response: the TNF- $\alpha$  increase after cesarean section suppresses nocturnal melatonin production. *J Pineal Res.* 2007;43(4):365-71. doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00487.x.
235. Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM. Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via

- complex formation with calmodulin. *J Cell Biochem.* 1997;65:430-42. doi: 10.1002/(sici)1097-4644(19970601)65:3<430::aid-jcb12>3.0.co;2-j.
236. Pringle JH. V. Notes on the Arrest of Hepatic Hemorrhage Due to Trauma. *Ann Surg.* 1908;48(4):541-549. doi: 10.1097/00000658-190810000-00005.
237. Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol.* 1995;268(5 Pt 1):L699-722. doi: 10.1152/ajplung.1995.268.5.L699.
238. Pytel E, Olszewska-Banaszczyk M, Koter-Michalak M, Broncel M. Increased oxidative stress and decreased membrane fluidity in erythrocytes of CAD patients. *Biochem Cell Biol.* 2013;91(5):315-8. doi: 10.1139/bcb-2013-0027.
239. Quesnelle KM, Bystrom PV, Toledo-Pereyra LH. Molecular responses to ischemia and reperfusion in the liver. *Arch Toxicol.* 2015;89(5):651-7. doi: 10.1007/s00204-014-1437-x.
240. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem.* 1991;266(7):4244-50.
241. Ramalho FS, Fernandez-Monteiro I, Rosello-Catafau J, Peralta C. Hepatic microcirculatory failure. *Acta Cir Bras.* 2006;21 Suppl 1:48-53. doi: 10.1590/s0102-86502006000700012.
242. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol.* 1994;124(1-2):1-6. doi: 10.1083/jcb.124.1.1.
243. Reinders ME, van Wagenveld BA, van Gulik TM, Frederiks WM, Chamuleau RA, Endert E, Klopper PJ. Hyaluronic acid uptake in the assessment of sinusoidal endothelial cell damage after cold storage and normothermic reperfusion of rat livers. *Transpl Int.* 1996;9(5):446-53. doi: 10.1007/bf00336821.
244. Reiter RJ, Craft CM, Johnson JE Jr, King TS, Richardson BA, Vaughan GM, Vaughan MK. Age-associated reduction in nocturnal pineal melatonin levels in female rats. *Endocrinology.* 1981;109(4):1295-7. doi: 10.1210/endo-109-4-1295.
245. Reiter RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar.

- Experientia. 1993;49(8):654-64. doi: 10.1007/bf01923947.
246. Reiter RJ. The role of the neurohormone melatonin as a buffer against macromolecular oxidative damage. *Neurochem Int.* 1995a;27(6):453-60. doi: 10.1016/0197-0186(95)80002-3.
247. Reiter RJ. Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: antioxidant protection and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol.* 1995b;16(4):383-415. doi: 10.1006/frne.1995.1014.
248. Reiter RJ. Melatonin and human reproduction. *Ann Med.* 1998;30(1):103-8. doi: 10.3109/07853899808999391.
249. Reiter RJ, Tan D, Kim SJ, Manchester LC, Qi W, Garcia JJ, Cabrera JC, El-Sokkary G, Rouvier-Garay V. Augmentation of indices of oxidative damage in life-long melatonin-deficient rats. *Mech Ageing Dev.* 1999;110(3):157-73. doi: 10.1016/s0047-6374(99)00058-5.
250. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci.* 2000;7(6):444-58. doi: 10.1007/bf02253360.
251. Reiter RJ, Tan DX, Burkhardt S. Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. *Mech Ageing Dev* 2002a;123:1007-19. doi: 10.1016/s0047-6374(01)00384-0.
252. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, El-Sawi MR. Melatonin reduces oxidant damage and promotes mitochondrial respiration: implications for aging. *Ann N Y Acad Sci.* 2002b;959:238-50. doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb02096.x.
253. Reiter RJ, Paredes SD, Manchester LC, Tan DX. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2009;44(4):175-200. doi: 10.1080/10409230903044914.
254. Reiter RJ, Fuentes-Broto L, Paredes SD, Tan DX, García JJ. Melatonin and the pathophysiology of cellular membranes. *Marmara Pharm J.* 2010a;14:1-9. doi: 10.12991/201014457.
255. Reiter RJ, Tan DX, Fuentes-Broto L. Melatonin: a multitasking molecule. *Prog Brain Res.*

- 2010b;181:127-51. doi:  
10.1016/S0079-6123(08)81008-4.
256. Reiter RJ, Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Alatorre-Jimenez M, Qin L. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res.* 2016;61:253-78. doi: 10.1111/jpi.12360.
257. Reiter RJ, Ma Q, Sharma R. Treatment of ebola and other infectious diseases: Melatonin “goes viral”. *Melatonin Res.* 2020;3(1)43-57. doi: 10.32794/mr11250047.
258. Ressmeyer AR, Mayo JC, Zelosko V, Sáinz RM, Tan DX, Poeggeler B, Antolín I, Zsizsik BK, Reiter RJ, Hardeland R. Antioxidant properties of the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction. *Redox Rep.* 2003;8(4):205-13. doi: 10.1179/135100003225002709.
259. Rezin GT, Amboni G, Zugno AI, Quevedo J, Streck EL. Mitochondrial dysfunction and psychiatric disorders. *Neurochem Res.* 2009;34:1021-9. doi: 10.1007/s11064-008-9865-8.
260. Richter C, Gogvadze V, Laffranchi R, Schlapbach R, Schweizer M, Suter M, Walter P, Yaffee M. Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1271(1):67-74. doi: 10.1016/0925-4439(95)00012-s.
261. Ródenas J, Carbonell T, Mitjavila MT. Different roles for nitrogen monoxide and peroxyxynitrite in lipid peroxidation induced by activated neutrophils. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(3):374-80. doi: 10.1016/s0891-5849(99)00250-6.
262. Rodríguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res.* 2004;36(1):1-9. doi: 10.1046/j.1600-079x.2003.00092.x.
263. Rodríguez-Reynoso S, Leal C, Portilla E, Olivares N, Muñoz J. Effect of exogenous melatonin on hepatic energetic status during ischemia/reperfusion: possible role of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide. *J Surg Res.* 2001;100(2):141-9. doi: 10.1006/jsre.2001.6185.
264. Roka F, Brydon L, Waldhoer M, Strosberg AD, Freissmuth M, Jockers R, Nanoff C. Tight association of the human Mel(1a)-melatonin receptor and G(i): precoupling and

- constitutive activity. *Mol Pharmacol.* 1999;56(5):1014-24. doi: 10.1124/mol.56.5.1014.
265. Ross AW, Barrett P, Mercer JG, Morgan PJ. Melatonin suppresses the induction of AP-1 transcription factor components in the pars tuberalis of the pituitary. *Mol Cell Endocrinol.* 1996;123(1):71-80. doi: 10.1016/0303-7207(96)03897-x.
266. Russo L, Gracia-Sancho J, García-Calderó H, Marrone G, García-Pagán JC, García-Cardeña G, Bosch J. Addition of simvastatin to cold storage solution prevents endothelial dysfunction in explanted rat livers. *Hepatology.* 2012;55(3):921-30. doi: 10.1002/hep.24755.
267. Sahin I, Severcan F, Kazanci N. Melatonin induces opposite effects on order and dynamics of anionic DPPG model membranes. *J Mol Struct.* 2007;834-836:195-201. doi: 10.1016/j.molstruc.2006.12.002.
268. Saija A, Tomaino A, Trombetta D, Pellegrino ML, Tita B, Caruso S, Castelli F. Interaction of melatonin with model membranes and possible implications in its photoprotective activity. *Eur J Pharm Biopharm.* 2002;53(2):209-15. doi: 10.1016/s0939-6411(01)00239-9.
269. Sani M, Sebai H, Refinetti R, Mondal M, Ghanem-Boughanmi N, Boughattas NA, Ben-Attia M. Dosing-time dependent effects of sodium nitroprusside on cerebral, renal, and hepatic catalase activity in mice. *J Drug Deliv.* 2015;2015:790480. doi: 10.1155/2015/790480.
270. Scheinichen D, zu Vilsendorf AM, Weissig A, Bornscheuer A, Becker T, Juettner B, Mahr KH, Heine J. Reduced P-selectin expression on circulating platelets after prolonged cold preservation in renal transplantation. *Clin Transplant.* 2003;17(5):444-50. doi: 10.1034/j.1399-0012.2003.00073.x.
271. Sedeek M, Nasrallah R, Touyz RM, Hébert RL. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and the kidney: friend and foe. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(10):1512-8. doi: 10.1681/ASN.2012111112.
272. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg.* 2001;181(2):160-6. doi: 10.1016/s0002-9610(00)00573-0.
273. Severcan F, Sahin I, Kazanci N. Melatonin strongly interacts with

- zwitterionic model membranes--  
evidence from Fourier transform  
infrared spectroscopy and  
differential scanning calorimetry.  
*Biochim Biophys Acta*.  
2005;1668(2):215-22. doi:  
10.1016/j.bbamem.2004.12.009.
274. Shah V, Kamath PS. Nitric oxide  
in liver transplantation:  
pathobiology and clinical  
implications. *Liver Transpl*.  
2003;9(1):1-11. doi:  
10.1053/jlts.2003.36244.
275. Shen XD, Ke B, Zhai Y, Gao F,  
Anselmo D, Lassman CR, Busuttill  
RW, Kupiec-Weglinski JW. Stat4 and  
Stat6 signaling in hepatic  
ischemia/reperfusion injury in mice:  
HO-1 dependence of Stat4  
disruption-mediated cytoprotection.  
*Hepatology*. 2003;37:296-303. doi:  
10.1053/jhep.2003.50066.
276. Shi X, Dalal NS. Vanadate-  
mediated hydroxyl radical  
generation from superoxide radical  
in the presence of NADH: Haber-  
Weiss vs Fenton mechanism. *Arch  
Biochem Biophys*. 1993;307(2):336-  
41. doi: 10.1006/abbi.1993.1597.
277. Shinitzky M. Membrane fluidity  
in malignancy. Adversative and  
recuperative. *Biochim Biophys Acta*.  
1984;738(4):251-61. doi:  
10.1016/0304-419x(83)90007-0.
278. Sies H Oxidative stress: a  
concept in redox biology and  
medicine. *Redox Biol*. 2015;4:180-3.  
doi: 10.1016/j.redox.2015.01.002.
279. Simone S, Rascio F, Castellano G,  
Divella C, Chieti A1, Ditonno P,  
Battaglia M, Crovace A, Staffieri F,  
Oortwijn B, Stallone G, Gesualdo L,  
Pertosa G, Grandaliano G.  
Complement-dependent NADPH  
oxidase enzyme activation in renal  
ischemia/reperfusion injury. *Free  
Radic Biol Med*. 2014;74:263-73. doi:  
10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.0  
03.
280. Simons K, Sampaio JL.  
Membrane organization and lipid  
rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol*.  
2011;3(10):a004697. doi:  
10.1101/cshperspect.a004697.
281. Sindram D, Porte RJ, Hoffman  
MR, Bentley RC, Clavien PA. Platelets  
induce sinusoidal endothelial cell  
apoptosis upon reperfusion of the  
cold ischemic rat liver.  
*Gastroenterology*. 2000;118(1):183-  
91. doi: 10.1016/s0016-  
5085(00)70427-6.
282. Sinning C, Westermann D,  
Clemmensen P. Oxidative stress in

- ischemia and reperfusion: current concepts, novel ideas and future perspectives. *Biomark Med.* 2017;11(11):11031-1040. doi: 10.2217/bmm-2017-0110.
283. Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS, Slominski AT. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;351(2):152-66. doi: 10.1016/j.mce.2012.01.004.
284. Sohal RS. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic Biol Med.* 2002;33(1):37-44. doi: 10.1016/s0891-5849(02)00856-0.
285. Sokołowska M, Rokita H, Włodek L. Activation of DNA biosynthesis in human hepatoblastoma HEPG2 cells by the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. *Fundam Clin Pharmacol.* 2003;17(5):599-607. doi: 10.1046/j.1472-8206.2003.00182.x.
286. Soltys K, Dikdan G, Koneru B. Oxidative stress in fatty livers of obese Zucker rats: rapid amelioration and improved tolerance to warm ischemia with tocopherol. *Hepatology* 2001;34:13-8. doi: 10.1053/jhep.2001.25452.
287. Squadrito GL, Pryor WA. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med.* 1998;25(4-5):392-403. doi: 10.1016/s0891-5849(98)00095-1.
288. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Free Radic Res.* 2006;40(12):1250-8. doi: 10.1080/10715760600918142.
289. Swiderska-Kończak G, Klusek J, Kołataj A. The effect of melatonin on glutathione and glutathione transferase and glutathione peroxidase activities in the mouse liver and kidney in vivo. *Neuro Endocrinol Lett.* 2006;27(3):365-8.
290. Takahashi T, Sasaki M, Itoh H, Yamadera W, Ozone M, Obuchi K, Hayashida K, Matsunaga N, Sano H. Melatonin alleviates jet lag symptoms caused by an 11-hour eastward flight. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2002;56(3):301-2. doi: 10.1046/j.1440-1819.2002.00988.x.
291. Tan DX, Pöeggeler B, Reiter RJ, Chen LD, Chen S, Manchester LC, Barlow-Walden LR. The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo.

- Cancer Lett. 1993;70(1-2):65-71. doi: 10.1016/0304-3835(93)90076-l.
292. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Zhang M, Weintraub ST, Cabrera J, Sainz RM, Mayo JC. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1472:206-14. doi: 10.1016/s0304-4165(99)00125-7.
293. Tan DX, Manchester LC, Burkhardt S, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Shohami E, Huo YS, Hardeland R, Reiter RJ. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J*. 2001;15(12):2294-6. doi: 10.1096/fj.01-0309fje.
294. Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Allegra M, Hardeland R. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem*. 2002;2(2):181-97. doi: 10.2174/1568026023394443.
295. Tan DX, Manchester LC, Hardeland R, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM, Reiter RJ. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res*. 2003;34(1):75-8. doi: 10.1034/j.1600-079x.2003.02111.x.
296. Tan DX, Manchester LC, Sainz RM, Mayo JC, León J, Reiter RJ. Physiological ischemia/reperfusion phenomena and their relation to endogenous melatonin production: a hypothesis. *Endocrine*. 2005;27(2):149-58. doi: 10.1385/endo:27:2:149.
297. Tan DX, Korkmaz A, Reiter RJ, Manchester LC. Ebola virus disease: potential use of melatonin as a treatment. *J Pineal Res*. 2014;57(4):381-4. doi: 10.1111/jpi.12186.
298. Tan DX, Manchester LC, Esteban-Zubero E, Zhou Z, Reiter RJ. Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and Metabolism. *Molecules*. 2015;20(10):18886-906. doi: 10.3390/molecules201018886.
299. Tatham AL, Crabtree MJ, Warrick N, Cai S, Alp NJ, Channon KM. GTP cyclohydrolase I

- expression, protein, and activity determine intracellular tetrahydrobiopterin levels, independent of GTP cyclohydrolase feedback regulatory protein expression. *J Biol Chem.* 2009;284(20):13660-8. doi: 10.1074/jbc.M807959200.
300. Tengattini S, Reiter RJ, Tan DX, Terron MP, Rodella LF, Rezzani R. Cardiovascular diseases: protective effects of melatonin. *J Pineal Res.* 2008;44(1):16-25. doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00518.x.
301. Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol.* 2003;18(8):891-902. doi: 10.1046/j.1440-1746.2003.03056.x.
302. Teoh NC. Hepatic ischemia reperfusion injury: Contemporary perspectives on pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection-the good, bad and deadly. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26 Suppl 1:180-7. doi: 10.1111/j.1440-1746.2010.06584.x.
303. Tomás-Zapico C, Coto-Montes A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res.* 2005;39(2):99-104. doi: 10.1111/j.1600-079X.2005.00248.x.
304. Tresguerres JA, Ariznavarreta C, Granados B, Martín M, Villanúa MA, Golombek DA, Cardinali DP. Circadian urinary 6-sulphatoxymelatonin, cortisol excretion and locomotor activity in airline pilots during transmeridian flights. *J Pineal Res.* 2001;31(1):16-22. doi: 10.1034/j.1600-079x.2001.310103.x.
305. Tsuda K, Nishio I. Membrane fluidity and hypertension. *Am J Hypertens.* 2003;16(3):259-61. doi: 10.1016/s0895-7061(02)03257-0.
306. Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink M, Lotze M, Yang H, Li J, Tracey K, Geller D, Billiar T. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J Exp Med.* 2005;201:1135-43. doi: 10.1084/jem.20042614.
307. Tsung A, Klune JR, Zhang X, Jeyabalan G, Cao Z, Peng X, Stolz DB, Geller DA, Rosengart MR, Billiar TR. HMGB1 release induced by liver ischemia involves Toll-like receptor 4 dependent reactive oxygen species production and calcium-mediated

- signaling. *J Exp Med.* 2007;204:2913-23. doi: 10.1084/jem.20070247.
308. Tsutsui M, Shimokawa H, Otsuji Y, Ueta Y, Sasaguri Y, Yanagihara N. Nitric oxide synthases and cardiovascular diseases: insights from genetically modified mice. *Circ J.* 2009;73(6):986-93. doi: 10.1253/circj.cj-09-0208.
309. Turina M, Christ-Crain M, Polk HC Jr. Diabetes and hyperglycemia: strict glycemic control. *Crit Care Med.* 2006;34(9 Suppl):S291-S300. doi: 10.1097/01.CCM.0000231887.84751.04.
310. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003;552(Pt 2):335-44. doi: 10.1113/jphysiol.2003.049478.
311. Uehara T, Bennett B, Sakata ST, Satoh Y, Bilter GK, Westwick JK, Brenner DA. JNK mediates hepatic ischemia reperfusion injury. *J Hepatol.* 2005;42:850-9. doi: 10.1016/j.jhep.2005.01.030.
312. Ulhôa MA, Marqueze EC, Burgos LG, Moreno CR. Shift work and endocrine disorders. *Int J Endocrinol.* 2015;2015:826249. doi: 10.1155/2015/826249.
313. Vajdová K, Graf R, Clavien PA. ATP-supplies in the cold-preserved liver: A long-neglected factor of organ viability. *Hepatology.* 2002;36(6):1543-52. doi: 10.1053/jhep.2002.37189.
314. Vakkuri O, Rintamäki H, Leppäluoto J. Plasma and tissue concentrations of melatonin after midnight light exposure and pinealectomy in the pigeon. *J Endocrinol.* 1985;105(2):263-8. doi: 10.1677/joe.0.1050263.
315. Valez V, Cassina A, Batinic-Haberle I, Kalyanaraman B, Ferrer-Sueta G, Radi R. Peroxynitrite formation in nitric oxide-exposed submitochondrial particles: detection, oxidative damage and catalytic removal by Mn-porphyrins. *Arch Biochem Biophys.* 2013;529(1):45-54. doi: 10.1016/j.abb.2012.10.012.
316. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2005;12(10):1161-208. doi: 10.2174/0929867053764635.
317. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human

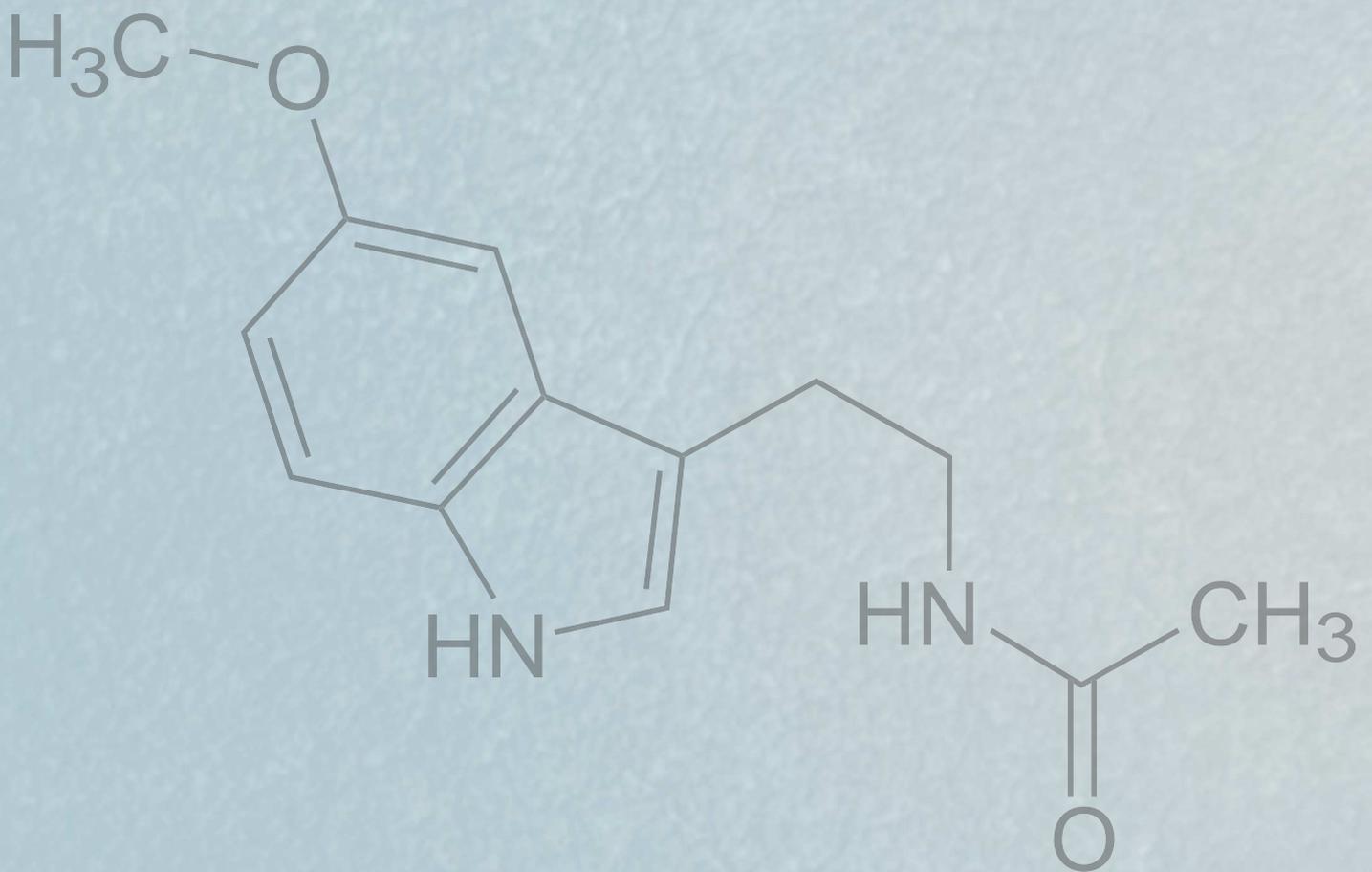
- disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.
318. Van Bossuyt H, Wisse E. Structural changes produced in Kupffer cells in the rat liver by injection of lipopolysaccharide. *Cell Tissue Res.* 1988;251(1):205-14. doi: 10.1007/bf00215466.
319. van der Vliet A, Janssen-Heininger YM. Hydrogen peroxide as a damage signal in tissue injury and inflammation: murderer, mediator, or messenger? *J Cell Biochem.* 2014;115(3):427-35. doi: 10.1002/jcb.24683.
320. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(2):112-24. doi: 10.1038/nrm2330.
321. Venegas C, García JA, Doerrier C, Volt H, Escames G, López LC, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. Analysis of the daily changes of melatonin receptors in the rat liver. *J Pineal Res.* 2013;54(3):313-21. doi: 10.1111/jpi.12019.
322. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol.* 1994;145(6):1421-31.
323. von Heesen M, Seibert K, Hülser M, Scheuer C, Wagner M, Menger MD, Schilling MK, Moussavian MR. Multidrug donor preconditioning protects steatotic liver grafts against ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg.* 2012;203(2):168-76. doi: 10.1016/j.amjsurg.2011.01.026.
324. Vorbeck ML, Martin AP, Long JW Jr, Smith JM, Orr RR Jr. Aging-dependent modification of lipid composition and lipid structural order parameter of hepatic mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 1982;217(1):351-61. doi: 10.1016/0003-9861(82)90511-2.
325. Waldhauser F, Ehrhart B, Förster E. Clinical aspects of the melatonin action: impact of development, aging, and puberty, involvement of melatonin in psychiatric disease and importance of neuroimmunoendocrine interactions. *Experientia.* 1993;49(8):671-81. doi: 10.1007/bf01923949.
326. Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Baynosa RC, Khiabani KT, Zamboni WA. Microcirculatory

- effects of melatonin in rat skeletal muscle after prolonged ischemia. *J Pineal Res.* 2005;39(1):57-65. doi: 10.1111/j.1600-079X.2005.00215.x.
327. Wang H, Li ZY, Wu HS, Wang Y, Jiang CF, Zheng QC, Zhang JX. Endogenous danger signals trigger hepatic ischemia/reperfusion injury through toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B pathway. *Chin Med J (Engl).* 2007;120(6):509-14.
328. Winterbourn CC. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett.* 1995;82-83:969-74. doi: 10.1016/0378-4274(95)03532-x.
329. Witt-Enderby PA, MacKenzie RS, McKeon RM, Carroll EA, Bordt SL, Melan MA. Melatonin induction of filamentous structures in non-neuronal cells that is dependent on expression of the human mt1 melatonin receptor. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2000;46(1):28-42. doi: 10.1002/(SICI)1097-0169(200005)46:1<28::AID-CM4>3.0.CO;2-5.
330. Witthaut R, Farhood A, Smith CW, Jaeschke H. Complement and tumor necrosis factor-alpha contribute to Mac-1 (CD11b/CD18) up-regulation and systemic neutrophil activation during endotoxemia in vivo. *J Leukoc Biol.* 1994;55(1):105-11. doi: 10.1002/jlb.55.1.105.
331. Wróbel M, Góralaska J, Jurkowska H, Sura P. Similar effect of sodium nitroprusside and acetylsalicylic acid on antioxidant system improvement in mouse liver but not in the brain. *Biochimie.* 2017;135:181-185. doi: 10.1016/j.biochi.2017.02.006.
332. Wu H, Zhang J, Wang L, Tian Y, Wang H, Rotstein O. Toll-like receptor 4 involvement in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Hepatobil Pancreat Dis Int.* 2004;3:250-3.
333. Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai AP, Cheng YL, Cheng PW, Li CY, Li CJ. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cell Physiol Biochem.* 2018;46(4):1650-67. doi: 10.1159/000489241.
334. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med.* 2007;357(11):1121-35.
335. Yoon IY, Song BG. Role of morning melatonin administration and attenuation of sunlight exposure in improving adaptation of night-shift workers. *Chronobiol Int.*

- 2002;19(5):903-13. doi: 10.1081/cbi-120014571.
336. Yoshida N, Yoshikawa T, Nakamura Y, Arai M, Matsuyama K, Iinuma S, Yagi N, Naito Y, Miyasaka M, Kondo M. Role of neutrophil-mediated inflammation in aspirin-induced gastric mucosal injury. *Dig Dis Sci*. 1995;40(11):2300-4. doi: 10.1007/bf02063228.
337. Yokota H, Narayanan SP, Zhang W, Liu H, Rojas M, Xu Z, Lemtalsi T, Nagaoka T, Yoshida A, Brooks SE, Caldwell RW, Caldwell RB. Neuroprotection from retinal ischemia/reperfusion injury by NOX2 NADPH oxidase deletion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(11):8123-31. doi: 10.1167/iovs.11-8318.
338. Yu BP, Suescun EA, Yang SY. Effect of age-related lipid peroxidation on membrane fluidity and phospholipase A2: modulation by dietary restriction. *Mech Ageing Dev*. 1992;65(1):17-33. doi: 10.1016/0047-6374(92)90123-u.
339. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*. 1994;74(1):139-62. doi: 10.1152/physrev.1994.74.1.139.
340. Zaouali MA, Ben Abdennebi H, Padrissa-Altés S, Mahfoudh-Boussaid A, Roselló-Catafau J. Pharmacological strategies against cold ischemia reperfusion injury. *Expert Opin Pharmacother* 2010;11:537-55. doi: 10.1517/14656560903547836.
341. Zaouali MA, Reiter RJ, Padrissa-Altés S, Boncompagni E, García JJ, Ben Abdennebi H, Freitas I, García-Gil FA, Rosello-Catafau J. Melatonin protects steatotic and nonsteatotic liver grafts against cold ischemia and reperfusion injury. *J Pineal Res* 2011;50:213-21. doi: 10.1111/j.1600-079X.2010.00831.x.
342. Zaouali MA, Boncompagni E, Reiter RJ, Bejaoui M, Freitas I, Pantazi E, Folch-Puy E, Abdennebi HB, Garcia-Gil FA, Roselló-Catafau J. AMPK involvement in endoplasmic reticulum stress and autophagy modulation after fatty livergraft preservation: a role for melatonin and trimetazidine cocktail. *J Pineal Res* 2013;55:65-78. doi: 10.1111/jpi.12051.
343. Zelzer S, Oberreither R, Bernecker C, Stelzer I, Truschnig-Wilders M, Fauler G. Measurement of total and free malondialdehyde

- by gas-chromatography mass spectrometry--comparison with high-performance liquid chromatography methodology. *Free Radic Res.* 2013;47(8):651-6. doi: 10.3109/10715762.2013.812205.
344. Zhai Y, Shen XD, O'Connell R, Gao F, Lassman C, Busuttil RW, Cheng G, Kupiec-Weglinski JW. Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFNregulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway. *J Immunol.* 2004;173(12):7115-9. doi: 10.4049/jimmunol.173.12.7115.
345. Zhai W, Cardell M, De Meester I, Augustyns K, Hillinger S, Inci I, Arni S, Jungraithmayr W, Scharpé S, Weder W, Korom S. Intra-graft DPP IV inhibition attenuates post-transplant pulmonary ischemia/reperfusion injury after extended ischemia. *J Heart Lung Transplant.* 2007;26(2):174-80. doi: 10.1016/j.healun.2006.11.601.
346. Zhai Y, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Liver ischemia and reperfusion injury: new insights into mechanisms of innate-adaptive immune-mediated tissue inflammation. *Am J Transplant.* 2011;11(8):1563-9. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03579.x.
347. Zhang HM, Zhang Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *J Pineal Res.* 2014;57:131-46. doi: 10.1111/jpi.12162.
348. Zhu X, Fan WG, Li DP, Kung H, Lin MC. Heme oxygenase-1 system and gastrointestinal inflammation: a short review. *World J Gastroenterol.* 2011;17(38):4283-8. doi: 10.3748/wjg.v17.i38.4283.
349. Zhu L, Lu Y, Zhang J, Hu Q. Subcellular Redox Signaling. *Adv Exp Med Biol.* 2017;967:385-398. doi: 10.1007/978-3-319-63245-2\_25.
350. Zimmer G, Thurich T, Scheer B. Membrane fluidity and vitamin E. En: Packer L, Fuchs J (editores). *Vitamin E in Health and Disease.* New York, USA, Marcel Dekker, Inc.;1993:207-22.





**Universidad de Zaragoza**

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