



Universidad
Zaragoza

TRABAJO FIN DE GRADO

**Efecto protector de la melatonina en las membranas
biológicas**

**Protective effect of melatonin on biological
membranes**

Autora:

Lydia Aizea Salinas Fernández

Director:

José Joaquín García García

Departamento de Farmacología, Fisiología y Medicina Legal y Forense

Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza

Curso académico 2024 - 2025

ABREVIATURAS

AFMK	N- acetil- N-formil- 5-metoxikinuramina
AMK	N-acetil-5-metoxikuramina
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
CPK	Creatinfosfoquinasa
GPx	Glutación peroxidasa
GRd	Glutación reductasa
HNE	4-hidroxi-2-nonenal
LLPS	Separación de fases líquido-líquido
MDA	Malonildialdehido
MLO	Orgánulos sin membrana
mPTP	Poro de transición de permeabilidad mitocondrial
NO•	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
NPC	Complejos de poros nucleares
Nrf2	Factor nuclear tipo eritroide 2
•OH	Radical hidroxilo
ONOO-	Peroxinitrito
RNS	Especies reactivas del nitrógeno
ROO•	Radical peroxilo
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SOD	Superóxido dismutasa

ÍNDICE

1	RESUMEN:.....	3
2	INTRODUCCIÓN.....	5
2.1	MEMBRANAS BIOLÓGICAS.....	5
2.2	RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO	9
2.3	MELATONINA	13
2.4	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS:.....	18
3	MATERIAL Y MÉTODOS:	19
3.1	ESTRATEGIAS DE BÚSQUEDA:	19
3.2	CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN:	19
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN:.....	21
4.1	MELATONINA Y PEROXIDACIÓN LIPÍDICA:	21
4.2	MELATONINA Y MITOCONDRIA:	25
4.3	EFFECTO DE LA MELATONINA EN LA FLUIDEZ:	30
5	CONCLUSIONES:	39
6	BIBLIOGRAFIA:.....	40

1 RESUMEN:

La melatonina es una indolamina secretada principalmente por la glándula pineal que ejerce múltiples funciones entre las que destacan su potente actividad antioxidante, antiinflamatoria y reguladora de los ritmos circadianos. Asimismo, es de vital importancia su papel protector de la estructura y función de las membranas biológicas, especialmente en la fluidez de la bicapa lipídica, en la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados y en la función de las mitocondrias.

La fluidez de la membrana es la valoración del desplazamiento lateral de lípidos y proteínas. Cuando se altera se comprometen funciones como el transporte transmembrana, la transducción de señales, la formación de microdominios lipídicos y la organización del citoesqueleto. Para aumentar la fluidez, la melatonina se inserta en la región interfacial de los grupos de la cabeza, de manera que modula la organización de los lípidos, y preserva su fluidez.

Además, actúa como agente neutralizador directo de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, reduciendo la iniciación y propagación de la peroxidación lipídica. A nivel mitocondrial, impide la oxidación de la cardiolipina, estabiliza la membrana mitocondrial interna y previene la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, eventos clave en la disfunción energética y en la activación de la vía intrínseca de la apoptosis.

Por último, se discute el papel emergente de la melatonina en la regulación de los orgánulos sin membrana mediante la estabilización de las balsas lipídicas y el mantenimiento de las propiedades viscoelásticas de la membrana. Estos hallazgos posicionan a la melatonina como un agente protector clave en patologías asociadas al estrés oxidativo como el Alzheimer, la isquemia-reperfusión y diversos procesos tumorales.

Palabras clave: antioxidante, fluidez, melatonina, membrana, mitocondria, peroxidación lipídica

ABSTRACT:

Melatonin is an indoleamine secreted primarily by the pineal gland that performs multiple functions, among which its potent antioxidant, anti-inflammatory, and circadian rhythm regulating activity stand out. Likewise, its protective role on the structure and function of biological membranes is of vital importance, especially regarding the fluidity of the lipid bilayer, the peroxidation of polyunsaturated fatty acids, and mitochondrial function.

Membrane fluidity is the assessment of the lateral displacement of lipids and proteins. When it is altered, functions such as transmembrane transport, signal transduction, the formation of lipid microdomains, and cytoskeleton organization are compromised. To enhance membrane fluidity, melatonin inserts itself into the interfacial region of the lipid headgroups, thereby modulating lipid organization and preserving fluidity.

Furthermore, it acts as a direct neutralizing agent of reactive oxygen and nitrogen species, reducing the initiation and propagation of lipid peroxidation. At the mitochondrial level, it prevents cardiolipin oxidation, stabilizes the inner mitochondrial membrane, and prevents the opening of the mitochondrial permeability transition pore, key events in energetic dysfunction and the activation of the intrinsic apoptosis pathway.

Lastly, the emerging role of melatonin in regulating membraneless organelles is discussed through the stabilization of lipid rafts and the maintenance of the viscoelastic properties of the membrane. These findings position melatonin as a key protective agent in pathologies associated with oxidative stress such as Alzheimer's, ischemia-reperfusion, and various tumor processes

Key Words: antioxidant, fluidity, melatonin, membrane, mitochondria, lipid peroxidation

2 INTRODUCCIÓN

2.1 MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Las membranas biológicas son estructuras celulares que dan forma a las células y permiten separar el compartimento interno del externo. A su vez, controlan el tránsito de sustancias al modificar su permeabilidad y están implicadas en la transducción de señales, por ello, resultan indispensables para el correcto funcionamiento de las células.

En 1925 Gorter y Grendel propusieron el modelo de bicapa lipídica, que constituye la base del concepto moderno de membrana celular. Realmente la composición de las membranas es compleja e incluso dinámica a lo largo del ciclo celular, siendo diferente también según la localización y el estado funcional (Schevchenko y Simons, 2010). Los lípidos de cada monocapa tienen un carácter anfipático, es decir, tienen una región hidrófoba y una hidrófila que se orienta hacia la fase acuosa. (Gorter y Grendel, 1925; Ronner, 2020). Además, están compuestas por proteínas en mayor o menor proporción según el tipo de célula, pero en términos generales, ocupan el 50% de la superficie de la membrana. Asimismo, poseen cadenas de oligosacáridos que pueden estar unidos a proteínas o a lípidos en la superficie externa de la membrana de las células eucariotas. Estos desempeñan funciones de reconocimiento celular. (Campos Muñiz, 2023)

Las membranas biológicas se encuentran constituidas por tres tipos de lípidos: fosfolípidos, glucolípidos y esteroides. Los fosfolípidos están compuestos por dos cadenas de ácidos grasos unidas a glicerol y a un fosfato. El colesterol está formado por un grupo hidroxilo, una estructura esteroide de cuatro anillos y una cadena lateral corta de hidrocarburos. En condiciones fisiológicas, el colesterol ordena los lípidos y condensa la bicapa de manera que, incrementa su resistencia y disminuye su permeabilidad. Del mismo modo la presencia de ácidos grasos insaturados aumenta la fluidez de la membrana, mientras que los saturados la reducen (Ronner, 2020). La composición lipídica de la bicapa difiere según si se trata de la hoja externa, donde predominan los esfingolípidos, la esfingomielina y la fosfatidilcolina, o de la hoja interna, en la que abundan la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina (Watson, 2015). Los fosfolípidos pueden transportarse de la hoja externa a la interna por medio de unas enzimas denominadas flipasas, durante un proceso que

se conoce como translocación interna (flipping). En cambio, si son transportados al exterior se conoce como traslocación externa (flopping) y lo llevan a cabo las flopasas (Ronner, 2020).

Los lípidos están organizados en dominios, son regiones de la membrana lipídica que miden de 10 a 200nm, ricos en colesterol y esfingolíidos que difieren en función y estructura. Estos dominios están formados por interacciones lípido-lípido, proteína-lípido y albergan diferentes proteínas que desempeñan funciones importantes como la señalización de calcio (Karnovsky et al, 1982; Samhan-Arias et al, 2023).

Fue en 1997 cuando Simons e Ikonen introdujeron por primera vez el término balsas lipídicas, son regiones separadas por fases en la bicapa lipídica que están formadas por agrupaciones de esfingolípidos y microdominios móviles formadores de colesterol. Están caracterizadas por: pequeño tamaño entre 10-200 nm, heterógeneas, muy dinámicas, con dominios ricos en esteroides y esfingolípidos, que compartimentalizan los procesos celulares. Son responsables de la transducción de señales y el transporte de proteínas (Loh y Reiter, 2021; Simons e Ikonen, 1997).

Las balsas pueden ser de dos tipos planares o cavéolas. Las cavéolas son invaginaciones de la membrana plasmática que participan en la transducción de señales, en el mantenimiento de las membranas y en la endocitosis (Ronner, 2020). Permiten controlar las interacciones proteína-proteína y facilitan la formación de complejos funcionales proteína-proteína o proteína-lípido en las membranas (Parton y Del Pozo, 2013).

Las proteínas de la membrana están involucradas en diferentes procesos celulares, tales como el transporte de iones, electrones y moléculas, la transducción de señales, las reacciones enzimáticas y la comunicación intercelular (Jelokhani-Niaraki, 2023). Pueden ser de dos tipos: integrales o intrínsecas y periféricas o extrínsecas. Las integrales atraviesan toda la membrana y tienen anclajes a la membrana constituidos por aminoácidos. Las proteínas transmembrana pueden estar formadas por hélices α o por barriles β . Las proteínas periféricas se unen a lípidos o a otras proteínas de membrana mediante interacciones electrostáticas (Ronner, 2020; Watson, 2015).

Las proteínas transmembrana pueden actuar como receptores de membrana o como transportadores. Un tipo importante de transportador es el canal iónico que permite el paso rápido de iones a través de la membrana, de manera que mantiene un equilibrio osmótico y modula el potencial de membrana. Además, los canales iónicos interactúan con una gran cantidad de proteínas señalizadoras y segundos mensajeros intracelulares (Cheng y Smith, 2019). Los dos tipos de receptores de membrana más abundantes son los acoplados a las proteínas G y los de un solo paso, se encargan principalmente de responder a señales extracelulares y transmitirlos al interior de la célula. Cabe destacar que la interacción y la orientación de los dominios transmembrana influye en la transducción de señales (Cheng y Smith, 2019).

Las proteínas periféricas se unen de forma laxa en las membranas, de manera que, durante la señalización celular, pueden ser reclutadas hacia la membrana a través de sus dominios de unión a la membrana, mediante los cuales se unen a ciertas especies de lípidos con alta afinidad y especificidad. En caso de que no posean dominio de unión a la membrana, utilizan parte de sus superficies moleculares o estructuras secundarias anfipáticas. Las proteínas ancladas a lípidos pueden ser: preniladas, aciladas grasas o ancladas a glicosilfosfatidilinositol.

En 1972 Singer y Nicolson propusieron un nuevo modelo para comprender la estructura de la membrana celular conocido como mosaico fluido. Éste se estableció en base a dos características, siendo la primera la presencia de proteínas con conformación de alfa hélice, por lo que el modo de unión primario es hidrofóbico y la segunda es que las cabezas iónicas y polares de los lípidos, así como de las cadenas laterales iónicas de las proteínas se encontrarían en la superficie externa de la membrana. Asimismo, añadieron el concepto de que la membrana debía ser fluida ya que, las moléculas lipídicas se pueden desplazar lateralmente, y sus cabezas hidrofílicas se orientan hacia el exterior de manera que pueden interactuar con moléculas acuosas (Singer y Nicolson 1972).

Gitler introdujo el concepto de plasticidad, que se fundamenta en el hecho de que las estructuras que componen la membrana son fluidas y ésta sufre modificaciones inducidas por cambios en el ambiente o por interacción con otras moléculas. También sugirió que en

la mayoría de membranas, las proteínas se distribuyen de forma asimétrica y que la fracción principal de éstas se orienta hacia la capa interna, estableciendo finalmente que la funcionalidad de los elementos de membrana depende de estas traslaciones (Gitler 1972).

El modelo de islotes proteicos establece que las proteínas de membrana están separadas en diferentes modelos según su función y naturaleza. Estos dominios están enriquecidos con colesterol y asociados a filamentos de actina del citoesqueleto que regulan su posición y separación (Lillemeier y Davis, 2011). En 2020 Griffé et al, destacaron la importancia de los agrupamientos en la señalización celular de proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol localizadas en la porción exoplásmica. Estos agrupamientos dependen de un parámetro que se aplica a cada agente conocido como deseo de agrupamiento y que resulta de la combinación de procesos celulares como la autoafinidad, el dominio lipídico de membrana, el tamaño y el modelo Picket Fence (Griffé et al, 2020; Campos Muñiz, 2023).

La estructura y dinámica de las membranas biológicas depende tanto de factores internos como externos. La organización de la membrana desempeña un papel fundamental al facilitar la co-localización y oligomerización de las proteínas de señalización, lo que mejora la eficiencia y especificidad de la transducción de señales. También puede inducir cambios conformacionales específicos en las proteínas, bien a través de receptores transmembrana controlados por componentes lipídicos específicos o mediante equilibrios conformacionales modificados por las propiedades físicas de las balsas lipídicas (Cheng y Smith, 2019). Una de las características más relevantes de la membrana es su fluidez, que hace referencia a la capacidad que tienen los componentes para moverse en la membrana. La mayoría de las membranas biológicas son ricas en lípidos insaturados que adoptan una fase fluida y desordenada a temperatura ambiente conocida como fase cristalina líquida o desordenada. No obstante, las membranas que se componen principalmente por lípidos saturados, a bajas temperaturas pueden adoptar una fase de gel ordenada y rígida (Renne y Ernst, 2023).

2.2 RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que contienen como mínimo un electrón desapareado en su orbital más externo, lo que les confiere una alta reactividad. Se producen tanto de forma endógena en la mitocondria y por acción de las NAPH oxidasas, como de forma exógena por acción de la radiación, el tabaco y la contaminación. Destacan principalmente las especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS) y las derivadas del nitrógeno (Halliwell y Gutteridge, 2015).

La sobreproducción de ROS ocasiona un desequilibrio de oxido-reducción, que conduce al estrés oxidativo con daño del ADN, proteínas y membranas (Liguori et al, 2018). Las principales ROS son el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno, los radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) y alcoxilo ($\text{RO}\cdot$) y el oxígeno singlete. El radical superóxido se origina durante la fosforilación oxidativa en la mitocondria cuando hay una transferencia de electrones a una molécula de oxígeno procedentes de los complejos I y III de transferencia electrónica. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como no tiene carga puede atravesar las membranas biológicas, por lo que es un potente oxidante que juega un papel importante en la transducción de señales inducidas por factores de crecimiento, así como, en el mantenimiento del equilibrio thiol-redox y en el funcionamiento de la mitocondria. El radical $\text{OH}\cdot$ es el más potente de los agentes oxidantes producidos por los sistemas biológicos, de manera que causa daño a todas las biomoléculas más importantes. Está implicado en el desarrollo de varias enfermedades crónicas. El hierro ferroso puede reaccionar con un peróxido lipídico y generar radicales $\text{RO}\cdot$ que pueden propagar la reacción de peroxidación lipídica. Del mismo modo, el radical $\text{ROO}\cdot$ también está implicado en reacciones de peroxidación. Por último, el oxígeno singlete no contiene un electrón desapareado, sino que se trata de una especie reactiva que interactúa preferentemente con los enlaces dobles conjugados de los ácidos grasos poliinsaturados (Jomova et al, 2023).

Las principales especies reactivas del nitrógeno son: el óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) y el peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$). El $\text{NO}\cdot$ es una molécula lipofílica que actúa como molécula de señalización en el sistema nervioso central y cuando reacciona con radicales superóxido

forma el ONOO⁻. Este último tiene una acción oxidante muy potente que causa daño a proteínas y al ADN por lo que su presencia se ha relacionado con la progresión de tumores. Este radical interfiere en vías de señalización molecular al oxidar o nitrogenar residuos de proteínas (Jomova et al, 2023).

La peroxidación lipídica es el proceso en el cual se oxidan preferentemente los ácidos grasos poliinsaturados, es decir, los de cadena larga que poseen uno o más dobles enlaces. Existen dos tipos de peroxidación: la no enzimática y la enzimática. La peroxidación lipídica no enzimática tiene tres etapas: la iniciación, la propagación y la terminación. Se trata del conjunto de reacciones redox catalizadas por el hierro lábil, es decir, aquel que está libre o débilmente unido. En la iniciación, el hierro ferroso (Fe^{2+}) reacciona con el peróxido de hidrógeno formando un radical $\cdot\text{OH}$ altamente reactivo que a su vez ataca los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas biológicas extrayendo un hidrógeno y generando un radical lipídico. Posteriormente, se inicia la fase de propagación en la que el radical lipídico reacciona con oxígeno molecular y forma un radical $\text{ROO}\cdot$, que a su vez puede extraer otro hidrógeno de un ácido graso vecino, repitiendo el ciclo y generando más peróxidos lipídicos. Finalmente, la terminación tiene lugar bien cuando dos radicales reaccionan entre sí y forman un producto no reactivo o por medio de antioxidantes que donan electrones a los radicales neutralizándolos y evitando la propagación. La figura A ilustra estas etapas. En cambio, la peroxidación lipídica enzimática está mediada por la 5-lipoxigenasa que oxida el ácido araquidónico en el carbono 5, generando 5-hidroperoxieicosatetraenoico y leucotrieno A₄, que inicia la síntesis de leucotrienos mediadores de la inflamación. Los productos de degradación de los peróxidos lipídicos son los hidroxiácidos y los aldeídos reactivos y son herramientas útiles para cuantificar la peroxidación lipídica en las muestras biológicas (Gaschler y Stockwell, 2018).

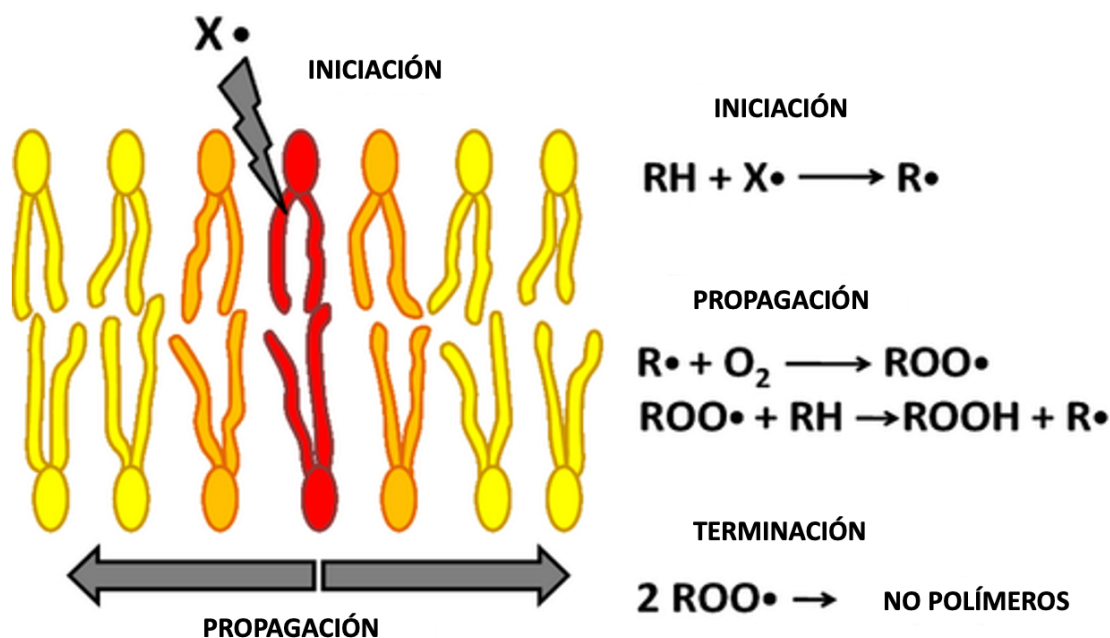


Figura A: Peroxidación lipídica en la membrana biológica. Cuando un radical libre ($X\cdot$) capta un átomo de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado (RH) se forma un dieno conjugado que reacciona rápidamente con una molécula de oxígeno dando lugar a un peroxilo lipídico ($ROO\cdot$). Posteriormente el $ROO\cdot$ capta otro átomo de hidrógeno de un segundo RH formando un hidroperóxido lipídico y un segundo dieno conjugado. Durante este proceso se forman numerosos productos finales que pueden ser medidos como malondialdehído, 4-hidroxi-alquenos e isoprostanos. Un dieno conjugado ($R\cdot$): cola de ácido graso que ha perdido un electrón (García et al, 2014).

La peroxidación de los lípidos de membrana modifica las propiedades biofísicas de la membrana, sobre todo se alteran las interacciones lípido-lípido, la permeabilidad y la fluidez de la membrana y los gradientes iónicos (Gaschler y Stockwell, 2018). El hidroperóxido 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina posee un grupo -OOH que es más hidrofílico que la cadena acil lipídica original, de modo que se orienta hacia la superficie de la membrana, originando una torsión de la cadena acil que aumenta el área molecular por lípido (Wong – Ekkabut et al, 2007).

En las membranas los hidroperóxidos aumentan el área media por lípido lo que podría inducir incompatibilidades entre los diferentes lípidos. Este aumento se produce porque los peróxidos inducen un cambio estructural en el fosfolípido al insertarse un grupo -OOH en la cadena de ácidos grasos de manera que aumenta la polaridad y el volumen de la molécula, esto genera repulsión entre las cadenas lipídicas con el consecuente aumento de espacio entre ellas. Como consecuencia, se puede producir la separación de fases,

donde las regiones con lípidos más ordenados se separan de las regiones más desordenadas (Akimov et al, 2007).

La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados por la 5-lipoxigenasa genera lisofosfolípidos que solubilizan el citosol, este hecho unido al defecto de empaquetamiento de la bicapa originado por el cambio conformacional de los lípidos oxidados aumenta la permeabilidad de la membrana permitiendo el paso de moléculas pequeñas. No obstante, a concentraciones moderadas la membrana mantiene su integridad (Chatterjee y Agarwal, 1988; Itri et al, 2014; Gaschler, Stockwell, 2018).

Las simulaciones moleculares dinámicas han demostrado que las colas lipídicas oxidadas poseen un carácter más polar, de manera que, migran hacia la fase acuosa de la membrana y promueven un aumento en el área molecular lipídica que conlleva una disminución del espesor de la bicapa (Beranova et al, 2010). Estas simulaciones concluyeron que la oxidación masiva de fosfatidilcolina puede generar poros en la membrana que la desestabilizan y ocasionan su ruptura (Vernier et al, 2009; Itri et al, 2014). Asimismo, la presencia de lípidos oxidados aumenta la susceptibilidad de la membrana a la electroporación, es decir, se altera el potencial eléctrico de la membrana celular. También, causan pérdida de la asimetría lipídica de la bicapa que desempeña un papel importante en la fisiología de la célula, especialmente en la señalización apoptótica (Vernier et al, 2009; Itri et al, 2014).

Las alteraciones en la estructura de la membrana modifican la difusión lateral de lípidos y proteínas con implicaciones funcionales en la señalización celular. Los dominios lipídicos que resultan de la oxidación pueden actuar como plataformas para la interacción selectiva de proteínas y otros componentes celulares (Beranova et al, 2010; Itri et al, 2014).

2.3 MELATONINA

La melatonina, también conocida como N-acetil-5-metoxitriptamina, es una indolamina presente en todos los seres vivos y secretada principalmente por la glándula pineal. Fue aislada por primera vez en 1958 por Aaron Lerner. También se ha descrito su producción en otras localizaciones como la retina, las células de la médula ósea, las plaquetas, las células epiteliales, los linfocitos, la glándula de Harder, el cerebelo y sobre todo el tracto gastrointestinal (Tordjman et al, 2017; Ahmad et al, 2023).

Los pinealocitos son las células encargadas de la producción de melatonina en la glándula pineal. Cuando la retina recibe un estímulo luminoso se transmite por un largo circuito nervioso a través del núcleo supraquiasmático del hipotálamo. El aminoácido triptófano, se hidroxila por la 5 triptófano-hidroxilasa dando lugar al 5-hidroxitriptófano que a través de la L-aminoácido aromático descarboxilasa se convierte en serotonina. La serotonina primero es acetilada por la N-acetiltransferasa y posteriormente actúa la hidroxilindol-O-metiltransferasa, obteniéndose finalmente la melatonina (Tordjman et al, 2017). La síntesis se ve influenciada por factores tales como la presencia de luz, la hora de irse a dormir, el ejercicio, la ingesta de alcohol, cafeína o la toma de fármacos como benzodiacepinas, ibuprofeno o anticonceptivos orales (Ahmad et al, 2023). Concluida su síntesis, es liberada a la circulación sistémica, desde donde se distribuye a los tejidos diana (Tordjman et al, 2017).

Las vías de actuación de la melatonina pueden tener efectos inmediatos, prospectivos y cronobióticos. Los inmediatos aparecen como consecuencia de la vía de acción hormonal clásica. Se deben principalmente a la presencia de la melatonina en los fluidos biológicos y su interacción instantánea con los efectores moleculares. Se expresan fundamentalmente durante la noche cuando la melatonina se libera a la circulación sistémica y al líquido cefalorraquídeo. Serán diferentes según el órgano diana, la concentración de la hormona, el tipo de receptor y el sistema de señalización implicados. Los efectos prospectivos dependen de vías de acción específicas de la melatonina, se expresan solo durante el día, es decir, la acción nocturna de la melatonina desencadena mecanismos moleculares y celulares que se ponen en marcha cuando la melatonina ya no está presente en la sangre.

Estos efectos pueden ser de dos tipos: efectos consecutivos o prolongados. Entre los proximales o consecutivos de la melatonina destaca la hipersensibilidad de la vía de transducción de la adenilatociclasa/AMPC que tiene lugar tras una inhibición prolongada derivada de la interacción de la melatonina con el receptor acoplado a proteínas G. Se ha estudiado su efecto sobre las células beta del páncreas, en las que al activar la vía dependiente de AMPC disminuye la toxicidad derivada de la apoptosis de las células beta y se reduce la activación de las proteínas quinasas activadas por estrés disminuyendo estrés oxidativo derivado de la hiperglucemia crónica. Además, restaura la respuesta de la insulina glucosa e incretina dependiente (Cipolla-Neto y Amaral, 2018). Los efectos prolongados de la melatonina modulan el periodo, amplitud o fase del día en la que se expresan los genes rítmicos, es decir, aquellos implicados en la generación y mantenimiento de los ritmos circadianos, al participar como un determinante activo en las funciones diarias del sistema nervioso central y periférico. Si por cualquier causa existe una ausencia de melatonina o de sus receptores el resultado es una ruptura del ritmo de estos genes. Es por ello, por lo que se atribuye un efecto cronobiótico a la melatonina (Cipolla-Neto y Amaral, 2018).

En los últimos 15 años se ha demostrado la implicación de la melatonina en numerosas funciones, relacionadas con su efecto antiinflamatorio, antioxidante, regulador del ciclo circadiano e inhibidor del crecimiento de las células tumorales (Reiter et al, 2016). Puede ejercer su acción de forma endocrina, autocrina o paracrina, bien de forma directa o mediada por receptores de membrana plasmática o nucleares huérfanos. También interactúa con proteínas intracelulares como la calreticulina, reticulina o calmodulina. La calmodulina actúa como segundo mensajero intracelular, de manera que la melatonina compite con el calcio por unirse a ella (Ahmad et al, 2023).

Una de las vías mejor caracterizadas es la activación de dos receptores de membrana: uno de alta afinidad ML1 y otro de baja afinidad ML2. Los receptores ML1 están acoplados a proteínas G y contienen dos subtipos: MT1 y MT2, que inhiben la activación de la adenilato ciclasa en las células diana. Los de tipo ML2, también conocidos como MT3, pertenecen a la familia de quinona reductasas (Tordjman et al, 2017; Cipolla-Neto y Amaral, 2018; Ahmad et al, 2023). Se ha demostrado que los receptores de melatonina pueden formar complejos

homodiméricos o heterodiméricos que definirán diferentes patrones de señalización (Okamoto et al, 2024). Los receptores de membrana de melatonina se encuentran ampliamente distribuidos por el cerebro, sistema cardiovascular (aorta, pared del ventrículo, arterias coronarias y cerebrales), vejiga, hígado, retina, glándula parótida, apéndice, ciego, colon, piel, páncreas, plaquetas, células del sistema inmune, riñón, adipocitos y placenta (Ahmad et al, 2023).

Los receptores MT1 (Mel 1a) están codificados en el cromosoma 4 y se distribuyen ampliamente en la pars tuberalis de la hipófisis y en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo. La unión de la melatonina a estos receptores da lugar a la inhibición de la adenilato ciclasa y por tanto disminuye el AMPc, al mismo tiempo que aumenta la acción de la fosfolipasa C y aumenta el inositol trifosfato (Ahmad et al, 2023). Las vías de señalización de los MT1 involucran la activación de canales iónicos de potasio KIR 3.1/ 3.2 que intervienen en la inhibición de la activación de neuronas del SNC, modulan la creatinfosfoquinasa y la fosfolipasa A2. Asimismo, estimulan la vía de la protein kinasa 1/2-ERK 1/2 activada por mitógenos en células no neuronales y la vasoconstricción (Cipolla-Neto y Amaral, 2018; Okamoto et al, 2024). Los receptores MT2 (Mel 1b), codificados en el cromosoma 11, están involucrados en la hidrólisis del fosfoinositol, la fisiología de la retina, la modulación del ritmo circadiano, la dilatación de los vasos cardíacos y la respuesta inflamatoria. Se localizan fundamentalmente en la retina y secundariamente en el hipocampo, córtex, núcleo paraventricular y cerebelo. Las vías de señalización de los MT2 incluyen: inhibición de la producción de GMPc, estimulación de la actividad de CPK en SNC y regulación de la contracción del útero (Cipolla-Neto y Amaral, 2018). MT3 constituye un tercer sitio de unión para la melatonina, se trata de una quinona reductasa 2 que actúa como enzima detoxificante (Cipolla-Neto y Amaral, 2018).

La melatonina también puede unirse a receptores nucleares como el receptor huérfano relacionado con el ácido retinoico o el receptor Z retinoide, que pueden inducir la producción de IL-2 e IL-6, por parte de los linfocitos que poseen un efecto inmunomodulador (Ahmad et al, 2023).

La melatonina desempeña acciones no mediadas por receptor, siendo su papel como antioxidante la más destacable. De este modo, elimina directamente los radicales libres y sus metabolitos, al mismo tiempo que activa mecanismos antioxidantes que incluyen el aumento tanto de la expresión como de la actividad citosólica de las enzimas antioxidantes (Cipolla-Neto y Amaral, 2018; Ahmad et al, 2023). Al mismo tiempo, también puede desempeñar una función antioxidante al inhibir enzimas pro-oxidantes como la xantina oxidasa (Chitimus et al, 2020). Entre los metabolitos derivados de la interacción de la melatonina con radicales libres destacan la 3-hidroximelatonina cíclica (c3OHM), la N-acetil-N-formil-5-metoxikinuramina (AFMK) y la N-acetil-5-metoxikuramina (AMK). Estos metabolitos también tienen acción antioxidante lo que se conoce como cascada antioxidante y permite la neutralización de hasta 10 radicales por cada molécula de melatonina (Reiter et al, 2016). Finalmente, la melatonina actúa como quelante de metales como el aluminio, cadmio, cobre, hierro y zinc, siendo esta interacción concentración dependiente. En el cerebro la metaloproteína encargada de esta función tiene un papel minoritario, por ello, se cree que los niveles de melatonina en el líquido cefalorraquídeo son mayores, de manera que proporcionan un efecto protector extra contra el estrés oxidativo. El cobre y el hierro son imprescindibles para un correcto funcionamiento de las células, no obstante, en altas concentraciones generan reacciones de Fenton y de Haber- Weiss de las que se obtienen radicales $\cdot\text{OH}$ implicados en la fisiopatología de múltiples enfermedades neurológicas. La unión del cobre con la melatonina origina complejos estables evitando la producción de los radicales $\cdot\text{OH}$ (Reiter et al, 2016).

La mitocondria es el sitio donde se produce una mayor cantidad de radicales libres de forma natural en el ser vivo como consecuencia de la respiración celular. Estos radicales son capaces de producir un daño irreparable en los orgánulos de la célula o comprometer la producción de adenosín trifosfato (ATP). Por ello, la melatonina desempeña un papel fundamental al limitar la fuga de electrones de la cadena respiratoria consiguiendo que se reduzcan un menor número de moléculas de oxígeno al anión superóxido (Reiter et al, 2016; Cipolla-Neto y Amaral, 2018; Ahmad et al, 2023).

La melatonina también tiene acción oncostática, es decir, puede detener el crecimiento de algunos tumores, gracias a su efecto modulador de los receptores de membrana, estimulante de la apoptosis y regulador del metabolismo de los tumores. También es capaz de inhibir la angiogénesis e inducir alteraciones epigénéticas. Además, disminuye los efectos adversos derivados del uso de la radioterapia y la quimioterapia (Li et al, 2017).

El efecto antiinflamatorio de la melatonina se ha comprobado tanto en procesos agudos como crónicos. La administración de melatonina exógena disminuye la respuesta inflamatoria, ya que reduce citoquinas pro-inflamatorias, como la IL-1 β , y el factor de necrosis tumoral alfa, y aumenta las citoquinas antiinflamatorias como la IL-4. Además, inhibe la expresión de la ciclooxigenasa y de la óxido nítrico sintasa (NOS), mientras que reduce la producción de prostanoïdes, leucotrienos y otros mediadores inflamatorios como quimiocinas y moléculas de adhesión (Chitimus et al, 2020). También, actúa en el proceso de degradación de proteínas al regular el sistema de ubiquitina–proteasoma. El mecanismo de acción consiste en interactuar directamente con las proteínas e impedir su degradación al inhibir la actividad de la creatinfosfoquinasa (CPK) II dependiente de calcio calmodulina y su autofosforilación mediante la interacción directa con calcio activado con calmodulina. Finalmente, previene las mutaciones y delección del ADN mitocondrial al regular la expresión de la fosfoinositol-3-kinasa y la fosforilación de la histona H2AX (Cipolla- Neto y Amaral, 2018; Ahmad y Ali 2023). Por último, la melatonina también ejerce un efecto antiapoptótico que tiene como finalidad la optimización de la función mitocondrial. Está relacionado con un aumento del factor antiapoptótico Bcl2 y la disminución de los factores pro-apoptóticos Bax y caspasa 3. Aparentemente, la melatonina se encarga de mantener el balance entre los estímulos pro/anti apoptóticos según las necesidades locales para asegurar la homeostasis (Chitimus et al, 2020).

2.4 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS:

Las membranas biológicas son estructuras fundamentales para el correcto funcionamiento celular, ya que, desempeñan funciones tan importantes como la delimitación y protección del contenido de la célula, la regulación del intercambio de sustancias y la comunicación intercelular. Una de las características más importantes es su fluidez, por ello, cuando ésta se altera las membranas son más susceptibles al daño oxidativo y aparecen numerosas patologías como la Enfermedad de Alzheimer por depósito de beta-amiloide, las lesiones por isquemia-reperfusión, el envejecimiento celular acelerado o la carcinogénesis, entre otras. En consecuencia, el estudio de los factores que alteran la fluidez de la membrana, así como sus posibles opciones terapéuticas constituyen un tema interesante de investigación.

La melatonina es una molécula presente en todos los seres vivos, que se encuentra en concentraciones muy altas en las células, especialmente en las mitocondrias. Es extraordinariamente eficaz en la reducción del estrés oxidativo debido a sus efectos antioxidantes, antiinflamatorios y cronobiológicos. Esta indolamina se posiciona como la principal molécula antioxidante para la protección de las membranas biológicas, por ello en este trabajo se va a estudiar su implicación en los procesos de peroxidación lipídica, que tiene como resultado la preservación de la fluidez y el mantenimiento de la función mitocondrial.

Los objetivos del presente trabajo son:

1. Conocer la acción de la melatonina en las membranas biológicas, evaluando su implicación en la fluidez, función mitocondrial y protección frente al estrés oxidativo
2. Estudiar los mecanismos por los que la melatonina modifica la fluidez de las membranas, así como caracterizar la interacción de la indolamina con los fosfolípidos
3. Determinar el papel de la melatonina en la regulación de la peroxidación lipídica y su acción como neutralizadora de radicales libres
4. Investigar el efecto de la melatonina sobre la integridad de la membrana mitocondrial y su intervención en la regulación de la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial.

3 MATERIAL Y MÉTODOS:

3.1 ESTRATEGIAS DE BÚSQUEDA:

Para elaborar la introducción se ha realizado una búsqueda en la base de datos de Pubmed. Los descriptores Mesh empleados para encontrar bibliografía sobre las membranas biológicas fueron: “cell membrane”, “plasmatic membrane”, aplicando las estrategias de búsqueda (cell membrane) AND (structure), (cell membrane) OR (plasm* membrane). Las estrategias de búsqueda empleadas para la melatonina fueron: melatonin; (melatonin) AND (biological membrane); (melatonin) AND (oxidative stress); melatonin receptor. Por último, en la parte correspondiente al estrés oxidativo se usaron las siguientes estrategias: oxidative stress review; (oxidative stress) AND (cell membrane); free radicals review.

Para obtener los resultados, se ha llevado a cabo una búsqueda refinada utilizando la base de datos de Pubmed. La estrategia de búsqueda empleada es: [(melatonin OR N-acetyl-5-methoxytryptamine OR pineal hormone) AND (protective effects OR protective action OR neuroprotective OR antioxidant properties OR cell protection OR membrane stabilization OR cellular defense) AND (biological membranes OR cell membranes OR membrane integrity OR plasma membrane OR lipid bilayer OR membrane lipids OR membrane fluidity)], aplicando el filtro de últimos 10 años

3.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN:

Se han incluido artículos de tipo revisión bibliográfica y sistemática que estuvieran disponibles en inglés o en español. Asimismo, los artículos seleccionados debían tener acceso a texto completo, publicados a ser posible en los últimos diez años, priorizando aquellos más recientes escritos en los últimos cinco. No obstante, en la introducción y para algún tema concreto se han incluido algunos más antiguos.

Se han excluido aquellos artículos cuya metodología no tenía calidad suficiente, así como, aquellos que no se ajustaban al tema concreto de búsqueda, no aportaban información relevante o se encontraban en un idioma diferente al español o al inglés. Del mismo modo, se han descartado todos lo que no cumplen los criterios de inclusión definidos previamente. La figura B resume el proceso de selección de la bibliografía utilizada.

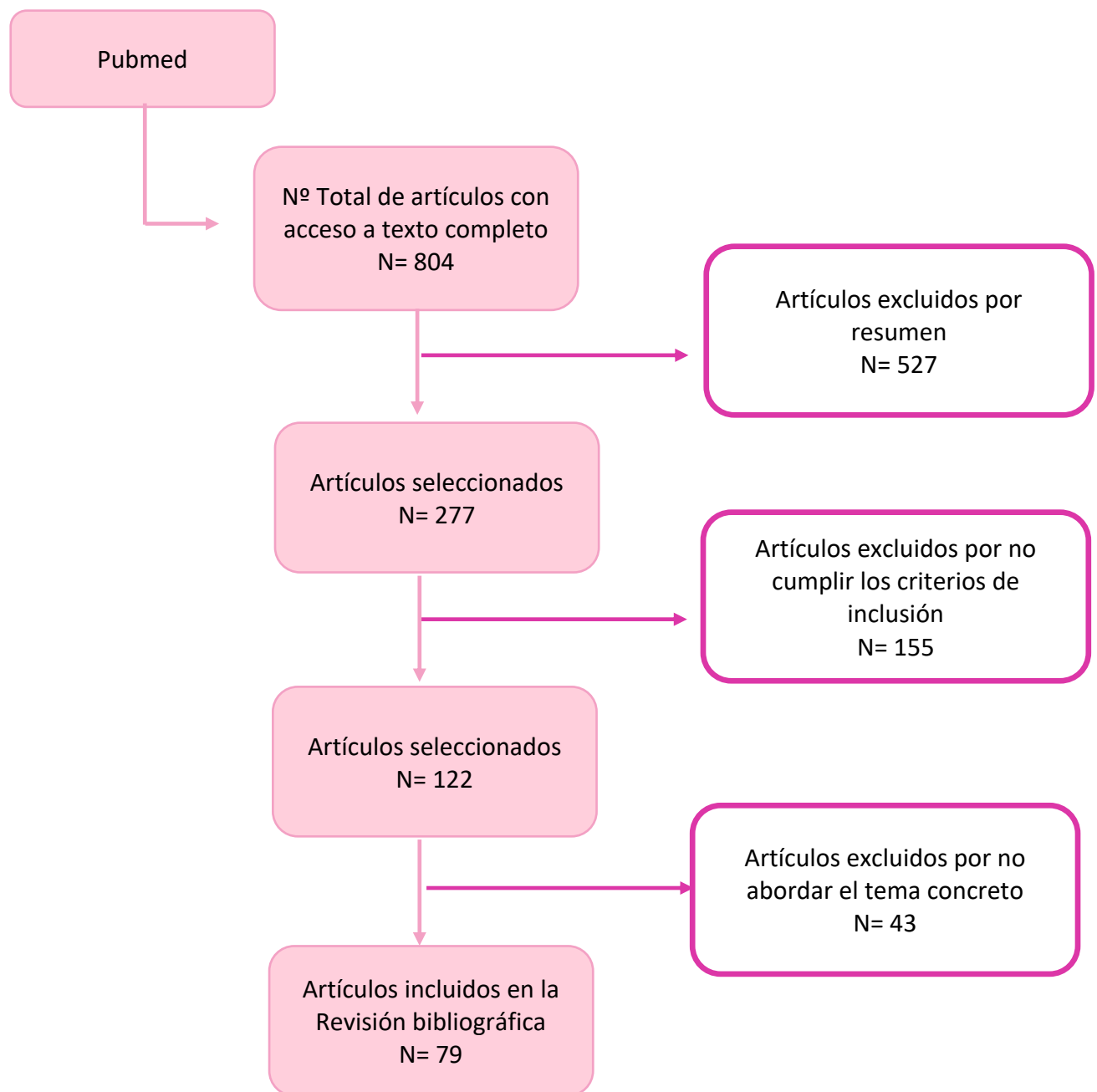


Figura B: diagrama de flujo de la bibliografía utilizada

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

4.1 MELATONINA Y PEROXIDACIÓN LIPÍDICA:

Los ácidos grasos poliinsaturados son componentes esenciales de la membrana de las células eucariotas, ya que, confieren fluidez, flexibilidad y permeabilidad selectiva. La peroxidación lipídica tiene lugar cuando se produce la oxidación de estos ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran en las bicapas lipídicas tanto en las membranas externas de las células como en las membranas de los orgánulos subcelulares. Como consecuencia, disminuye la fluidez de la membrana, se produce una caída en el potencial de membrana, aumenta la permeabilidad a hidrogeniones y al calcio e incluso puede llegar a producir la ruptura de las membranas. Las ROS originan un daño en los sistemas biológicos que se relaciona con la aparición de procesos patológicos como la inflamación, la carcinogénesis, las enfermedades degenerativas y el envejecimiento (Catalá, 2007). El radical $\cdot\text{OH}$, por su mayor reactividad, es el que tiene una mayor facilidad para iniciar la reacción de peroxidación lipídica, no obstante, hay otras especies reactivas que también pueden iniciarla como son el ONOO^- y el oxígeno singlete, bien mediante la abstracción de una molécula de hidrógeno de los lípidos presentes o mediante la donación de un solo electrón. La fluidez de la membrana es necesaria para mantener una difusión libre de lípidos y proteínas a través de la bicapa y preservar la asimetría de la membrana, de manera que evita la interacción de proteínas y lípidos que activan macrófagos y promuevan la apoptosis. La melatonina es capaz de reducir la iniciación de la peroxidación lipídica (Reiter et al, 2014).

El daño a la membrana se produce fundamentalmente por la generación de cadenas acilo fragmentadas, enlaces cruzados lípido-lípido o lípido-proteína que provocan una pérdida de movimiento libre en la bicapa y por la producción de isoprostanos y neuroprostanos a partir del ácido araquidónico y docosahexaenoico respectivamente. Se ha supuesto que la forma en la que los peróxidos causan todas estas reacciones adversas en la membrana es la reorientación de las cabezas de los lípidos que ocasiona un aumento de la interacción con la fase acuosa, lo que disminuye el grosor de la membrana y aumenta la permeabilidad (Catalá, 2007). Curtis et al objetivaron que un aumento del estrés oxidativo modifica el orden de la bicapa y ocasiona una desviación angular media de los ácidos grasos

con respecto a su plano original, lo que provoca una alteración del movimiento de las moléculas dentro de la membrana (Curtis et al, 1984). Los dos productos tóxicos principales obtenidos al final de la peroxidación lipídica son el malonildialdehído (MDA) y el 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE). Éstos promueven la destrucción de la estructura de la bicapa y obstaculizan la interacción de la membrana con sus proteínas. Cuando se produce una activación de la fosfolipasa que inicia la hidrólisis de los fosfolípidos, éstos disminuyen, por lo que se afecta la fluidez de la membrana, la agrupación de receptores y consecuentemente la función de la bicapa. La existencia de una fluidez óptima determina una adecuada comunicación entre el receptor β -adrenérgico y la proteína G, necesario para la transducción de señales de membrana (Banerjee et al, 2021)

Tanto la melatonina como sus metabolitos tienen la capacidad de eliminar radicales libres mediante reacciones antioxidantes que pueden ser de tipo I, si capturan de forma directa los radicales o de tipo II que implican la inactivación de radicales $\cdot\text{OH}$ a través del secuestro de iones metálicos que actúan en las reacciones de tipo Fenton (Chaiyasit et al, 2007). Además, existen procesos de reparación celular antioxidante de tipo III en los que la melatonina y sus metabolitos preservan la integridad química de las biomoléculas sometidas a estrés oxidativo. Por último, están las reacciones antioxidantes de tipo IV que mejoran las enzimas antioxidantes e inhiben las enzimas prooxidantes (Galano y Reiter, 2018; Loh y Reiter, 2021). Por tanto, la molécula de melatonina exhibe una gran capacidad para para neutralizar el estrés oxidativo y por consiguiente normalizar la fluidez de las membranas biológicas (Reiter et al, 2014).

Una molécula de melatonina elimina de forma eficaz dos $\cdot\text{OH}$ cuando se produce el metabolito c3OHM (Purushotaman et al, 2020). Este hallazgo coincidía con los resultados obtenidos de estudios experimentales previos realizados por Tan et al que demostraron que c3OHM era como mínimo igual de efectiva que la melatonina para neutralizar radicales $\cdot\text{OH}$. Además, redujo la degradación oxidativa del citocromo C cuando se expone al H_2O_2 (Tan et al, 2014). En trabajos posteriores llevados a cabo por el mismo grupo se estudiaron las reacciones de c3OHM con el $\cdot\text{OH}$ y con el radical $\text{ROO}\cdot$, y se comprobó que c3OHM y en

concreto sus metabolitos AMK y AFMK eran varios órdenes de magnitud más rápidos que la melatonina, interaccionando con radicales $\text{ROO}\cdot$ a una velocidad 98,4 veces superior que el trolox, un análogo de la vitamina E que se emplea para valorar las capacidades antioxidantes *in vitro* (Galano et al, 2014; Manchester et al, 2015).

Teixeira et al investigaron el potencial *in vitro* de la melatonina como antioxidante tras inducir la peroxidación lipídica con $\cdot\text{OH}$ y ascorbato en diferentes modelos de membrana. Las membranas de los microsomas cerebrales y hepáticos de ratas incubadas con melatonina mostraron menor peroxidación lipídica. Gavazza y Catalá examinaron este efecto preventivo de la melatonina en microsomas y mitocondrias de testículos de rata y demostraron que tenía un efecto protector de los ácidos grasos poliinsaturados cuando se usaba una concentración de 5,0 mM en las membranas celulares y de 1,0 mM en las mitocondriales, inhibiendo completamente la peroxidación. De este experimento se deduce que el efecto de la melatonina depende del tipo y de la composición de la membrana (Teixeira et al, 2003; Gavazza y Catalá 2003).

Estudios experimentales han demostrado la capacidad de la melatonina para neutralizar directamente radicales como el $\cdot\text{OH}$, $\text{ROO}\cdot$, el anión ONOO- , el superóxido y el oxígeno singlete (Catalá, 2007; Wongprayon y Govitrapong, 2017). Además, aumenta la expresión y actividad de varias enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GRd) y peroxirredoxina que eliminan el H_2O_2 del microambiente celular (Catalá, 2007; Paradies et al, 2015; Reiter et al, 2018). También, reduce la expresión y actividad NOS por lo que disminuyen los niveles de $\text{NO}\cdot$ y de ONOO- (Proietti et al, 2017). Se han descrito efectos adicionales de la melatonina que la reafirman como antioxidante altamente efectivo: actúa de forma sinérgica con otros neutralizadores de radicales libres clásicos haciéndolos más eficaces, inhibe enzimas como la mieloperoxidasa o la lipooxigenasa, aumenta la eficiencia en la transferencia de electrones entre los complejos respiratorios mitocondriales y estimula la síntesis de novo de glutatión al estimular a la enzima gamma-glutamyl-cistein-sintasa. El mantenimiento del óxido nítrico por debajo de un nivel crítico evita entrar en un círculo vicioso donde se producen respuestas

inflamatorias cada vez mayores que atraen células inmunes y agravan la disfunción mitocondrial (Paradies et al, 2015; Reiter et al, 2018). Las acciones antioxidantes de la melatonina se dirigen fundamentalmente a la protección de los lípidos en la membrana celular con su consecuente estabilización, así como a la protección de las proteínas en el citosol y el ADN en el núcleo (Catalá, 2007).

Los mecanismos por los cuales el estrés oxidativo estimula la actividad de las enzimas eliminadoras de ROS parecen involucrar la vía Keap/Nrf2/ARE. De manera que, el estrés oxidativo estimula la liberación del factor nuclear tipo eritroide 2 (Nrf2), pero también produce modificaciones postransduccionales de la proteína Keap 1 que hacen que pierda su capacidad para unirse y degradar Nrf2. De modo, que Nrf2 se trasloca al núcleo y se une al elemento de respuesta antioxidante (ARE) en la región promotora de enzimas detoxificantes como la SOD y GPx que tiene como resultado el aumento de la expresión del ARNm y la actividad de estas enzimas. Nrf2 también se ha relacionado con una reducción del crecimiento tumoral y una mayor esperanza de vida (Manchester et al, 2015; Han et al, 2017). Tuli et al sugirieron que la melatonina desempeña un papel regulador en la vía Keap/Nrf2/ARE a través de su capacidad para inhibir la vía ubiquitina/proteasoma, lo que contribuye a mantener niveles elevados de Nrf2 (Tuli et al, 2015). Además, Nrf2 también se activa por medio de la vía quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) que a su vez está regulada por la melatonina (Manchester et al, 2015).

Pese a que está completamente demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* la capacidad de la melatonina para reducir el daño oxidativo, no está claramente definido si depende únicamente de la melatonina en sí o de los metabolitos generados en su interacción con radicales libres. De manera que, si se incuban varios antioxidantes con ABTS⁺ se comprueba que la melatonina no solo es capaz de reducir rápidamente ABTS⁺ sino que a diferencia de los otros mantiene la neutralización de radicales durante 12 minutos. Esto se puede atribuir a la actividad de otros metabolitos de la ruta metabólica de la indolamina: 6-hidroxi-melatonina, 5-hidroxitriptófano y 5-metoxitriptamina. (Manchester et al, 2015; Hardeland, 2017). Esta cascada es la responsable de que a partir de una única molécula de melatonina se neutralicen hasta diez especies reactivas (Reiter et al, 2014). El catabolito

AMK es capaz de inhibir la NOS, así como de eliminar el ONOO⁻, los [•]OH, ROO[•] y el oxígeno singlete (Manchester et al, 2015; Hardeland, 2017).

La reacción de los radicales libres con los dominios lipídicos puede causar un daño en las proteínas de membrana al producir su carbonilación, hecho que provoca una alteración y deterioro tanto de la dinámica como de la función de la membrana, ocasionando alteraciones en la arquitectura del citoesqueleto y de la distribución de las propias proteínas (Banerjee et al, 2021). Se ha sugerido que la poliinsaturación altera propiedades de la membrana que son esenciales para la actividad de proteínas receptoras integrales. Por ello, aquellas membranas que contienen ácido docosahexaenoico que es seis veces insaturado, están sometidas a una tensión elástica que influye en la función de estas proteínas. Un ejemplo es la rodopsina que está rodeada de fosfolípidos enriquecidos con ácido docosahexaenoico, por lo que el entorno es más fluido y tiene una implicación en los cambios conformacionales que tienen lugar después de la fotoactivación. (Guajardo et al, 2006). Estos cambios están relacionados con la fluidez de la membrana, las afinidades de los receptores, los flujos de iones y las actividades de las enzimas unidas a la membrana. La adición de melatonina previno tanto la peroxidación como la oxidación de las proteínas (Catalá, 2007).

Leaden et al demostraron tanto *in vivo* como *in vitro* los efectos antioxidantes de la melatonina sobre ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados que habían sufrido peroxidación lipídica. La evaluación de la inhibición de la peroxidación lipídica se realizó a través de quimioluminiscencia, de manera que a una concentración de 1,2 mM se inhibió completamente el proceso oxidativo (Leaden et al, 2002).

4.2 MELATONINA Y MITOCONDRIA:

Las mitocondrias constituyen las centrales energéticas de las células eucariotas al generar ATP por medio de la fosforilación oxidativa. Su función es tan importante, que cuando se produce una disfunción de estos orgánulos se favorece la aparición del envejecimiento, las lesiones por isquemia-reperfusión, la diabetes y la muerte celular dando lugar a un elevado número de enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares. La

disfunción mitocondrial está causada principalmente por un aumento en la formación de ROS, por una alteración en la actividad de los complejos de la cadena respiratoria y por una apertura del poro de transición de la permeabilidad de las mitocondrias (Paradies et al, 2015). La concentración de melatonina en la mitocondria es unas 100 veces superior que la sanguínea, esto se debe a la acción de los transportadores PEPT1/2 y GLUT1, así como a la síntesis endógena independiente de la glándula pineal (Millet – Boureima et al, 2021).

Jou et al. demostraron que la generación de radicales libres por las mitocondrias se reduce rápidamente cuando las células se incuban en una solución que contiene melatonina (Jou et al, 2010; Reiter et al, 2018). También estabiliza la membrana mitocondrial y mejora la actividad de la cadena de transporte de electrones (Paradies et al, 2010).

La existencia de un grupo metileno entre dos dobles enlaces hace a los ácidos grasos poliinsaturados particularmente sensibles a la acción de las ROS, del mismo modo, cuanto mayor es el número de dobles enlaces más sensibles son a la oxidación. Por tanto, los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana mitocondrial no solo son los objetivos principales de las ROS, sino que participan en reacciones en cadena de radicales libres por las que se generan hidroperóxidos y endoperóxidos que experimentan fragmentación y dan lugar a metabolitos como MDA y HNE (Paradies et al, 2010)

La presencia de los metabolitos HNE y MDA en la membrana mitocondrial como consecuencia del proceso de peroxidación lipídica disminuyen la fluidez de membrana, de hecho, HNE disminuyó la fluidez de membrana a una concentración tan baja como 50 μM (Chen y Yu, 1994)

La membrana mitocondrial puede contener hasta un 24-25% de cardiolipina, un lípido aniónico que puede estabilizar la curvatura intrínseca negativa de la membrana mitocondrial que resulta imprescindible para la formación y mantenimiento de las crestas. Las crestas mitocondriales aumentan la superficie disponible para la cadena de transporte de electrones y la actividad de la ATP sintasa. Además, la curvatura estabiliza la composición lipídica y reduce la tensión lineal entre dominios lipídicos que favorece la formación de microdominios funcionales en la membrana. La cardiolipina es sintetizada en la membrana

mitocondrial interna y se encuentra casi exclusivamente en ella. Debido a esta ubicación cercana al sitio de producción de ROS o a su alto contenido en ácidos grasos insaturados se posiciona como un objetivo preferente de las ROS. Cuando sufre un daño oxidativo se altera la función bioquímica de la membrana mitocondrial, de manera que se altera la fluidez, el potencial de la membrana mitocondrial, las propiedades eléctricas pasivas, la permeabilidad iónica y la actividad enzimática de la membrana (Petrosillo, 2009; Loh y Reiter, 2021).

Por tanto, una deficiencia de cardiolipina por su peroxidación y consecuente agotamiento, produce una disminución de la eficiencia energética y del acoplamiento mitocondrial que compromete el músculo esquelético (Loh y Reiter, 2021). La cardiolipina una vez oxidada se trasloca a la membrana mitocondrial externa y participa en la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, lo que favorece la liberación de factores proapoptóticos como el citocromo C (Paradies et al, 2015). Esto se puede observar en numerosas patologías como la isquemia miocárdica, enfermedades metabólicas, cáncer y trastornos neurológicos. La melatonina ha demostrado inhibir la peroxidación de la cardiolipina al inhibir la peroxidación de las cadenas acilo linoleicas. De esta manera, evita la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (mPTP) y la liberación de citocromo C, por lo que impide que las ROS específicas acumuladas en los grupos de la cabeza de lípidos en las interfaces membrana-agua inicien la cascada de peroxidación. Al suprimir el estrés oxidativo y la peroxidación se detiene la externalización y oxidación de la cardiolipina, por lo que no puede interactuar con el inflamosoma NLRP3 y la alfa sinucleína. Por este mecanismo la melatonina es capaz de detener la formación de ovillos fibrilares de alfa sinucleína, por lo que disminuye la toxicidad en las neuronas (Loh y Reiter, 2021). La figura C ilustra el efecto de la cardiolipina oxidada en la apertura de mPTP y el efecto protector de la melatonina. Asimismo, la peroxidación de la cardiolipina se relaciona con la permeabilización de la membrana mitocondrial externa a través de su asociación con proteínas de la familia BCL2 (Paradies et al, 2010). Por tanto, se ha propuesto que la

oxidación de la cardiolipina constituye uno de los factores más importantes tanto para la disfunción mitocondrial como para el inicio de la apoptosis (Petrosillo et al, 2009).

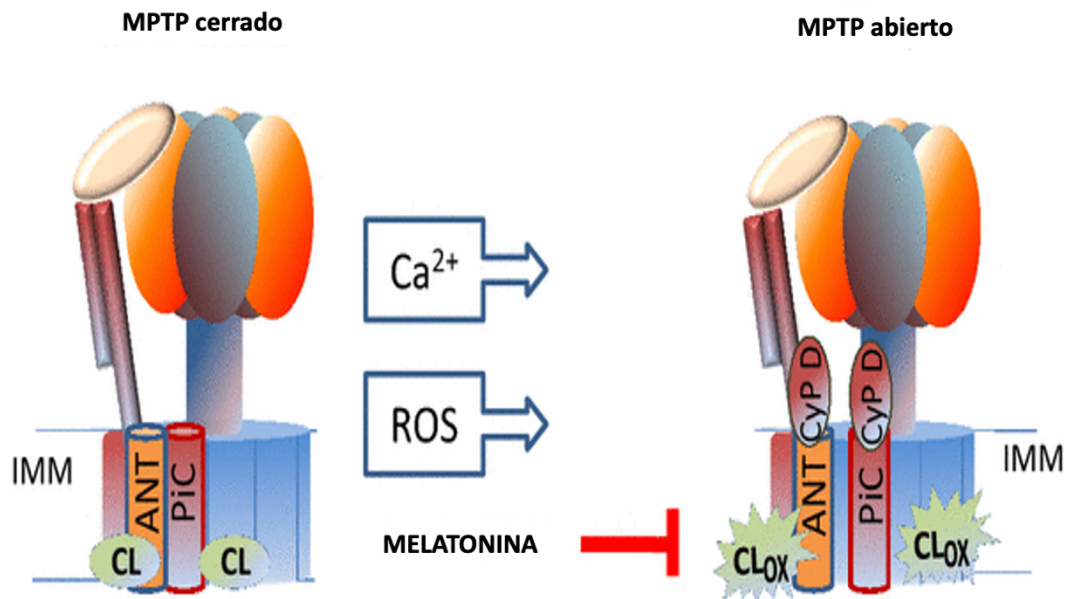


Figura C: Papel de la cardiolipina oxidada en la apertura del MPTP y efecto protector de la melatonina. MPTP: poro de transición de la permeabilidad mitocondrial; ROS: especies reactivas del oxígeno; IMM: membrana mitocondrial interna; CL: cardiolipina; CLox: cardiolipina oxidada. ANT: translocador de nucleótidos de adenina; PiC: transportador de fosfato mitocondrial; Cyp D: ciclofilina -D (Paradies et al, 2017).

En condiciones fisiológicas la membrana mitocondrial interna es impermeable a casi todos los metabolitos e iones. Sin embargo, cuando hay una alta concentración de calcio en la matriz mitocondrial, se abre un poro inespecífico que permite la difusión pasiva de casi cualquier molécula, perdiendo la permeabilidad selectiva de esta membrana (Paradies et al, 2010).

La apertura de mPTP es un indicador de aumento repentino de estrés oxidativo en las mitocondrias. La presencia de daño oxidativo induce una sobrecarga de calcio que desencadena la apertura de los mPTP que a su vez provoca destrucción del potencial de membrana mitocondrial, desacoplamiento mitocondrial y supresión de la síntesis de ATP. Del mismo modo, la apertura de los mPTP aumenta las concentraciones de ROS y de calcio. Muchos estudios sugieren que el mPTP está implicado en las primeras etapas de la apoptosis (Matuz-Mares et al, 2022)

La melatonina interfiere en procesos relacionados con la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial de varias maneras. En el espacio intermembrana activa la cobre-zinc-SOD mediante un mecanismo que involucra una subforma mitocondrial del citocromo p450, para neutralizar radicales superóxido generados por la fuga de electrones procedentes del complejo III. En un estudio realizado por Jou se demostró que la melatonina reduce la duración de la apertura del mPT, siendo la concentración necesaria para superar la sobrecarga de calcio mediada por ionomicina de 100 μM (Jou et al, 2010; Hardeland, 2017).

Se ha demostrado que la melatonina previene la peroxidación de la cardiolipina en las mitocondrias de corazón de rata, confirmando su efecto contra la disfunción de las mitocondrias que aparece en las lesiones de isquemia/reperfusión. Petrosillo et al realizan un estudio para comprobar el efecto de la melatonina como agente preventivo de la formación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial que ocasiona la liberación de citocromo C. EL máximo efecto protector se consiguió con una concentración de 50 μM de melatonina (Petrosillo et al, 2009)

En un estudio realizado por Karbownik et al se evaluó el efecto de la melatonina sobre la fluidez de la membrana mitocondrial. Las ratas tratadas con δ -ácido-aminolevulinico experimentaron una disminución en la fluidez, una alteración del potencial de membrana y un aumento de la permeabilidad. Mientras que al administrar melatonina disminuían los niveles del ácido y aumentaba la fluidez (Karbownik et al, 2000; Acuña Castroviejo et al, 2002).

En la enfermedad de Alzheimer el depósito de beta amiloide aumenta la generación de ROS, altera la síntesis de ATP y causa un colapso del potencial de membrana mitocondrial, también produce defectos en los complejos mitocondriales I y IV que se traducen en mutaciones o daño oxidativo del ADN mitocondrial (Wongprayon y Govitrapong, 2017). Mecocci et al describieron un aumento de la viscosidad y una disminución concomitante de la fluidez de la membrana mitocondrial en diferentes lóbulos cerebrales en pacientes con enfermedad de Alzheimer. Así, la acumulación de péptido beta amiloide en la membrana mitocondrial puede iniciar reacciones de peroxidación lipídica,

dañar a las proteínas de membrana y alterar la estructura de las mitocondrias. De este modo, la peroxidación indujo la reorientación de los fosfolípidos de la membrana en el cerebro (Mecocci et al, 1996).

García et al evaluaron la capacidad de la melatonina para estabilizar la fluidez de la membrana de sinaptosomas y de mitocondrias. Para ello, se seleccionaron dos cepas de ratones: SAMP propensos a la senescencia acelerada y SAMR resistentes a la senescencia acelerada que fueron estudiados a los 5 y a los 10 meses de edad, y a su vez, se comparó con ratones de ambas cepas que habían recibido tratamiento crónico con melatonina desde el mes hasta los 10 meses de edad. De esta manera, se observó que las cepas tratadas crónicamente con melatonina tenían una fluidez similar a la del grupo SAMR a los 5 meses, lo que confirmó la capacidad de la indolamina para preservar la fluidez mitocondrial. Asimismo, este estudio reafirmó que tras la administración de melatonina se redujo la peroxidación lipídica de la membrana mitocondrial interna, especialmente en los ratones SAMP₈ y se incrementó el ratio glutatión reducido/ glutatión oxidado que implica disminución del estrés oxidativo. Todo ello contribuye a enlentecer el proceso de envejecimiento (García et al, 2011)

4.3 EFECTO DE LA MELATONINA EN LA FLUIDEZ:

Una de las propiedades esenciales de la membrana plasmática es la fluidez, pues permite la difusión de proteínas y lípidos, así como la señalización celular y la adaptación a cambios ambientales. La fluidez de una membrana está determinada por la composición de los lípidos que la integran, es decir, la proporción de fosfolípidos saturados e insaturados, la presencia de colesterol y la temperatura. Los ácidos grasos insaturados poseen dobles enlaces que aumentan la fluidez, ya que, reducen el empaquetamiento lipídico. Los ácidos grasos saturados y el colesterol pueden reducir la fluidez. A temperaturas fisiológicas, el colesterol aumenta la rigidez, a altas temperaturas restringe el movimiento de los fosfolípidos y a bajas temperaturas evita la cristalización de la membrana. Si existen alteraciones en la fluidez se pueden afectar procesos clave como la endocitosis, la exocitosis y la función de proteínas transmembrana, lo que resalta su importancia en la homeostasis celular (Lodish et al, 2021). La fluidez de la membrana no está determinada únicamente por

la insaturación de la cadena acilo, sino que también depende de la longitud de esta cadena, de la composición de la cabeza lipídica, la localización del doble enlace y la abundancia de esfingolípidos y esteroides (Renne y Ernst, 2023).

Dobretsov et al llevaron a cabo un experimento *in vitro* en el que inducían la peroxidación lipídica con sulfato ferroso y ascorbato en membranas tanto artificiales como biológicas, y se evaluaba el resultado por tres métodos de fluorescencia diferentes: todos demostraban la disminución en la fluidez de membrana después de la peroxidación (Dobretsov et al, 1977; Catalá, 2007). Este efecto también ha sido demostrado a través de experimentos *in vivo* en el hipocampo de ratones con daño celular necrótico (Nam et al, 2005).

Si se incluye colesterol en mezclas lipídicas complejas como membranas artificiales de liposomas, tiene lugar un ordenamiento de las cadenas acilo lipídicas y se forma una fase líquida ordenada que es relativamente fluida a pesar del alto orden de los lípidos. Por lo general, los lípidos compactos como los fosfolípidos saturados o los esfingolípidos y el colesterol aumentan el orden de los lípidos de membrana aumentando su rigidez, mientras que los lípidos poco compactados como los fosfolípidos insaturados hacen que la membrana sea más fluida (Renne y Ernst, 2023).

En la enfermedad de Alzheimer, la acumulación de beta amiloide en la membrana plasmática origina la aparición de roturas, la disrupción de los dominios y del potencial de membrana, así como un aumento del estrés oxidativo y de la peroxidación lipídica que sumados a otros cambios patológicos conduce a la muerte celular. Como se ha descrito anteriormente, la melatonina es un potente antioxidante que ha demostrado actuar directamente sobre las propiedades de la membrana al aumentar la fluidez actuando sobre las monocapas de fosfatidilcolina y los liposomas de manera que reduce el grosor de la bicapa y ocasiona un aumento del desorden en estos sistemas (Mei et al, 2020).

Las simulaciones moleculares dinámicas predicen que la melatonina se ubica cerca de la región interfacial en los grupos de la cabeza con la misma orientación que el plano de la

membrana a diferencia del colesterol que se coloca perpendicular. Este efecto se representa en la figura D (Mei et al, 2020).

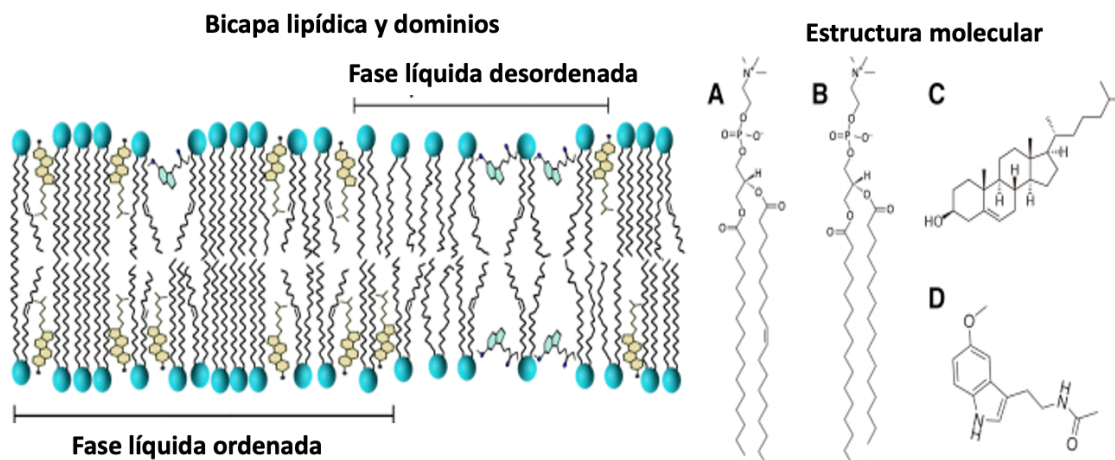


Figura D: Coexistencia de fases líquida ordenada y desordenada. En la zona de la membrana donde se encuentra la fase líquida ordenada las colas de los lípidos están alineadas, por tanto, la membrana es más rígida que en la desordenada. La molécula de melatonina, representada en azul se localiza entre las cabezas de los lípidos disminuyendo el orden y por tanto, aumentando la fluidez de la membrana. C: Molécula de colesterol (amarilla), D molécula de melatonina (azul) (Mei et al, 2020)

Para estudiar la influencia de la melatonina en el equilibrio de las fases se usó un modelo terciario de membranas lipídicas que demostró que la melatonina disminuyó la coexistencia de fases ordenada y desordenada, al reducir las diferencias entre estas fases. Para ello, disminuye el orden en la fase líquida ordenada al insertarse en las regiones interfaciales de la bicapa. Esto ocasiona la ruptura de las interacciones de Van der Waals entre las cadenas acilo, lo que a su vez, aumenta el espacio entre las moléculas y disminuye el empaquetamiento lipídico. Además, desplaza parcialmente al colesterol, disminuyendo la rigidez característica de la fase ordenada. En cambio, la fase líquida desordenada ya presenta una fluidez elevada, por lo que la melatonina ejerce un efecto mínimo (Mei et al, 2020).

En investigaciones previas se demostró la utilidad de la melatonina para mantener la fluidez bajo estrés oxidativo y disminuir los productos de la peroxidación lipídica (García et al, 1997). Por ello, se propuso que la melatonina protege frente a la peroxidación lipídica al

evitar que los radicales libres inicien procesos de oxidación en la fase acuosa. En el estudio de Mei et al se expuso que los efectos protectores de la melatonina también derivan de la preferencia intrínseca de la indolamina por la fase lipídica más desordenada y con mayor grado de enlaces insaturados (Mei et al, 2020).

Mugurova et al. investigaron como se modula el grosor de la membrana en presencia de colesterol, melatonina o ambos. El colesterol tiene un efecto condensador en la membrana que aumenta su grosor, esto se debe a un aumento en el orden de las colas lipídicas y en consecuencia produce su elongación. Cuando se incluye colesterol en las membranas que contienen melatonina los cambios en el espesor de la membrana son similares, por lo tanto, las interacciones entre el colesterol y la melatonina no parecen modular el efecto del colesterol en las bicapas lipídicas. No obstante, la adición de melatonina en varias concentraciones causó una pequeña disminución en el grosor de la bicapa, ya que al ser una molécula pequeña tiene un efecto menor. Este efecto se debe a la capacidad de la melatonina para desordenar las colas lipídicas, aumentando el espacio entre las cabezas lipídicas, de manera que la región de hidrocarburos se expande lateralmente y disminuye a lo largo de la dirección normal de la bicapa (Murugova et al, 2020).

Esteban et al investigaron los efectos *in vivo* de la melatonina cuando se utiliza en el tratamiento de las lesiones hepáticas por isquemia-reperfusión. Para ello, diseñaron un modelo experimental constituido por 37 ratas que se dividieron en 4 grupos: control, isquemia, isquemia-reperfusión e isquemia-reperfusión y adición de melatonina. Los efectos de la isquemia-reperfusión sobre las células incluyen, sobre todo, disfunción de las mitocondrias, acidosis, liberación de calcio de los depósitos intracelulares, apoptosis, fallo de la perfusión capilar, daño endotelial y la liberación de mediadores proinflamatorios y factores de transcripción. En este estudio, la fluidez de membrana se monitorizó mediante espectroscopia de fluorescencia. El grupo de ratas tratadas con melatonina 30 minutos antes de la inducción de isquemia demostró que la indolamina era capaz de prevenir la rigidez tanto de la membrana celular como de la membrana mitocondrial en un 100% y un 87,91%, de manera que se objetivaron niveles de fluidez de membrana similares a la que

presentaban las membranas del grupo control. Con respecto al efecto de la melatonina sobre la peroxidación lipídica, se observó que en el grupo de ratas a las que se había administrado previamente melatonina, el daño oxidativo se evitó por completo. De esta manera, los resultados del estudio demostraron la eficacia de la melatonina para preservar la fluidez de las membranas celulares y mitocondriales, así como para disminuir los marcadores de estrés oxidativo MDA y la carbonilación proteica (Esteban-Zubero et al, 2023).

Costa et al, asociaron la propiedad antioxidante de la melatonina a su elevada permeabilidad de membrana, a su alta solubilidad en la membrana acuosa y a su capacidad para atravesar con facilidad la membrana nuclear. Estas propiedades unidas a la distribución favorable en la membrana estabilizan la membrana microsómica contribuyendo a la protección de la célula (Costa et al, 1995; Banerjee, 2021). Las moléculas de melatonina se alinean en la membrana y se mueven en paralelo con las cadenas de acilo de fosfolípidos a concentraciones bajas o con las bicapas lipídicas en las regiones del grupo de la cabeza a concentraciones altas. Una mayor concentración de melatonina favorece un estado más ordenado de la membrana e inhibe la inserción de péptidos amiloides en la membrana lipídica, por ello una membrana más fluida en pacientes con enfermedad de Alzheimer supone un obstáculo, para la inserción de beta amiloide (Banerjee, 2021). Moroni et al observaron una disminución en la rigidez de la membrana de los eritrocitos de ratas mayores con un injerto de glándula pineal procedente de ratas jóvenes, lo que reafirma el efecto protector de la melatonina (Moroni et al, 2004).

Los condensados biomoleculares u orgánulos sin membrana (MLO) son compartimentos subcelulares que carecen de una envoltura de bicapa lipídica y se forman mediante un proceso de separación de fases líquido-líquido. Contienen proteínas, ARN y otros ácidos nucleicos, y constituyen compartimentos subcelulares dinámicos y químicamente diferentes (Gomes, Shorter, 2019). Están presentes en todas las células tanto en el núcleo como en el citoplasma y en la membrana de casi todas las células eucariotas con las que existe una estrecha interdependencia. Los MLO se ensamblan mediante separación de fases líquido-líquido (LLPS) en gotitas transitorias, no estáticas y similares a

los líquidos que regulan las funciones moleculares esenciales. De manera que, cuando la separación de fases es aberrante, debido a balsas lipídicas de membrana desreguladas, a las modificaciones postraduccionales, a la ausencia de ATP o a la presencia de proteínas de ARN específicas, pueden originar una agregación proteica patológica como la que aparece en los trastornos neurodegenerativos. La melatonina puede actuar sobre la separación de fases en los condensados moleculares optimizando las reacciones interdependientes que tienen lugar entre la membrana y los MLO a través de la estabilización de los dominios de la balsa lipídica, la reducción de la tensión lineal y el mantenimiento de la curvatura y fluidez negativas de la membrana. Asimismo, su potencial antioxidante protege a los lípidos de membrana, especialmente a la cardiolipina, de las cascadas de peroxidación, por lo que favorece el tráfico de proteínas, la señalización, la actividad de los canales iónicos y la funcionalidad de la ATPasa. También se ha observado su capacidad para controlar la LLPS a través de las modificaciones postraduccionales y mediante modificaciones de la N6-metiladenosina conseguir un equilibrio entre el ARNm y las proteínas de unión al ARN (Loh y Reiter, 2021). La LLPS es importante porque constituye la fuerza impulsora del ensamblaje o disolución de biomoléculas en las reacciones esenciales como la transducción de señales, la respuesta al estrés, la expresión, organización y reparación del genoma. Esto tiene lugar cuando LLPS crea compartimentos distintos al enriquecer o excluir biomoléculas del entorno (Loh y Reiter, 2021).

Los MLO formados en la superficie de la membrana plasmática pueden regular la señalización de las proteínas receptoras/ transmembrana al aumentar la afinidad de unión a las proteínas y modular los entornos locales. Las membranas son las principales reguladoras para LLPS, ya que, tienen capacidad para concentrar y cambiar los umbrales de las proteínas durante la separación de fases. De este modo, cuando existen alteraciones en la fluidez de la membrana y en la composición lipídica aparece una señalización disfuncional en las balsas lipídicas, al mismo tiempo que contribuye al desarrollo de trastornos como la enfermedad de Alzheimer porque aumenta la agregación del péptido A β -42 y se facilita la unión e internalización de fibrillas amiloides patógenas (Loh y Reiter, 2021).

Los lípidos por si solos generan una curvatura al organizarse en dominios con lípidos definidos, sin embargo, en algunos procesos mediados por proteínas como las flipasas originan diferencias en la composición de lípidos entre las láminas opuestas de la bicapa y dan lugar a diferencias en la curvatura de la membrana. Se han descrito varios mecanismos de inducción de curvatura, ésta puede generarse mediante el enriquecimiento de proteínas transmembrana, mediante el agrupamiento de proteínas en la superficie de la bicapa o por la inserción de proteínas periféricas (Bradley y Radhakrishnan, 2016). La oxidación de los lípidos en las membranas altera sus funciones porque induce cambios en la estructura molecular que conducen a una disminución de la curvatura intrínseca negativa de la membrana, una menor fluidez y a un aumento de la permeabilidad (Loh y Reiter, 2021).

Los dominios transitorios nanoscópicos de balsas lipídicas se forman cuando hay separación de fases como respuesta a estímulos externos. La melatonina es una molécula hidrófoba que puede modular la dinámica viscoelástica a través de la acumulación y propagación de estrés en las interacciones lípido-lípido. La adición de melatonina en los modelos de membrana condujo a la ruptura de los patrones de desplazamiento en la membrana fuera de fase, así como a la interrupción de la de la dinámica de vibración de las balsas lipídicas. En las balsas lipídicas el estrés se propaga en forma de movimientos colectivos compuestos por vibraciones moleculares longitudinales (ondas de compresión) y transversales (ondas de corte). Estas propiedades acústicas de las balsas lipídicas pueden modificarse tras la inclusión de melatonina, lo que a nivel microscópico resulta en un aumento de rigidez de las balsas lipídicas que protege su integridad estructural, hace que sean más móviles y mantiene sus propiedades biofísicas. Esto a escala macroscópica se traduce en una membrana más fluida (Bolmatov et al, 2022). Asimismo, la ruptura del patrón de propagación vibracional disminuye la velocidad de penetración de ROS y de otras moléculas pequeñas. Modelos de membrana ternaria han observado que la melatonina puede modificar el orden de la cadena de hidrocarburos para inducir la separación de fases. Además, se localiza preferentemente en las interfases de membrana por lo que puede formar enlaces fuertes de hidrógeno con los grupos de cabeza aniónicos de los lípidos de membrana y de esta forma modular la flexibilidad de la cadena de acilo lipídico y la dinámica

de los lípidos. Cabe destacar la capacidad de la melatonina para interactuar directamente con el colesterol y desplazarlo y conducirlo a la fase L_0 ordenada (Loh y Reiter, 2021).

El estrés oxidativo altera las tasas de formación de balsas lipídicas, ya que, ante la existencia de inflamación y el agotamiento de ATP las balsas se agrandan al ensamblar MLO patológicos. La peroxidación lipídica altera la organización, el ensamblaje y estructura de los lípidos de la membrana, de manera que los peróxidos derivados de esta reacción inducen el crecimiento de estas balsas de tamaño nanométrico a micrométrico, acompañado también de una mayor tensión lineal, entendiéndose esta como la energía requerida para crear límites entre los dominios de las balsas lipídicas y las membranas. Asimismo, la peroxidación evita la formación de balsas a temperatura ambiente al promover la separación de fases y favorecer un aumento de la fase líquida desordenada sin balsa. La melatonina previene la formación de fase líquida desordenada sin balsa, bien reduciendo la tensión lineal o actuando como surfactante al aumentar la solubilidad independientemente de la energía. Como la melatonina estabiliza y mantiene los dominios lipídicos nanoscópicos, es capaz lograr que la concentración de ATP citosólico esté alta. La cantidad de ATP tanto en la membrana como en el citosol impulsa la formación, ajuste y disolución de los MLO, y está regulada por canales iónicos sensibles al estrés oxidativo. Además, el tamaño de los MLO puede ajustarse a través de modificaciones postransduccionales como la fosforilación que depende del ATP (Loh y Reiter, 2021).

Bolmatov et al evalúan la estructura y dinámica de las balsas lipídicas en presencia de melatonina. Los lípidos que se encuentran en las membranas se organizan en fases líquidas ordenadas y desordenadas, de manera que ante una mezcla de diferentes lípidos estas fases tienen a separarse y coexisten. Moléculas pequeñas como la melatonina tienen un impacto estructural en las mezclas heterogéneas de lípidos, ya que, pueden acoplarse a la curvatura de la membrana lipídica y generar deformaciones locales. Además, puede prevenir la oxidación de colesterol en las balsas lipídicas, lo que protege la función de las proteínas embebidas en los dominios (Bolmatov et al, 2022).

Para regular los condensados, las células dependen de las moléculas de ARN, ya que, contienen fuerzas electrostáticas poderosas que proceden de las altas densidades de carga

negativa de las cadenas de fosfato. De esta manera, un nivel bajo de ARN con carga negativa podría interactuar con proteínas cargadas positivamente promoviendo la separación de fases y la consecuente formación de condensados transcripcionales. La regulación de la liberación de ARN nuclear está directamente relacionada con la fluidez de la membrana nuclear, por lo que si disminuye la fluidez hay un descenso lineal en la liberación de ARN nuclear. Además, se ha propuesto que una disminución en la génesis de complejos de poros nucleares (NPC), que median la exportación de ARNm al citosol, el transporte de proteínas bidireccional y regulan la transcripción puede depender de la fluidez de las membranas de la envoltura nuclear. Esto se demostró cuando células de *Saccharomyces cerevisiae* que tenían defectos en la regulación de la fluidez de la membrana ensamblaron NPC defectuosos. La peroxidación de lípidos en la envoltura nuclear puede reducir la fluidez de la membrana, pero si se añade melatonina que actúa ubicándose preferentemente en los grupos de cabezas lipídicas se producen interacciones dinámicas que reducen el espesor de la bicapa y aumentan la fluidez de la membrana. Asimismo, la presencia de grupos hidrofílicos y lipofílicos facilitan la eliminación de radicales libres. Para que la envoltura nuclear pueda soportar los NPC es preciso que estén fuertemente curvadas, es posible que los dominios lipídicos nucleares desempeñen un papel importante en la generación de la curvatura y fluidez de la membrana en la envoltura nuclear, ya que los lípidos de alta curvatura pueden atraer proteínas que mejoran aún más la curvatura de la membrana. La melatonina podría controlar las fluctuaciones de temperatura que afectan a las afinidades de unión del ARN, así como estabilizar la separación de fases en un rango de temperaturas de forma que se preserve la estructura y composición nanoscópica de los dominios lipídicos al reducir la tensión lineal de la membrana (Loh y Reiter, 2021).

5 CONCLUSIONES:

1. La melatonina ejerce un potente efecto protector sobre las membranas biológicas al aumentar su fluidez y estabilidad. Se evidencia que, al interactuar preferentemente con los dominios lipídicos más desordenados los cuales son más susceptibles a la peroxidación, la indolamina ayuda a mantener la integridad de la bicapa, reduciendo el grosor y promoviendo un equilibrio en la coexistencia de fases ordenadas y desordenadas.
2. En modelos experimentales, la administración de melatonina previene la rigidez inducida por procesos de isquemia-reperfusión. Los estudios *in vivo* en ratas demostraron que, al aplicarse antes del evento isquémico, la melatonina restablece la fluidez tanto de las membranas celulares como de las mitocondriales, disminuyendo marcadores de daño oxidativo como el malondialdehído y HNE.
3. A nivel mitocondrial, la melatonina se concentra de forma significativa y actúa reduciendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Además, protege la membrana mitocondrial evitando la peroxidación de lípidos esenciales, como la cardiolipina, lo que a su vez previene la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial y la consiguiente activación de procesos apoptóticos.
4. La acción antioxidante de la melatonina se da tanto de forma directa al neutralizar radicales libres y sus metabolitos como indirecta, mediante la modulación de enzimas antioxidantes y la inhibición de enzimas prooxidantes. Esta capacidad antioxidante es crucial para preservar no solo la fluidez y estructura de la membrana, sino también la funcionalidad de los sistemas celulares y mitocondriales ante el estrés oxidativo.

6 BIBLIOGRAFIA:

Acuña Castroviejo D, Escames G, Carazo A, León J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. *Curr Top Med Chem*. 2002; 2(2):133-51. doi: 10.2174/1568026023394344

Ahmad SB, Ali A, Bilal M, Rashid SM, Wani AB, Bhat RR, Rehman MU. Melatonin and Health: Insights of Melatonin Action, Biological Functions, and Associated Disorders. *Cell Mol Neurobiol*. 2023; 43(6):2437-2458. doi: 10.1007/s10571-023-01324-w.

Akimov SA, Kuzmin PI, Zimmerberg J, Cohen FS. Lateral tension increases the line tension between two domains in a lipid bilayer membrane. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*. 2007; 75(1 Pt 1):011919. doi: 10.1103/PhysRevE.75.011919.

Banerjee A, Chattopadhyay A, Bandyopadhyay. Melatonin and biological membrane bilayers: a never ending amity. *Melatonin Res*. 2021, Vol 4 (2) 232-252; doi: 10.32794/mr11250093

Beranova L, Cwiklik L, Jurkiewicz P, Hof M, Jungwirth P. Oxidation changes physical properties of phospholipid bilayers: fluorescence spectroscopy and molecular simulations. *Langmuir*. 2010; 26: 6140–6144. doi: 10.1021/la100657a

Bolmatov D, Lavrentovich MO, Reiter RJ. Molecular interactions of melatonin with lipid rafts. *Melatonin Res*. 2022; Vol 5 (2) 101-113; doi: 10.32794/mr112500123.

Bradley RP, Radhakrishnan R. Curvature-undulation coupling as a basis for curvature sensing and generation in bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; 113(35): E5117-124. doi: 10.1073/pnas.1605259113.

Campos Muñiz C, Fernández Perrino FJ. Evolution of the Concepts of Architecture and Supramolecular Dynamics of the Plasma Membrane. *Membranes (Basel)*. 2023; 13(6):547-572. doi: 10.3390/membranes13060547.

Catalá A. The ability of melatonin to counteract lipid peroxidation in biological membranes. *Curr Mol Med*. 2007; 7(7):638-649. doi: 10.2174/156652407782564444

Chaiyasit W, Elias RJ, McClements DJ, Decker EA. Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2007; 47(3):299-317. doi: 10.1080/10408390600754248.

Chatterjee SN, Agarwal S. Liposomes as membrane model for study of lipid peroxidation. *Free Radical Biol Med*. 1988; 4:51–72. doi: 10.1016/0891-5849(88)90011-1

Chen JJ, Yu BP. Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. *Free Radic Biol Med.* 1994; 17(5):411-418. doi: 10.1016/0891-5849(94)90167-8.

Cheng X, Smith JC. Biological Membrane Organization and Cellular Signaling. *Chem Rev.* 2019; 119(9):5849-5880. doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00439.

Chitimus DM, Popescu MR, Voiculescu SE, Panaitescu AM, Pavel B, Zagrean L, Zagrean AM. Melatonin's Impact on Antioxidative and Anti-Inflammatory Reprogramming in Homeostasis and Disease. *Biomolecules.* 2020; 10(9):1211. doi: 10.3390/biom10091211.

Cipolla-Neto J, Amaral FGD. Melatonin as a Hormone: New Physiological and Clinical Insights. *Endocr Rev.* 2018; 39(6):990-1028. doi: 10.1210/er.2018-00084.

Costa EJ, Lopes RH, Lamy-Freund MT. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *J Pineal Res.* 1995; 19(3):123-126. doi: 10.1111/j.1600-079x.1995.tb00180.x

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

Dobretsov GE, Borschevskaya TA, Petrov VA, Vladimirov YA. The increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxidation. *FEBS Lett.* 1977; 84(1):125-8. doi: 10.1016/0014-5793(77)81071-5.

Esteban-Zubero E, López-Pingarrón L, Ramírez JM, Reyes-Gonzales MC, Azúa-Romeo FJ, Soria-Aznar M, Agil A, García JJ. Melatonin Preserves Fluidity in Cell and Mitochondrial Membranes against Hepatic Ischemia-Reperfusion. *Biomedicines.* 2023; 11(7):1940. doi: 10.3390/biomedicines11071940.

Galano A, Reiter RJ. Melatonin and its metabolites vs oxidative stress: From individual actions to collective protection. *J Pineal Res.* 2018; 65(1): e12514. doi: 10.1111/jpi.12514.

Galano A., Tan D.X., Reiter R.J. Cyclic 3-Hydroxymelatonin, a Key Metabolite Enhancing the Peroxyl Radical Scavenging Activity of Melatonin. *RSC Adv.* 2014; 4:5220. doi: 10.1039/c3ra44604b.

García J.J., Reiter R.J., Muñoz-Hoyos A. Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. *FEBS Lett.* 1997; 408:297–300. doi: 10.1016/s0014-5793(97)00447-x

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):225-237. doi: 10.1111/jpi.12128.

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(11):2045-2054. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.12.013

Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017; 482(3):419-425. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.086

Gavazza M, Catalá A. Melatonin preserves arachidonic and docosapentaenoic acids during ascorbate-Fe²⁺ peroxidation of rat testis microsomes and mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003; 35(3):359-366. doi: 10.1016/s1357-2725(02)00256-x.

Gitler C. Plasticity of Biological Membranes. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 1972; 1: 51–92. doi: 10.1146/annurev.bb.01.060172.000411

Gomes E, Shorter J. The molecular language of membraneless organelles. *J Biol Chem*. 2019; 294(18):7115-7127. doi: 10.1074/jbc.TM118.001192

Gorter, E, Grendel, F. On Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes of the Blood. *J. Exp. Med.* 1925, 41, 439– 443. doi: 10.1084/jem.41.4.439

Griffié J., Peters R., Owen D.M. An Agent-Based Model of Molecular Aggregation at the Cell Membrane. *PLoS ONE*. 2020; 15: e0226825. doi: 10.1371/journal.pone.0226825

Guajardo MH, Terrasa AM, Catalá A. Lipid-protein modifications during ascorbate-Fe²⁺ peroxidation of photoreceptor membranes: protective effect of melatonin. *J Pineal Res*. 2006; 41(3):201-210. doi: 10.1111/j.1600-079X.2006.00352.x

Halliwel B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press; 2015. p. 896

Han L., Wang H., Li L., Li X., Ge J., Reiter R.J., Wang Q. Melatonin protects against maternal obesity-associated oxidative stress and meiotic defects in oocytes via the SIRT3-SOD2-dependent pathway. *J. Pineal Res*. 2017; 63:12431. doi: 10.1111/jpi.12431

Hardeland R. Melatonin and the electron transport chain. *Cell Mol Life Sci*. 2017; 74(21):3883-3896. doi: 10.1007/s00018-017-2615-9.

Itri R, Junqueira HC, Mertins O, Baptista MS. Membrane changes under oxidative stress: the impact of oxidized lipids. *Biophys Rev*. 2014; 6(1):47-61. doi: 10.1007/s12551-013-0128-9.

Jelokhani-Niaraki, M. Membrane Proteins: Structure, Function and Motion. *Int. J. Mol. Sci*. 2023, 24(1): 468-473. doi: 10.3390/ijms24010468

Jomova K, Raptova R, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, Valko M. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Arch Toxicol*. 2023; 97(10):2499-2574. doi: 10.1007/s00204-023-03562-9.

Jou MJ, Peng TI, Hsu LF, Jou SB, Reiter RJ, Yang CM, Chiao CC, Lin YF, Chen CC. Visualization of melatonin's multiple mitochondrial levels of protection against mitochondrial Ca(2+)-mediated permeability transition and beyond in rat brain astrocytes. *J Pineal Res*. 2010; 48(1):20-38. doi: 10.1111/j.1600-079X.2009.00721.x

Karbownik M, Tan D, Manchester LC, Reiter RJ. Renal toxicity of the carcinogen delta-aminolevulinic acid: antioxidant effects of melatonin. *Cancer Lett*. 2000; 161(1):1-7. doi: 10.1016/s0304-3835(00)00568-1

Karnovsky MJ, Kleinfeld AM, Hoover RL, Klausner R.D. The Concept of Lipid Domains in Membranes. *J. Cell Biol*. 1982; 94:1–6. doi: 10.1083/jcb.94.1.1

Leaden P, Barrionuevo J, Catalá A. The protection of long chain polyunsaturated fatty acids by melatonin during nonenzymatic lipid peroxidation of rat liver microsomes. *J Pineal Res*. 2002; 32(3):129-134. doi: 10.1034/j.1600-079x.2002.1o829.x.

Li Y, Li S, Zhou Y, Meng X, Zhang JJ, Xu DP, Li HB. Melatonin for the prevention and treatment of cancer. *Oncotarget*. 2017; 13; 8(24):39896-39921. doi: 10.18632/oncotarget.16379

Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018; 13:757–772. doi: 10.2147/CIA.S158513.

Lillemeier BF, Davis MM. Probing the plasma membrane structure of immune cells through the analysis of membrane sheets by electron microscopy. *Methods Mol Biol*. 2011; 748:169-182. doi: 10.1007/978-1-61779-139-0_12.

Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Bretscher A, Ploegh H, Martin KC, Yaffe MB, Amon A. *Molecular Cell Biology*. 9th ed. New York: Macmillan international; 2021. P 1684 -1690

Loh D, Reiter RJ. Melatonin: Regulation of Biomolecular Condensates in Neurodegenerative Disorders. *Antioxidants (Basel)*. 2021; 10(9):1483. doi: 10.3390/antiox10091483.

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):403-419. doi: 10.1111/jpi.12267.

Matuz-Mares D, González-Andrade M, Araiza-Villanueva MG, Vilchis-Landeros MM, Vázquez-Meza H. Mitochondrial Calcium: Effects of Its Imbalance in Disease. *Antioxidants (Basel)*. 2022; 11(5):801. doi: 10.3390/antiox11050801

Mecocci P, Cherubini A, Beal MF, Cecchetti R, Chionne F, Polidori MC, Romano G, Senin U. Altered mitochondrial membrane fluidity in AD brain. *Neurosci Lett*. 1996; 207(2):129-132. Doi: 0.1016/0304-3940(96)12509-x.

Mei N, Robinson M, Davis JH, Leonenko Z. Melatonin Alters Fluid Phase Coexistence in POPC/DPPC/Cholesterol Membranes. *Biophys J*. 2020; 119(12):2391-2402. doi: 10.1016/j.bpj.2020.10.030

Millet-Boureima C, Ennis CC, Jamison J, McSweeney S, Park A, Gamberi C. Empowering Melatonin Therapeutics with *Drosophila* Models. *Diseases*. 2021; 9(4):67. doi: 10.3390/diseases9040067

Moroni F, Marcheselli F, Recchioni R, Fattoretti P, Bertoni-Freddari C. Pineal graft in old rats improves erythrocyte resistance to peroxyl radical-induced hemolysis. *Biogerontology*. 2004; 5(5):339-344. doi: 10.1007/s10522-004-2572-1.

Murugova T, Ivankov O, Ermakova E, Kondela T, Hrubovčák P, Skoi V, Kuklin A, Kučerka N. Structural changes introduced by cholesterol and melatonin to the model membranes mimicking preclinical conformational diseases. *Gen Physiol Biophys*. 2020; 39(2):135-144. doi: 10.4149/gpb_2019054

Nam E, Lee SM, Koh SE, Joo WS, Maeng S, Im HI, Kim YS. Melatonin protects against neuronal damage induced by 3-nitropropionic acid in rat striatum. *Brain Res*. 2005;1046(1-2):90-96. doi: 10.1016/j.brainres.2005.03.053.

Okamoto HH, Cecon E, Nureki O, Rivara S, Jockers R. Melatonin receptor structure and signaling. *J Pineal Res*. 2024; 76(3): e12952. doi: 10.1111/jpi.12952.

Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Mitochondrial bioenergetics decay in aging: beneficial effect of melatonin. *Cell Mol Life Sci*. 2017; 74(21):3897-3911. doi: 10.1007/s00018-017-2619-5

Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Protective role of melatonin in mitochondrial dysfunction and related disorders. *Arch Toxicol*. 2015; 89(6):923-939. doi: 10.1007/s00204-015-1475-z

Paradies G, Petrosillo G, Paradies V, Reiter RJ, Ruggiero FM. Melatonin, cardiolipin and mitochondrial bioenergetics in health and disease. *J Pineal Res*. 2010; 48(4):297-310. doi: 10.1111/j.1600-079X.2010.00759.x.

Parton, RG, Del Pozo M A. Caveolae as Plasma Membrane Sensors, Protectors and Organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2013, 14, 98–112, doi: 10.1038/nrm351221

Petrosillo G, Colantuono G, Moro N, Ruggiero FM, Tiravanti E, Di Venosa N, Fiore T, Paradies G. Melatonin protects against heart ischemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 297(4):H1487-93. doi: 10.1152/ajpheart.00163.2009

Proietti S, Cucina A, Minini M, Bizzarri M. Melatonin, mitochondria, and the cancer cell. *Cell Mol Life Sci*. 2017; 74(21):4015-4025. doi: 10.1007/s00018-017-2612-z.

Purushothaman A, Sheeja AA, Janardanan D. Hydroxyl radical scavenging activity of melatonin and its related indolamines. *Free Radic Res*. 2020; 54(5):373-383. doi: 10.1080/10715762.2020.1774575

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(3):253-278. doi: 10.1111/jpi.12360.

Reiter RJ, Tan DX, Galano A. Melatonin reduces lipid peroxidation and membrane viscosity. *Front Physiol*. 2014; 5:377. doi: 10.3389/fphys.2014.00377.

Reiter RJ, Tan DX, Rosales-Corral S, Galano A, Zhou XJ, Xu B. Mitochondria: Central Organelles for Melatonin's Antioxidant and Anti-Aging Actions. *Molecules*. 2018; 23(2):509. doi: 10.3390/molecules23020509

Renne MF, Ernst R. Membrane homeostasis beyond fluidity: control of membrane compressibility. *Trends Biochem Sci*. 2023;48(11):963-977. doi: 10.1016/j.tibs.2023.08.004.

Ronner P. Membranas biológicas. En: Netter. *Bioquímica esencial*. Elsevier España; 2020. P: 108-115. Doi: 10/1016/B978-84-9113-515-9.00011-2

Samhan-Arias AK, Poejo J, Marques-da-Silva D, Martínez-Costa OH, Gutierrez-Merino C. Are There Lipid Membrane-Domain Subtypes in Neurons with Different Roles in Calcium Signaling? *Molecules*. 2023; 28(23):7909. doi: 10.3390/molecules28237909

Shevchenko, A.; Simons, K. Lipidomics: Coming to Grips with Lipid Diversity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2010; 11, 593– 598. doi: 10.1038/nrm2934 25.

Simons K., Ikonen E. Functional Rafts in Cell Membranes. *Nature*. 1997; 387:569–572. doi: 10.1038/42408.

Singer SJ, Nicolson GL. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science*. 1972; 175: 720–731. doi: 10.1126/science.175.4023.720.

Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Galano A, Reiter RJ. Cyclic-3-hydroxymelatonin (C3HOM), a potent antioxidant, scavenges free radicals and suppresses oxidative reactions. *Curr Med Chem*. 2014; 21(13):1557-1565. doi: 10.2174/0929867321666131129113146

Teixeira A, Morfim MP, de Cordova CA, Charão CC, de Lima VR, Creczynski-Pasa TB. Melatonin protects against pro-oxidant enzymes and reduces lipid peroxidation in distinct membranes induced by the hydroxyl and ascorbyl radicals and by peroxynitrite. *J Pineal Res*. 2003; 35(4):262-268. doi: 10.1034/j.1600-079x.2003.00085.x

Tordjman S, Chokron S, Delorme R, Charrier A, Bellissant E, Jaafari N, Fougere C. Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. *Curr Neuropharmacol*. 2017;15(3):434-443. doi: 10.2174/1570159X14666161228122115.

Tuli HS, Kashyap D, Sharma AK, Sandhu SS. Molecular aspects of melatonin (MLT)-mediated therapeutic effects. *Life Sci*. 2015; 135:147-157. doi: 10.1016/j.lfs.2015.06.004

Vernier PT, Levine ZA, Wu YH, Joubert V, Ziegler MJ, Mir LM, Tieleman DP. Electroporating fields target oxidatively damaged areas in the cell membrane. *PLoS One*. 2009; 4(11): e7966. doi: 10.1371/journal.pone.0007966.

Watson H. Biological membranes. *Essays Biochem*. 2015; 59: 43-69. doi: 10.1042/bse0590043.

Wong-Ekkabut J, Xu Z, Triampo W, Tang IM, Tieleman DP, Monticelli L. Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophys J*. 2007; 93(12):4225-4236. doi: 10.1529/biophysj.107.112565

Wongprayoon P, Govitrapong P. Melatonin as a mitochondrial protector in neurodegenerative diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2017; 74(21):3999-4014. doi: 10.1007/s00018-017-2614-x.