

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLOGÍA**



**MELATONINA COMO PROTECTOR FRENTE  
A LOS RADICALES LIBRES EN LA  
HEPATOTOXICIDAD POR ÁCIDOS BILIARES**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR

***Dña. Lorena Fuentes Broto***

PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EUROPEO

**Zaragoza, 2008**



**ENRIQUE MARTINEZ BALLARÍN**, Profesor Titular del Área de Fisiología de la Universidad de Zaragoza,

**JOSÉ JOAQUÍN GARCÍA GARCÍA**, Profesor Titular del Área de Fisiología de la Universidad de Zaragoza, y

**FRANCISCO JAVIER MIANA MENA**, Profesor Ayudante Doctor del Área de Fisiología de la Universidad de Zaragoza,

**CERTIFICAN:**

Que D<sup>a</sup> Lorena Fuentes Broto, ha realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Farmacología y Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza, el siguiente trabajo de investigación titulado: **“Melatonina como protector frente a los radicales libres en la hepatotoxicidad por ácidos biliares”**. Consideramos que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para su presentación y defensa como Tesis para optar al grado de Doctor Europeo.

Zaragoza, 30 de abril de 2008

José Joaquín García García   Enrique Martínez Ballarín   Francisco Javier Miana Mena



Este trabajo ha sido financiado gracias a los siguientes proyectos de investigación:



**GOBIERNO  
DE ARAGON**

**“Fisiología del envejecimiento y del estrés oxidativo” (B 40).**  
Grupo de Investigación Consolidado del Gobierno de Aragón.



**“Red Temática de Investigación Cooperativa en Envejecimiento y Fragilidad” (RETICEF) (RD06/0013).** Fondo de Investigación Sanitaria. Ministerio de Sanidad y Consumo.  
Enero 2.003 - Diciembre 2.008.



**Programa de Apoyo a la Investigación. Solicitud de Infraestructuras.** Universidad de Zaragoza. Convocatorias 2.004 (INF2004-BIO-03) y 2007 (INF2007-BIO-05).



**“Ayuda para la publicación de Tesis Doctorales”.** Colegio Oficial de Farmacéuticos de Zaragoza.



## AGRADECIMIENTOS

Hace algo menos de cinco años asistí a un curso de Doctorado impartido por los profesores Joaquín García y Enrique Martínez Ballarín dónde mostraban los interesantes estudios que se estaban llevando a cabo en su laboratorio. El tema me fascinó y tras la entrevista oportuna, me dieron la oportunidad de comenzar a trabajar en el grupo de investigación de Fisiología del Envejecimiento de la Universidad de Zaragoza. Los comienzos fueron difíciles en busca de becas predoctorales u otras ayudas, pero, algunas veces, no conseguir lo que una desea significa que una oportunidad mejor está esperando para llamar a la puerta. Así sucedió en mi caso, y actualmente presento esta Tesis Doctoral como un deseo de mejorar y continuar mi carrera científico-docente.

Una Tesis Doctoral es un reto profesional y personal, en el que intervienen muchas Instituciones y personas sin las cuales sería imposible su realización, por eso quiero agradecer el apoyo y el interés que he recibido de todos ellos:

Al Ministerio de Sanidad, Gobierno de Aragón, Universidad de Zaragoza y Colegio Oficial de Farmacéuticos de Zaragoza, sin cuyo apoyo estructural y económico hubiera sido imposible llevar a cabo esta Tesis.

Al los **profesores Joaquín García y Enrique Martínez Ballarín** por haberme brindado la oportunidad de realizar esta tesis doctoral bajo su dirección y depositar su confianza en mí, contribuyendo enormemente a terminar de despertar en mí el entusiasmo por la ciencia. Al **Prof. Javier Miana** por su predisposición permanente para brindarme ayuda en todo momento. Gracias a los tres por enseñarme el verdadero significado de la investigación científica; vuestra labor como tutores, directores y, sobre todo, como profesores y grandes transmisores de conocimientos, ha permitido la realización de este trabajo.

Al **Prof. Darío Acuña-Castroviejo** por aceptarme en su laboratorio, dónde, a pesar de realizar una corta estancia, me inculcó el entusiasmo e interés por la ciencia y la necesidad de la voluntad, la disciplina y la constancia en el trabajo diario como

pilares básicos para hacer ciencia. A la **Prof. Germaine Escames** que me dio sabios consejos que me han servido y seguro me servirán en mi carrera científica.

Herrn **Prof. Rüdiger Hardeland** danke ich herzlich für seine kompetente, nette und zeitintensive Betreuung sowohl während meiner Tätigkeit in sein Labor. Bedanken möchte ich mich ebenfalls für das gute Arbeitsklima durch Herrn PD Dr. Burkhard Poeggeler und Frau Jutta Böker. Bei Herrn **PD. Dr. Burkhard Poeggeler** bedanke ich mich für die zusätzliche Unterstützung im Labor sowie die anregenden Gespräche. Frau **Jutta Böker** möchte ich für ihre Hilfe und Unterstützung während der Arbeit im Labor danken.

A mis compañeros de Fisiología: **Sergio, Maribel, Carlos, César, Eva, Gerard, José Luis, Luismi, Eduardo y Marcos**, con quienes he pasado en el laboratorio muchas horas de trabajo y alegrías.

Bei meinen Kommilitonen in Göttingen **Sarah, Andrea, Anna, Monique, Mirko, Katinka, Katrin** möchte ich mich für die gute und entspannte Zusammenarbeit in und außerhalb des Labor bedanken.

A mis compañeros de docencia en Huesca, en especial a **Fernando Lostalé** y a **Marta Castro**, quienes junto con mis directores de Tesis me habéis dado grandes consejos, ánimo y complicidad en los momentos más difíciles. Gracias por supuesto a todos los alumnos pasados y futuros, porque por vosotros realizo esta Tesis, para poder seguir investigando y facilitando vuestro aprendizaje. También a todas las personas del Departamento que han hecho posible que este trabajo saliera adelante.

A **Mapi, Marta, Goretti, Laura, María, Conchi** y todos nuestros compañeros de “tuper ware” por los agradables momentos en la “biblioteca”.

A todos mis amigos: los mañicos, los que nos conocimos en tierras charras (**Bea, Luci, Nai, Ana, Rebe, Elena, Pili, Alfredo,...**) los mandos del Hogar Aragón (**Elena, Mari, Anabel, Rosa, Capi, LaHoz, Darío,...**), los compis de óptica (**Gema, Sofía, Sara,...**), gracias por haberme demostrado siempre vuestro cariño y haberme ayudado siempre que os necesito, así como por aguantarme tanto en los buenos como en los malos momentos.



A toda mi familia, en especial a **Jimena**, la más pequeña. Pero todo esto no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de mi madre, **Nélida**, una luchadora nata, por haberme inculcado unos valores basados en el amor, trabajo y constancia, tan necesarios para cualquier aspecto de la vida. Gracias por darme tanto ánimo. Gracias también a mi padre, **Paco**, que siempre ha confiado en mí y me ha animado, enseñándome la importancia del respeto. A los dos gracias por enseñarme que la virtud está en el término medio, quizás nunca os podré agradecer suficientemente todas vuestras enseñanzas, cariño y dedicación.

A todas aquellas personas y amigos que no he citado y que de alguna forma han contribuido a que esta Tesis haya llegado a buen término.

A todos, muchas gracias.



***A mi madre, a mi padre,  
a todos mis profesores y  
a todas las personas que  
he conocido en mi vida  
porque de ellas he  
aprendido cuanto sé.***



"Todo hombre puede ser, si se lo propone,  
escultor de su propio cerebro."

**Santiago Ramón y Cajal (1852-1934)**

"La suerte viene a quien menos la aguarda."

**Federico García Lorca (1898-1936)**

"Con el conocimiento se acrecientan las dudas".

**Johann Wolfgang Goethe (1749 –1832)**



## ABREVIATURAS





·Asc <sup>-</sup>	Radical ascorbilo	IP3	Inositoltrifosfato
·NO	Óxido nítrico	JNK	Quinasas c-Jun-N-terminal
·O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Radical superóxido	LCA	Ácido litocólico
·OH	Radical hidroxilo	LOX	Lipooxigenasa
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxígeno singlete	LPO	Lipoperoxidación
4-HDA	4-hidroxialquenos	MAO	Monoaminoxidasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico	MAPk	Quinasas activadas por mitógenos
ADNm	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial	MDA	Malondialdehído
ADP	Adenosin difosfato	MPT	Permeabilidad transitoria mitocondrial
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico	Mrp2	Proteínas de resistencia a múltiples fármacos
aMT	Melatonina ó N-(2-(5-metoxiindol-3-il)etil)acetamida	NaCl	Cloruro sódico
AP-1	Proteína activadora 1	NAD	Nicotinamida adenín-dinucleótido
ATP	Adenosin trifosfato	NADP	Nicotinamida adenín-dinucleótido fosfato
AscH <sup>-</sup>	Ascorbato	NAT	N-acetil-transferasa
BH4	Tetrahidrobiopterina	NFκB	Factor nuclear Kappa B
BSA	Albúmina sérica bovina	nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
Bsep	Bomba exportadora de ácidos biliares	NO <sub>2</sub>	Dióxido de nitrógeno
CD4	Linfocitos T cooperadores	NOS	Óxido nítrico sintasa
c-fos	Factor de transcripción pro-crecimiento	O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular
COX	Ciclooxigenasa	ONOO <sup>-</sup>	Anión peroxinitrito
CREB	Proteínas que se unen a fragmentos del ADN sensibles al AMPc	p/v	Peso/volumen
DCA	Ácido desoxicólico	PI3-K	Fosfatidilinositol-3quinasa
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina	PKC	Proteínquinasa C
EDTA	Ácido etilendiaminetetracético	PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial	PLC	Fosfolipasa C
ERNs	Especies reactivas dependientes de nitrógeno	QCA	Ácido quenodesoxicólico
EROs	Especies reactivas dependientes de oxígeno	R·	Radical alquilo
FAD	Flavín adenín dinucleótido	RO·	Radical alcoilo
FDA	Food and Drug Administration	ROO·	Radical peroxilo
FMN	Flavín mononucleótido	ROOH	Peróxido lipídico
FeCl <sub>3</sub>	Cloruro férrico	RS·	Radical de átomos de azufre
GPx	Glutación peroxidasa	SOD	Superóxido dismutasa
GTP	Trifosfato de guanosina	TCA	Ácido tricloroacético
H <sup>+</sup>	Hidrogenión	TDA	Ácido taurodesoxicólico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno	TLC	Ácido taurolitocólico
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazina-1-etanosulfónico	TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
HIOMT	Hidroxiindol-O-metil transferasa	TQA	Ácido tauroquenodesoxicólico
HO <sub>2</sub> ·	Radical perhidroxilo	TRIS	Tris[hidroximetil]aminometano
HOCl	Ácido hipocloroso	UDA	Ácido ursodesoxicólico
HONOO	Ácido peroxinitroso	UV	Ultravioleta
IDO	Indolamina-2,3-dioxigenasa	v/v	Volumen/volumen
IL	Interleucina	Vit C	Ácido ascórbico
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible		



**ÍNDICE**



<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>ESTRÉS OXIDATIVO EN LOS SERES VIVOS .....</b>	<b>3</b>
<i>Radicales libres .....</i>	<i>3</i>
Concepto de radical libre.....	3
Tipos de radicales libres .....	4
Formación de los radicales libres en los seres vivos.....	12
<i>Mecanismos de protección .....</i>	<i>23</i>
Antioxidantes .....	24
Sistemas reparadores .....	24
<i>Fisiopatología de los radicales libres .....</i>	<i>26</i>
Funciones de los radicales libres .....	26
Concepto de estrés y daño oxidativo .....	27
<b>FISIOPATOLOGÍA DE LOS ÁCIDOS BILIARES .....</b>	<b>32</b>
<i>Síntesis y transporte.....</i>	<i>33</i>
<i>Estructura y características genéricas .....</i>	<i>38</i>
<i>Funciones .....</i>	<i>39</i>
<i>Implicaciones etiopatogénicas.....</i>	<i>40</i>
<b>FISIOLOGÍA DE LA MELATONINA .....</b>	<b>44</b>
<i>Estructura funcional de la glándula pineal .....</i>	<i>44</i>
<i>Biosíntesis de melatonina .....</i>	<i>46</i>
<i>Distribución.....</i>	<i>50</i>
<i>Metabolismo y farmacocinética .....</i>	<i>51</i>
<i>Mecanismos de acción.....</i>	<i>53</i>
Mecanismos mediados por receptor .....	54
Interacción con proteínas intracelulares .....	57
Mecanismos y función antioxidante de la melatonina .....	59
<i>Otras funciones de la melatonina .....</i>	<i>66</i>
Regulación de los ritmos biológicos .....	66
Regulación de la reproducción .....	67
Inmunomodulación .....	69
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>71</b>
JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO.....	73
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	75
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>77</b>
MATERIAL .....	79

<i>Reactivos químicos utilizados</i> .....	79
<i>Material de laboratorio</i> .....	80
<i>Material biológico</i> .....	81
DISEÑO EXPERIMENTAL .....	82
<i>Estudio del daño oxidativo por ácidos biliares</i> .....	83
<i>Cinéticas de tiempo de daño oxidativo</i> .....	84
<i>Cinéticas de concentración de daño oxidativo</i> .....	85
<i>Cinéticas de concentración de melatonina</i> .....	86
MÉTODOS PARA LA PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	87
<i>Perfusión de los animales y obtención tisular</i> .....	87
<i>Homogeneización del tejido hepático</i> .....	87
<i>Aislamiento de membranas de tejido hepático</i> .....	88
MÉTODOS ANALÍTICOS .....	90
<i>Determinación de la concentración de proteínas</i> .....	90
<i>Cuantificación de la peroxidación lipídica</i> .....	92
<i>Cuantificación de restos carbonilo</i> .....	94
MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....	96
<i>Estudio descriptivo de los datos</i> .....	96
<i>Inferencia estadística</i> .....	96
<i>Cálculo de daño oxidativo inducido o potenciado</i> .....	96
<i>Cálculo de la IC<sub>50</sub></i> .....	97
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>99</b>
ESTUDIO DEL DAÑO POR ÁCIDOS BILIARES .....	101
CINÉTICAS DE TIEMPO DE DAÑO OXIDATIVO .....	108
CINÉTICAS DE CONCENTRACIÓN.....	112
VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA MELATONINA.....	119
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>127</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>149</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>153</b>

## ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1. Vida media de algunas especies reactivas dependientes del oxígeno (EROs) y del nitrógeno .....	4
Tabla 2. Resumen de los principales antioxidantes biológicos. ....	25
Tabla 3. Estructuras de los ácidos biliares estudiados en este trabajo.....	36
Tabla 4. Efecto de distintos ácidos biliares en la formación de MDA+4-HDA y carbonilación proteica en homogeneizados y membranas de hígado. La incubación se realizó a 37°C durante 2h con 1 mM de cada ácido biliar, en presencia y ausencia de FeCl <sub>3</sub> 0,1 mM y ácido ascórbico 0,1 mM. ....	101
Tabla 5. Incremento porcentual de daño oxidativo a lípidos y proteínas hepáticas causado por ácidos biliares (1mM). ....	102
Tabla 6. Efecto del tiempo de incubación en la formación de MDA+4-HDA y restos carbonilo en homogeneizados y membranas de hígado.....	109
Tabla 7. Efecto del ácido taurolitocólico (TLC) en la formación de MDA+4-HDA y restos carbonilo en homogeneizados y membranas de hígado.....	113
Tabla 8. Efecto protector de la melatonina (aMT) en la oxidación de lípidos y proteínas inducida por ácido taurolitocólico (TLC) 1 mM, en ausencia y presencia de FeCl <sub>3</sub> 0,1 mM y ácido ascórbico 0,1 mM en homogeneizados y membranas aisladas de hígado .....	119
Tabla 9. Concentraciones de melatonina necesarias para inhibir el 50% del daño oxidativo (IC <sub>50</sub> ) debido a la presencia de ácido taurolitocólico 1mM, en ausencia y presencia de FeCl <sub>3</sub> 0,1 mM y ácido ascórbico 0,1 mM en homogeneizados y membranas de hígado. ....	126

## ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1. Configuración electrónica de los orbitales moleculares de varias especies reactivas dependientes de oxígeno. ....	5
Figura 2. Síntesis de óxido nítrico catalizada por la óxido nítrico sintasa.....	10
Figura 3. Reducción del oxígeno para formar agua. ....	13
Figura 4. Formación de radicales libres en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. ....	15
Figura 5. Localización del sistema citocromo P <sub>450</sub> en la membrana del retículo endoplásmico .....	17
Figura 6. Activación de la NADPH oxidasa. PKC: proteinquinasa C.....	20
Figura 7. Reacciones principales de la peroxidación lipídica. ....	29
Figura 8. Reacciones de los radicales libres con las proteínas.....	30
Figura 9. Principales ácidos biliares y sus sitios de síntesis y metabolismo .....	34
Figura 10. Resumen de los mecanismos de toxicidad de los ácidos biliares .....	43
Figura 11. Biosíntesis de melatonina a partir de triptófano. ....	48
Figura 12. Vía nerviosa de regulación de la síntesis de melatonina. ....	49
Figura 13. Resumen de los principales mecanismos de acción y funciones de melatonina.....	54
Figura 14. Interacción de la melatonina con los ·OH. ....	61

Figura 15. Reacción de una molécula de $H_2O_2$ con otra de melatonina. ....	62
Figura 16. Formación de 6-hidroxi-melatonina por la interacción de melatonina con peroxinitrito.....	63
Figura 17. Reacción de la melatonina con el ácido hipocloroso. ....	63
Figura 18. Diseño y nomenclatura utilizada en los experimentos del daño oxidativo inducido por ácidos biliares en ausencia o presencia de $FeCl_3$ y ácido ascórbico. ....	83
Figura 19. Diseño experimental y nomenclatura en las cinéticas de tiempo de ácido taurolitocólico (TLC) en ausencia o presencia de daño oxidativo inducido por $Fe^{2+}$ .....	84
Figura 20. Procedimiento experimental y nomenclatura utilizada en las cinéticas de concentración de ácido taurolitocólico (TLC) en ausencia o presencia de $FeCl_3$ y ácido ascórbico.....	85
Figura 21. Planificación de los experimentos destinados a evaluar la acción antioxidante de la melatonina (aMT) frente a la toxicidad del ácido taurolitocólico (TLC) en ausencia o presencia de $FeCl_3$ y ácido ascórbico.....	86
Figura 22. Protocolo de aislamiento de membranas de hepatocitos. ....	89
Figura 23. Protocolo de cuantificación de proteínas. ....	91
Figura 24. Protocolo de cuantificación de malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxialquenos (4-HDA). ....	93
Figura 25. Fundamento de la cuantificación de restos carbonilo en las proteínas.....	95
Figura 26. Efecto de los ácidos biliares en la formación de MDA+4-HDA en homogeneizados de hígado. ....	103
Figura 27. Efecto de los ácidos biliares en la formación de restos carbonilo en homogeneizados de hígado. ....	103
Figura 28. Efecto de distintos ácidos biliares en la formación de MDA+4-HDA en membranas hepáticas aisladas. ....	104
Figura 29. Efecto de distintos ácidos biliares en la formación de restos carbonilo en membranas de hígado. ....	104
Figura 30. Efecto de los ácidos biliares en la formación de MDA+4-HDA en homogeneizados de hígado en el sistema generador de radicales libres del $FeCl_3$ y ácido ascórbico. ....	106
Figura 31. Los ácidos biliares aumentaron la formación de restos carbonilo causada por hierro y ácido ascórbico en homogeneizados de hígado. ....	106
Figura 32. Los ácidos UDA, TQA, TDA y TLC potencian la peroxidación lipídica inducida por $Fe^{2+}$ en las membranas aisladas del tejido hepático. ....	107
Figura 33. Efecto de los ácidos biliares en la carbonilación proteica en membranas aisladas de hígado. ....	107
Figura 34. Efecto del tiempo de incubación en la formación de MDA+4-HDA en homogeneizados de hígados. ....	110
Figura 35. Papel del tiempo de incubación en la oxidación proteica en homogeneizados de hígado. ....	110



Figura 36. Influencia del tiempo de incubación en la formación de MDA+4-HDA en membranas de hepatocitos.....	111
Figura 37. Efecto del tiempo de incubación en la formación de restos carbonilo en membranas de hígado.....	111
Figura 38. El ácido taurolitocólico (TLC) aumentó la peroxidación lipídica en homogeneizados de hígado.....	114
Figura 39. El ácido taurolitocólico (TLC) modificó la formación restos carbonilo en homogeneizados de hígado .....	114
Figura 40. Efecto concentración dependiente del ácido taurolitocólico (TLC) de la formación de MDA+4-HDA en membranas de hígado. ....	115
Figura 41. Respuesta concentración dependiente del ácido taurolitocólico (TLC) en la carbonilación proteica en membranas aisladas de hígado. ....	115
Figura 42. Efectos del ácido taurolitocólico (TLC) en la formación de MDA+4-HDA en homogeneizados de hígado. ....	117
Figura 43. Cinética de concentración de ácido taurolitocólico (TLC) para la formación de restos carbonilo en homogeneizados de hígado.....	117
Figura 44. El TLC potenció la peroxidación lipídica en membranas de hígado. ....	118
Figura 45. Efecto del ácido taurolitocólico (TLC) en la oxidación de las proteínas de las membranas de hígado.....	118
Figura 46. Efecto protector de la melatonina (aMT) en la oxidación de lípidos inducida por ácido taurolitocólico en homogeneizados de hígado .....	121
Figura 47. Efecto de la melatonina (aMT) en la oxidación de proteínas inducida por ácido taurolitocólico en homogeneizados de hígado. ....	121
Figura 48. Cinética de la melatonina (aMT) en la oxidación de lípidos inducida por ácido taurolitocólico 1mM en membranas de hígado. ....	122
Figura 49. La melatonina (aMT) reduce la oxidación de proteínas inducida por ácido taurolitocólico en membranas de hígado. ....	122
Figura 50. Efecto de melatonina (aMT) en la oxidación de lípidos potenciada por ácido taurolitocólico (TLC) en homogeneizados de hígado.. ....	124
Figura 51. Melatonina (aMT) redujo la oxidación de lípidos potenciada por ácido taurolitocólico (TLC) en membranas de hígado.....	124
Figura 52. Cinética de concentraciones de melatonina (aMT) en la oxidación de proteínas potenciada por ácido taurolitocólico en membranas de hígado. ....	126



## INTRODUCCIÓN



## ESTRÉS OXIDATIVO EN LOS SERES VIVOS

### RADICALES LIBRES

#### CONCEPTO DE RADICAL LIBRE

El átomo está compuesto por un núcleo formado por protones y neutrones y una corteza de electrones que se mueven en torno al núcleo y están dispuestos en orbitales, que son regiones del espacio donde la probabilidad de encontrar un electrón es mayor. Los electrones se distribuyen en diferentes tipos de orbitales según su nivel energético. En cada orbital puede haber hasta dos electrones, girando sobre su propio eje, lo que genera una energía magnética determinada por el número cuántico de *spin*, que puede ser representado por,  $+\frac{1}{2}$  ó  $-\frac{1}{2}$ , según el sentido de giro horario o antihorario respectivamente. Si un electrón dado se aparea con otro, entonces estos dos electrones que desapareados tenían un sentido de rotación opuesto, anulan mutuamente sus *spines* o campos magnéticos, denominándose a ese átomo o molécula, diamagnética. Los electrones suelen buscar la asociación con otro electrón, de manera que se puedan aparear sus sentidos de rotación en un sistema de baja energía.

Un radical libre es aquella especie química, ya sea átomo, molécula o parte de ésta, con existencia independiente que posee uno o varios electrones desapareados en su orbital más externo [Fridovich, 1978]. El electrón desapareado o solitario tiene un momento magnético o *spin* no compensado llamado “magnetón Bohr”, determinando que el átomo o molécula sea paramagnética. La carga eléctrica de la especie química puede ser positiva, negativa o neutra. Los electrones tienden a estar pareados en su orbital, porque ésta es la configuración energética más estable, por ello, el radical libre tiene una gran tendencia a recuperar la situación de estabilidad perdida, lo que podrá lograr de dos formas, bien cediendo el electrón desapareado, agente reductor, o bien captando un electrón, agente oxidante. En este proceso, el radical libre compensa su orbital incompleto, pero a expensas de desestabilizar la configuración electrónica del elemento con el que reacciona, ya que el átomo o molécula atacado pierde o gana

electrones, convirtiéndose a su vez en radical libre [Halliwell, 1993]. La vida media de los radicales libres depende del tiempo que tardan en reaccionar para conseguir captar o ceder su electrón desapareado (tabla 1).

**Tabla 1.** Vida media de algunas especies reactivas dependientes del oxígeno (EROs) y del nitrógeno [Reiter, 1995a].

Especie	Fórmula	Vida media a 37°C (s)
Hidroxilo	$\cdot\text{OH}$	$10^{-9}$
Alquilo	$\text{R}\cdot$	$10^{-8}$
Oxígeno singlete	$^1\text{O}_2$	$10^{-6}$
Superóxido	$\cdot\text{O}_2^-$	$10^{-6}$
Alcoxilo	$\text{RO}\cdot$	$10^{-6}$
Peroxilo	$\text{ROO}\cdot$	$10^{-2}$
Óxido nítrico	$\cdot\text{NO}$	$< 1$
Oxígeno molecular	$\text{O}_2$	$> 10^2$
Peróxido de hidrógeno	$\text{H}_2\text{O}_2$	Estable

## TIPOS DE RADICALES LIBRES

Existe una gran cantidad de radicales libres, tanto derivados del oxígeno como del nitrógeno, o radicales libres centrados en otras moléculas, como el azufre.

### 1. ESPECIES REACTIVAS DEPENDIENTES DE OXÍGENO

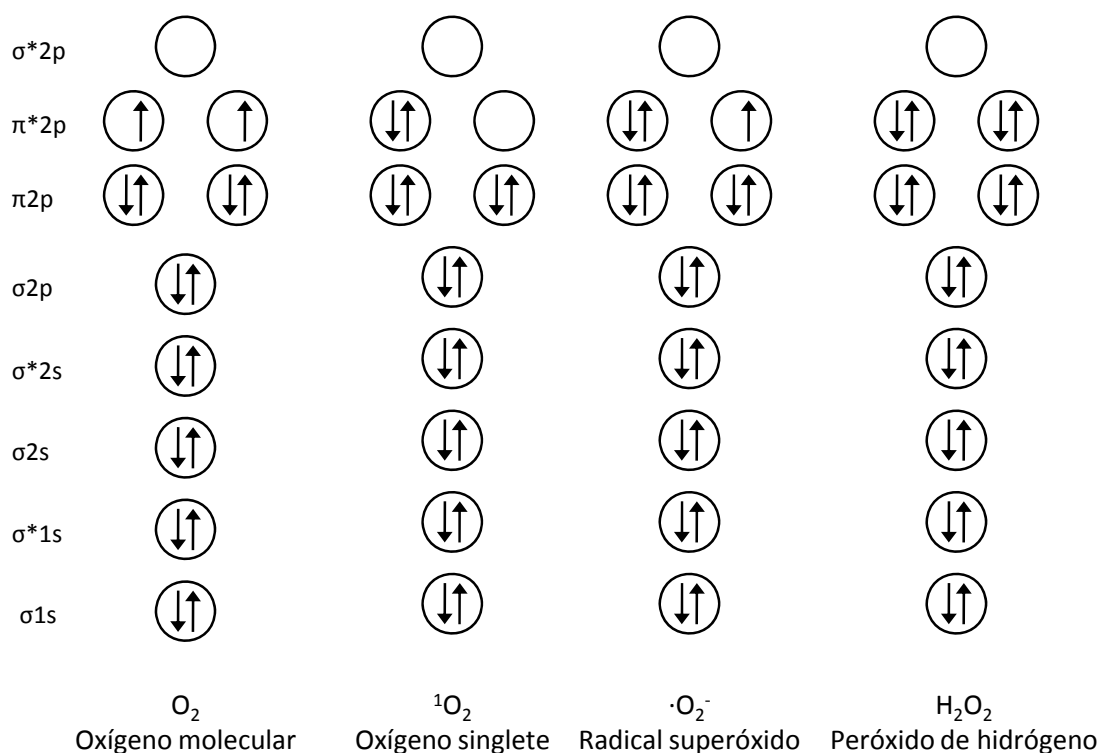
Se denominan especies reactivas dependientes del oxígeno (EROs), tanto a sus radicales libres como a las moléculas precursoras y derivadas. Algunas son auténticos radicales libres, como el hidroxilo. Otras, como el peróxido de hidrógeno, no son en realidad radicales, pero son fuentes de ellos.

#### 1.1. Oxígeno molecular

En la naturaleza, el oxígeno como tal aparece mayoritariamente en forma molecular o diatómica ( $\text{O}_2$ ). El oxígeno molecular contiene 16 electrones, distribuidos en los orbitales moleculares. En total tiene 10 electrones enlazantes y 6 electrones antienlazantes de acuerdo con la teoría del orbital molecular, que sostiene que cuando dos átomos se enlazan combinan sus orbitales electrónicos, dando lugar a dos orbitales moleculares. Uno de ellos es el enlazante, que se caracteriza por tener una energía inferior a aquéllos de los que proviene, y el otro es el antienlazante, cuya

energía es superior a la de los orbitales atómicos originales. El propio oxígeno molecular es un radical libre, ya que posee dos electrones desapareados en los orbitales más externos, los  $\pi$  antienlazantes ( $\pi^*$ ) (figura 1).

Ambos electrones tienen el mismo sentido de rotación, lo que le da el carácter paramagnético a la molécula. El estado basal del oxígeno molecular recibe el nombre de triplete, puesto que contiene electrones desapareados con *spines* paralelos. Al tener el mismo número cuántico de *spin* para los dos electrones desapareados, la molécula de  $O_2$  sólo interactuará con radicales cuyos electrones tengan *spines* complementarios a los del oxígeno, fenómeno que se denomina “restricción de *spin*”. Por ello, el  $O_2$  es un birradical con muy baja reactividad.



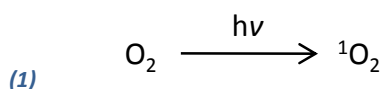
**Figura 1.** Configuración electrónica de los orbitales moleculares de varias especies reactivas dependientes de oxígeno.

## 1.2. Oxígeno singlete

La molécula de oxígeno puede presentarse con otras configuraciones electrónicas en sus últimos orbitales antienlazantes. Una de ellas es la del oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), que es una forma excitada del oxígeno en la que los dos electrones de los últimos orbitales antienlazantes se configuran con *spines* opuestos (figura 1). El  $^1O_2$

no es un radical libre, pero al ser una forma excitada reacciona fácilmente con otras moléculas.

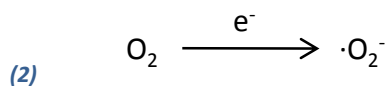
El  $^1\text{O}_2$  se genera a partir del oxígeno molecular, por absorción de energía electromagnética, la cual invierte transitoriamente el *spin* de uno de los dos electrones desapareados del oxígeno, de modo que los giros de los electrones en los orbitales más externos muestran una orientación antiparalela. La absorción de grandes cantidades de energía electromagnética por el oxígeno molecular para generar  $^1\text{O}_2$  se encuentra restringida a acontecimientos fotoquímicos [Zigler y Goosey, 1981; Sik y cols., 1983] (1). También puede formarse en reacciones de oxidación de diversas especies o en el transcurso de algunas reacciones enzimáticas. Su vida media es alrededor de  $10^{-6}$  segundos. Puede interaccionar con otras moléculas transfiriéndoles su energía de excitación o combinándose químicamente con ellas. El  $^1\text{O}_2$  tiene capacidad para sustraer un hidrogenión ( $\text{H}^+$ ) de un ácido graso insaturado, iniciando la reacción de la peroxidación lipídica [Halliwell y Gutteridge, 1990].



### 1.3. Radical superóxido

---

El radical anión superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) procede de la reducción univalente del oxígeno molecular (2). Se produce en todas las células eucariotas animales, sobre todo en la mitocondria y el retículo endoplasmático [Fridovich, 1978; Nohl y Hegner, 1978].



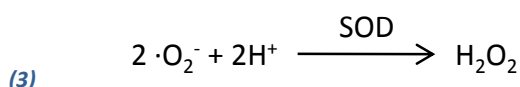
En la cadena respiratoria en estado 4, a nivel de los complejos I y III, entre el 1 y el 2% de los electrones transportados, no llega al complejo IV, sino que da lugar a  $\cdot\text{O}_2^-$  [Boveris y cols., 1972]. También se forma  $\cdot\text{O}_2^-$  durante el estallido respiratorio de las células fagocíticas: monocitos-macrófagos y granulocitos, y como producto de muchas reacciones enzimáticas, como las que implican a las deshidrogenasas flavoproteínicas (xantina oxidasa, aldehído oxidasa, purina oxidasa, etc.), oxidasas e hidroxilasas (diamino oxidasa, galactosa oxidasa, citocromo  $\text{P}_{450}$  a nivel del retículo endoplásmico



hepático, etc.) [Halliwell y Grootveld, 1987]. Finalmente, puede generarse por la autooxidación de moléculas, como el gliceraldehído, ascorbato, hidroquinonas, los compuestos tiólicos como la cisteína, las catecolaminas, flavinas y hemoproteínas, en presencia de cantidades traza de metales [McCord, 1989]. En conjunto se ha estimado que en una célula del cuerpo humano se producen del orden de  $10^{10}$  moléculas de  $\cdot\text{O}_2^-$  por día [Ames y cols., 1993].

El radical superóxido puede lesionar los transportadores de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial [Sohal y Brunk, 1992] y del ácido desoxirribonucleico (ADN) [Farr y cols., 1986], así como inducir la oxidación de otras muchas moléculas como la adrenalina, el dihidroxifumarato o la hidroxidopamina [Halliwell y Gutteridge, 1999].

La eliminación de  $\cdot\text{O}_2^-$  generado en la célula se realiza por las enzimas superóxido dismutasas (SOD) que catalizan la siguiente reacción (3):

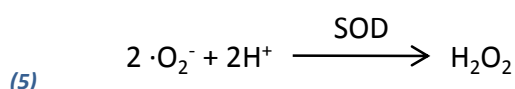
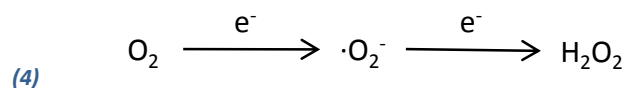


Aunque el  $\cdot\text{O}_2^-$  no es muy tóxico, es la principal fuente de formación de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que a su vez es un precursor del radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), la especie reactiva de mayor toxicidad [Sawyer, 1988; Fridovich, 1997]. También el  $\cdot\text{O}_2^-$  puede reaccionar con el radical óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ), y formar anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) [Radi y cols., 1991; Halliwell y Gutteridge, 1999].

#### 1.4. Peróxido de hidrógeno

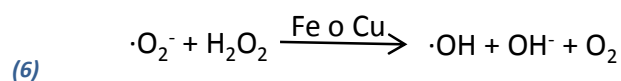
El  $\text{H}_2\text{O}_2$  no es un radical libre como tal, pues no posee electrones desapareados en su orbital más externo (figura 1), pero está dentro de las especies reactivas derivadas del oxígeno porque produce otros radicales libres. Es la forma menos reactiva de las especies reactivas de oxígeno. Su importancia recae en que atraviesa las membranas biológicas, con lo que puede dar lugar a reacciones de oxidación en puntos de la célula más alejados de su lugar de producción participando en numerosas reacciones que dan lugar a la generación de radicales libres.

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  se puede formar a partir de diversas fuentes: Reducción directa de una molécula de oxígeno por dos electrones [Sawyer, 1988; Fridovich, 1997] (4); dismutación del  $\cdot\text{O}_2^-$ , reacción catalizada por la enzima SOD [Cheeseman y Slater, 1993; Frei, 1994] (5); producto de algunas enzimas (glucosa oxidasa, uricasa, etc.) [Fridovich y Freeman, 1986] y por reacciones químicas de autooxidación.

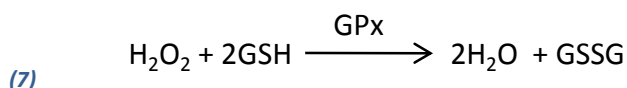


Se ha comprobado que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  está implicado en la regulación de la transducción de la señal de expresión de genes a través del factor nuclear Kappa B (NF $\kappa$ B) y la proteína activadora 1 (AP-1). Ambos son factores de transcripción capaces de inducir la transcripción de genes tales como el de la manganeso-superóxido dismutasa [Yi y cols., 2002], interleucina 2 (IL-2), factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad y factor de transcripción pro-crecimiento (c-fos) [Schreck y Baeuerle, 1994].

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  no es tóxico a concentraciones fisiológicas, pero mediante la reacción de Fenton-Haber-Weiss (6) se puede convertir en  $\cdot\text{OH}$  [Fenton, 1894; Haber y Weiss, 1934]. El hierro (Fe) así como el cobre (Cu) son los metales de transición más comunes, por lo que la naturaleza del daño producido por estas reacciones dependerá de la disponibilidad y localización de estos metales.



La detoxificación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  se lleva a cabo por acción de sistemas enzimáticos como la glutatión peroxidasa (GPx), que conllevan la formación de agua (7).

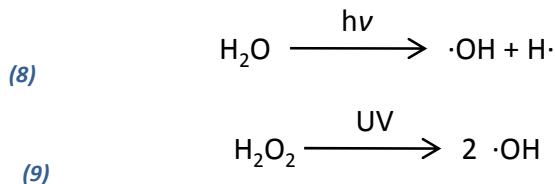


### 1.5. Radical hidroxilo

El  $\cdot\text{OH}$  es el radical libre más reactivo y por ello dañino que existe, con una vida media de aproximadamente 1 nanosegundo (tabla 1). No tiene gran poder de difusión

y se desconoce una enzima que lo detoxifique directamente, posiblemente porque el propio  $\cdot\text{OH}$  la destruiría.

En el ser vivo se puede producir por varios mecanismos: 1) Fisión homolítica del agua, aunque es poco frecuente puede formarse a consecuencia de radiación de alta energía (rayos X, rayos  $\gamma$ ) (8). 2) Ruptura fotolítica del  $\text{H}_2\text{O}_2$  (9), la luz UV no tiene suficiente energía como para escindir una molécula de agua, pero puede dividir el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en dos moléculas de radical hidroxilo. 3) Reacciones de Fenton-Haber-Weiss [Fenton, 1894; Haber y Weiss, 1934], en la que una molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  reacciona con una molécula de  $\cdot\text{O}_2^-$ , u otro agente reductor, para producir un  $\cdot\text{OH}$ , un  $\text{OH}^-$  y  $\text{O}_2$  (6), aunque la velocidad de esta reacción es demasiado baja para ser de importancia fisiológica, los metales de transición como el hierro o el cobre pueden actuar como cofactores de la misma, acelerando la velocidad de la reacción [Halliwell y Gutteridge, 1989]. El propio ácido ascórbico, un buen antioxidante, es capaz de reducir el Fe (III) a Fe (II) tanto *in vitro* [Rowley y Halliwell, 1983b], como *in vivo* [Winterbourn y Vissers, 1983].



El  $\cdot\text{OH}$  tiene capacidad para reaccionar con las bases púricas y pirimidínicas del ADN, es, por tanto, un agente genotóxico [Bohr y Anson, 1999; Sastre y cols., 2000]. Así mismo el  $\cdot\text{OH}$  puede arrancar un  $\text{H}^+$  de la cadena carbonada de los ácidos grasos poliinsaturados, iniciando la peroxidación lipídica [Halliwell y Gutteridge, 1990] y es capaz de dañar las proteínas [Yu, 1994].

#### 1.6. Radical perhidroxilo

El radical perhidroxilo ( $\text{HO}_2\cdot$ ) se genera a partir de  $\cdot\text{O}_2^-$ . Es un radical libre muy liposoluble, resultando un potente inductor de la peroxidación lipídica en membranas biológicas [Kanner y cols., 1987].

## 1.7. Radicales alcoxilo y peroxilo

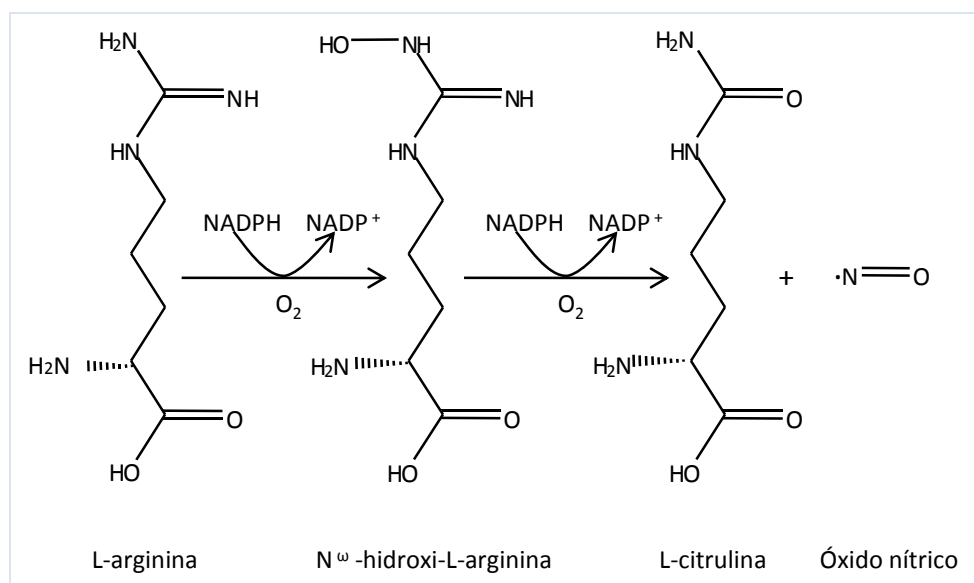
Los radicales alcoxilo ( $\text{RO}\cdot$ ) y peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ) son especies generadas durante la peroxidación lipídica, por el ataque de algunos radicales libres sobre las cadenas carbonadas de los ácidos grasos [Kanner y cols., 1987; Halliwell y Gutteridge, 1999]. Son menos reactivos y más selectivos que los radicales  $\cdot\text{OH}$ , pero son parte fundamental en el desarrollo de la peroxidación lipídica, dado que estas especies pueden iniciar y propagar la reacción [Kanner y cols., 1987].

## 2. ESPECIES REACTIVAS DEPENDIENTES DE NITRÓGENO

Las especies reactivas dependientes de nitrógeno (ERNs) engloban tanto a los radicales libres dependientes de nitrógeno como a las especies que generan dichos radicales.

### 2.1. Óxido nítrico

El  $\cdot\text{NO}$  es un gas lipofílico e hidrosoluble, cuya vida media es relativamente larga (3-5 s). Se produce en numerosos tipos celulares durante la conversión de L-arginina a L-citrulina, una reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS) [Moncada y cols., 1991; Bush y cols., 1992] (figura 2).



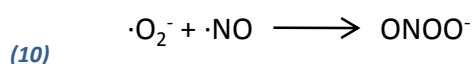
**Figura 2.** Síntesis de óxido nítrico catalizada por la óxido nítrico sintasa.

El  $\cdot\text{NO}$  es un radical libre que tiene como funciones actuar como regulador del flujo sanguíneo local, antiagregante plaquetario, se produce por los macrófagos activados contribuyendo a la defensa inmunitaria primaria y también actúa como neuromodulador, segundo mensajero y mediador del neurotransmisor excitador glutamato [Moncada y cols., 1991; Czapski y Goldstein, 1995]. Posee una acción antiinflamatoria importante, pero a la vez que promueve la disfunción celular y tisular a través de un efecto proinflamatorio [Grisham y cols., 1999]. Otro efecto del  $\cdot\text{NO}$  reside en su capacidad de reacción con el hierro de proteínas intracelulares, principalmente las mitocondriales, siendo inactivadas por él la mayoría de las enzimas que poseen un grupo prostético hemo. Puede reaccionar con ácidos nucleicos dando lugar a mutaciones y roturas del ADN, y ocasionar necrosis.

El óxido nítrico es a menudo considerado como una “espada de doble filo”. Un exceso de  $\cdot\text{NO}$  es citotóxico. Este  $\cdot\text{NO}$  es poco reactivo y no puede nitrar proteínas irreversiblemente, pero puede reaccionar con otros reactivos intermedios que pueden alterar su función; como la reacción entre  $\cdot\text{NO}$  y el  $\cdot\text{O}_2^-$  donde se forma  $\text{ONOO}^-$ , que es un potente oxidante responsable de gran parte de la toxicidad causada por el  $\cdot\text{NO}$  [Beckman y Ames, 1998; Halliwell y Gutteridge, 1999].

## 2.2. Radical peroxinitrito

El  $\text{ONOO}^-$  se forma *in vivo* por la reacción entre el  $\cdot\text{NO}$  y el  $\cdot\text{O}_2^-$  [Gryglewski y cols., 1986; Radi y cols., 1991; Miles y cols., 1996; Pietraforte y Minetti, 1997](10):



Aunque se haya presentado a la reacción de formación del peroxinitrito como una forma de eliminación de  $\text{O}_2^-$  sin la consiguiente formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  [Granger y Kubes, 1996; Wink y Mitchell, 1998], el  $\text{ONOO}^-$  puede protonarse formando ácido peroxinitroso ( $\text{HONOO}$ ) y éste se descompone con facilidad en  $\cdot\text{OH}$  y dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2$ ), que son muy tóxicos [Janssen y cols., 1993; Lipton y cols., 1993].

El  $\text{ONOO}^-$  también es capaz de inducir la peroxidación lipídica en lipoproteínas, interferir con la señalización celular por nitración de residuos aromáticos en proteínas,

degradar carbohidratos, nitrar y oxidar la guanosina, y fragmentar ADN [Beckmann y cols., 1994; Beckman y Koppenol, 1996]. Todas estas actividades convierten al  $\text{ONOO}^-$  en una molécula con efectos devastadores en la función celular.

### 2.3. Dióxido de nitrógeno

---

El dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2$ ) es un radical libre contaminante producido primariamente a partir de la oxidación del  $\cdot\text{NO}$  atmosférico [Postlethwait y cols., 1995]. Es un iniciador muy efectivo de la cadena de peroxidación lipídica [Halliwell, 1994].

## 3. RADICALES DE ÁTOMOS DERIVADOS DE CARBONO

---

Los radicales centrados en un átomo de carbono ( $\text{R}\cdot$ ) surgen del ataque de un radical oxidante sobre una molécula biológica. En el primer paso se arranca un átomo de hidrógeno de un grupo metileno situado entre dos enlaces dobles. Este tipo de radicales es muy inestable y reacciona rápidamente con el oxígeno, dando lugar a un  $\text{ROO}\cdot$ . A su vez, estos radicales pueden participar en otras reacciones que generan otras especies radicales [Frei, 1994].

## 4. RADICALES DE ÁTOMOS DERIVADOS DE AZUFRE

---

Los átomos de azufre también pueden ser el centro de un radical libre ( $\text{RS}\cdot$ ) formado, por ejemplo, a partir de la cisteína. Ésta se autooxida con facilidad dando lugar a la formación de radicales tiilo e hidroxilo [Estrela y cols., 1983; Sparrow y Olszewski, 1993].

## FORMACIÓN DE LOS RADICALES LIBRES EN LOS SERES VIVOS

---

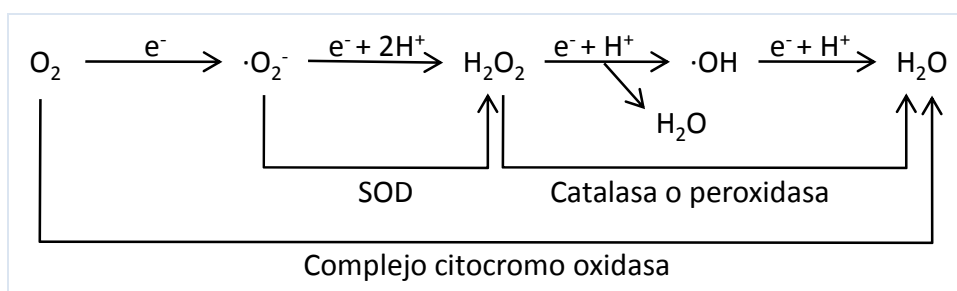
Los radicales libres pueden ser de origen endógeno o exógeno [Freeman y Crapo, 1982; Frei, 1994].

## 1. FUENTES ENDÓGENAS DE RADICALES LIBRES

### 1.1. Cadena de transporte de electrones mitocondrial

Los organismos aerobios utilizan el oxígeno como aceptor de electrones durante el proceso de la respiración mitocondrial para acumular energía en forma de adenosín trifosfato (ATP). En la mitocondria se produce la oxidación de los ácidos grasos y el ciclo del ácido cítrico, que producen la forma reducida de nicotinamida adenín-dinucleótido (NADH) y de flavín adenín-dinucleótido (FADH<sub>2</sub>). Estas moléculas, a su vez, transfieren electrones a la cadena respiratoria, un sistema formado por complejos enzimáticos que catalizan una cadena de reacciones redox acopladas utilizando al oxígeno como aceptor final de electrones, con la finalidad última de obtener la energía necesaria para convertir el adenosín difosfato (ADP) en ATP. En la respiración mitocondrial es inevitable la formación de subproductos a partir del oxígeno, radicales libres [Yu, 1994]. Este hecho es conocido como “la paradoja del oxígeno”, ya que el mismo oxígeno imprescindible para la vida en los organismos aerobios la quita. La mitocondria es la principal fuente de especies reactivas como:  $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{NO}$  y  $\text{ONOO}^-$ .

Debido a las propiedades del oxígeno, su reducción tetravalente requiere la transferencia sucesiva de 4 electrones al orbital  $\pi$  antienlazante, generando tres intermedios “parcialmente reducidos” entre éste y el agua: el primero es el  $\cdot\text{O}_2^-$ , resultante de la reducción molecular del oxígeno con un electrón; el segundo es el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , resultante de la adición de un segundo electrón y dos protones; el tercero es el  $\cdot\text{OH}$ , resultante de la incorporación de un tercer electrón y un protón. El cuarto electrón y otro protón generan la molécula de agua (figura 3).



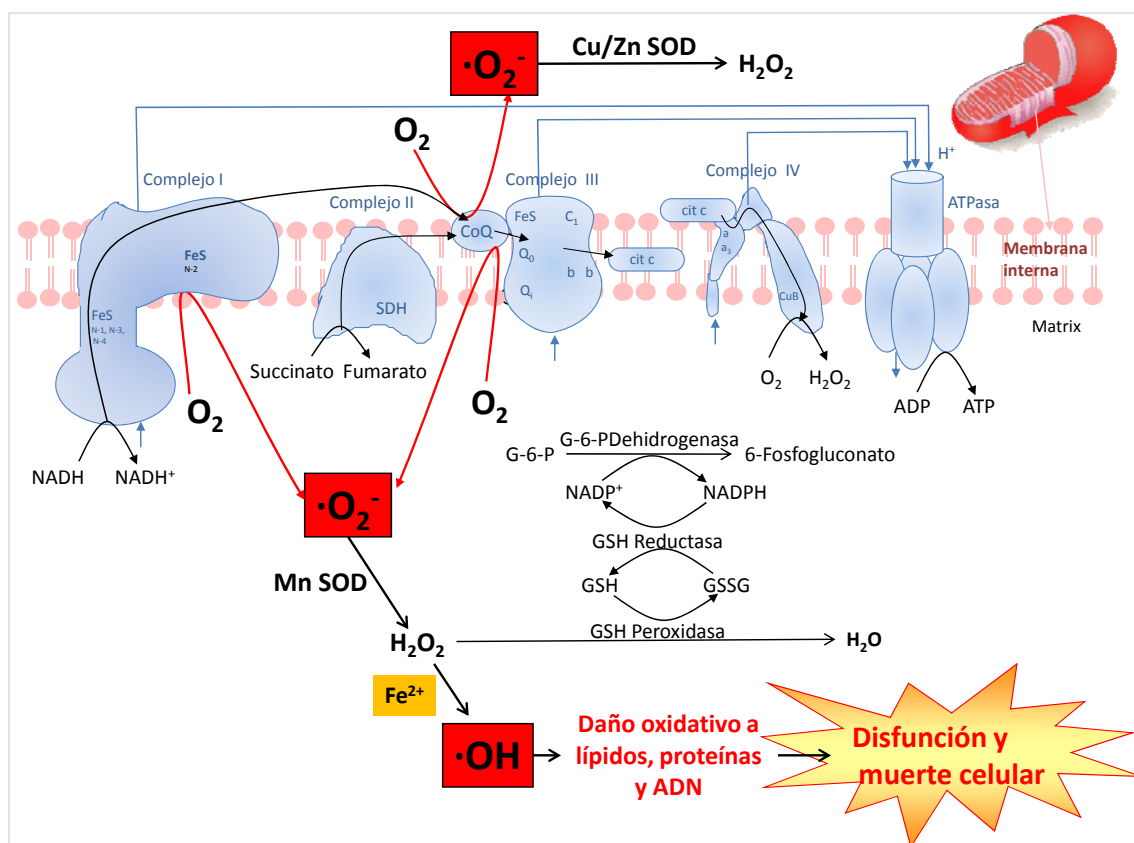
**Figura 3.** Reducción del oxígeno para formar agua. SOD: Superóxido dismutasa.

La cadena de transporte electrónico mitocondrial está formada por complejos situados en la membrana interna mitocondrial que se denominan del I al IV, aunque a la enzima ATP-sintasa a veces se le denomine complejo V.

El citocromo  $a_3$  del complejo IV de la cadena respiratoria es capaz de mantener estrechamente unidas a su centro activo todas las especies parcialmente reducidas del oxígeno hasta que se completa la transferencia de 4 electrones y 4 protones al  $O_2$  y con ello la formación de  $H_2O$  [Benzi y Moretti, 1995]. Por tanto, la citocromo C oxidasa perteneciente al complejo IV de la cadena respiratoria no produce este radical. Además, exhibe cierta actividad superóxido dismutasa.

Sin embargo hay elementos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, como los complejos I (NADH-coenzima Q reductasa) y III (citocromo C oxidasa), que tienen la capacidad de transferir un electrón directamente al  $O_2$ , aunque no siempre sean capaces de retener el  $\cdot O_2^-$  formado especialmente cuando el flujo de electrones es lento [Cross y Jones, 1991; Benzi y Moretti, 1995]. En el estado controlado y altamente reducido, estado 4 (cuando todo el ADP está en forma de ATP), el 2 % de los electrones transportados por la cadena de transporte electrónico mitocondrial no llegan al complejo IV y producen la reducción parcial del oxígeno, liberando  $\cdot O_2^-$ ; y en el estado activo y más oxidado, estado 3, la producción de radicales libres es mínima (0,1%) [Boveris y cols., 1972; Cadenas y cols., 1977; Frei, 1994]. En el caso del complejo I, el candidato más probable como generador de radicales libres parece ser el centro hierro-sulfurado  $N_2$  que generan superóxido como resultado de la autooxidación de la flavinsemiquinona asociada a este complejo [Turrens y Boveris, 1980; Herrero y Barja, 1997; Genova y cols., 2004], mientras que en el caso del complejo III se ha debatido intensamente sobre si podrían corresponder a la autooxidación de la ubisemiquinona [Boveris y cols., 1976] o al citocromo b [Nohl y Jordan, 1986] (figura 4).





**Figura 4.** Formación de radicales libres en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. SOD: Superóxido dismutasa, SDH: Succinato deshidrogenasa, cit c: Citocromo c, CoQ: Coenzima Q, GSH: Glutatión reducido, G-6-P: Glucosa 6 fosfato.

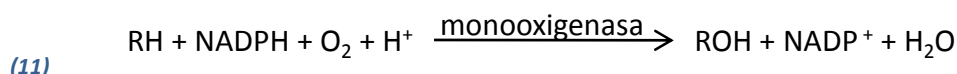
Así pues, se produce  $\cdot\text{O}_2^-$ , que a través de la reacción catalizada por la superóxido dismutasa genera  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que atraviesa las membranas y sale al citoplasma, donde puede reaccionar con otras especies formando diversos tipos de radicales libres [Boveris y cols., 1972]. La producción mitocondrial de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue inicialmente descrita por Jensen [1966]. Estudios posteriores demostraron que la mayor parte del peróxido de hidrógeno mitocondrial, procedía de la dismutación del  $\cdot\text{O}_2^-$  [Boveris y Cadenas, 1975]. Se ha estimado que se producen del orden de  $10^{10}$  moléculas de  $\cdot\text{O}_2^-$  por célula y día [Ames y cols., 1993]. Los procesos de formación de  $\cdot\text{O}_2^-$  son una serie de reacciones no enzimáticas cuya velocidad aumenta linealmente con la concentración de  $\text{O}_2$  presente en el medio.

## 1.2. Citocromo $\text{P}_{450}$

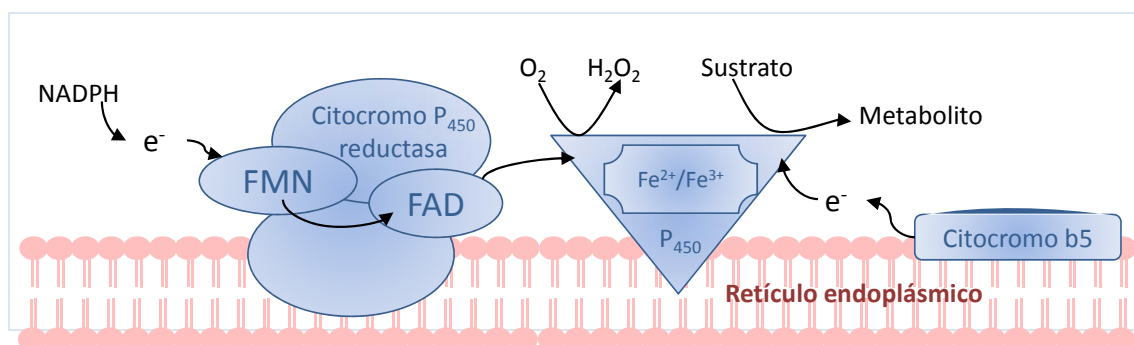
El citocromo  $\text{P}_{450}$  es una familia de hemoproteínas presentes en numerosas especies, desde bacterias a mamíferos, y de las que ya se han identificado más de 2000

isoformas diferentes. En el hombre, están ampliamente distribuidos por todo el organismo, especialmente hígado e intestino, que poseen uno o más de estos citocromos y se localizan en varias organelas, aunque principalmente en el retículo endoplásmico y en las mitocondrias. El hepatocito posee una importante cantidad de citocromo P<sub>450</sub> puesto que una de sus principales funciones es la detoxificación de sustancias endógenas, por lo tanto, ésta supone también una importante fuente de radicales libres en la célula.

Salvo excepciones, el P<sub>450</sub> cataliza reacciones de monooxigenación (11) que requieren oxígeno molecular y NADPH para oxidar el sustrato, pero sólo uno de los átomos de oxígeno es incorporado en la molécula del sustrato, mientras que el otro es reducido hasta agua, por eso se denominan también monooxigenasas u oxidasas mixtas.



Los citocromos P<sub>450</sub> pueden clasificarse en cuatro clases en función de cómo acceden los electrones desde el NADPH hasta el centro catalítico del enzima [Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000]: Las proteínas de clase I se encuentran asociadas a la membrana interna de la mitocondria y utilizan una reductasa que contiene FAD y una ferrosulfoproteína (ferridoxina). Las de clase II usan una cadena de transferencia de electrones más corta y sólo necesitan una reductasa del citocromo P<sub>450</sub> que contiene FAD/FMN para la transferencia de electrones. El citocromo P<sub>450</sub> y las NADPH-citocromo-P<sub>450</sub>-reductasas no están asociados y ambos están anclados de forma independiente en la cara externa de la membrana del retículo endoplásmico (figura 5). La actividad del citocromo P<sub>450</sub> se ve favorecida por la presencia de citocromo b5 que facilita la transferencia de electrones desde el NADH [Vergeres y Waskell, 1995]. Las de clase III son autosuficientes y no requieren un donante de electrones. Finalmente las de clase IV, que sólo se han identificado en hongos y reciben los electrones directamente del NADPH.



**Figura 5.** Localización del sistema citocromo  $P_{450}$  en la membrana del retículo endoplásmico  
 FMN: Flavín mononucleótido, FAD: Flavín adenín dinucleótido.

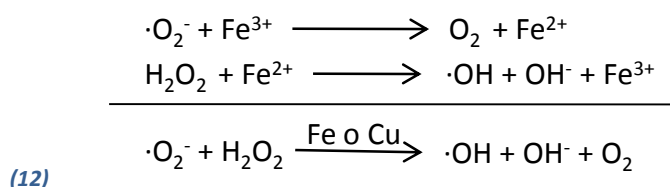
La NADPH-citocromo- $P_{450}$ -reductasa canaliza un flujo de electrones desde el NADPH hasta el citocromo  $P_{450}$ . En ocasiones, los electrones son cedidos por el NADH mediante la actividad de la NADH-citocromo  $b_5$ -reductasa. El centro catalítico de los  $P_{450}$  es el átomo de hierro hexacoordinado (con los 4 anillos de la protoporfirina IX, con el grupo tiol de un residuo de cisteína de la cadena polipeptídica y con el solvente, normalmente agua). El primer paso del proceso catalítico consiste en la unión del sustrato al citocromo  $P_{450}$  oxidado ( $Fe^{3+}$ ). En el segundo paso se produce la reducción, por la reductasa, del complejo hemoproteína-sustrato al estado ferroso, el  $Fe^{3+}$  del grupo hemo pasa a  $Fe^{2+}$ . El tercer paso es la unión del oxígeno molecular para formar un complejo oxicitocromo  $P_{450}$ ,  $O_2$ - $P_{450}$ - $Fe^{2+}$ -sustrato; dicho complejo puede disociarse, dando lugar a un  $\cdot O_2^-$ , regenerándose la hemoproteína férrica,  $P_{450}$ - $Fe^{3+}$ -sustrato. Además el complejo recibe un segundo electrón para formar sucesivamente otros complejos, de modo que en definitiva un átomo de oxígeno es transferido al sustrato para oxidarlo y el otro reacciona con dos protones para formar agua; el sustrato oxidado queda liberado y el citocromo  $P_{450}$  se regenera en forma férrica. El resultado final sería la hidroxilación de diversos sustratos endógenos y exógenos. Mediante dichas reacciones se consigue que muchas sustancias tóxicas sean más hidrosolubles facilitando su eliminación por orina y bilis.

Sin embargo, se ha propuesto la formación de  $\cdot O_2^-$  por el citocromo  $P_{450}$  [Koop, 1992; Goepfert y cols., 1995]. El desacoplamiento del ciclo catalítico del  $P_{450}$  se produce cuando los electrones del cofactor NADPH son consumidos sin formación de metabolitos oxidados. Esto ocurre cuando a) el intermediario  $Fe^{2+}$ - $O_2$  se autooxida liberando anión superóxido y regenerando el enzima en estado férrico; b) el

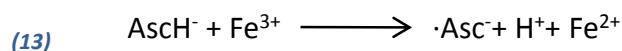
intermediario  $\text{Fe}^{3+}$ -hidroperóxido se disocia en una molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y enzima férrico; o c) la especie  $\text{Fe}=\text{O}$  en lugar de oxidar el sustrato es reducida a una molécula de agua por transferencia adicional de electrones [Ortiz de Montellano y De Voss, 2002].

### 1.3. Reacciones de Fenton y Haber-Weiss

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es una molécula relativamente estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición. Sin embargo, en presencia de iones de metales de transición, sobre todo hierro, y en menor medida cobre y otros iones, puede interaccionar con ellos por medio de una reacción de oxirreducción: las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (12). En éstas el  $\cdot\text{O}_2^-$  reduce al metal, y éste al peróxido de hidrógeno, dando lugar a la formación del  $\cdot\text{OH}$  y el anión hidroxilo. El metal no se consume en el proceso actuando sólo como catalizador del mismo.



La necesidad de la presencia de metales de transición en la reacción de Fenton convierte al hierro y al cobre (los más abundantes en los sistemas biológicos) en agentes esenciales como catalizadores del daño oxidativo. El Fe (II) se oxida a Fe (III) con mucha facilidad, y éste es muy insoluble. Además los procesos de captación y distribución del hierro, y de los iones metálicos en general, están muy finamente regulados en los mamíferos que contienen un gran número de proteínas de unión a metales: ferritina, transferrina, ceruloplasmina, etc., actuando como reserva de iones metálicos y, además, impidiendo que estos iones participen en reacciones redox [Halliwell, 1991; Rouault y Klausner, 1996]. Por ello, el hierro libre en los sistemas biológicos está en muy pequeñas cantidades y en forma férrica [Halliwell y Gutteridge, 1986]. El verdadero papel del  $\cdot\text{O}_2^-$  en las reacciones de Fenton y Haber-Weiss es el de actuar como reductor del hierro. Sin embargo, el ion férrico puede a su vez, ser reducido por el ascorbato ( $\text{AscH}^-$ ), oxidándose éste a radical ascorbilo ( $\cdot\text{Asc}$ ) (13) con lo que se genera un ciclo de producción continua de  $\cdot\text{OH}$  [Rowley y Halliwell, 1983a; Sawyer, 1988].



#### 1.4. NAD(P)H oxidasas

Se asocian con la membrana plasmática un gran número de oxidorreductasas que utilizan NADH o NADPH como donantes de electrones y como aceptor final de electrones el  $\text{O}_2$ , cuya reducción conlleva la formación de  $\cdot\text{O}_2^-$  [Moldovan y Moldovan, 2004]. El sistema mejor conocido es la NADPH oxidasa presente en los fagocitos activados (neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos) junto con la mieloperoxidasa.

Al encontrarse con un agente infeccioso, los fagocitos experimentan un aumento muy acusado de su consumo de oxígeno llamado “estallido respiratorio”. Dicho consumo ocurre principalmente en la membrana plasmática donde se encuentra un complejo enzimático, la NADPH oxidasa, que consta de diversas subunidades: gp91 y p22 (subunidades del citocromo b558 en la membrana), y p40, p47 y p67 (subunidades citoplasmáticas) y la pequeña proteína rac1 que se une al trifosfato de guanosina (GTP). La translocación de las subunidades citosólicas reguladoras a la membrana celular es un prerrequisito para la activación de la enzima y la subsiguiente producción de  $\cdot\text{O}_2^-$ . Si bien la interacción del p67 con el citocromo b558 es esencial para el flujo de electrones desde la NADPH al  $\text{O}_2$  para formar  $\cdot\text{O}_2^-$ , tanto el rac1 como el p47 sirven como transportadores para el p67 hacia la membrana.

El contacto entre el receptor CD35 y su ligando C3b, inicia en el fagocito una serie de señales en las que participan proteínas G (GTPasas), tirosinquinasa y fosofolipasa C, entre otros componentes. El consecuente aumento del calcio intracelular, las señales mediadas por inositoltrifosfato (IP3), y la PKC activan finalmente a la NADPH oxidasa, fosforilando a sus subunidades citosólicas [Hoyal y cols., 1998; Iles y Forman, 2002]. Estas subunidades fosforiladas, se translocan a la cara interna de la membrana, proceso promovido por rac1, donde interaccionan con el citocromo b558 (gp91 y p22) y lo activan (figura 6). El citocromo b558 activado utiliza el  $\text{O}_2$  extracelular para producir  $\cdot\text{O}_2^-$ . Éste puede reducirse por la SOD, hasta  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el cual sirve como precursor de la generación de  $\cdot\text{OH}$  [Moslen, 1994].

La mieloperoxidasa incrementa notablemente la actividad microbicida del  $\text{H}_2\text{O}_2$  dado que en presencia de haluros, generalmente cloruro, se oxida para formar el ácido hipocloroso (HOCl).

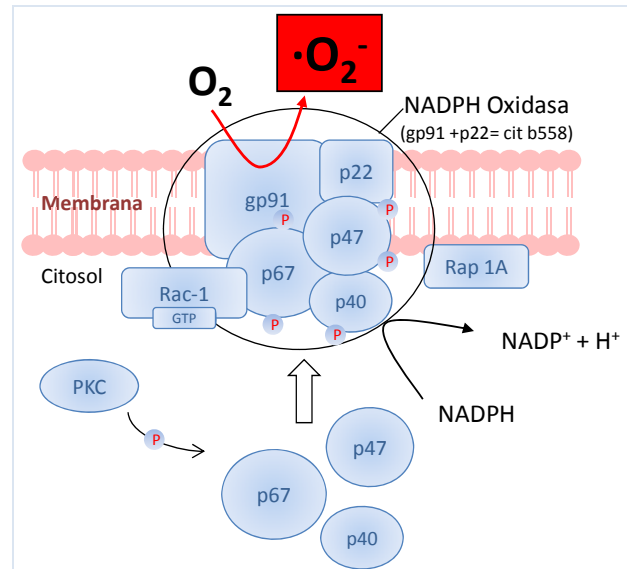


Figura 6. Activación de la NADPH oxidasa. PKC: proteínaquinasa C.

El  $\cdot\text{OH}$  y  $\text{HClO}$  son formados por la NADPH oxidasa y la mieloperoxidasa en los fagocitos activados como un mecanismo para combatir a los microorganismos [Babior, 1978]. Sin embargo, esta función defensiva también tiene su contrapartida ya que estos radicales pueden atacar y dañar los tejidos sanos circundantes, hecho que se ha implicado en la etiopatogenia de algunas enfermedades con base inmunológica como la artritis reumatoide [Babior, 1978; Moslen, 1994].

El papel del  $\cdot\text{O}_2^-$  producido en las células no fagocíticas es menos conocido, pero se asocia con procesos celulares esenciales como la proliferación y la apoptosis [Lambeth, 2002].

### 1.5. Xantina oxidasa

La xantina deshidrogenasa es una metaloflavoenzima compleja que participa en el metabolismo de las purinas, oxidando la hipoxantina a xantina y ésta a ácido úrico. En su forma deshidrogenasa no produce radicales libres, ya que emplea el  $\text{NAD}^+$  como aceptor de electrones [Saugstad, 1990; Kinnula y cols., 1995], pero en condiciones de hipoxia, isquemia, y otras situaciones de déficit energético, algunas proteasas

citósolicas se activan por el aumento del calcio intracelular y catalizan la conversión de xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa [Granger y cols., 1981]. En su forma oxidasa, esta enzima emplea oxígeno molecular como aceptor de electrones produciendo radicales libres [Radi y cols., 1992]. En hipoxia, la xantina deshidrogenasa, encargada de metabolizar la hipoxantina para dar xantina, pasa a xantina oxidasa y, como no hay oxígeno disponible, la hipoxantina se va acumulando sin poder ser oxidada. Al producirse la reoxigenación la xantina oxidasa, utilizando la hipoxantina por un lado y por otro el oxígeno molecular, aportado en la reperfusión, cataliza la formación de grandes cantidades de  $\cdot\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  [Granger y cols., 1981; Saugstad, 1990].

#### 1.6. Óxido nítrico sintasa

---

Una familia de enzimas denominadas NOS catalizan la conversión de L-arginina a L-citrulina y óxido nítrico [Andrew y Mayer, 1999; Cosentino y Luscher, 1999]. La NOS posee dos dominios catalíticos. 1) El de actividad reductasa que está ubicado en la mitad C-terminal de la enzima y presenta los sitios de unión para los cofactores NADPH, FAD y FMN. Las flavinas FAD y FMN están encargadas del traslado de electrones desde el cofactor NADPH al grupo hemo. 2) El dominio de actividad oxidasa que contiene un grupo hemo ubicado en la mitad N-terminal de la proteína, y determina la oxidación de la L-arginina. Ambos dominios se hallan separados por un sitio de unión para la calmodulina. De esta manera un terminal guanidino nitrogenado de la arginina incorpora 5 electrones oxidándose, en una reacción que es sustentada por la NADPH reducida y las flavinas FMN y FAD. La tetrahidrobiopterina (BH4) y el tiol constituyen cofactores adicionales de la NOS [White y Marletta, 1992; Vanhoutte, 1997; Cosentino y Luscher, 1998; 1999; Heymes y cols., 1999]. El flujo de electrones se establece desde la NADPH hasta el hierro del grupo hemo. La transferencia de electrones requiere la fijación de calmodulina a la NOS. Existen tres isoformas de NOS: La neuronal (nNOS) y la endotelial (eNOS) se expresan constitutivamente y su actividad está regulada por la concentración intracelular de calcio [Bredt y cols., 1991; Lamas y cols., 1992]. La inducible (iNOS) la expresan los macrófagos cuando son estimulados por citoquinas, lipopolisacáridos u otros antígenos, siendo su expresión regulada tanto a nivel transcripcional como posttranscripcional, en lo cual participan factores de

transcripción sensibles al estado redox como el NF- $\kappa$ B o las quinasas activadas por mitógenos (MAPk) [Moncada y Higgs, 1991; Yui y cols., 1991; Lowenstein y Snyder, 1992; MacMicking y cols., 1997].

#### 1.7. $\beta$ -oxidación de ácidos grasos

---

Los microsomas, también denominados peroxisomas realizan la metabolización de ácidos grasos o  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos con una longitud de cadena de 24 o más carbonos, así como la de fenoles, formaldehidos y alcoholes, requiriendo la presencia de O<sub>2</sub> y generando grandes cantidades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [Boveris y cols., 1972; Beckman y Ames, 1998]. Esta fuente tiene gran importancia en el hepatocito, ya que dispone de grandes peroxisomas responsables del metabolismo de los ácidos grasos así como de otras sustancias tóxicas, entre las que destaca el acetaldehído procedente de la oxidación del etanol [Halliwell y Gutteridge, 1999].

#### 1.8. Ciclooxigenasa

---

La síntesis de prostaglandinas normalmente implica la producción de  $\cdot$ OH como consecuencia de la actividad ciclooxigenasa; éstos participan en la cascada del ácido araquidónico, inhibiendo la propia ciclooxigenasa por una retroalimentación negativa, y favoreciendo por tanto la ruta metabólica proagregante del tromboxano A<sub>2</sub> frente a la ruta antiagregante y vasodilatadora de la prostaciclina.

#### 1.9. Autooxidación de monoaminas

---

Las aminooxidasas oxidan las monoaminas formando radicales libres. Los mecanismos de formación de éstos en estas vías metabólicas se han implicado en la etiopatogenia de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson [Fahn y Cohen, 1992; Chiueh y cols., 1993].

#### 1.10. Otras enzimas

---

La lipooxigenasa y la ciclooxigenasa son enzimas asociadas a la membrana plasmática que participan en el metabolismo del ácido araquidónico, generando radicales libres durante su ciclo de catálisis [Freeman y Crapo, 1982; Frei, 1994]. Otra



fuente en la mitocondria son las enzimas dependientes de NADH. La interacción de algunos metales, los hidroperóxidos o el  $^1\text{O}_2$  con ellas, produce su alteración y provoca el envejecimiento mitocondrial [Bindoli, 1988].

## 2. FUENTES EXÓGENAS DE RADICALES LIBRES

Muchos agentes antineoplásicos [Deno y cols., 1982], tales como la adriamicina, bleomicina, daunorrubicina y algunos antibióticos que dependen de grupos quinoides o de unión a metales para su actividad son fuente de radicales libres. Algunos de los efectos de estas drogas se han atribuido a su capacidad para reducir el oxígeno a  $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\cdot\text{OH}$ . También la irradiación de los organismos debido a las radiaciones (rayos X y  $\gamma$ ) o debido a radiaciones de partículas (electrones, protones, neutrones, deuterones y partículas  $\alpha$  y  $\beta$ ) y los factores ambientales, como los contaminantes aéreos fotoquímicos, la hiperoxia, los pesticidas, humo del tabaco, solventes, anestésicos e hidrocarburos aromáticos. Estos agentes, o bien poseen radicales libres, como el humo del tabaco, o bien se convierten en radicales libres mediante la biotransformación en la que actúan enzimas con actividad monooxigenasa, como el citocromo  $\text{P}_{450}$  o la flavín monooxigenasa, diversas oxidasas (alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, amino oxidasas, aromatasas), la epóxido hidrolasa o esterasas y amidasas hepáticas y plasmáticas [Halliwell y Gutteridge, 1989; Philpot, 1991].

## MECANISMOS DE PROTECCIÓN

La atmósfera de nuestro planeta fue anaerobia hasta la aparición del oxígeno hace unos 2.500 millones de años, como resultado de la rotura del agua en el proceso fotosintético de unas algas microscópicas cianofíceas. El oxígeno molecular, vital para la existencia de los organismos aerobios, es inherentemente tóxico dada su capacidad de formación de radicales libres. Para sobrevivir en este ambiente aerobio poco favorable, los organismos vivos desarrollaron una serie de mecanismos de defensa antioxidante. La célula posee también la capacidad de sintetizar sistemas reparadores/eliminadores de las proteínas, lípidos y ADN dañados.

## ANTIOXIDANTES

En 1995 Halliwell los definió como “cualquier sustancia que, en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato” [Halliwell y cols., 1995]. Desde un punto de vista bioquímico, los radicales libres se clasifican en enzimáticos y no enzimáticos. Los primeros son proteínas de peso molecular elevado, que minimizan el daño oxidativo catalizando reacciones químicas. Los antioxidantes no enzimáticos son moléculas pequeñas que reaccionan directamente con los radicales libres, evitando que ejerzan su acción tóxica sobre lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. En este contexto de moléculas antioxidantes no enzimáticas se debe incluir a la melatonina, objeto de estudio de este trabajo de investigación, que se tratará en detalle más adelante. Las principales características de varias moléculas antioxidantes presentes en el ser vivo en condiciones fisiológicas se resumen en la tabla 2.

## SISTEMAS REPARADORES

Aunque en sentido estricto no deben ser consideradas como antioxidantes, ya que no eliminan radicales libres, hay una serie de enzimas que participan en los procesos de reparación de biomoléculas dañadas por ellos. Se ha demostrado que la peroxidación lipídica estimula la fosfolipasa A<sub>2</sub>, y también que las formas peroxidadas de los fosfolípidos son el sustrato preferido de la fosfolipasa A<sub>2</sub> [Halliwell y Gutteridge, 1990], por lo tanto la fosfolipasa A<sub>2</sub> degrada los fosfolípidos oxidados de la membrana [Dempsey y Halbrook, 1983; Sevanian y Kim, 1985; Dizdaroglu, 1993]. También podemos destacar las enzimas reparadoras de ADN, la metionina sulfóxido reductasa, y las enzimas proteolíticas intracelulares, que actúan degradando proteínas dañadas oxidativamente evitando su acumulación [Davies y cols., 1986; Giulivi y Davies, 1990].

Tabla 2. Resumen de los principales antioxidantes biológicos.

Antioxidantes enzimáticos			
Antioxidante		Localización	Acción
<b>Superóxido dismutasas</b> SOD (EC1.15.1.1)	Cu/Zn SOD	Citosol, núcleo y lisosomas	Catalizan dismutación de $\cdot\text{O}_2^-$ a $\text{H}_2\text{O}_2$ [McCord y Fridovich, 1969; Fridovich, 1974]
	Mn SOD	Mitocondria	
	Extracelular SOD	Plasma	
<b>Catalasa o hemoperoxidasa</b> (EC1.11.1.6)		Peroxisomas y citosol	Cataliza depuración de $\text{H}_2\text{O}_2$ , reduce hidroperóxidos de metilo y etilo [Chance y cols., 1979; Bai y Cederbaum, 2001]
<b>Glutación peroxidasa</b> GPx (EC1.11.1.9)		Intracelular	Cataliza reducción de $\text{H}_2\text{O}_2$ y otros hidroperóxidos [Mills, 1957]
<b>Glutación reductasa</b> GR EC1.6.4.2)		Intracelular	Regenera el GSH a partir del GSSG [Hopkins y Elliott, 1931]
<b>Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa</b> (EC1.1.1.49)		Intracelular	Fuente de NADPH
Antioxidantes no enzimáticos			
Antioxidante		Localización	Acción
<b>Glutación</b> GSH	Intracelular, alveolos	Sustrato de la GPx, reacciona con $\cdot\text{OH}$ , $\cdot\text{O}_2^-$ y radicales libres orgánicos, regenera la vitamina C [Martensson y Meister, 1991; Meister, 1992; 1994]	
<b>Coenzima Q</b>	Cadena de transporte electrónico mitocondrial	Protege frente a la peroxidación lipídica, regenera vitamina E [Do y cols., 1996]	
<b>Vitamina E</b>	Membranas lipídicas y lipoproteínas plasmáticas	Depura $\cdot^1\text{O}_2$ , $\cdot\text{O}_2^-$ , $\cdot\text{OH}$ , $\cdot\text{NO}$ y $\text{RO}\cdot$ [Ohki y cols., 1984; Escames y cols., 1997; Siu y cols., 1998; Halliwell y Gutteridge, 1999; Siu y cols., 1999], detiene la peroxidación lipídica y quela hierro [Zimmer y cols., 1993]	
<b>Vitamina C</b>	Fluidos intra- y extra-celulares	Depura $\cdot\text{O}_2^-$ , $\text{H}_2\text{O}_2$ , $\cdot\text{OH}$ , $\cdot^1\text{O}_2$ y $\cdot\text{NO}$ formando radical semidehidroascorbato, [Niki, 1991; Meister, 1992; Ghosh y cols., 1997; Mendiratta y cols., 1998; Chen y cols., 2000; Zhang y Omaye, 2000] contribuye a la regeneración de la vitamina E [May y cols., 1998].  Actúa como prooxidante cuando reduce $\text{Fe}^{3+}$ a $\text{Fe}^{2+}$ y éste cataliza la reacción de Fenton-Haber-Weiss generando $\cdot\text{OH}$ [Fukuzawa y cols., 1981; Samuni y cols., 1983; Sahu y Washington, 1991; 1992; Buettner y Jurkiewicz, 1996; Gerster, 1999].	
<b>Ácido úrico</b>	Amplia distribución	Depura $\cdot\text{OH}$ , $\cdot^1\text{O}_2$ , $\text{HClO}$ y $\text{ROO}\cdot$ [Ames y cols., 1981], quela metales de transición [Davies y cols., 1986]	
<b>Quelantes:</b> transferrina, ceruloplasmina, ferritina, lactoferrina, hemopexina, hemosiderina, EDTA y desferroxamina		Quelan metales de transición [Bates y Schlabach, 1973; Kanner y cols., 1987; Ehrenwald y Fox, 1994; Yu, 1994].	
<b>Bilirrubina</b>	Sangre, tejidos	Antioxidante que rompe reacciones en cadena, reacciona con $\text{ROO}\cdot$ y $\cdot^1\text{O}_2$ [Neuzil y Stocker, 1993]	
<b><math>\beta</math>-caroteno</b>	Membranas lipídicas	Depura $\cdot\text{O}_2^-$ , $\text{ROO}\cdot$ y $\cdot^1\text{O}_2$ [Rousseau y cols., 1992; Regnault y cols., 1993; Telfer y cols., 1994; Biesalski y cols., 1996]	
<b>Flavonoides</b>	Exógenos	Reaccionan con $\text{ROO}\cdot$ , $\cdot\text{OH}$ y el $\cdot\text{O}_2^-$ , formando el radical fenoxi [Rice-Evans y cols., 1995; Rice-Evans y Miller, 1996]	
<b>Glucosa</b>	Amplia distribución	Depura $\cdot\text{OH}$ [Yu, 1994]	
<b>Cisteína</b>	Amplia distribución	Reduce compuestos orgánicos donando electrones del sulfidrilo [Yu, 1994]	
<b>Melatonina</b>	Citosol, núcleo, mitocondria, membranas, plasma	Potente antioxidante. Depura $\cdot\text{OH}$ , $\cdot\text{O}_2^-$ , $\text{H}_2\text{O}_2$ , $\text{NO}\cdot$ , $\text{HClO}$ , $\text{ONOO}\cdot$ . Activa enzimas antioxidantes e inhibe enzimas productoras de radicales libres [Reiter y cols., 2003a]	

## FISIOPATOLOGÍA DE LOS RADICALES LIBRES

El estrés oxidativo producido por los radicales libres ha sido implicado en la patogénesis de una gran variedad de enfermedades en el ser humano [Davies, 1995].

### FUNCIONES DE LOS RADICALES LIBRES

Aunque los radicales libres son subproductos tóxicos del metabolismo celular, existen evidencias de su necesidad para el desarrollo adecuado de la función celular [Aslan y Ozben, 2003; Chiarugi y cols., 2003; Nathan, 2003]. Los radicales libres participan, como moléculas señalizadoras, en la regulación del crecimiento celular y en las respuestas adaptativas. Estímulos extracelulares, por citoquinas y factores de crecimiento, producen un estallido transitorio de radicales libres en células de mamíferos. La señal de transducción inducida por el factor de crecimiento derivado de plaquetas y la transcripción génica inducida por citoquinas, se inhiben cuando se evita el incremento de la concentración de radicales libres, mediante su eliminación por agentes químicos o enzimáticos [Dalle-Donne y cols., 2001].

Los radicales de oxígeno pueden actuar como segundos mensajeros, ya que su concentración se eleva por acción de un ligando extracelular. Todos ellos activan una forma citoplasmática del factor de transcripción NF- $\kappa$ B que resulta al eliminar una subunidad proteica inhibidora, I $\kappa$ B. El factor de transcripción NF- $\kappa$ B es un complejo multiproteico que regula una gran variedad de genes relacionados con la inmunidad, la inflamación y el cáncer. Esta activación se inhibe por agentes que eliminan radicales de oxígeno y puede recuperarse por exposición a un débil estrés oxidativo.

Desde los años 90 varios estudios apuntan que una pequeña cantidad de oxidantes tales como el peróxido de hidrógeno juegan un papel crucial como segundo mensajero en la transducción de señal para la activación, diferenciación y proliferación celular [Schreck y cols., 1992]. La inducción o inhibición de la proliferación celular por lo tanto parece ser dependiente de los niveles de oxidantes/antioxidantes en la célula. Un ambiente reducido estimula la proliferación, sin embargo un ligero cambio hacia un ambiente oxidado induce la apoptosis o necrosis en las células. En líneas generales, la

apoptosis es inducida por un estímulo moderado de oxidantes y la necrosis por un efecto oxidante intenso.

## CONCEPTO DE ESTRÉS Y DAÑO OXIDATIVO

La generación de radicales libres, en organismos sanos, está relativamente equilibrada con sus sistemas de defensa antioxidante, pero cuando el equilibrio se desplaza hacia la formación de radicales libres, se genera estrés oxidativo. Éste se define como una alteración del equilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras [Sies y Mehlhorn, 1986]. Así pues, puede originarse por un exceso de sustancias prooxidantes (exposición a radiación ionizante, radiación ultravioleta (UV) intensa, toxinas, estrés psicológico o físico, y ciertas patologías), por una deficiencia de agentes antioxidantes (sistemas enzimáticos deficientes en recién nacidos, envejecimiento,...), o por ambos factores a la vez. La acción de radicales libres sobre los constituyentes estructurales celulares produce una agresión interna continuada, que amenaza a la integridad de todas las biomoléculas. Las consecuencias patológicas dependerán entonces del tipo de constituyente celular que se vea más dañado.

### 1. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

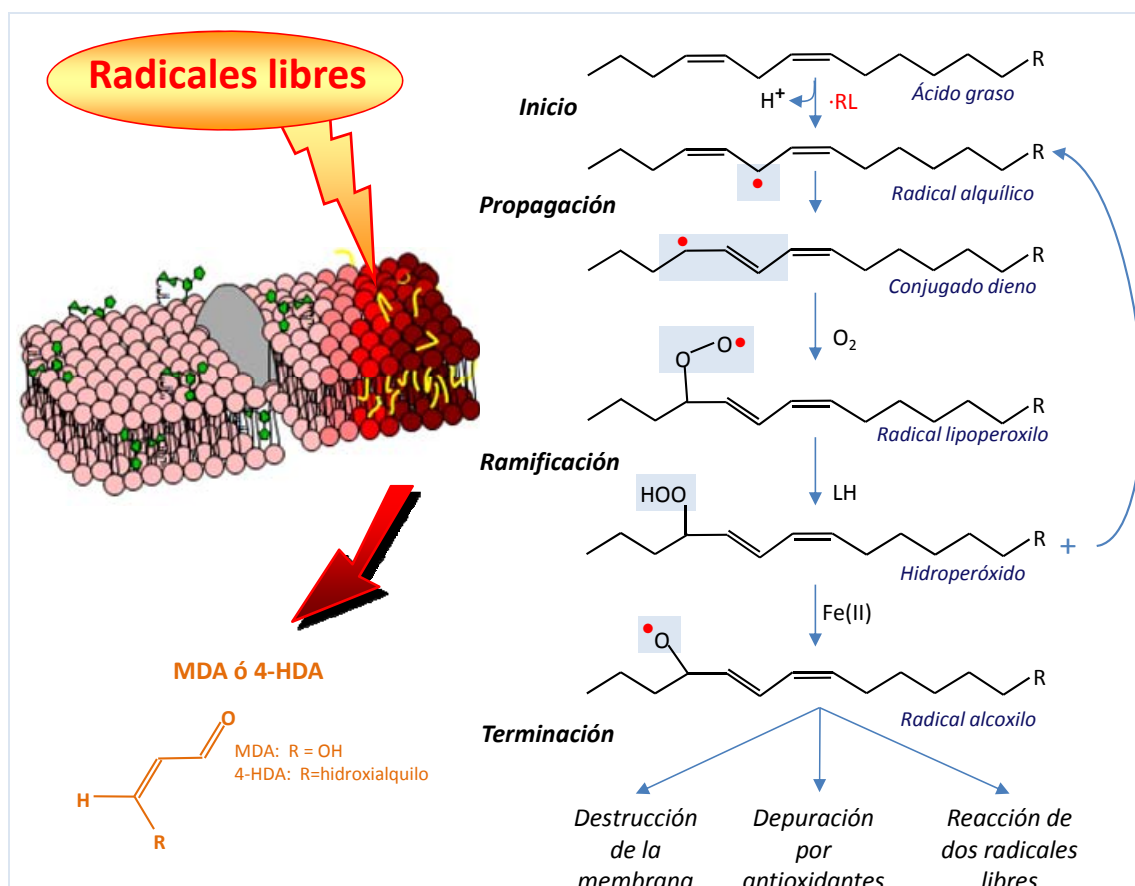
Los lípidos, el componente más abundante molecularmente de las membranas biológicas, son las biomoléculas más susceptibles de ser atacadas por radicales libres, especialmente aquéllos que poseen mayor número de dobles enlaces en su molécula, es decir, los ácidos grasos poliinsaturados [Cheeseman y Slater, 1993; Gutteridge, 1995]. Los radicales libres que pueden iniciar esta reacción son  $\cdot\text{OH}$ ,  $^1\text{O}_2$ , el ozono,  $\text{RO}\cdot$  y  $\text{ROO}\cdot$  [Kanner y cols., 1987; Halliwell, 1990]. El proceso de ataque oxidativo a los lípidos se denomina peroxidación lipídica.

La reacción de la peroxidación lipídica comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, y se extrae un átomo de hidrógeno. Esta reacción se produce significativamente en los carbonos contiguos a dobles enlaces de ácidos grasos poliinsaturados, ya que los radicales formados se

estabilizan por resonancia con el doble enlace del resto acilo, formando conjugados dienos. Este radical centrado en un átomo de carbono reacciona con el  $O_2$  y forma un  $ROO\cdot$  y otras moléculas como endoperóxidos, hidroperóxidos y cicloperóxidos [Curtis y cols., 1984]. El nuevo  $ROO\cdot$  formado es capaz, a su vez, de extraer un átomo de hidrógeno de un fosfolípido adyacente, formando un radical alquílico ( $R'\cdot$ ) y un peróxido lipídico ( $ROOH$ ), propagando así una reacción en cadena que se extiende por toda la membrana [Kanner y cols., 1987; Hunt y cols., 1988]. La reacción sólo termina cuando los radicales libres interaccionan con moléculas antioxidantes o bien mediante la fragmentación de los ácidos grasos en gran número de productos hasta que se agota el sustrato, lo que implica la muerte celular. De forma esquemática, la reacción de la peroxidación lipídica se divide en cuatro pasos: iniciación, propagación, ramificación y terminación (figura 7).

La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados produce su y la formación de uniones cruzadas entre fosfolípidos o entre fosfolípidos y proteínas [Bruch y Thayer, 1983; Curtis y cols., 1984]. Estas alteraciones estructurales son las principales responsables de la rigidez en las membranas biológicas cuando éstas son expuestas a radicales libres, y por lo tanto determina su pérdida funcional [Dobretsov y cols., 1977; Bruch y Thayer, 1983; Schroeder, 1984; Garzetti y cols., 1993; Chen y Yu, 1994].

Entre los productos formados destacan el malonildialdehído (MDA) y los 4-hidroxiálquenos (4-HDA), cuantificados en este trabajo como indicadores del grado de oxidación lipídica. Los productos generados durante la peroxidación lipídica pueden ser también moléculas muy tóxicas capaces de provocar graves alteraciones en la membrana como modificaciones en las proteínas que la integran [Esterbauer y cols., 1991; Subramaniam y cols., 1997; Refsgaard y cols., 2000; Zarkovic, 2003] e incluso la ruptura de la membrana [Halliwell y Gutteridge, 1990].



**Figura 7.** Reacciones principales de la peroxidación lipídica.

$\cdot RL$ : Radical libre, LH: lípido intacto, MDA: malonildialdehído, 4-HDA: 4-hidroxialquenos.

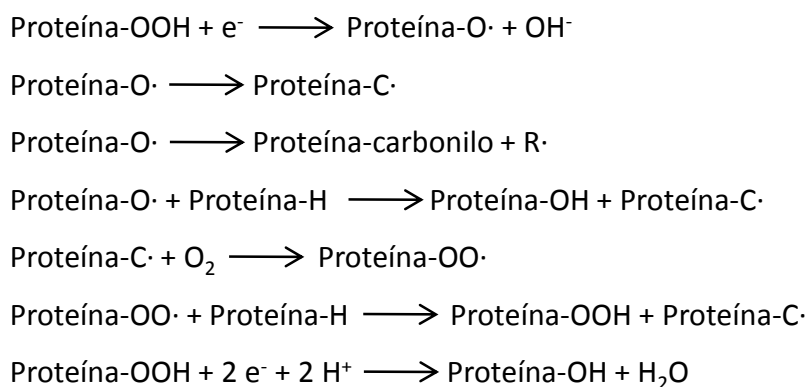
## 2. DAÑO OXIDATIVO A LAS PROTEÍNAS

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles, sobre todo a nivel del grupo carbonilo, de ser atacados por los radicales libres. Dentro de los aminoácidos, la tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína son los que presentan mayor predisposición a ser oxidados [Davies y cols., 1987]. Esta oxidación puede dar lugar a una alteración de la estructura primaria y un cambio conformacional de la proteína y, por tanto, a una modificación o pérdida de su función.

Las alteraciones bioquímicas que producen los radicales libres en las proteínas incluyen oxidaciones de las cadenas laterales, fragmentación de la cadena peptídica, formación de enlaces cruzados entre proteínas, modificación de los puentes disulfuro y los enlaces no covalentes como los de hidrógeno, cambios de conformación, alteración de la hidrofobicidad, y adquisición de otros grupos reactivos como por ejemplo la 3,4-

dihidroxifenilalanina, los hidroperóxidos y los carbonilos [Davies y Goldberg, 1987; Dean y cols., 1997; Stadtman, 2001; Davies, 2003]. Un caso a destacar es cuando el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y las formas reducidas del hierro y cobre, interaccionan en los sitios de unión de estos metales a las proteínas, produciendo radicales libres que oxidan inmediatamente a los residuos de aminoácidos vecinos. En muchas enzimas este sitio de unión de metales puede ser el centro activo, por lo que el ataque de radicales libres anularía su funcionalidad [Stadtman, 1993].

Aunque la reacción de las proteínas con los radicales libres no se puede considerar como una reacción en cadena en sentido clásico, también se producen una serie de reacciones sucesivas (figura 8) [Headlam y Davies, 2003]:



*Figura 8. Reacciones de los radicales libres con las proteínas.*

En los procesos de daño oxidativo a proteínas, algunos aminoácidos como la lisina, prolina y arginina, se oxidan dando grupos carbonilo, de modo que el contenido en carbonilos de las proteínas se puede emplear como un indicador de daño oxidativo a las mismas [Stadtman, 1992]. En este trabajo se ha cuantificado la aparición de estos restos como indicador bioquímico de la oxidación de las proteínas.

### 3. DAÑO AL ADN

El ADN también es susceptible de daño oxidativo. El oxígeno es capaz de adicionarse a las bases o al azúcar del ADN. Cuando un radical libre ataca a una desoxirribosa del ADN, generalmente se produce una ruptura de la cadena a nivel del



lugar de reacción. Sin embargo, la cadena complementaria que permanece intacta, puede mantener juntos los dos extremos de la cadena dañada hasta que actúen las enzimas reparadoras. De este modo, este tipo de daño no es usualmente crítico para la célula a no ser que haya una rotura cercana en las dos cadenas [Breen y Murphy, 1995]. La adición de los radicales libres a las bases del ADN es más habitual que la ruptura de las cadenas, y da lugar a una gran variedad de productos derivados, entre ellos se encuentran la 8-oxoadenina, 8-oxoguanina, 4,6-diamino-5-formamidopirimidina, 5-hidroxicitosina, 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina, 5-hidroxiuracil, timina glicol y la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina. También se pueden formar puentes cruzados ADN-proteína.

Cuando la replicación del ADN dañado tiene lugar antes de la reparación o cuando un ADN dañado se repara de manera incorrecta, tiene lugar una mutación [Halliwell y Aruoma, 1991; Breen y Murphy, 1995]. Así pues, las lesiones oxidativas al ADN y la mutagénesis son causas importantes del cáncer [Ames y cols., 1993].

Una de las bases modificadas cuyo contenido aumenta en el ADN tras un estrés oxidativo es la 8-hidroxiguanina [Kasai y Nishimura, 1984]. Esta lesión puede repararse por una glicosilasa, que elimina la base nitrogenada (8-hidroxiguanina), o por una endonucleasa, que elimina el nucleósido (8-hidroxi-2'-deoxiguanosina) [Tchou y Grollman, 1993]. Tras ser escindidas del resto de la cadena, ambas se eliminan por la orina. La cantidad del nucleósido 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina en órganos o en orina se utiliza como índice del daño oxidativo al ADN *in vivo* [Fraga y cols., 1990].

Al menos en el caso del ADN nuclear se cree que el hierro juega de nuevo un papel importante en el daño oxidativo. Si el  $H_2O_2$  llega al núcleo, reacciona con el hierro ferroso, generando  $\cdot OH$  que ataca en ese mismo lugar al azúcar o a la base, produciendo roturas de hebra y modificaciones en las bases [Imlay y Linn, 1988].

El daño oxidativo al ADN mitocondrial (ADNmt) es unas 15 veces superior al del ADN nuclear [Richter y cols., 1988]. La mitocondria es la principal fuente de radicales libres, que actuarían sobre los lípidos de membrana mitocondrial, las proteínas de sus sistemas enzimáticos y, fundamentalmente, sobre ADNmt. Este ADNmt es muy susceptible al daño oxidativo dado que, al contrario del ADN nuclear, carece de los

mecanismos de reparación adecuados y no tiene la protección que suponen las histonas y poliaminas [Schapira y Cooper, 1992]. Esto ha llevado a pensar que el daño oxidativo sobre estructuras mitocondriales juega un papel determinante en los procesos de envejecimiento, es la llamada teoría mitocondrial del envejecimiento, inicialmente propuesta por Harman en 1972, y desarrollada por Miquel en 1980 [Harman, 1972; Miquel, 1992].

#### 4. DAÑO OXIDATIVO A LOS GLÚCIDOS

---

Los mono y disacáridos resisten la acción de los radicales libres de oxígeno. La glucosa, la manosa y el manitol son depuradores del radical superóxido, al retenerlo e impedir su acción sobre otras moléculas, actuando como agentes protectores celulares [Albertini y cols., 1996]. El daño oxidativo a los glúcidos reviste importancia cuando se trata de polisacáridos de función estructural, ya que los polisacáridos son despolimerizados por los radicales libres [Monboisse y Borel, 1992] dando lugar a procesos degenerativos. Un caso especial es el del ácido hialurónico cuya función estructural reside en mantener la viscosidad del fluido sinovial. La exposición a agentes oxidantes, sobre todo radical superóxido provoca su fragmentación, lo que conduce a la desestabilización del tejido conectivo y a la pérdida de viscosidad del fluido sinovial, como es el caso de la artritis reumatoide [Greenwald y Moy, 1980; Grootveld y cols., 1991].

## FISIOPATOLOGÍA DE LOS ÁCIDOS BILIARES

Los ácidos biliares son los aniones orgánicos predominantes en la bilis, y en condiciones fisiológicas están confinados en la circulación enterohepática. Sin embargo, en la colestasis, condición patológica del hígado definida como una alteración hepática en la que hay acumulación de bilis [Javitt y cols., 1982], cuando la circulación enterohepática está interrumpida, los ácidos biliares se acumulan en el hígado.

## SÍNTESIS Y TRANSPORTE

En el hombre, la síntesis de ácidos biliares  $C_{24}$  se realiza en el hígado a partir del colesterol al igual que en la mayoría de los vertebrados. Los ácidos biliares sintetizados *de novo* o primarios en el hombre son el ácido cólico, un ácido biliar con tres grupos hidroxilo en las posiciones C-3, C-7 y C-12 y el ácido quenodesoxicólico (QCA), uno con dos grupos hidroxilos en las posiciones C-3 y C-7. El proceso global de la biosíntesis de ácidos biliares es complejo y abarca 20 pasos enzimáticos diferentes (figura 10). En esta ruta, la adición de grupos hidroxilo y la oxidación de la cadena lateral, forma productos finales más hidrosolubles del colesterol. A pesar de que la ruta de hidroxilación varía entre especies, ésta siempre es en una parte de la molécula, siendo invariablemente el producto final una molécula anfipática, dado que tiene una parte hidrofóbica y otra hidrofílica. Sin embargo, los ácidos biliares tienen diferentes grados de hidrofobicidad e hidrofiliidad [Sarbu y cols., 2001]. Antes de la secreción hacia los canalículos biliares, tanto el ácido cólico como el QCA son conjugados en su grupo carboxilo al grupo amino de la taurina o la glicina. La conjugación mejora las características hidrofílicas del ácido biliar y el poder ácido de la cadena lateral, convirtiendo un ácido débil ( $pK_a \approx 5,0$ ) en un ácido fuerte ( $pK_a \approx 3,9$  para el conjugado con glicina y 2,0 para el de taurina) y disminuyendo la difusión pasiva de ácidos biliares a través de las membranas celulares durante el tránsito a lo largo del árbol biliar y el intestino delgado. El efecto neto de la conjugación es mantener altas concentraciones intraluminales de ácidos biliares en el intestino delgado para facilitar la digestión y la posterior absorción de grasas [Hofmann, 1999]. Sin embargo, los ácidos biliares también son desconjugados por la flora bacteriana endógena durante el paso intestinal, lo que facilitará su reabsorción y paso a sangre, para ser reconjugados de nuevo en el hígado. Los ácidos biliares conjugados a pH fisiológico se encuentran predominantemente en su forma aniónica, por lo que se les llama también sales biliares [Hofmann, 1994]. Por simplificar y por la similitud de ambas formas, en este trabajo denominaremos ambas formas como ácidos biliares. La mayoría de los ácidos biliares secretados al intestino delgado por el esfínter de Oddi, son absorbidos intactos en forma eficiente entrando en la circulación enterohepática, dejando pasar a colon

menos de un 5% del conjunto de ácidos biliares [Redinger, 2003; Kullak-Ublick y cols., 2004]. Los ácidos biliares que son reabsorbidos en el íleon, son transportados vía portal al hígado, donde son extraídos por los hepatocitos [Kullak-Ublick y cols., 2004]. Los niveles de ácidos biliares en la sangre venosa portal durante el ayuno y el periodo postprandial son aproximadamente 0,014 y 0,043 mM respectivamente [Angelin y cols., 1982].

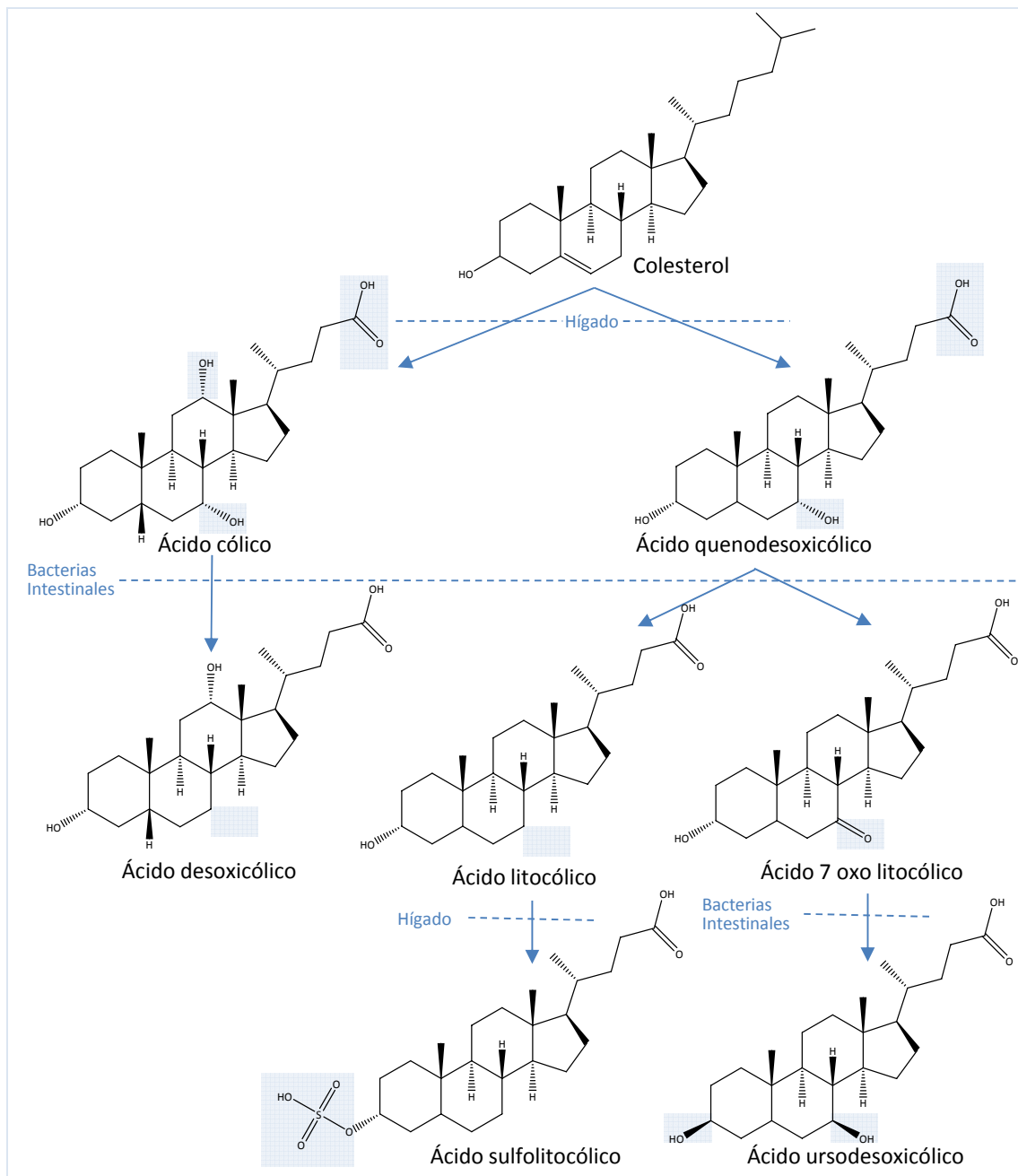
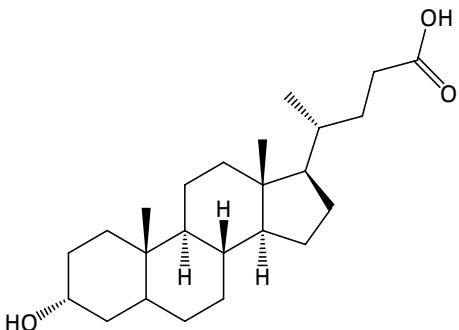
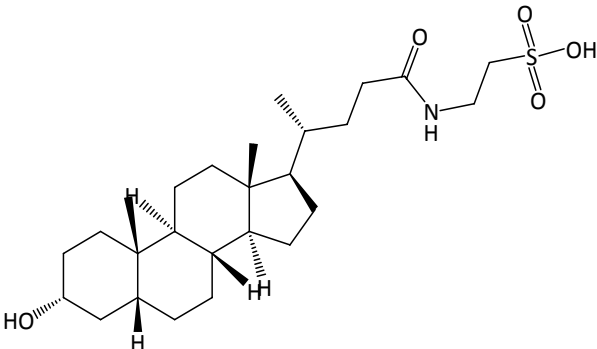
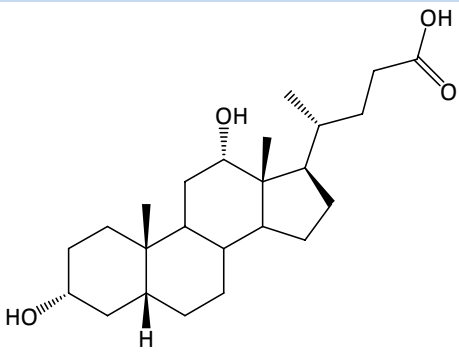
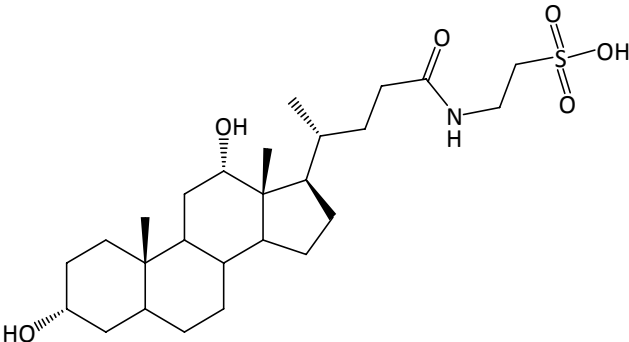
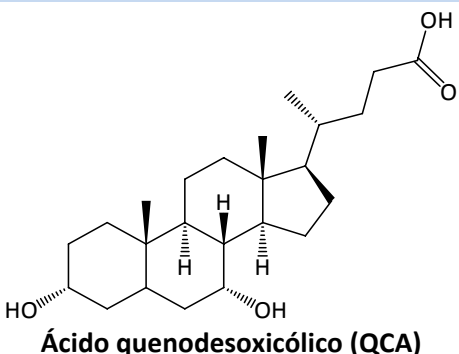
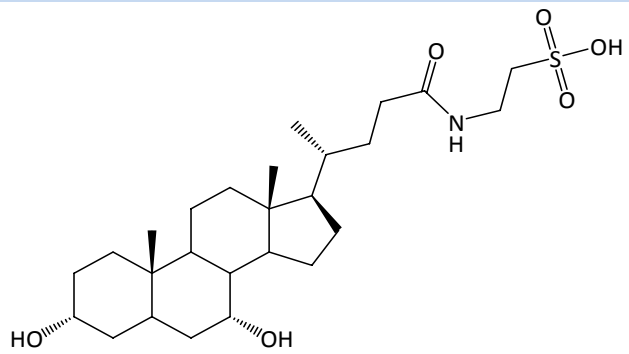
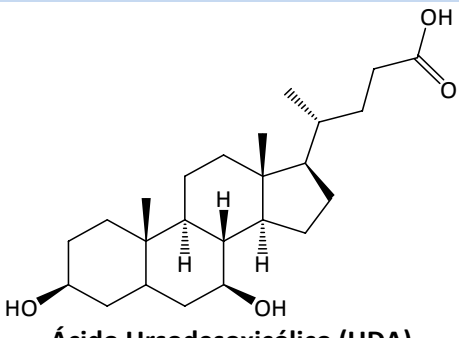


Figura 9. Principales ácidos biliares y sus sitios de síntesis y metabolismo

Los ácidos biliares que llegan al colon son metabolizados por la flora bacteriana anaeróbica. Primeramente sufren una desconjugación y después la acción de la 7 $\alpha$ -deshidroxilasa bacteriana produce ácidos biliares secundarios desoxicólico (DCA) y litocólico (LCA) en el colon. El DCA, producido a partir del ácido cólico, es un ácido biliar dihidroxilo con grupos hidroxilos en las posiciones C-3 y C-12. El LCA, producido a partir del ácido QCA, es un ácido biliar monohidroxilo con un grupo hidroxilo en la posición C-3 (tabla 3). Tras ser absorbido en colon y retornar al hígado, el DCA es reconjugado con glicina o taurina y circula en sangre con los ácidos biliares primarios. El LCA es poco soluble y se reabsorbe en muy pequeña cantidad [Hill, 1990]. La conjugación hepática de los ácidos biliares circulantes es extremadamente eficiente, de manera que todos los ácidos biliares de la bilis (en especial, ácido cólico, QCA y DCA) están en su forma conjugada [Falany y cols., 1994]. La desconjugación y la deshidroxilación bacteriana en el colon también son muy eficientes, por lo cual los ácidos biliares de la materia fecal están todos desconjugados y comprenden primordialmente a los ácidos biliares secundarios DCA y LCA. Como una modificación terciaria, el ácido LCA también es sulfatado en la posición C-3 y reconjugado con taurina o glicina. Los ácidos biliares terciarios se forman en el hígado y por las bacterias intestinales a partir de los ácidos biliares secundarios. Estas reacciones comprenden la sulfatación y la hidroxilación hepáticas del ácido LCA, formando ácido sulfolitocólico, y la reducción del ácido 7-oxo-litocólico a ácido QCA o su epímero 7 $\beta$ -ursodesoxicólico. El ácido ursodesoxicólico (UDA) es conjugado en el hígado, circula con el pool de ácidos biliares primarios, y constituye menos del 5% de los ácidos biliares primarios.

En la vesícula biliar la composición biliar de ácidos biliares es: QCA (35%), cólico (35%), DCA (25%), UDA (2%), LCA (1%), otros (oxo- y 3 $\beta$ -hidroxi derivados de los ácidos biliares secundarios) (2%) [Ridlon y cols., 2006]. Y en el agua fecal de individuos con una dieta baja en fibra es: DCA (58%), LCA (12%) y cólico (4%) [Alberts y cols., 2003].

**Tabla 3.** Estructuras de los ácidos biliares estudiados en este trabajo.  
[coeficientes de partición octanol-agua, log P, según Sarbu y cols., 2001]

Ácido biliar libre	Ácido biliar conjugado
 <p><b>Ácido litocólico (LCA)</b> Solubilidad en agua (20°C, pH=7): 0,023 g/L</p>	 <p><b>Ácido taurolitocólico (TLC)</b> Solubilidad en agua (20°C, pH=7): 5,8 g/L</p>
 <p><b>Ácido desoxicólico (DCA)</b> Solubilidad en agua (20°C, pH=7): 0,39 g/L Log P = 2,65</p>	 <p><b>Ácido taurodesoxicólico (TDA)</b> Solubilidad en agua (20°C, pH=7): 95 g/L</p>
 <p><b>Ácido quenodesoxicólico (QCA)</b> Solubilidad en agua (20°C, pH=7): 0,39 g/L Log P = 2,25</p>	 <p><b>Ácido tauroquenodesoxicólico (TQA)</b> Solubilidad en agua (20°C, pH=7): 95 g/L</p>
 <p><b>Ácido Ursodesoxicólico (UDA)</b> Solubilidad en agua (20°C, pH=7): 0,39 g/L Log P = 2,20</p>	

Recientemente se ha puesto de manifiesto la importancia de los ácidos biliares como reguladores transcripcionales de la homeostasis del colesterol. La cantidad de ácidos biliares sintetizada por el hígado, está estrechamente regulada para evitar la sobreacumulación de ácidos biliares y de colesterol. Cuando los ácidos biliares se concentran por encima de los niveles fisiológicos, se pone en marcha un mecanismo de retroalimentación negativa que disminuye su síntesis [Russell y Setchell, 1992]. Por el contrario, la formación de ácidos biliares se incrementa cuando el sustrato, el colesterol, se acumula. Ambas respuestas reguladoras ocurren en la transcripción y están mediadas por miembros de la familia de receptores nucleares hormonales, actuando en dos genes que codifican las hidrolasas de las rutas biosintéticas [Chawla y cols., 2001].

Los ácidos biliares sufren un largo proceso de circulación enterohepática [Muller y Jansen, 1997; Meier y Stieger, 2002]. Diversos sistemas de transporte en las membranas basolateral y canalicular de los hepatocitos permiten su secreción de la sangre a la bilis. Dirigiendo la totalidad del proceso se encuentra la  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPasa en la membrana basolateral que mantiene un gradiente electroquímico entre el hepatocito y el medio extracelular. Este transportador intercambia tres iones de sodio intracelulares por dos iones de potasio extracelulares, manteniendo así un alto gradiente sodio-potasio. Además, dado el balance global del intercambio eléctrico, el interior de la célula está cargado negativamente (-35mV) en comparación con el exterior, favoreciendo la captación de iones cargados positivamente y la excreción de los iones con carga negativa. La ATPasa  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  está presente en la membrana basolateral, no se encuentran en la membrana canalicular [Sellinger y Boyer, 1990]. Este transportador entre otros, está influido por cambios en la fluidez de la membrana. La captación de ácidos biliares por el hepatocito se realiza a través de un cotransportador sodio-taurocolato localizado en la membrana basolateral. Este mecanismo sodio-dependiente es específico para los ácidos biliares. Existe también un transportador inespecífico que se ocupa de la captación de aniones orgánicos, que es sodio-independiente y transporta tanto ácidos biliares como una gran variedad de aniones y cationes orgánicos. Este transportador es de la familia de proteínas transportadoras de aniones orgánicos, denominada abreviadamente OATP. Otros

transportadores de iones en la membrana basolateral son los intercambiadores de sodio y potasio implicados en el control de pH intracelular. Un cotransportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  también realiza esta función. La membrana basolateral también contiene mecanismos de captación de sulfatos, cationes orgánicos y ácidos grasos no esterificados, y diversas isoformas de la proteína de resistencia a multidroga o MRP. El transporte de ácidos biliares a través de la célula implica a las proteínas citosólicas. El retículo endoplásmico y el aparato de Golgi también están implicados en el transporte de ácidos biliares. El transporte vesicular parece ser importante únicamente cuando existen tasas de flujo suprafisiológicas de ácidos biliares.

En condiciones normales, el paso limitante en el transporte de ácidos biliares a través de los hepatocitos es su excreción a la bilis a través de la membrana canalicular de la que se encargan diversos sistemas de transporte primario activo, dependientes de ATP, bombas exportadoras de sales biliares. Estas proteínas son unos transportadores pertenecientes a la superfamilia de transportadores ABC.

Los ácidos biliares, como componentes de la bilis, recorren los conductos biliares hasta la vesícula biliar donde se almacenan para su futuro uso. La regulación transcripcional y post-transcripcional de los transportadores involucrados en la circulación enterohepática está estrechamente relacionada con la regulación de la homeostasis lipídica. La disminución o ausencia de la expresión de los sistemas de transporte hepatocelulares es una causa importante de diversos tipos de enfermedades colestáticas [Trauner y cols., 1998].

## **ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS GENÉRICAS**

Los ácidos biliares son esteroides hidroxilados, sintetizados a partir de colesterol en el hígado. La molécula de un ácido biliar contiene un anillo esteroideo y una cadena hidrocarbonada lateral corta. La cadena termina en un grupo carboxilo, que puede ser conjugado con glicina o taurina a través de un grupo amino. Los anillos esteroideos contienen grupos hidroxilo y los ácidos biliares se diferencian por el número, la posición y la orientación de estos grupos. La distribución de los grupos hidrofílicos, grupos hidroxilo y cadena lateral y los hidrofóbicos en distintas caras del



anillo esteroideo genera una molécula anfipática. En la tabla 3 se han detallado las estructuras químicas de los ácidos biliares estudiados en este trabajo.

La hidrofobicidad/lipofilidad de un compuesto es una propiedad compleja que generalmente se mide disolviéndolo en una mezcla bifásica de agua y un líquido inmiscible y determinando luego la concentración de equilibrio en cada fase. Se calcula así el coeficiente de partición entre ambos solventes. El más usado como medida de hidrofobicidad es el coeficiente de partición octanol-agua ( $P_o/w$ ) y para utilizarlo en relaciones lineales de energía libre se expresa como logaritmo ( $\log P$ ).

En la tabla 3 se compendian los coeficientes de partición de los ácidos biliares obtenidos de los datos experimentales de la bibliografía [Sarbu y cols., 2001]. En resumen, podemos decir que el LCA es el más hidrofóbico de los estudiados en este trabajo, y en orden de hidrofiliidad creciente están el DCA, QCA y el más hidrofílico de los ácidos biliares libres es el UCA. Los respectivos ácidos biliares conjugados con la taurina son más hidrofílicos que sus ácidos libres [Attili y cols., 1986; Natalini y cols., 2007].

## FUNCIONES

Los ácidos biliares y sus sales, son productos naturales constituyentes fundamentales de la bilis. La principal función de los ácidos biliares es la emulsión de los lípidos biliares, en particular el colesterol. Por lo tanto, la síntesis de ácidos biliares y su excreción en heces representa el único mecanismo significativo para eliminar el exceso de colesterol. Su acción emulsionante también facilita la absorción intestinal de las vitaminas liposolubles y la digestión de los triglicéridos de la dieta, ya que proporciona una mayor accesibilidad de las lipasas pancreáticas a estas grasas. Además, la bilis es una importante vía de eliminación de toxinas, carcinógenos, fármacos y sus metabolitos. También se excretan en la bilis además del colesterol, otros compuestos endógenos y productos metabólicos como bilirrubina y hormonas [Nathanson y Boyer, 1991].

## IMPLICACIONES ETIOPATOGÉNICAS

Desde hace tiempo se conoce que los ácidos biliares están implicados en la etiopatogenia de enfermedades como el cáncer [Cook y cols., 1940; para revisión ver Bernstein y cols., 2005]. El mecanismo de acción de la carcinogénesis es todavía desconocido, pero hay varios efectos que pueden estar implicados (figura 10). Los ácidos biliares a altas dosis son extremadamente tóxicos, probablemente a través del daño a las membranas celulares [Billington y cols., 1980], membranas mitocondriales [Gores y cols., 1998; Palmeira y Rolo, 2004] o interfiriendo con la función celular [Vaezi y Richter, 2000]. Esta citotoxicidad y alteración de la membrana puede estimular la proliferación y, por lo tanto, contribuir al cáncer [Nagengast y cols., 1995]. A bajas dosis, se sabe que los ácidos biliares estimulan efectos de señalización celular que involucran, PKC [LaRue y cols., 2000], c-myc [Tselepis y cols., 2003], COX-2 [Zhang y cols., 1998] y NF- $\kappa$ B [Jenkins y cols., 2004]. Los ácidos biliares pueden ser tanto promotores tumorales como carcinogénicos a través de dos vías de señalización celular distintas: ERK (Ras/Raf/MEK/ERK) y PKC que median cooperativamente la activación inducida por los ácidos biliares de un heterodímero formado por los factores oncogénicos Fos y Jun denominado proteína activadora 1 (AP-1) [Qiao y cols., 2000].

Los ácidos biliares pueden ser genotóxicos a través de la inducción de daño oxidativo al ADN [Venturi y cols., 1997; Debruyne y cols., 2001; Bernstein y cols., 2005]. Así, pueden activar la formación  $\text{ONOO}^-$  [Washo-Stultz y cols., 1999]. El daño al ADN puede estar causado directamente por  $\text{NO}\cdot$ , por  $\text{ONOO}^-$  o por  $\cdot\text{OH}$  [Booth y cols., 1997; Jaiswal y cols., 2000]. Esta hipótesis encajaría con las investigaciones en las que los ácidos biliares no pueden dañar directamente al ADN, sino que requieren intermediarios celulares [Scates y cols., 1994; Glinghammar y cols., 2002]. Los ácidos DCA y QCA, a concentraciones fisiológicas, estimulan la hidroxilación de las bases de ADN mediada por radical hidroxilo, generando 8-hidroxideoxiadenina y 8-hidroxideoxiguanina [Allgayer y cols., 1999; 2002]. El LCA inhibe la polimerasa  $\beta$ , una enzima necesaria para la reparación del ADN [Ogawa y cols., 1998]. El DCA causa la degradación de p53 [Qiao y cols., 2001]. Las funciones de esta p53 en la respuesta al

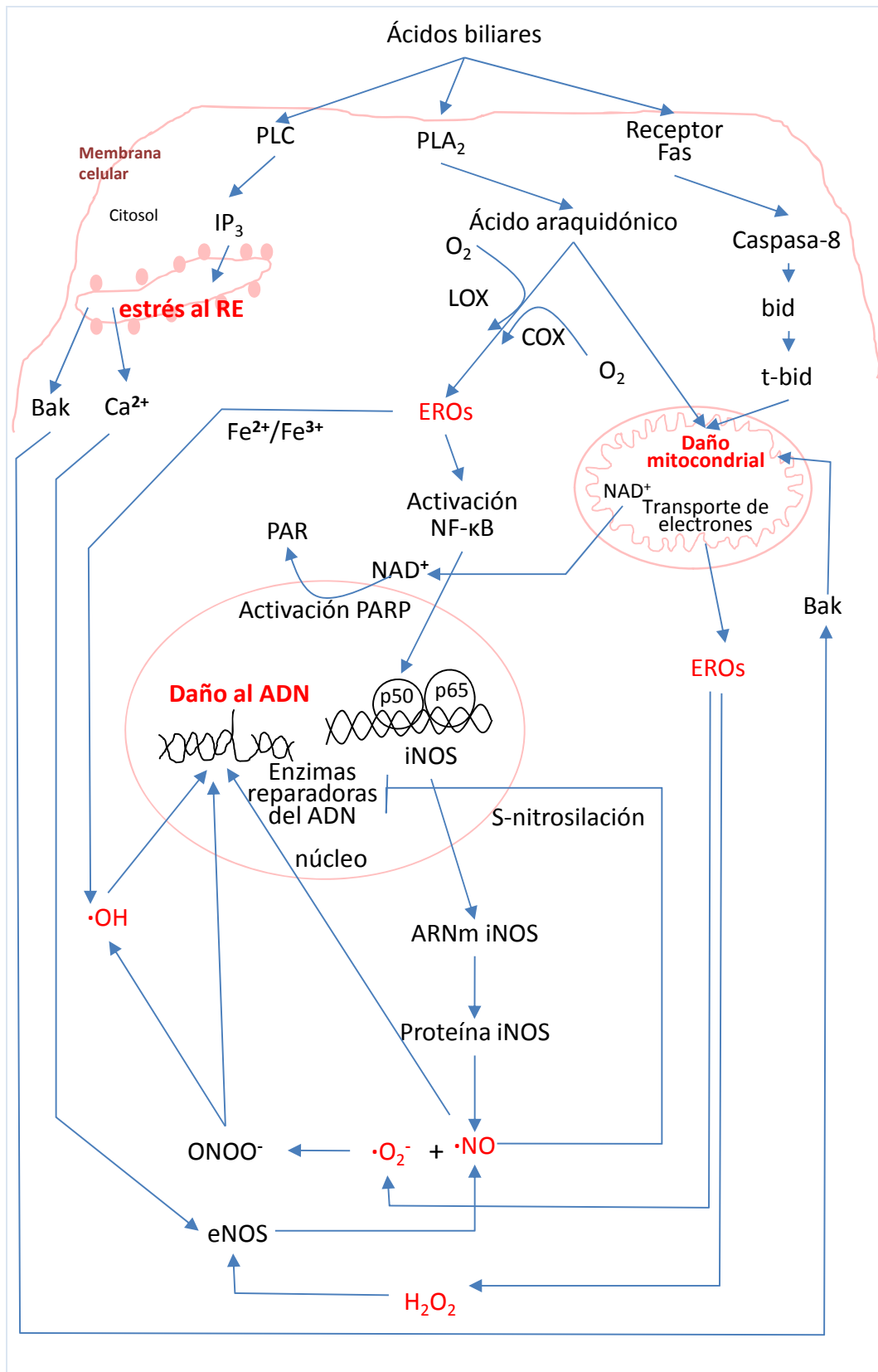
daño del ADN incluyen, primero, parada del ciclo celular dando tiempo para permitir la reparación del ADN; segundo, actuar directamente sobre la reparación del ADN; y tercero, estimulación de la apoptosis cuando el daño al ADN es excesivo [Bernstein y cols., 2002]. Por lo tanto, la reducción de p53 inducida por DCA incrementaría la inestabilidad genómica ya que disminuye la reparación del ADN y reduce la retirada por apoptosis de las células con daño en el ADN. La pérdida de la capacidad apoptótica está asociada con un aumento en la tasa de mutación [Cherbonnel-Lasserre y cols., 1996; Cherbonnel-Lasserre y Dosanjh, 1997; Saintigny y cols., 2001]. Mediante el test de Ames Salmonella se ha medido la capacidad mutagénica de los ácidos biliares [Silverman y Andrews, 1977], sin embargo los ácidos biliares no han mostrado genotoxicidad, posiblemente porque la principal fuente de producción de EROs, la mitocondria, está ausente en las bacterias.

Los efectos celulares inducidos por ácidos biliares incluyen proliferación celular, apoptosis y regulación genética, y dependen de la producción de EROs [Craven y cols., 1986; 1987; Araki y cols., 2005]. Estos desempeñan un papel relevante en la carcinogénesis [Cerutti, 1985; Olinski y cols., 1992; Guyton y Kensler, 1993; Feig y cols., 1994; Jaruga y cols., 1994]. En la etiopatogenia del cáncer influyen varios factores en sus tres fases evolutivas, mutación del ADN (iniciación), estimulación o crecimiento celular (promoción) y malignización celular (progresión) [Elledge, 1996]. Los radicales libres pueden actuar en cualquiera de ellas [Nakamura y cols., 1988; Salim, 1993; Hussain y cols., 1994; Zalewski, 2004].

La generación de EROs celulares puede tener tanto efectos pro- como antiapoptóticos según el estímulo y la cantidad y duración de la producción de EROs [Tirosh y cols., 2003; Park y cols., 2004]. Las EROs pueden estimular la activación de vías de señalización celular antiapoptóticas como ERK y fosfatidilinositol-3quinasa [Qiao y cols., 2001]. En hepatocitos de rata, los ácidos biliares DCA y TDA aumentan la producción de EROs mitocondrial, lo que activa receptores con actividad tirosina quinasa y estimulan las vías de señalización ERK y fosfatidilinositol-3quinasa (PI3-K). Por lo tanto la toxicidad de DCA puede ser potencialmente reducida por las EROs al activar la vías ERK y PI3-K, a la vez que estimulada por las EROs a través de la pérdida

irreversible del potencial de membrana y liberación del citocromo C hacia el citosol [Qiao y cols., 2001]. Recientemente se ha observado que DCA es un clastógeno, mutágeno y tóxico para las células esofágicas, induciendo su genotoxicidad a través de un mecanismo mediado por EROs [Jenkins y cols., 2007].

El factor de transcripción NF- $\kappa$ B está involucrado en la activación de rutas de supervivencia [Rust y cols., 2000; Mistry y cols., 2004; Mattson, 2005] y protege frente a la apoptosis [Colell y cols., 2001; Crowley-Weber y cols., 2002; Richmond, 2002; Monks y cols., 2004]. NF- $\kappa$ B estimula la progresión tumoral, en parte, a través de la activación de la NOS [Payne y cols., 1998] y la ciclooxigenasa-2 [Schottelius y Baldwin, 1999; Schmid y Adler, 2000] y la liberación de citoquinas proliferativas y antiapoptóticas [Jobin y Sartor, 2000; Lu y cols., 2004]. DCA activa NF- $\kappa$ B en hepatocitos a través de diversos mecanismos que tienen en común la generación de estrés oxidativo [Payne y cols., 2007]: la activación de proteínas de membrana plasmática como la NADPH oxidasa y la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa; la acción de enzimas metabolizantes de xenobióticos como las monooxigenasas citocromo P<sub>450</sub>; la alteración del complejo mitocondrial IV; y la modulación de flujos de Ca<sup>2+</sup>.



**Figura 10.** Resumen de los mecanismos de toxicidad de los ácidos biliares [modificado de Bernstein y cols., 2005].  
 EROs: Especies reactivas dependientes de oxígeno, PLA<sub>2</sub>: Fosfolipasa A<sub>2</sub>, COX: Ciclooxigenasa, LOX: Lipooxigenasa, t-Bid: Bid truncado, RE: Retículo endoplásmico, PARP: Poli (ADP-ribosa) polimerasa, iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible, eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial, NFκB: Factor nuclear Kappa B, PLC: Fosfolipasa C, IP<sub>3</sub>: Inositoltrifosfato.

## FISIOLOGÍA DE LA MELATONINA

### ESTRUCTURA FUNCIONAL DE LA GLÁNDULA PINEAL

La glándula pineal o epífisis cerebral se conoce desde hace más de 2000 años, ya que se describió por primera vez por Herófilo de Alejandría (335-280 a.C.), quien afirmó que este órgano actuaba como *“un esfínter que controla el flujo de pensamientos”*. En el siglo II d.C., Galeno de Pérgamo (129-199), introdujo el término *conarium* para la glándula pineal, porque la pineal tiene forma del cono de una piña, y concibió la glándula pineal como una estructura necesaria para dar soporte a los vasos sanguíneos. El término actual pineal deriva del latín *pinealis*, y *pine* significa “piña”. Citas literarias clásicas orientales sitúan el *“séptimo chacra”* en la zona correspondiente a la glándula pineal, refiriéndose a éste como *“el tercer ojo”*, un órgano de clarividencia y mediación que también permite al hombre recordar sus vidas pasadas.

Se considera una de las mejores descripciones de la pineal y de su situación anatómica la realizada por Andrés Vesalio (1514-1564) en su obra *“De Humanis Corporis Fabrica”*, sin embargo fue el polifacético René Descartes (1596-1650), quien en su libro *“De Homine”*, recogiendo en gran parte la idea de la filosofía griega, asignó a la glándula pineal el lugar donde reside el alma, siendo una encrucijada anatómica de conexión entre lo corporal y lo espiritual. Descartes pensó que los estímulos percibidos por los ojos eran llevados al cerebro y desde allí alcanzaban la glándula pineal.

A partir de la segunda mitad del siglo XIX se replanteó la fisiología de la glándula pineal, aumentando el interés por su anatomía comparada, histología y embriología, principalmente debido al desarrollo de métodos técnicos más refinados de corte y tinción tisular. En 1850, Rudolph Albert von Kolliker (1817-1905) observó la presencia de fibras nerviosas en la glándula pineal de mamífero, y en 1904, Santiago Ramón y Cajal (1852-1934) encontró fibras nerviosas ramificadas en la glándula pineal de ratón, y sugirió que eran de origen simpático [Ramón y Cajal, 1904].

A finales del siglo XIX, con el auge de la fisiología del sistema endocrino se sospechó que la glándula pineal de los mamíferos pudiera desempeñar un papel como glándula endocrina. Esta hipótesis se confirmó con la observación de casos clínicos de pubertad precoz en niños con tumores no parenquimatosos de la glándula pineal [Heubner, 1898]. En 1905, Studnicka estableció el origen de la glándula pineal como un órgano fotorreceptor en especies inferiores y postuló la función secretora de la pineal [Studnicka, 1905].

Sin embargo, en toda la historia de la investigación de la glándula pineal no hay ningún descubrimiento más importante que el de su principal hormona, la melatonina, una estructura aislada por Lerner y cols. [1958]. Estos autores descubrieron que dicha molécula aclaraba la piel de la rana, y le dieron el nombre de melatonina al relacionar su función con el pigmento melanina y su estructura con la serotonina.

Durante el siglo pasado se fueron conociendo en mayor profundidad las funciones de la glándula pineal, como la importancia de la luz-oscuridad en el control de su función [Fiske y Huppert, 1968] y los efectos de la glándula pineal en la reproducción de los mamíferos como órgano neuroendocrino [Wurtman y cols., 1963; Hoffman y Reiter, 1965]. Estos descubrimientos sentaron las todavía incipientes bases de la fisiología moderna de la glándula pineal y la melatonina.

La glándula pineal, en el hombre, está localizada inmediatamente por encima de los tubérculos cuadrigéminos del mesencéfalo, en la región de la comisura posterior. Es un órgano impar con forma cónica y unido al diencefalo por el tallo pineal. La base de este tallo presenta un fondo de saco que se continúa con la cavidad del tercer ventrículo. También se le denomina epífisis puesto que es la evaginación superior del diencefalo en contraposición a la glándula pituitaria o hipófisis que se encuentra en la parte inferior.

Embriológicamente la pineal se origina a partir del ectodermo hacia la octava semana de vida fetal como una evaginación del epéndimo que forma el techo del tercer ventrículo. Aunque comienza como una estructura sacular, rápidamente la proliferación de las células de sus paredes la convierten en una glándula sólida.

Es uno de los tejidos corporales con mayor flujo sanguíneo en relación a su peso que en el hombre adulto es de unos 150 mg [Reiter, 1981]. La irrigación de la pineal proviene fundamentalmente de vasos de la piamadre, ramas de las arterias coroidales posteriores que derivan de la cerebral posterior.

La glándula pineal está innervada por fibras postganglionares simpáticas procedentes del ganglio cervical superior [Ramón y Cajal, 1904]. También tiene innervación serotoninérgica de origen central, fibras pinealopetales, y fibras pinealofugales que se proyectan hacia diversas áreas del sistema nervioso central inmaduro [Vollrath, 1985].

Histológicamente, la glándula pineal en los mamíferos está compuesta fundamentalmente por dos tipos celulares integrados en folículos: la célula parenquimatosa o pinealocito, y la célula intersticial o astrocito inmaduro [Vollrath, 1985]. La evolución filogenética funcional de la pineal se corresponde con una evolución citológica, de tal forma que si en especies inferiores predomina el pinealocito como fotorreceptor, conforme nos acercamos a los mamíferos, las estructuras celulares evolucionan para capacitar al pinealocito en la síntesis de melatonina y otras sustancias, y su posterior secreción.

---

## **BIOSÍNTESIS DE MELATONINA**

La melatonina es una molécula de al menos dos mil millones de años [Poeggeler y Hardeland, 1994; Macías y cols., 1999], que está presente en todos los animales y plantas donde se ha buscado, con la misma estructura molecular, situación que muy rara vez sucede en la Naturaleza. Se cree que la melatonina apareció con la misión fundamental de “neutralizar el efecto dañino del oxígeno” como productor de radicales libres, poseyendo un potente efecto antioxidante. Con el transcurso del tiempo ha sido capaz de ir adquiriendo otras funciones propias de una hormona.

La melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina es una indolamina descrita por primera vez por McCord y Allen (1917) y aislada por Lerner y cols. [1958] a partir de extractos de glándula pineal. Se trata de un cristal orgánico, de color blanco, con un

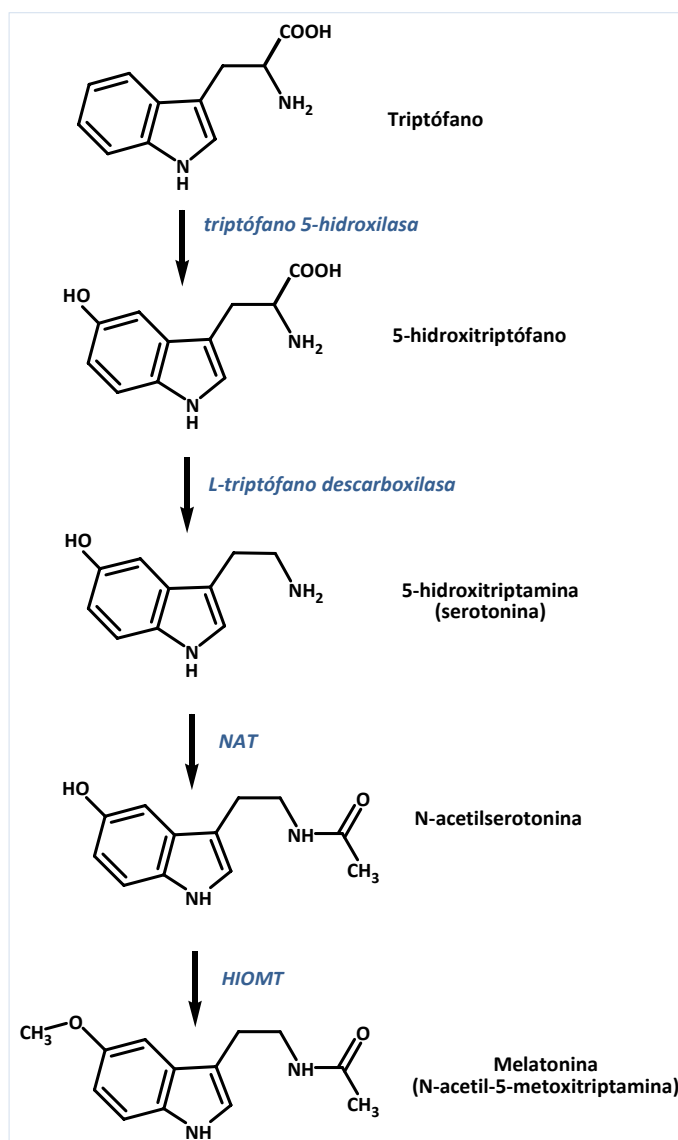


peso molecular es de 232,38 Da y un punto de fusión entre 116 y 118 °C, poco soluble en agua y mucho en etanol [Szmuszkowicz y cols., 1960].

La biosíntesis de melatonina (figura 11) a partir de triptófano, un aminoácido aromático esencial, tiene lugar en la glándula pineal y en otros tejidos productores de melatonina como retina [Grace y cols., 1991], cuerpo ciliado del iris [Aimoto y cols., 1985], glándula lacrimal [Mhatre y cols., 1988], médula ósea [Tan y cols., 1999b], aparato digestivo [Bubenik, 1980; Vakkuri y cols., 1985a; Huether y cols., 1992; Tan y cols., 1999a], ovario [Itoh y cols., 1997], sistema inmune [Guerrero y Reiter, 2002] y el sistema portal hepático [Huether y cols., 1992]. Así, los niveles tisulares de melatonina son cientos de órdenes de magnitud mayores que los del plasma [Reiter y Tan, 2003].

El triptófano entra en el pinealocito desde los capilares sanguíneos a través de un transporte activo bajo control adrenérgico y sufre una hidroxilación en posición 5 por acción de la triptófano-5-hidroxilasa, convirtiéndose en 5-hidroxitriptófano. Este paso limitante en la síntesis ocurre en la mitocondria y requiere una pteridina como cofactor, posiblemente la tetrahidrobiopterina, molécula que alcanza concentraciones elevadas en la glándula pineal [Sitaram y Lees, 1978]. La actividad de la triptófano-5-hidroxilasa también depende de los grupos tiol. Así, los agentes reductores aumentan la velocidad de reacción de 50 a 100 veces [Hori, 1975; Ebadi y Govitrapong, 1986]. Se ha descrito una pequeña variación circadiana de la actividad de la triptófano-5-hidroxilasa, ligeramente mayor durante la noche [Wurtman y cols., 1971]. Finalmente, la cantidad de sustrato también puede ser un factor clave en la síntesis del 5-hidroxitriptófano.

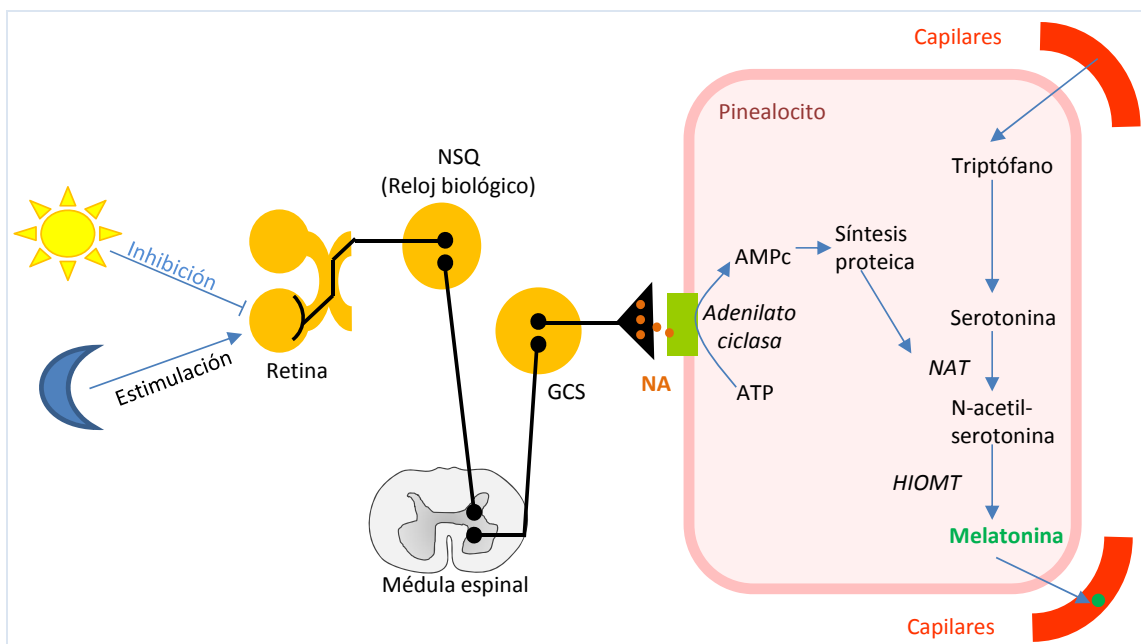
Posteriormente, el 5-hidroxitriptófano se descarboxila mediante la L-triptófano descarboxilasa para formar 5-hidroxitriptamina o serotonina, siendo ésta un importante neurotransmisor del sistema nervioso central. La L-triptófano descarboxilasa está localizada en el citosol del pinealocito y de otras estirpes celulares. Su actividad está regulada por la iluminación ambiental a través de fibras simpáticas y requiere el piridoxal fosfato como cofactor [Snyder y cols., 1964].



**Figura 11.** Biosíntesis de melatonina a partir de triptófano.  
NAT: N-acetil-transferasa, HIOMT: hidroxindol-O-metil transferasa.

La serotonina tiene dos vías principales de metabolización en la glándula pineal. Puede desaminarse por acción de la MAO, o convertirse en melatonina por la acción de dos enzimas que actúan sucesivamente: en primer lugar la N-acetil-transferasa (NAT), que presenta un marcado ritmo circadiano, y transfiriere a la serotonina un grupo acetilo del cofactor acetil coenzima A principalmente, dando así lugar a la N-acetil-5-hidroxi-triptamina o N-acetil-serotonina. A continuación la enzima hidroxindol-O-metil transferasa (HIOMT) va a transferir a la N-acetil-serotonina un grupo metilo de un cofactor de S-adenosil-metionina y convertirla en N-acetil-5-metoxi-triptamina, melatonina.

La actividad de la N-acetil-transferasa, determina el ritmo pineal de producción hormonal y puede regularse mediante su expresión génica o mediante la activación y estabilidad de la enzima [para revisión ver Hardeland, 2008]. La expresión de la enzima se puede regular por una vía nerviosa controlada por el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, el llamado reloj biológico. Esta vía (figura 12) comienza en la retina y continúa a través de los axones de las células ganglionares [Lewy y cols., 1980; Smith y cols., 1981]. En el quiasma óptico estas fibras se separan del tracto óptico principal para dirigirse al núcleo supraquiasmático. Este núcleo proyecta al núcleo paraventricular del hipotálamo, desde donde se dirige a la columna intermediolateral de la médula espinal torácica, origen de las terminaciones pregangliónicas que alcanzan al ganglio cervical superior [Cardinali y cols., 1981]. Finalmente, las fibras posganglionares se introducen en el parénquima pineal y llegan a los pinealocitos en una relación anatómica que recuerda a una estructura sináptica.



**Figura 12.** Vía nerviosa de regulación de la síntesis de melatonina. NSQ: Núcleo supraquiasmático, GCS: Ganglio cervical superior, NA: Noradrenalina, NAT: N-acetil-transferasa, HIOMT: hidroxindol-O-metil transferasa.

El estímulo lumínico durante el día mantiene hiperpolarizados a los fotorreceptores lo que impide la liberación al final de la vía nerviosa de noradrenalina. En ausencia de luz, los fotorreceptores generan potenciales de acción que son conducidos por esta vía neuronal hasta los terminales simpáticos que liberaran

noradrenalina que se une a receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  del pinealocito [Reiter, 1991a]. Dicha unión desencadena una reacción bioquímica intracelular, que se traduce en un incremento de la expresión y actividad de la NAT, con la consecuente elevación de las concentraciones de N-acetilserotonina y melatonina [Hardeland y cols., 1993].

Algunos factores pueden modificar la actividad de la NAT: el estrés y fármacos como la pargilina (inhibidor de la monoaminoxidasa), la isoprenalina (análogo a la noradrenalina), y la desmetilimipramina (bloquea la captación de noradrenalina), aumentan la actividad de la NAT, mientras que por el contrario, los  $\beta$ -bloqueantes, la ciclohexamida (inhibe la síntesis proteica) y la ouabaína (despolariza la membrana), inhiben la NAT [Romero y Axelrod, 1974; Quay, 1980].

Recientemente, se ha demostrado la presencia, en prácticamente todos los tejidos del organismo, de la expresión de los genes que codifican los enzimas clave de la síntesis de melatonina (NAT y HIOMT) [Stefulj y cols., 2001]; por lo que cada tejido puede producir la melatonina que necesita en cada momento, sin depender de la melatonina circulante.

---

## **DISTRIBUCIÓN**

La estructura indólica de la melatonina la hace una molécula bastante liposoluble, que atraviesa fácilmente por difusión simple la bicapa de la membrana del pinealocito. Esto determina que el estímulo de la síntesis de melatonina en la glándula pineal eleve rápidamente sus niveles en plasma y en todos los compartimientos del organismo [Reiter, 1991b].

La melatonina es transportada en el plasma en parte unida a la albúmina (70%) y en parte en forma libre (30%). La vida media de la melatonina en el plasma oscila entre 20 y 40 minutos [Illnerova y cols., 1979; Vakkuri y cols., 1985b].

De cualquier forma los niveles plasmáticos de melatonina están condicionados por la duración del ciclo luz/oscuridad siguiendo un ritmo circadiano, con concentraciones altas durante la noche y basales durante el día [Pang y cols., 1980; Aimoto y cols., 1985; Menéndez-Peláez y cols., 1987; Reiter, 1991a].

Incluso la señal de melatonina es capaz de reflejar información fotoperiódica acerca de los cambios estacionales. De modo genérico, podríamos decir que en el verano se producen bajos niveles de melatonina, y en invierno concentraciones mayores, pero de menor amplitud [Arendt y cols., 1981].

El ritmo circadiano de melatonina está fuertemente influido por la edad. Los recién nacidos y hasta los 3 meses de vida producen cantidades elevadas de melatonina en relación al adulto, pero carecen de ritmo circadiano. Al final del primer año de vida es cuando comienzan a diferenciarse los niveles plasmáticos diurnos y nocturnos, alcanzando las mayores concentraciones en el pico nocturno [Waldhauser y cols., 1993; Reiter, 1998]. Durante la pubertad hay una caída sobre todo a expensas de los valores nocturnos. Este ritmo circadiano día/noche se mantiene hasta que en época adulta entre los 45 y 65 años, decae progresivamente hasta igualarse los niveles séricos diurnos y nocturnos [Reiter, 1995b]. Otros factores que afectan al ritmo circadiano de melatonina son el ciclo menstrual, el tiempo diario de exposición al sol, el consumo de algunos fármacos como  $\beta$ -bloqueantes o benzodiacepinas, el estrés y el ejercicio [Ariznavarreta y cols., 2002].

Sin embargo, la melatonina sintetizada fuera de la glándula pineal escasamente pasa a la circulación, manteniendo niveles elevados de melatonina en los tejidos [Hardeland, 2008]. Esto refuerza que la melatonina realice otras funciones además de la hormonal. A nivel gastrointestinal, la melatonina se produce en las células enterocromafines, pero también se puede obtener melatonina del plasma o del tubo digestivo. Aunque las concentraciones se mantienen moderadas, el tracto gastrointestinal, debido a su tamaño, puede contener hasta 400-500 veces más melatonina que la glándula pineal [Bubenik, 2002; Hardeland y Pandi-Perumal, 2005]. También se encuentran altas concentraciones de melatonina en la bilis y en la circulación enterohepática [Bubenik y cols., 1999; Tan y cols., 1999a].

## METABOLISMO Y FARMACOCINÉTICA

Tras su paso por la sangre la mayor parte de la melatonina se cataboliza en el hígado, donde se transforma en 6-hidroximelatonina, gracias a la acción de las enzimas

del citocromo P<sub>450</sub>, como CYP1A2, CYP1A1 o CYP1B1 [Ma y cols., 2005], o por depuración de la melatonina de dos  $\cdot\text{OH}$ . La 6-hidroximelatonina es eliminada fácilmente por la orina al hacerse más hidrosoluble tras la conjugación hepática con anión sulfato o con ácido glucurónico [Kopin y cols., 1961; Kveder y Mc, 1961; Hardeland y cols., 1993]. La enzima CYP2C19 también en el hígado produce la desmetilación de melatonina formando N-acetilserotonina [Ma y cols., 2005].

La melatonina puede seguir otras rutas catabólicas, como la desacetilación para convertirse en 5-metoxitriptamina y la posterior desaminación por la MAO A que produce 5-metoxindol-3-acetaldehído, que a su vez será convertido, por la aldehído deshidrogenasa y la alcohol deshidrogenasa, en ácido 5-metoxiindolacético y 5-metoxitriptofol respectivamente. Esto sucede principalmente en la retina, aunque también en el hígado [Galzin y cols., 1988; Grace y cols., 1991].

También es posible su transformación en kinureninas mediante una ruptura oxidativa de su anillo pirrólico. Esto ocurre en la glándula pineal y el cerebro en presencia de la mieloperoxidasa, de la enzima indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO) [Hirata y cols., 1974; Kennaway y cols., 1988], o de numerosas formas no enzimáticas como la reacción con  $\cdot\text{OH}$ ,  $\cdot\text{O}_2^-$  o  $\text{H}_2\text{O}_2$  [Hardeland y cols., 1993; Tan y cols., 1998; 2000a]. En este caso, la melatonina se transforma primero en N<sup>1</sup>-acetil-N<sup>2</sup>-formil-5-metoxikinurenina (AFMK) y después por la acción de la arilamina formamidasa [Hardeland y Pandi-Perumal, 2005; Hardeland, 2005; Pandi-Perumal y cols., 2006], la hemoperoxidasa (catalasa) [Tan y cols., 2000a; Hardeland, 2005] o la liberación inducida por luz UV de monóxido de carbono, se transforma en N<sup>1</sup>-acetil-5-metoxikinurenina (AMK), molécula estable que se puede eliminar por la orina [Seever y Hardeland, 2008]. Con este mecanismo no enzimático, la melatonina depura dos radicales libres a la vez:  $\cdot\text{OH}$  y  $\cdot\text{O}_2^-$ .

AMK y AFMK son productos del metabolismo de la melatonina en el cerebro, pero también son productos secundarios cuando la melatonina actúa como depurador de radicales libres [Hirata y cols., 1974]. Es interesante el hecho de que los principales metabolitos de melatonina en cerebro, AFMK y AMK, también manifiestan importantes propiedades antioxidantes [Tan y cols., 2001; Tan y cols., 2003; Mayo y

cols., 2005], por lo tanto no sólo la melatonina sino también sus metabolitos son altamente eficientes en reducir el daño producido por los radicales libres. Nos referimos a ésta como la “cascada antioxidante de la melatonina”, un proceso que incrementa mucho la eficiencia de su ubicua actividad como depurador de radicales libres y antioxidante.

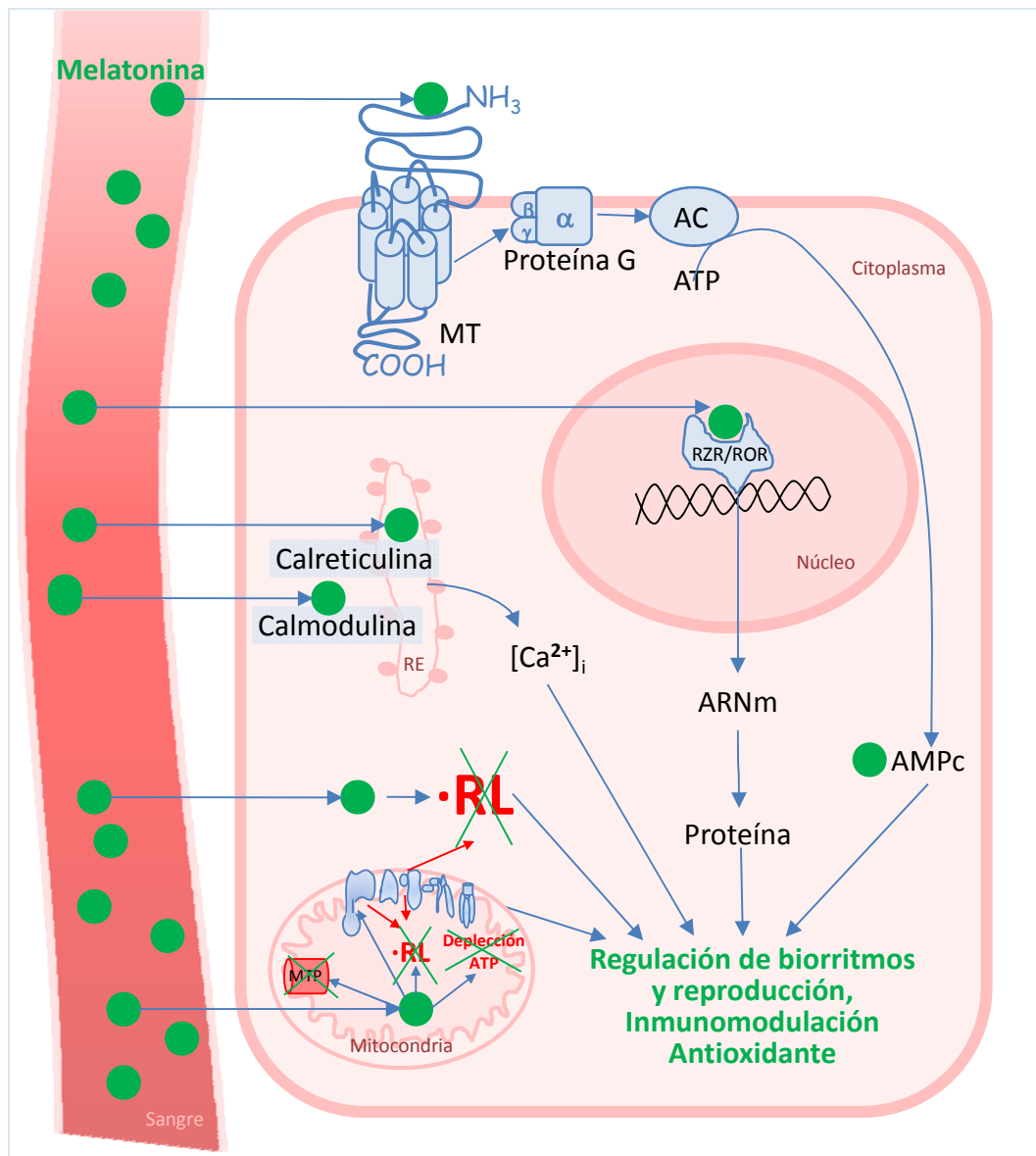
Otra vía de degradación es la formación de compuestos tricíclicos de la familia de las  $\beta$ -carbolinas. Estas moléculas se han aislado en todos los tejidos donde hay gran producción de melatonina [Airaksinen y cols., 1978; Kari, 1981; Leino y cols., 1983; Leino, 1984; Leino y cols., 1984]. Se ha propuesto una vía no enzimática consistente en la condensación de una indolamina y un aldehído, denominada ruta de Pictet-Spengler, que conduce a la formación de  $\beta$ -carbolinas [Mclsaac y cols., 1972; Bosin y cols., 1983; Callaway y cols., 1994].

## MECANISMOS DE ACCIÓN

Tras considerar a la melatonina como una hormona, se intentaron explicar sus funciones, principalmente las relacionadas con el control de los biorritmos y la reproducción, a través de su interacción con receptores de membrana. Sin embargo, estudios posteriores han descrito funciones de la melatonina que eran independientes de receptores de membrana. Así, en primer lugar, se demostró que la melatonina es un potente depurador de radicales libres [Tan y cols., 1993b; Reiter y cols., 1994]; en segundo lugar, se caracterizaron receptores nucleares para la melatonina en órganos periféricos [Acuña-Castroviejo y cols., 1993; Becker-Andre y cols., 1994; Hirose y cols., 1994] y en SNC [Acuña-Castroviejo y cols., 1993; Giguere y cols., 1994; Carlberg y Wiesenber, 1995]; por último, se demostró la capacidad de la melatonina para unirse a algunas proteínas intracelulares, como la proteína quinasa C (PKC) [Anton-Tay y cols., 1998], la calmodulina [Huerto-Delgadillo y cols., 1994; Pozo y cols., 1997] y la calreticulina [Macías y cols., 2003].

Esquemáticamente, los mecanismos de acción de la melatonina pueden dividirse en dos, aquéllos que están mediados por su unión a un receptor, ya sea de

membrana o nuclear, y aquéllos que se realizan de forma independiente de receptor, como la interacción con proteínas intracelulares y la actividad antioxidante (figura 13).



**Figura 13.** Resumen de los principales mecanismos de acción y funciones de melatonina. MT: Receptor de membrana de melatonina, AC: Adenilato ciclasa, RZR/ROR: Receptores nucleares de melatonina, ·RL: Radicales libres, MTP: Poro de permeabilidad transitoria mitocondrial, RE: Retículo endoplásmico.

## MECANISMOS MEDIADOS POR RECEPTOR

### 1. RECEPTORES DE MEMBRANA

Mediante agonistas marcados (2-[<sup>125</sup>I]-yodomelatonina) se han identificado receptores de membrana de melatonina [Dubocovich y Takahashi, 1987; Vanecek y cols., 1987; Weaver y cols., 1988; Williams y Morgan, 1988]. Son receptores proteicos



con 420 aminoácidos, de peso molecular 47.424 Da y con 7 dominios transmembrana hidrofóbicos [Ebisawa y cols., 1994]. Funcionalmente podemos hablar de dos tipos de receptores: de alta afinidad, del orden de 10-100 pM por 2-[<sup>125</sup>I]-aMT y que incluyen a los subtipos MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub>; y receptores de baja afinidad, con afinidad de 1-10 nM, MT<sub>3</sub> [Dubocovich y cols., 2003].

Los receptores MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub>, son receptores de membrana acoplados a proteínas G inhibitoras y ejercen su acción principalmente mediante la inhibición de la adenilatociclase, lo que conlleva una disminución del adenosinmonofosfato cíclico (AMPC) intracelular, la disminución de la actividad de la proteinquinasa A y la fosforilación de CREB, proteínas que se unen a fragmentos del ADN sensibles al AMPC. Los receptores MT<sub>1</sub> se expresan en cerebro, abundantemente en el núcleo supraquiasmático, el hipotálamo mediobasal, y la *porción tuberal* de la adenohipófisis [Vanecek, 1988; Williams y Morgan, 1988; Weaver y cols., 1989]. Además está presente en otras regiones del sistema nervioso central, vasculatura de ciertos órganos y células del sistema inmunitario [Martín y cols., 1982; Laudon y cols., 1988; Vanecek, 1988; Williams y Morgan, 1988; Duncan y cols., 1989; Weaver y cols., 1989; Bittman y Weaver, 1990; Weaver y Reppert, 1990; Blazynski y Dubocovich, 1991; Stankov y cols., 1991; Lindroos y cols., 1993; Pang y cols., 1995; Song y cols., 1997; García-Perganeda y cols., 1999]. Los MT<sub>2</sub> se hallan en la retina y otras estructuras cerebrales de mamíferos [Reppert y cols., 1995b; Reppert y cols., 1996; Mor y cols., 1999]. El receptor MT<sub>3</sub> no es claro que cumpla todos los criterios de receptor acoplado a proteína G, su activación estimula la hidrólisis de fosfoinositol [Dubocovich y cols., 2003].

Se han desarrollado diversos agonistas y antagonistas melatoninérgicos que se utilizan en investigación, o como en el caso de ramelteon (Rozerem®) como un fármaco aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) estadounidense para el tratamiento del insomnio [Pandi-Perumal y cols., 2007].

## 2. RECEPTORES NUCLEARES

---

La melatonina tiene funciones en tejidos en los que no se ha descrito receptores de membrana, como el corazón y el tiroides [Buzzell y cols., 1989; Reiter,

1991b; Chen y cols., 1993]. La existencia de receptores nucleares de melatonina se sugirió antes de su descubrimiento, cuando Withyachumnarnkul aisló melatonina en el núcleo celular, planteando que la melatonina podría actuar modificando la expresión génica en las células diana [Withyachumnarnkul y cols., 1986]. Mennenga y cols. [1991] describieron la presencia de melatonina en el núcleo de células de retina y glándula pineal de palomas y ratas, y redundaron en la posibilidad de que actúe en la transcripción génica.

Menéndez-Peláez y cols. [1991] demostraron que la melatonina inhibió la expresión de la enzima 5-aminolevulinato sintasa en la glándula harderiana del hámster sirio, y más adelante descubrieron una proteína nuclear que podría actuar como receptor nuclear para la melatonina, llevando a cabo estudios de fraccionamiento subcelular en tejidos de glándula harderiana, hipotálamo e hígado de rata [Menéndez-Peláez y cols., 1993]; también detectaron melatonina en el núcleo celular de numerosos tejidos, incluyendo cerebro, glándulas pineal y harderiana, intestino, hígado, riñón y bazo de roedores y primates, comprobando que la melatonina aparecía dispuesta principalmente asociada a la cromatina nuclear y no en el nucleolo.

Acuña-Castroviejo y cols. [1993; 1994] utilizando estudios de unión de ligando con  $^{125}\text{I}$ -aMT describieron la unión específica de alta afinidad de melatonina en un purificado de núcleos de hepatocitos de rata, con  $K_d = 148\text{-}190\text{ pM}$ , sugiriendo que la unión específica se producía con la fracción proteica del núcleo, y no con el ADN. Estos resultados, junto con los anteriores de Menéndez-Peláez y cols. podrían explicar efectos de la melatonina tales como la estimulación de enzimas antioxidantes, que podrían estar mediados por la acción sobre un receptor nuclear.

Los receptores nucleares son proteínas localizadas en el interior del núcleo, capaces de unirse a la región reguladora de algunos genes. Estas proteínas, cuando se unen a su ligando específico se activan, de forma que junto con factores de transcripción generales regulan la actividad de la ARN polimerasa II, necesaria para la expresión génica. Se conocen varias familias de receptores nucleares para hormonas esteroideas, tiroideas, vitamina  $\text{D}_3$  y retinoides. En muchos de estos receptores no se

pudo describir ninguna función cuando se descubrieron, por lo que se les denominó receptores nucleares huérfanos [Laudet y cols., 1992].

Se han clonado seis receptores nucleares de melatonina, miembros de la familia de proteínas huérfanas RZR/ROR. Se denominan ROR $\alpha_1$ , ROR $\alpha_2$ , ROR $\alpha_3$ , RZR $\alpha$ , RZR $\beta$ , RZR $\gamma$  [Becker-Andre y cols., 1993; Carlberg y cols., 1994; Giguere y cols., 1994; Hirose y cols., 1994]. RZR $\alpha$  y ROR $\alpha$  son nombres diferentes para el mismo receptor nuclear, que presenta al menos cuatro isoformas distintas generadas por el procesamiento diferencial de un ácido ARNm precursor común [Giguere y cols., 1994].

RZR/ROR $\alpha$  y RZR $\beta$  se expresan en el SNC [Carlberg y Wiesenberg, 1995]. RZR $\beta$  se encuentra en el núcleo supraquiasmático, retina y glándula pineal y sus niveles de expresión siguen ritmos circadianos, con niveles más altos durante la noche, y sigue un mecanismo regulado por AMPc [Baler y cols., 1996; Andre y cols., 1998]. RZR/ROR $\alpha$  se expresa en la periferia, con niveles más altos en la piel y en los leucocitos de sangre periférica [Becker-Andre y cols., 1993]. El receptor RZR $\gamma$  se encuentra fundamentalmente en el músculo esquelético, aunque también se ha localizado en el timo y en cantidades más bajas en páncreas, próstata, testículo, corazón e hígado [Hirose y cols., 1994].

El patrón característico en la expresión de los miembros de la familia de receptores huérfanos RZR/ROR, sugiere que cada subtipo de receptor debe tener funciones diferentes, relacionadas con mecanismos de control génico específicos de distintas células en diferentes procesos biológicos, tal y como ocurre con otros receptores nucleares que también poseen varios subtipos e isoformas, como RAR o receptor de ácido retinoico, RXR o receptor X retinoico, TR o receptor de hormonas tiroideas, y los PPARs o *peroxisome proliferator-activated receptors*.

## INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS INTRACELULARES

Se ha descrito la unión de la melatonina con proteínas intracelulares, como calmodulina, calreticulina y PKC. La calmodulina es una proteína ubicua y multifuncional, cuya función principal es quelar calcio, lo que le permite modular la actividad de muchas enzimas. Posee cuatro sitios de unión [Teo y Wang, 1973]. La

calmodulina interactúa con una gran cantidad de proteínas y péptidos citosólicos [Manalan y Klee, 1984]. Entre las enzimas que regula se encuentra la fosfodiesterasa de los nucleóticos cíclicos y la adenilato ciclasa necesaria para la formación del AMPc intracelular [Cheung, 1970; Cheung y cols., 1975]. Además puede interactuar con la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de eritrocitos y sinaptosomas, la quinasa de la cadena ligera de miosina, la NAD quinasa, la fosforilasa quinasa, la  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPasa y la NOS [Schmidt y cols., 1992]. También se une a otras proteínas del citoesqueleto, como la proteína 2 asociada al microtúbulo, tubulina, miosina y troponina. Cuando la melatonina interactúa con la calmodulina, inhibe la actividad fosfodiesterasa de forma concentración-dependiente, lo que permite modular directamente las señales intracelulares de calcio [Benitez-King y cols., 1993; Benitez-King y cols., 1996; Ouyang y Vogel, 1998].

La calreticulina es una proteína del retículo endoplasmático que también une calcio. Se trata de una proteína con varias funciones, entre las que se incluyen la actividad de los chaperones, la homeostasis intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$  y la regulación de la adhesión intercelular por interacción con las integrinas de la membrana [Macías y cols., 2003]. Hay varias evidencias que sugieren su localización citosólica [Jethmalani y cols., 1997; Yoon y cols., 2000; Holaska y cols., 2001] y nuclear [Roderick y cols., 1997]. Así, se describen interacciones de la calreticulina con la transducción de la señal hormonal de los glucocorticoides y los estrógenos [Platet y cols., 2000; Holaska y cols., 2001]. La unión de la melatonina a la calreticulina es altamente específica y se produce con una afinidad en el rango nanomolar [Macías y cols., 2003].

La PKC es una quinasa de serina y treonina activada por  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta enzima fosforila diversos sustratos y modifica la estructura del citoesqueleto [Aderem, 1992]. Benítez-King y Antón-Tay [1996] comprobaron que la melatonina activa la PKC, con una  $\text{IC}_{50}$  de 1 nM, de forma dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, otros derivados y análogos de la melatonina, como la serotonina, 6-hidroximelatonina, y N-acetilserotonina, no tuvieron efecto sobre la actividad de la enzima [Anton-Tay y cols., 1998].

Los resultados obtenidos de la interacción de melatonina con calmodulina, calreticulina y PKC, respaldan la idea de que la melatonina puede contribuir a modular la estructura del citoesqueleto. Además, como las tres proteínas son dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , es posible que otras proteínas con dominios de unión al calcio también puedan estar influidas por la melatonina. Los efectos de la melatonina en estos procesos de fosforilación/desfosforilación pueden ser el mecanismo por el que esta indolamina module numerosas respuestas biológicas.

Además, otro lugar de unión de la melatonina parece encontrarse en la mitocondria [Hardeland y Poeggeler, 2007]. Se postula que la proteína de unión se localiza en la rampa anfipática del complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial [Hardeland, 2008]. A concentraciones elevadas, se ha demostrado que la melatonina es capaz de inhibir la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PTP) [Andrabi y cols., 2004], un hecho que podría implicar un sitio de unión adicional, de baja afinidad.

La unión de la melatonina a los sitios de unión no mediados por receptor, propuestos previamente, permitiría explicar por qué la melatonina a pesar de ser capaz de atravesar todas las membranas biológicas no se libera en grandes cantidades al torrente circulatorio, sino que permanece en los tejidos a mayor concentración que en el plasma [Hardeland, 2008]. Además el hecho de que se acumule en algunos tejidos provoca la ausencia de ritmo circadiano de melatonina en éstos, y esto también puede resolver otra paradoja: por qué el pico nocturno de melatonina debería tener efectos protectores tanto de día como de noche, siendo que la mayor producción de radicales libres es en las fases de actividad neural y motora, ya que al carecer de ritmos de melatonina, sólo la generación de radicales libres se convierte en decisiva para la fase de detoxificación en estos tejidos [Hardeland y cols., 2003; Hardeland, 2005].

## MECANISMOS Y FUNCIÓN ANTIOXIDANTE DE LA MELATONINA

La presencia de melatonina en organismos unicelulares, como *Gonyaulax polyedra* [Poeggeler y Hardeland, 1994], o bacterias [Manchester y cols., 1995; Tilden y

cols., 1997], refuerzan la hipótesis de que la melatonina es un protector celular conservado evolutivamente [Hardeland y cols., 1995; Reiter y cols., 1997].

Un mecanismo de acción de la melatonina, independiente de su interacción con receptores o con proteínas intracelulares, es su interacción con radicales libres. Esta acción ocurre en todos los compartimientos del organismo. La primera observación de que la melatonina tiene propiedades antioxidantes la realizaron Iano y cols. [1991], y la confirmaron Tan y cols. [1993b], que demostraron que la melatonina neutraliza  $\cdot\text{OH}$ . A partir de ese momento, son miles los trabajos que demuestran la capacidad de la melatonina para interactuar con EROs, y por ello actuar como una molécula antioxidante.

## 1. ACCIONES ANTIOXIDANTES DIRECTAS DE LA MELATONINA

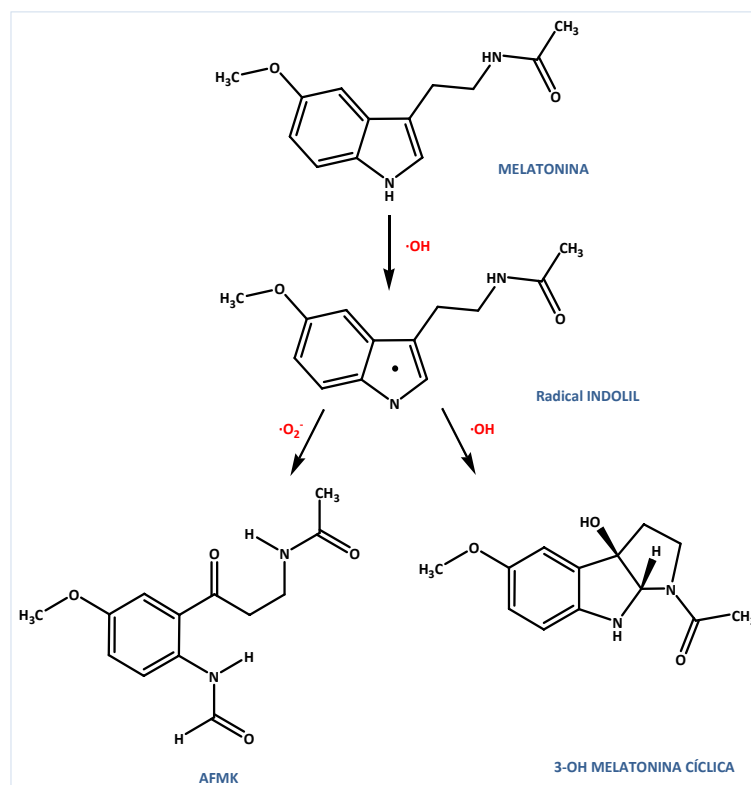
---

### 1.1. Reacción con $\cdot\text{OH}$

---

Su acción directa se debe a que la melatonina y algunos de sus metabolitos poseen la capacidad de depurar por sí mismos algunas especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno [Acuña-Castroviejo y cols., 2001; Reiter y cols., 2003b].

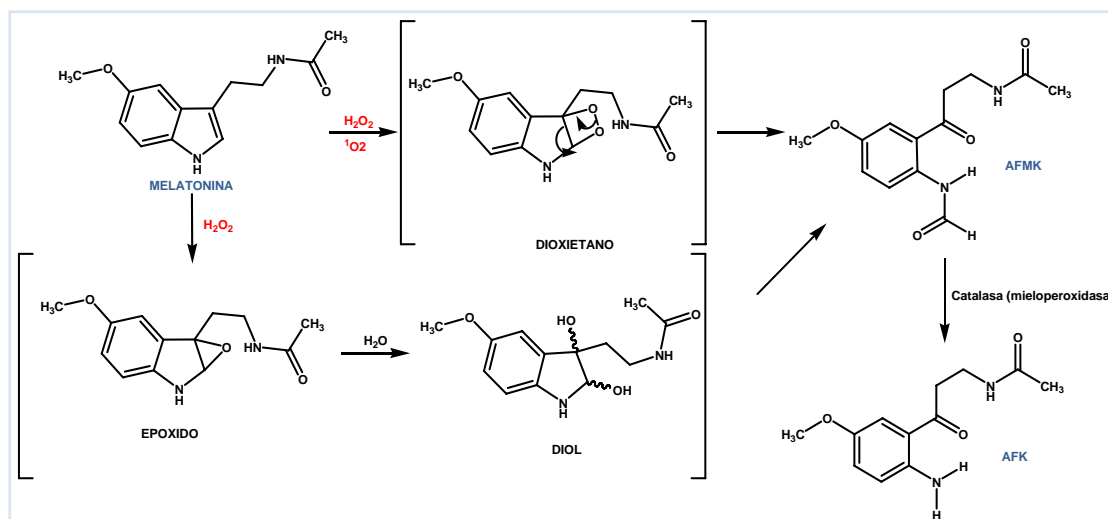
La melatonina es una molécula rica en electrones, que cede un electrón al  $\cdot\text{OH}$ , formándose un radical indolil, que es menos reactivo que el  $\cdot\text{OH}$  [Tan y cols., 1993b; 2000a]. Este radical puede reaccionar a su vez con un  $\cdot\text{O}_2^-$  para formar el producto final, AFMK, que se elimina por orina [Hardeland y cols., 1993; Poeggeler y cols., 1994]. Otra posibilidad es que el indolil radical formado reaccione con otro  $\cdot\text{OH}$  para producir la 3-hidroximelatonina cíclica (figura 14), que se elimina por orina. Mediante esta reacción, una molécula de melatonina tiene la capacidad de depurar dos  $\cdot\text{OH}$ . Se ha propuesto que la 3-hidroximelatonina cíclica se puede utilizar como un índice fiable de estrés oxidativo en el organismo *in vivo* [Roberts y cols., 1998; Tan y cols., 1998; Stasica y cols., 2000]. Tanto la 3-hidroximelatonina cíclica como la AFMK, tienen funciones depuradoras de agentes tóxicos [Acuña-Castroviejo y cols., 2001; Reiter y cols., 2003a].



**Figura 14.** Interacción de la melatonina con los  $\cdot\text{OH}$ .  
AFMK: N<sup>1</sup>-acetyl-N<sup>2</sup>-formil-5-metoxikinurenamina

## 1.2. Reacción con $\text{H}_2\text{O}_2$

La melatonina reacciona directamente con  $\text{H}_2\text{O}_2$  produciendo AFMK, a través de una serie de intermedios de reacción (figura 15) [Tan y cols., 2000a; 2000b]. Si en el medio se encuentra presente también un  $^1\text{O}_2$ , el mecanismo de reacción es diferente pero también conduce al mismo resultado, una molécula de AFMK. A continuación, la enzima catalasa (hemoperoxidasa) puede metabolizar el AFMK a AMK, y esta se excreta por la orina.

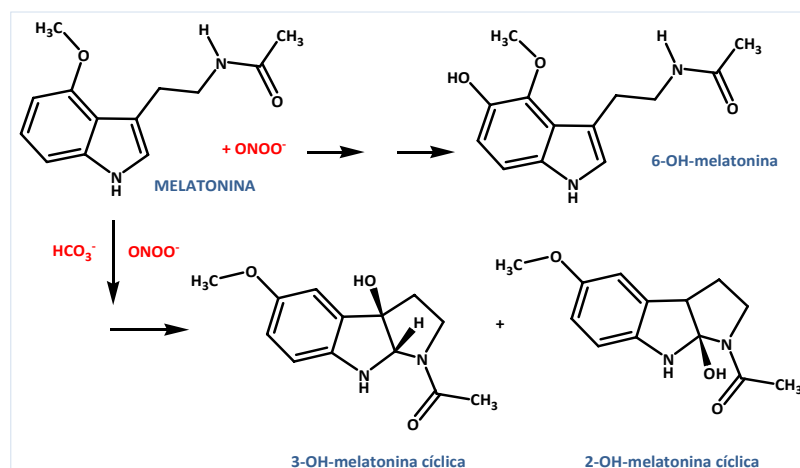


**Figura 15.** Reacción de una molécula de  $H_2O_2$  con otra de melatonina. AFMK:  $N^1$ -acetil- $N^2$ -formil-5-metoxikinurenamina, AMK:  $N^1$ -acetil-5-metoxikinurenamina.

### 1.3. Reacción con $ONOO^-$

La melatonina reacciona directamente con el  $ONOO^-$  [Zhang y cols., 1999], y el resultado de esta reacción es la formación de 6-hidroximelatonina, derivado que también tiene propiedades antioxidantes [Qi y cols., 2000; Maharaj y cols., 2003a; 2003b]. El  $ONOO^-$  se descompone en presencia de  $CO_2$  o proteínas que contengan el grupo hemo, como la hemoglobina. Si en el medio de reacción hay iones bicarbonato, los productos de la reacción son 2-hidroximelatonina cíclica y 3-hidroximelatonina cíclica. La 3-hidroximelatonina cíclica es el producto de reacción de melatonina con  $\cdot OH$ , y se cree que realmente lo que ocurre es que el  $ONOO^-$  se descompone para dar  $\cdot OH$ , y éste es el que reacciona con melatonina [Zhang y cols., 1998; Zhang y cols., 1999] (figura 16).

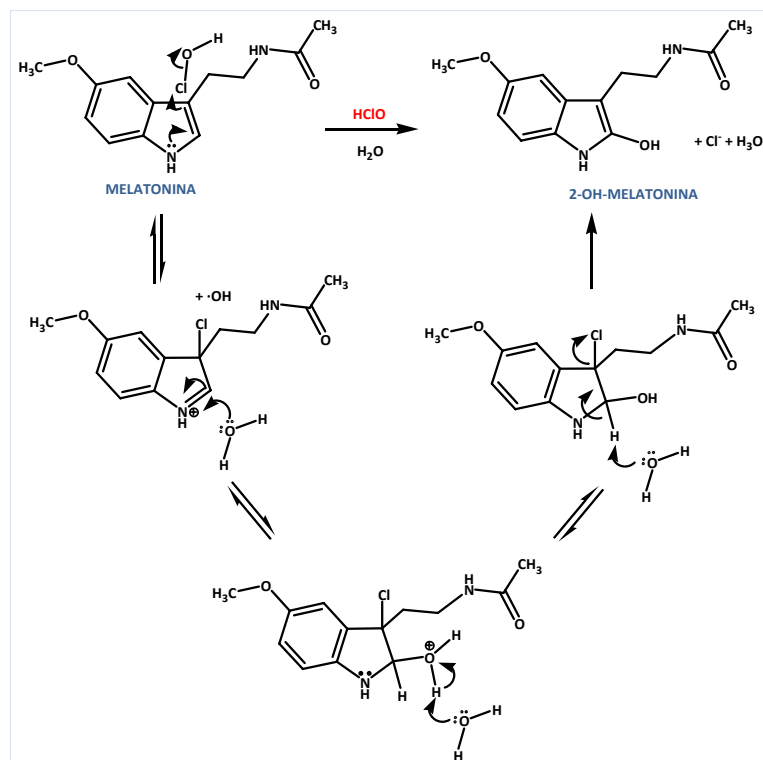




**Figura 16.** Formación de 6-hidroximelatonina por la interacción de melatonina con peroxinitrito.

#### 1.4. Reacción con $\text{HClO}$

La melatonina puede reaccionar con el  $\text{HClO}$  para producir 2-hidroximelatonina, por medio de una reacción de adición nucleófila [Marshall y cols., 1996; Dellegar y cols., 1999]. Participan activamente las moléculas de agua, por eso ocurre mucho más fácilmente en el citosol que en la membrana. Tras una serie de pasos intermedios, ilustrados en la figura 17, se produce la 2-hidroximelatonina que se excreta por orina [Dellegar y cols., 1999].



**Figura 17.** Reacción de la melatonina con el ácido hipocloroso.

### 1.5. Reacción con otros radicales libres

---

La melatonina también puede neutralizar el  $^1\text{O}_2$  oxidándose a AFMK [Cagnoli y cols., 1995; De Almeida y cols., 2003] y depurar  $\text{ROO}\cdot$  [Pieri y cols., 1994], interfiriendo así en la propagación de la peroxidación lipídica [Reiter y cols., 2003a], aunque este último podría deberse más a la acción de otras especies reactivas que pueden provocar peroxidación lipídica que a la depuración en sí de radicales  $\text{ROO}\cdot$ . No obstante, la melatonina es altamente eficaz para reducir los niveles de oxidación lipídica, tanto basales como estimulados por diversos mecanismos oxidativos [Reiter y cols., 2003a].

## 2. OTRAS ACCIONES ANTIOXIDANTES DE LA MELATONINA

---

Además de la capacidad intrínseca para depurar radicales libres, la melatonina es capaz de estimular la actividad y expresión de otros sistemas antioxidantes, estableciendo así una forma de acción indirecta para la reducción del estrés oxidativo [Kotler y cols., 1998; Antolín y cols., 2002; Mayo y cols., 2002].

En primer lugar, estimula el ciclo del glutatión, aumentando la actividad de la GPx y de la GR, regulando así el balance GSSG/GSH [Barlow-Walden y cols., 1995; Pablos y cols., 1995; Pablos y cols., 1998; Martín y cols., 2000a]. Además, aumenta la producción de glutatión por la estimulación de la  $\gamma$ -glutamylcisteina sintasa, enzima limitante en la ruta de síntesis de glutatión [Urata y cols., 1999]; y estimula la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que es la encargada de generar el NADPH, requerido por la GR [Pierrefiche y Laborit, 1995]. Así, la melatonina estimula otras enzimas antioxidantes como la SOD [Antolín y cols., 1996] y la catalasa [Coto-Montes y Hardeland, 1999; Acuña-Castroviejo y cols., 2001; Reiter y cols., 2003a; León y cols., 2004]. También inhibe otras enzimas que generan radicales libres, como la 5-aminolevulinato sintasa [Antolín y cols., 1996] y la NOS [Pozo y cols., 1994; 1997]. La melatonina también ejerce una acción sinérgica con otros antioxidantes como las vitaminas E y C [Reiter y cols., 2003a].

Dado que la melatonina es tanto lipofílica [Reiter, 1991b] como hidrofílica [Shida y cols., 1994], puede realizar sus funciones antioxidantes con igual eficiencia en

múltiples compartimentos subcelulares, es decir, en el núcleo [Tan y cols., 1993a; Blickenstaff y cols., 1994; Vijayalaxmi y cols., 1995], en el citosol [Abe y cols., 1994] y en las membranas [Pierrefiche y cols., 1993; Giusti y cols., 1995; Melchiorri y cols., 1995].

Recientemente se ha descrito que la melatonina puede realizar sus funciones antioxidantes a nivel mitocondrial. Estos estudios tienen especial interés porque la mitocondria es la primera fuente de radicales libres en las células eucariotas [Yu y cols., 1992] y además porque la melatonina es capaz de atravesar fácilmente la membrana mitocondrial y se acumula a elevadas concentraciones en dicha organela [Martín y cols., 2000a; Acuña-Castroviejo y cols., 2002; Acuña-Castroviejo y cols., 2003; León y cols., 2004]. Entre las principales acciones de la melatonina sobre la fisiología mitocondrial cabe incluir las siguientes: 1) la administración crónica de melatonina incrementa el número de mitocondrias de las células [Decker y Quay, 1982]; 2) estabiliza la membrana interna mitocondrial [García y cols., 1999]; 3) incrementa la actividad de los complejos I y IV de la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias hepáticas y cerebrales [Martín y cols., 2000b; Acuña-Castroviejo y cols., 2001; Acuña-Castroviejo y cols., 2005]; 4) previene la formación de radicales libres por la mitocondria, se postula que esta acción está mediada por un sitio de unión de la melatonina en el centro hierro-sulfurado N2 del complejo I [Hardeland y Poeggeler, 2007]; 5) aumenta la producción de ATP mitocondrial [Martín y cols., 2002]; 6) estabiliza la membrana mitocondrial frente a las EROs [Karbownik y cols., 2000] y 7) antagoniza o previene la apoptosis modulando la funciones mitocondriales [Baydas y cols., 2005; Sourdeval y cols., 2006] incluyendo los efectos en la homeostasis del calcio y el potencial de membrana mitocondrial [Xu y Ashraf, 2002; Hardeland, 2005; Sourdeval y cols., 2006], y también inhibiendo el poro de transición mitocondrial [Andrabi y cols., 2004]. Buenos ejemplos de los efectos protectores de la melatonina en la mitocondria son la inhibición de la peroxidación lipídica inducida por cianuro y ácido kaínico [Yamamoto y Mohanan, 2002; 2003], la reducción de la lipoperoxidación dependiente de NADPH en mitocondrias de placenta humana [Milczarek y cols., 2000], la reducción del daño en mitocondrias de cerebros de ratas inducido por lesión oxidativa [Wakatsuki y cols., 2001] y la prevención de la toxicidad del 1-metil-4-

fenilpiridinio [Absi y cols., 2000], el hidroperóxido de t-butilo [Martín y cols., 2000a] y el cianuro [Yamamoto y Tang, 1996]. Finalmente, la administración crónica de melatonina estimula la respiración mitocondrial en hígado y cerebro de ratones con envejecimiento acelerado [Okatani y cols., 2002a; 2002b; 2003b; 2003a].

Algunas de las propiedades antioxidantes de la melatonina son debidas a su efecto genómico en la regulación de la expresión de proteínas y la actividad de enzimas antioxidantes [Antolín y cols., 1996], así como la inhibición de la expresión de enzimas prooxidantes/proinflamatorias como la iNOS, la mtNOS y la COX-2 [Gilad y cols., 1997; Crespo y cols., 1999; Escames y cols., 2003; Mayo y cols., 2005]. La melatonina, además es un agente neuroinmunomodulador e inhibe la translocación del factor nuclear NF- $\kappa$ B en el interior del núcleo [Chuang y cols., 1996].

## **OTRAS FUNCIONES DE LA MELATONINA**

Además de su función antioxidante, la melatonina también participa en el control de los ritmos circadianos, la regulación de la reproducción y la inmunomodulación.

### **REGULACIÓN DE LOS RITMOS BIOLÓGICOS**

La glándula pineal es el principal mediador de la respuesta fisiológica ante los ritmos anuales, así como de los ritmos circadianos. Mediante su principal producto de secreción, la melatonina, actúa como nexo de unión entre el medio ambiente luminoso y los sistemas nervioso y endocrino. Todos los efectos cronobióticos de la melatonina están mediados por los receptores de membrana MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub> [Reppert y cols., 1995a; Jin y cols., 2003; Dubocovich y Markowska, 2005]. En el núcleo supraquiasmático, la melatonina afecta a la fase y amplitud de la oscilación circadiana. Dado que la glándula pineal está bajo el control del núcleo supraquiasmático, su acción en este marcapasos circadiano representa un mecanismo de retroalimentación envuelto en el reajuste del oscilador [Hardeland, 2008].

La administración exógena de melatonina sincroniza los ritmos circadianos que se encuentran en curso libre. Entre ellos el ritmo circadiano de la actividad de las neuronas del núcleo supraquiasmático. Ésta sincronización se produce a través de los receptores de alta afinidad para la melatonina. En humanos, la administración de melatonina sincroniza los ritmos de temperatura, sueño/vigilia y el de la melatonina endógena. La curva de respuesta de fase es una imagen especular de la que producen los pulsos de luz [Cassone y cols., 1986; Reiter, 1993; Vanecek, 1998].

El efecto de la melatonina sobre los ritmos circadianos también se ha estudiado en personas que realizan viajes transatlánticos [Petrie y cols., 1989; Tresguerres y cols., 2001; Takahashi y cols., 2002], en personas que trabajan en turnos de noche [Sack y Lewy, 1997; Yoon y Song, 2002] y en pacientes con ceguera causada por destrucción de la retina [Lewy y Newsome, 1983]. En todos ellos se describieron importantes alteraciones en el ritmo de secreción de melatonina y en los ciclos sueño-vigilia.

La administración exógena de melatonina a dosis farmacológicas produce hipotermia [Deacon y Arendt, 1995]. Por ello se cree que la melatonina también regula la variación circadiana de la temperatura corporal [Koster-van Hoffen y cols., 1993]. Todas estas funciones están relacionadas con el eje hipotálamo-epifisiario, en concreto con el núcleo supraquiasmático hipotalámico, que modularía la secreción de melatonina [Reiter, 1991c].

## REGULACIÓN DE LA REPRODUCCIÓN

Bajo fotoperiodos naturales, la duración del pico nocturno de melatonina es inversamente proporcional a las horas de exposición a la luz. El fotoperiodo cambia con las estaciones del año, siendo las noches más cortas en verano y más largas en invierno, y en consecuencia, los picos de melatonina duran menos en verano que en invierno. En animales de reproducción estacional, la melatonina regula el tamaño de los órganos sexuales, la secreción de hormonas asociadas con la fisiología reproductiva y el ciclo estral [Reiter, 1993; Moore, 1999]. Hoy día se acepta que la glándula pineal, a través de su hormona melatonina, controla los eventos neuroendocrinos de manera fotoperiódica [Badura y Goldman, 1992; Edmonds y Stetson, 1994]. En particular, los

cambios estacionales en los patrones de secreción de melatonina constituyen una señal esencial para las fluctuaciones anuales de la capacidad reproductora en animales mantenidos bajo condiciones fotoperiódicas naturales [Reiter, 1973b; Arendt, 1986].

Hace más de un siglo se estableció la relación de la glándula pineal con el desarrollo sexual y los cambios gonadotróficos. Heubner (1898) describió el caso clínico de un niño con pubertad precoz tras desarrollar un tumor en la glándula pineal. En los últimos años, numerosos trabajos relacionan la glándula pineal y la secreción de indolaminas con la reproducción en mamíferos [Reiter y Fraschini, 1969; Reiter, 1973a].

Se ha propuesto una relación entre la disminución de la secreción de melatonina al final de la infancia y la pubertad y el desarrollo de los caracteres sexuales [Waldhauser y cols., 1993]. Algunos autores sostienen la relación inversa entre la melatonina circulante y la edad. Durante la infancia y adolescencia no está necesariamente relacionada con el desarrollo sexual, sino más bien con la maduración corporal, lo que coincidiría con las observaciones que relacionan la secreción de hormona de crecimiento con melatonina en respuesta a la inyección de factor liberador de hormona del crecimiento [Valcavi y cols., 1993]. Los cambios en la actividad sexual de algunos mamíferos están ligados a los estacionales [Reiter, 1991a]. En diversas especies la administración de melatonina es capaz de modular la actividad del eje gonadal a diferentes niveles, incluyendo la secreción hipotalámica de factor liberador de gonadotropinas, la respuesta de los gonadotropos hipofisarios y por ello, la liberación de gonadotropinas y prolactina, la síntesis de esteroides gonadales o la respuesta de los órganos diana periféricos. Aunque los efectos más comúnmente observados fueron de carácter inhibitor, dependen en gran medida de la especie y de la pauta temporal de administración [Diaz y cols., 1999; Ijames y cols., 1999]. Muchos mamíferos tienen ciclos anuales de fertilidad e infertilidad, y es en estas especies donde la melatonina tiene una clara función reguladora de los ciclos reproductores. Estas pautas garantizan que el nacimiento de las crías se produzca en la época del año en la que las condiciones ambientales y la disponibilidad de alimento sean las óptimas para la supervivencia de los neonatos. En estas especies la pinealectomía bloquea los

efectos del fotoperiodo, y la administración de melatonina en la pauta apropiada es capaz de recuperar dicho efecto [Dardes y cols., 2000]. Por ejemplo en el hámster sirio, el aumento en la actividad pineal provocado por la reducción en la duración de los días durante el otoño y el invierno, produce regresión gonadal en el macho e interrupción de los ciclos estrales en la hembra, asegurándose así la inactividad sexual en dichas estaciones del año, sin embargo, la pinealectomía elimina dicha inactividad estacional [Hoffman y Reiter, 1965; Stetson y Watson-Whitmyre, 1986; Coto-Montes y Hardeland, 1999].

Desde el año 2000 está legalizada en España la comercialización de melatonina, como medio para mejorar la eficiencia reproductiva del ganado ovino. Se utilizan miniimplantes subcutáneos (2x4 mm) colocados en la base de la oreja que contienen 18 mg de melatonina, que se van liberando lentamente al objeto de inducir niveles plasmáticos de entre 100 y 300 pg/ml durante un periodo de tiempo de unos 100 días. De esta forma la oveja interpreta un ciclo de días cortos [Malpaux y cols., 1997], lo que estimula su actividad sexual [Forcada y cols., 2007], consiguiendo así sincronizar todos los partos en la época deseada.

## INMUNOMODULACIÓN

Los efectos inmunorreguladores de la melatonina representan otra línea de defensa [para revisión ver Carrillo-Vico y cols., 2005; Hardeland, 2008] [Maestroni y Conti, 1996; Gilad y cols., 1998; Guerrero y Reiter, 2002]. En la actualidad su papel antiinflamatorio está bien demostrado [Mayo y cols., 2005; Escames y cols., 2006], donde los efectos antioxidantes, mediante la disminución del NO, y los efectos mitocondriales, atenúan la señal proinflamatoria [Hardeland, 2008].

La melatonina también ejerce una acción estimulante de la respuesta inmune mediante la activación de varios tipos celulares como linfocitos T y B, NK, monocitos y células retículo endoteliales [Hardeland, 2008] y el aumento de producción de interleucina 4 (IL-4) en linfocitos T cooperadores (CD<sub>4</sub>) de la médula ósea y las células madre de la línea granulocítica-macrofágica [Maestroni y cols., 1994b].

La melatonina también protege a las células de la médula ósea de la apoptosis inducida por sustancias citotóxicas [Maestroni y cols., 1994a] y a los timocitos de la apoptosis inducida por glucocorticoides [Sáinz y cols., 1999]; esta protección se ha confirmado con el descubrimiento de receptores de alta afinidad para melatonina en linfocitos T<sub>CD4</sub> [González-Haba y cols., 1995]. Otros autores han descrito que la melatonina estimula la secreción de IL-1, IL-6, INF $\gamma$  [Barjavel y cols., 1998], la síntesis de ARNm de IL-1, la actividad citotóxica de los monocitos [Morrey y cols., 1994] y el incremento en la producción de IL-2 e IFN $\alpha$  por los linfocitos [García-Maurino y cols., 1998].



## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



## JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO

La bilis contiene ácidos biliares, bilirrubina, colesterol, metales de transición (como hierro y cobre), esteroides lipofílicos y varios metabolitos de xenobióticos. Entre sus funciones fisiológicas destaca la de regular el metabolismo del colesterol, promover la absorción de grasas y vitaminas liposolubles, y la excreción de sustancias tóxicas. Sin embargo, los ácidos biliares, que son sus mayores componentes, son citotóxicos cuando se acumulan intra o extracelularmente. Los ácidos biliares inducen apoptosis y necrosis celular, probablemente debido al daño oxidativo a la mitocondria [Roberts y cols., 1997; Palmeira y Rolo, 2004; Rolo y cols., 2004; Ferreira y cols., 2005; Sokol y cols., 2005].

En la colestasis, situación de acumulación de los ácidos biliares, se ha demostrado que los ácidos biliares inducen daño hepático [Parola y cols., 1996; Portincasa y cols., 2007], intestinal [Assimakopoulos y cols., 2006], renal [Kucuk y cols., 2003] y cerebral [Chroni y cols., 2006]. La acumulación suprafisiológica de ácidos biliares también induce pancreatitis aguda [Reinheckel y cols., 1998], fallo renal [Bomzon y cols., 1997], lesiones gastrointestinales [Craven y cols., 1986], y daño al ADN [Booth y cols., 1997; Debruyne y cols., 2001; Bernstein y cols., 2005; Jansen, 2007] y están implicados en el desarrollo del esófago de Barret [Jenkins y cols., 2007; Song y cols., 2007].

Los radicales libres han sido involucrados en la etiología de la colestasis [Sokol y cols., 1993]. Esta hipótesis es apoyada por los datos experimentales que muestran como diversos antioxidantes previenen estos cambios patológicos [Canturk y cols., 1998; Sokol y cols., 1998a; Montilla y cols., 2001; Rolo y cols., 2001; Gumprich y cols., 2004; Paumgartner y Beuers, 2004; Ara y cols., 2005; Crocenzi y cols., 2005; Soden y cols., 2007].

La melatonina previno el daño al hepatocito inducido por ácidos biliares [Montilla y cols., 1998; Padillo y cols., 2004], recuperó el estado antioxidante en la rata con ligadura del conducto biliar, [Esrefoglu y cols., 2005; Ohta y cols., 2005]. La melatonina también protegió de la colestasis materna [Pérez y cols., 2007], el estrés

oxidativo cerebral [Cruz y cols., 2007] y gástrico [Polat y Emre, 2006] en ratas con ictericia obstructiva, y frente al daño a la mucosa gastrointestinal inducido por una variedad de procesos generadores de radicales libres como la isquemia/reperfusión, alcohol y aspirina [Brzozowski y cols., 1997; De La Lastra y cols., 1997]. También se ha demostrado concentraciones de melatonina del orden de cientos de veces mayores en la bilis que en el plasma dependiendo de la especie animal donde se han medido [Tan y cols., 1999a; Messner y cols., 2001]. Se ha propuesto que esta presencia de melatonina tan elevada en la bilis pudiera estar relacionada con su función protectora contra el daño oxidativo de los ácidos biliares.

Este trabajo de investigación se diseñó para profundizar sistemáticamente en el conocimiento del papel del estrés oxidativo en la hepatotoxicidad por ácidos biliares y las propiedades antioxidantes de la melatonina frente a ésta hepatotoxicidad.

En primer lugar se estudió el estrés oxidativo inducido por ácidos biliares para comprobar si los ácidos biliares *per se* generan daño oxidativo. En segundo lugar, evaluamos la potenciación del daño oxidativo inducido por hierro y ascórbico en presencia de los ácidos biliares. Se utilizó un modelo productor de radicales libres que se basó en la generación de  $\cdot\text{OH}$ , utilizando un sistema constituido por cloruro férrico y ácido ascórbico, que como agente reductor, convierte el Fe (III) en Fe (II), por lo que exacerba la reacción de Fenton. En tercer lugar, se investigaron las condiciones óptimas de la lesión oxidativa a los lípidos y proteínas inducida por ácidos biliares. Por último, en cuarto lugar, se evaluó la actividad antioxidante y protectora de la melatonina, considerada como el principal producto de secreción de la glándula pineal, frente al daño inducido por ácidos biliares.

En todos los experimentos se utilizaron dos tipos de muestras, homogeneizado hepático y membranas aisladas. El uso de membranas celulares aisladas bien lavadas se justifica para reducir las interferencias en el modelo oxidativo causadas por la presencia de antioxidantes endógenos. En los homogeneizados de hígado se mantienen los niveles fisiológicos de antioxidantes. Puesto que la membrana celular está constituida en esencia por lípidos y proteínas, se utilizaron dos indicadores diferentes de lesión causada por radicales libres. Por un lado se determinaron los

niveles de MDA+4-HDA, como marcadores del daño oxidativo a los lípidos, y por otro se midieron los niveles de restos carbonilo como indicadores del daño oxidativo a las proteínas. Ambos parámetros bioquímicos definen bien el daño oxidativo producido a la membrana, y la cuantificación de éstos en ausencia o presencia de los diferentes ácidos biliares y de melatonina en variadas concentraciones ofrece una visión global del daño producido por los ácidos biliares y la protección que melatonina puede ejercer sobre el tejido hepático frente al daño por radicales libres inducido por ácidos biliares.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

**Primero:** Comparar entre sí las posibles efectos prooxidantes, de los ácidos biliares, valorando su actividad oxidativa de lípidos y proteínas de homogeneizados y membranas aisladas de tejido hepático, en presencia y ausencia de cloruro férrico y ácido ascórbico. El ácido biliar que mayor potenciación del daño oxidativo produzca se seleccionará para su posterior evaluación.

**Segundo:** Definir las condiciones de máximo daño oxidativo por ácidos biliares, en homogeneizados y membranas aisladas de tejido hepático, fijando el tiempo de incubación óptimo para inducir de forma significativa la oxidación de lípidos y proteínas. El modelo oxidativo elegido se utilizará en todas las valoraciones de la potencia antioxidante de la melatonina.

**Tercero:** Analizar los efectos protectores de melatonina, sobre la oxidación de lípidos y proteínas de homogeneizados y membranas aisladas hepáticas inducida por ácidos biliares, en presencia y ausencia de cloruro férrico y ácido ascórbico.



## MATERIAL Y MÉTODOS





## MATERIAL

### REACTIVOS QUÍMICOS UTILIZADOS

Todos los reactivos químicos utilizados en este trabajo se obtuvieron a partir de diversas casas comerciales, siempre de la mayor pureza disponible, y fueron conservados según las condiciones óptimas indicadas en el envase. A continuación se relacionan clasificados por el método donde se han utilizado y se indican los fabricantes donde se adquirieron:

#### *Perfusión animal y preparación tisular*

- Cloruro sódico (NaCl) (Panreac®).
- Tiopental sódico (Braun Medical®).
- Ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazina-1-etanosulfónico (HEPES) (Sigma-Aldrich®).
- Tris[hidroximetil]aminometano (TRIS) (Sigma-Aldrich®).

#### *Modelo de inducción de daño oxidativo*

- Quenodesoxicolato, tauroquenodesoxicolato, desoxicolato, taurodesoxicolato, ursodesoxicolato, litocolato y taurolitocolato sódicos, melatonina (aMT), cloruro férrico (FeCl<sub>3</sub>), ácido ascórbico, etilendiaminotetracético disódico (Sigma-Aldrich®).

#### *Cuantificación de la peroxidación lipídica*

- Acetonitrilo, ácido metanosulfónico, 1-metil-2-fenilindol, 1,1,3,3-tetrametoxipropano, Tris [hidroximetil] aminometano y metanol (Sigma-Aldrich®).
- Ácido clorhídrico (HCl) (Panreac®).

#### *Cuantificación de Los restos carbonilo proteicos*

- 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), ácido tricloracético (TCA), guanidina, etanol y acetato de etilo (Sigma-Aldrich®).

#### *Determinación de la concentración de proteínas*

- Albúmina sérica bovina (BSA), Tris[hidroximetil]aminometano (TRIS) (Sigma-Aldrich®).
- Reactivo de Bradford (Bio-rad®).

NaCl, LCA, TLC, DCA, TDA, QCA, TQA, UDA, BSA, EDTA, guanidina, DNPH, TCA y TRIS se disolvieron en agua destilada ultrapura obtenida con un sistema Milli-Q de Millipore®. Estas disoluciones se prepararon semanalmente, siendo almacenadas en botellas de vidrio color ámbar y conservadas en nevera a 4°C. La DNPH tras disolverse en agua ultrapura, se almacenó en una botella de vidrio color ámbar en oscuridad a temperatura ambiente. El 1-metil-2-fenilindol se diluyó en acetonitrilo y se conservó a 4°C.

El ácido ascórbico, el FeCl<sub>3</sub>, y el 1,1,3,3-tetrametoxipropano se disolvieron en tampón TRIS 20 mM (pH=7,40). Melatonina se disolvió en etanol (2%) y TRIS 20 mM. Todos estos reactivos se prepararon el mismo día del experimento, justo antes de ser utilizadas.

## **MATERIAL DE LABORATORIO**

El trabajo experimental se realizó en los laboratorios de Fisiología del Envejecimiento y del Estrés Oxidativo sitos en el Departamento de Farmacología y Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza. Están equipados con el siguiente utillaje utilizado en esta investigación:

- Agitadores: Vórtex Velp Scientifica® zx3 y vórtex Heidolph® REAX 2000.
- Balanza de precisión Cobos® CBH-300J.
- Balanza de precisión Cobos® A-220 CB.

- Baño termostatzado con agitación Bunsen® BTG-1.
- Centrífuga Beckman® Avanti 30™, refrigerada y equipada con dos rotores: F1010 para 10 tubos de 10 mL y H6002 para tubos Eppendorf de 1,5 y 2 mL.
- Espectrofotómetro Beckman-Coulter® DU800 con cubetas de plástico desechables para medir en el rango visible y cubetas de cuarzo para medir en el rango ultravioleta (UV).
- Homogeneizador de teflón acoplado a un rotor Heidolph® RZR 2020.
- Homogeneizador Ultra-Turrax Janke & Kunkel® T25.
- Dos juegos de pipetas de precisión Gilson®: P-20, P-200, P-1000 y P-5000.
- Un juego de pipetas Eppendorf®: 0,1-2,5; 2-20; 10-100; 50-250 y 200-1000.
- pHmetro Crison® micro pH 2001 equipado con sonda de temperatura.
- Material quirúrgico diverso: pinzas, tijeras, separadores, bisturí, etc.
- Sistema de agua destilada de Millipore® MilliRX.
- Sistema de agua ultrapura de Millipore® MilliQ.
- Máquina preparadora de escamas de hielo.
- Nevera (-20 °C). LIEBHERR Premium.
- Ultracongelador (-80 °C). Ing. CLIMAS. CVF 350/80.

## MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron los hígados de un total de 65 ratas macho de raza Sprague-Dawley con pesos comprendidos entre 200–225 g, adquiridas en Harlan Ibérica®. Los animales permanecieron estabulados en un ambiente controlado (temperatura  $22 \pm 1$  °C, ciclo de luz:oscuridad de 12:12 horas), con agua y comida *ad libitum* (dieta de mantenimiento para roedores, Harlan-Iberica®, tipo RMM). Todos los experimentos se realizaron cumpliendo estrictamente la normativa vigente europea (Directiva

86/609/CEE), española (Real Decreto 1201/2005) y autonómica (Ley 11/2003) para el uso de animales de experimentación. Para evitar la influencia del ritmo circadiano, todas las extracciones de tejido se realizaron entre las 8:00 y las 10:00 a.m.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

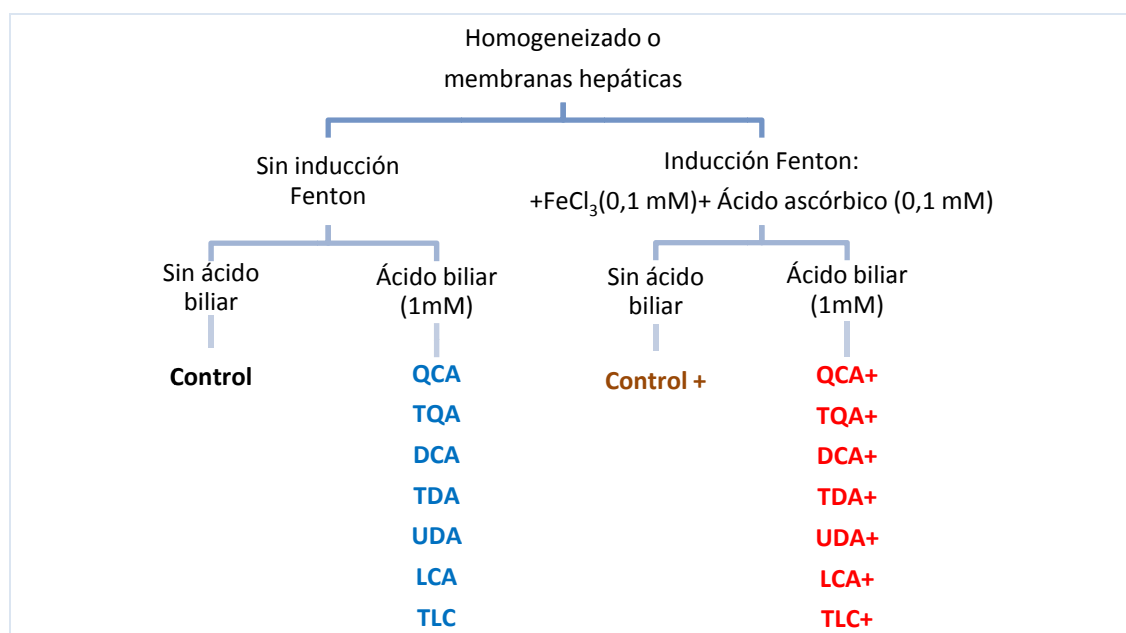
En la primera fase se estudió el efecto de diferentes ácidos biliares induciendo daño oxidativo. Esto nos permitió seleccionar el ácido biliar con mayor efecto prooxidante y realizar una segunda fase de estudios cinéticos de tiempo y de concentración para obtener las condiciones óptimas que se utilizaron en la tercera y última fase, donde se evaluó el efecto protector de la melatonina frente al daño oxidativo producido por este ácido biliar. Todos los experimentos se realizaron en dos tipos de muestras: homogeneizado de hígado y membranas de hepatocitos aisladas.

Por último, además de estudiar el efecto prooxidante de los ácidos biliares, se analizó su acción potenciadora del daño oxidativo producido por un sistema *in vitro* generador de radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) y peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ) basado en la reacción de Fenton. El metal de transición fue el hierro en estado reducido ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Los iones  $\text{Fe}^{2+}$  se obtuvieron de  $\text{FeCl}_3$  (0,1 mM) y ácido ascórbico (0,1 mM) como agente reductor. La oxidación se detuvo al final de la incubación mediante la adición de EDTA 2 mM. El EDTA quela el hierro libre del medio y de esa forma frena la progresión de la reacción de Fenton.

Inmediatamente después de cada incubación generadora de daño oxidativo se cuantificaron los niveles de dos marcadores del estrés oxidativo en el hígado, uno específico para la oxidación de lípidos y otro para las proteínas, MDA + 4-HDA y restos carbonilo de las proteínas respectivamente.

## ESTUDIO DEL DAÑO OXIDATIVO POR ÁCIDOS BILIARES

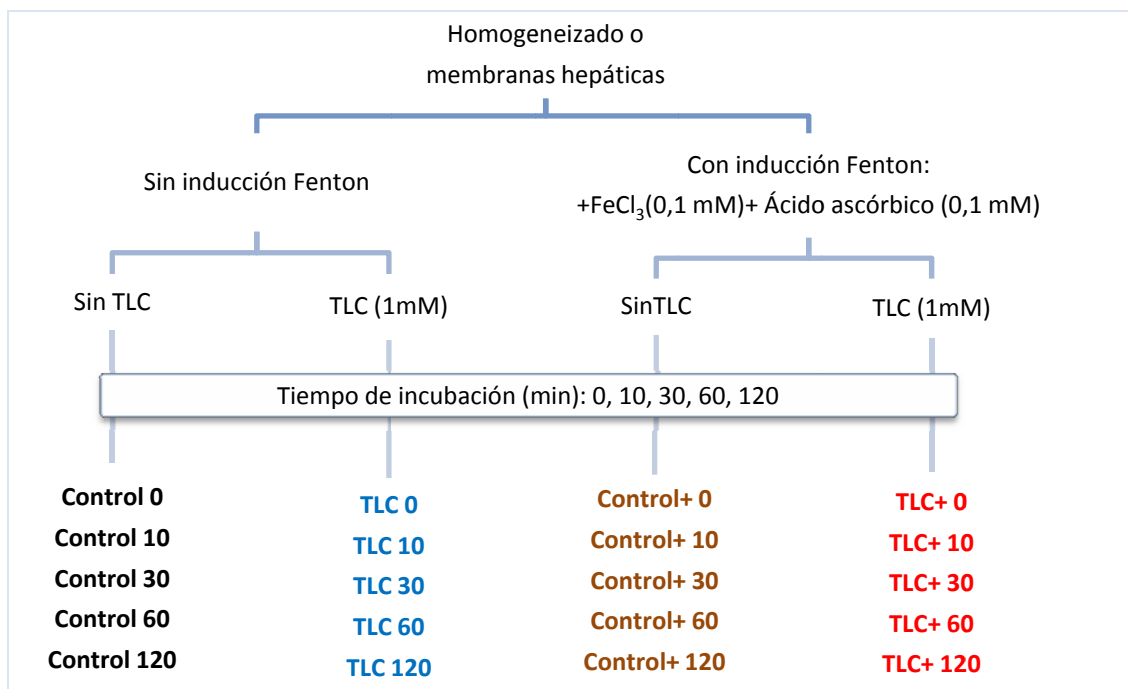
Homogeneizados hepáticos y una suspensión de membranas celulares aisladas de hepatocitos con una cantidad tisular equivalente a una suspensión proteínica de 0,5 mg/mL, fueron incubados a 37°C durante 2 horas en presencia y ausencia de  $\text{FeCl}_3$  y ácido ascórbico 0,1 mM y de concentraciones (1 mM) de los siguientes ácidos biliares: QCA, TQA, DCA, TDA, UDA, LCA y TLC (figura 18).



**Figura 18.** Diseño y nomenclatura utilizada en los experimentos del daño oxidativo inducido por ácidos biliares en ausencia o presencia de  $\text{FeCl}_3$  y ácido ascórbico. El tiempo de incubación fue de 120 min. QCA: Ácido quenodesoxicólico; TQA: Ácido tauroquenodesoxicólico; DCA: Ácido desoxicólico; TDA: Ácido taurodesoxicólico; UDA: Ácido ursodesoxicólico; LCA: Ácido litocólico; TLC: Ácido taurolitocólico.

## CINÉTICAS DE TIEMPO DE DAÑO OXIDATIVO

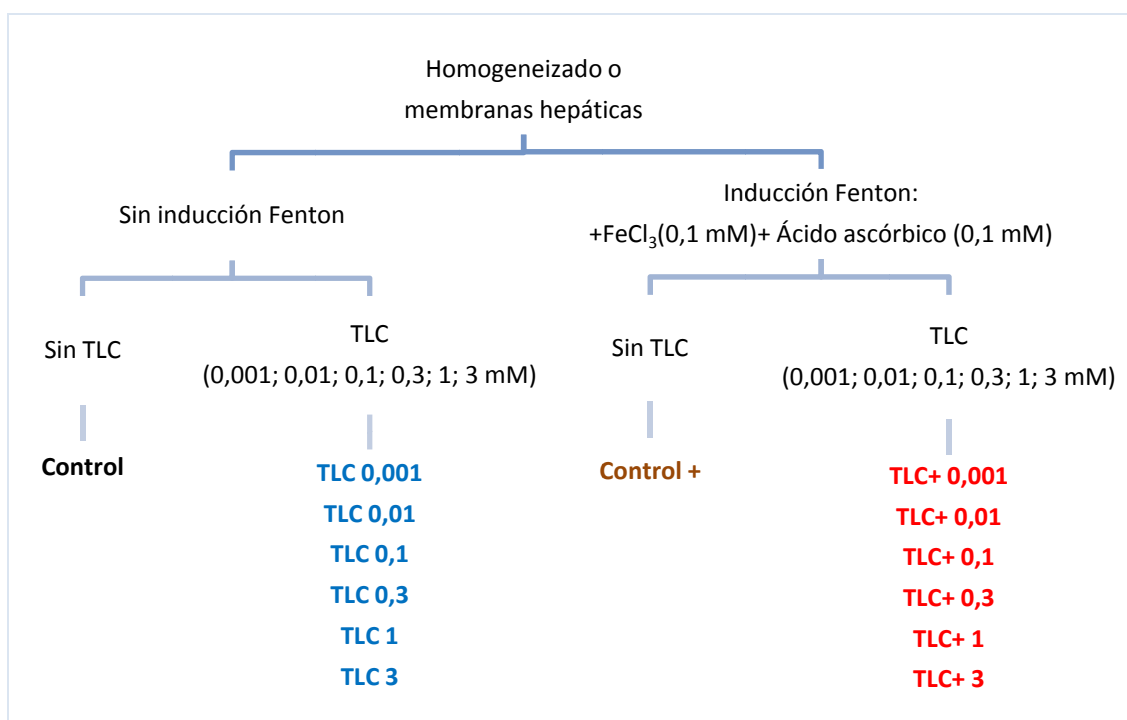
Seleccionado uno de los ácidos biliares, el TLC, la inducción del daño oxidativo se produjo incubando, con agitación suave, las alícuotas de los homogeneizados y de membranas (0,5 mg proteína/mL) a 37°C durante 0, 10, 30, 60 y 120 min en ausencia o presencia de  $\text{FeCl}_3$  y ácido ascórbico 0,1 mM, y 1 mM de TLC (figura 19).



**Figura 19.** Diseño experimental y nomenclatura en las cinéticas de tiempo de ácido taurolitocólico (TLC) en ausencia o presencia de daño oxidativo inducido por  $\text{Fe}^{2+}$ .

## CINÉTICAS DE CONCENTRACIÓN DE DAÑO OXIDATIVO

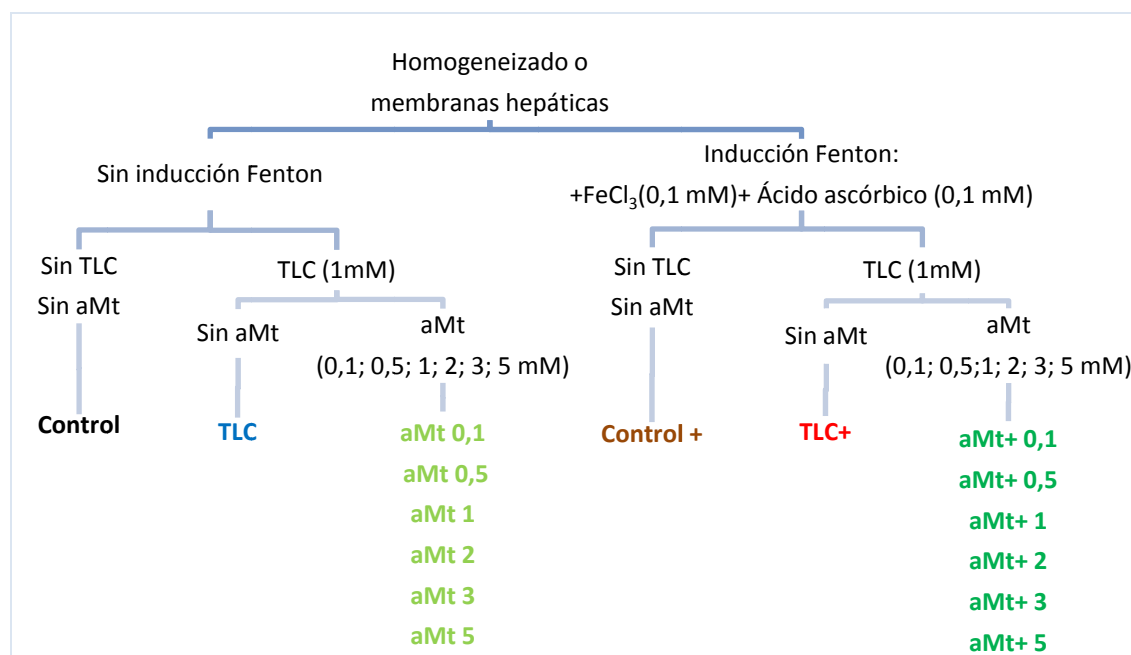
Seleccionado el tiempo de incubación, 120 min, alícuotas de los homogeneizados y de membranas se incubaron a 37°C con concentraciones crecientes de TLC de 0,001; 0,01; 0,1; 0,3; 1 y 3 mM en ausencia y presencia de  $\text{FeCl}_3$  y ácido ascórbico 0,1 mM (figura 20).



**Figura 20.** Procedimiento experimental y nomenclatura utilizada en las cinéticas de concentración de ácido taurolitocólico (TLC) en ausencia o presencia de  $\text{FeCl}_3$  y ácido ascórbico. El tiempo de incubación fue de 120 min.

## CINÉTICAS DE CONCENTRACIÓN DE MELATONINA

Finalmente estudiamos el efecto protector de la melatonina 0,1; 0,5; 1; 2; 3 y 5 mM frente a la toxicidad oxidativa del ácido taurolitocólico en ausencia o presencia de  $\text{FeCl}_3$  y ácido ascórbico (figura 21). Dado que la melatonina se disolvió en etanol (concentración final de etanol 0,05%), a las muestras controles y a aquellas en las que se indujo el estrés oxidativo, se les añadió la misma cantidad de etanol con el fin de que todas las muestras fueran tratadas bajo las mismas condiciones experimentales.



**Figura 21.** Planificación de los experimentos destinados a evaluar la acción antioxidante de la melatonina (aMT) frente a la toxicidad del ácido taurolitocólico (TLC) en ausencia o presencia de  $\text{FeCl}_3$  y ácido ascórbico. El tiempo de incubación fue de 120 min.



## MÉTODOS PARA LA PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

### PERFUSIÓN DE LOS ANIMALES Y OBTENCIÓN TISULAR

El objetivo de realizar una perfusión *in vivo* con suero fisiológico del lecho vascular, fue evitar que la hemoglobina interfiriera en los resultados de MDA + 4-HDA y que el hierro hemático elevara los niveles basales de estrés oxidativo.

Las ratas fueron anestesiadas mediante administración intraperitoneal de tiopental (50 mg/kg). A continuación, se accedió a la cavidad abdominal mediante una incisión en la línea alba hasta el diafragma, teniendo cuidado de no dañar el hígado. Se desplazó el paquete intestinal para facilitar el acceso al hígado. Mediante toracotomía en U se accedió a tórax y rápidamente, se practicó una punción en el ápex cardíaco, con una cánula de 18G. La perfusión intraventricular se realizó con suero fisiológico (0,9% NaCl) a 4°C. Para facilitar el drenaje del sistema venoso se realizó una incisión en la aurícula derecha del corazón, lo que permitió una rápida vía de salida de la sangre, que iba siendo sustituida con el suero fisiológico. Finalizada la perfusión en aproximadamente dos minutos, se extrajo el hígado lo más rápidamente posible, se lavó con suero fisiológico a 4°C mediante pases sucesivos por placas Petri colocadas en hielo. Los órganos se colocaron sobre papel de filtro para eliminar el suero y a continuación los hígados se almacenaron a -80°C hasta ser utilizados el día del experimento.

### HOMOGENEIZACIÓN DEL TEJIDO HEPÁTICO

Una vez pesado el hígado se troceó con bisturí sobre una placa Petri situada en hielo y los pedazos se introdujeron en un homogeneizador de vidrio con teflón acoplado a un rotor Heidolph® RZR 2020. Se añadió tampón Tris-HCl 20 mM a razón de 5 mL/g de tejido. La velocidad del homogeneizador fue de 300 revoluciones por minuto, velocidad que correspondía a la menor eficaz para homogeneizar el tejido.

Todo este proceso se realizó en frío para reducir al máximo posible la degradación enzimática tisular manteniendo el vidrio de homogeneización en hielo picado. Posteriormente, las muestras se distribuyeron en alícuotas y se almacenaron a -80°C hasta el momento de ser utilizadas en los ensayos.

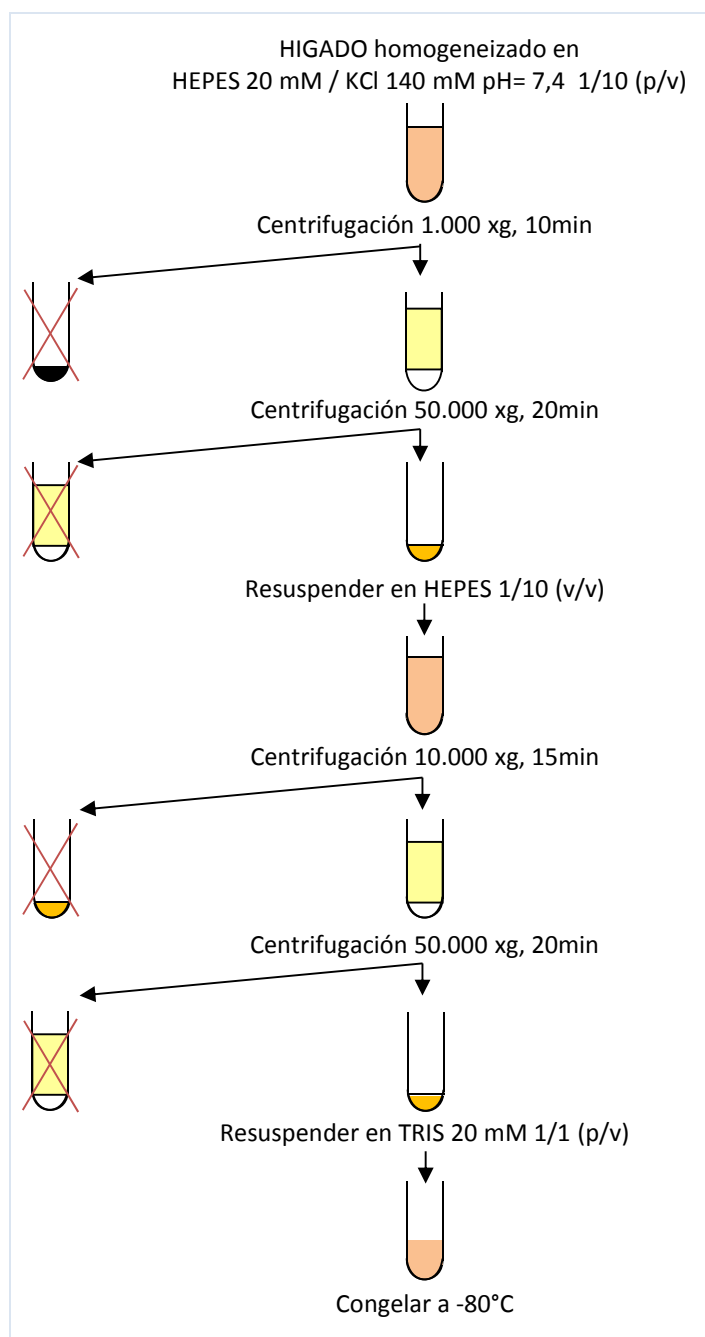
## AISLAMIENTO DE MEMBRANAS DE TEJIDO HEPÁTICO

Las membranas celulares se aislaron siguiendo la metodología descrita por Escames y cols. con ligeras modificaciones [Escames y cols., 2001; Millán-Plano y cols., 2003]. Este método consiste en la centrifugación diferencial (figura 22). En primer lugar se centrifugó el homogeneizado a 1000 xg durante 10 min a 4°C para eliminar los restos de tejido no homogeneizado, los núcleos grandes y otros detritos celulares. A continuación el sobrenadante se centrifugó a 50.000 xg durante 20 min a 4°C. El precipitado, que contenía las membranas y las mitocondrias, se resuspendió en tampón HEPES 20 mM KCl 140 mM (pH=7,4) y se volvió a centrifugar a 10.000 xg durante 15 min a 4°C. Una vez recogido el sobrenadante y la capa flogística, que contenían las membranas celulares, se centrifugó a 50.000 xg durante 20 min a 4°C. Esta velocidad de centrifugación conllevó la precipitación de las membranas, obteniendo por tanto un precipitado que se volvió a resuspender en tampón Tris-HCl 20 mM pH 7,4.

### Protocolo

- Homogeneizar las muestras de los hígados (1/10, p/v) en la solución tampón de HEPES 20 mM/ KCl 140 mM pH 7,4.
- Centrifugar el homogeneizado resultante a 1.000 xg durante 10 min a 4°C.
- Centrifugar el sobrenadante a 50.000 xg durante 20 min a 4°C.
- Resuspender el precipitado en el tampón HEPES 20 mM/ KCl 140 mM pH 7,4 (1/10, p/v ).
- Centrifugar a 10.000 xg durante 15 min a 4°C.

- Homogeneizar el sobrenadante y la capa flogística y centrifugar a 50.000 ×g durante 20 min a 4°C.
- Resuspender el precipitado final en tampón Tris-HCl 20 mM pH 7,4 (1/1, p/v) y conservar en alícuotas a -80°C hasta la realización de los ensayos.



**Figura 22.** Protocolo de aislamiento de membranas de hepatocitos.  
Método basado en la centrifugación a diferentes velocidades, lo que permite separar unas organelas de otras.

## MÉTODOS ANALÍTICOS

### DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

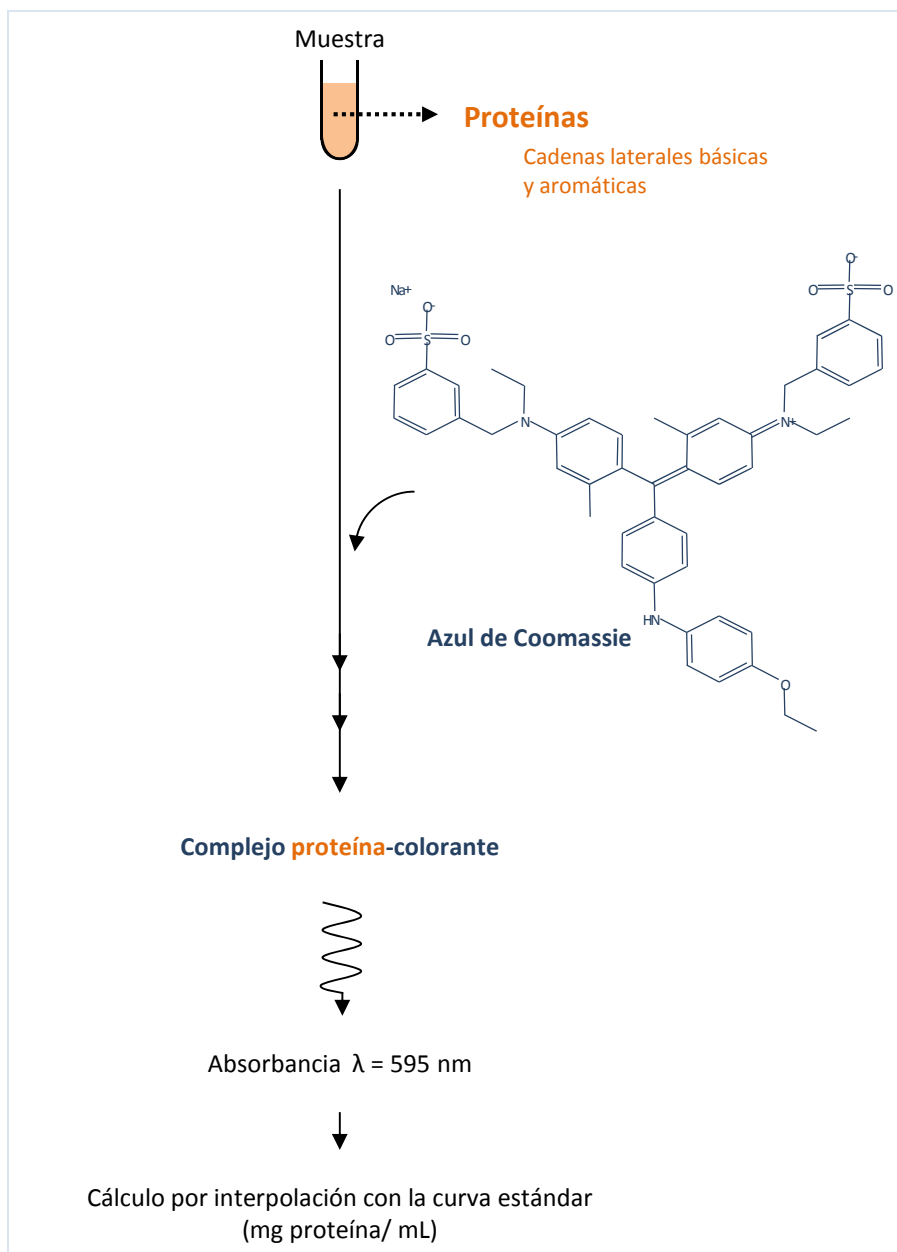
Todos los resultados de los indicadores de daño oxidativo obtenidos en este trabajo están referidos a la concentración de proteínas de las muestras analizadas. Para calcularla se utilizó el método de Bradford [1976]. Se basa en la reacción, por fuerza iónica, entre grupos sulfonados ácidos presentes en el azul de Coomassie y grupos amino libres presentes en aminoácidos básicos, principalmente arginina, lisina e histidina. Esta reacción produce cambios de absorbancia a 595nm que son directamente proporcionales a la concentración de proteína (figura 23).

La concentración de proteínas de la muestra problema se obtuvo interpolando su valor de absorbancia en la curva patrón obtenida (coeficiente correlación  $0,99 \pm 0,01$ ) y multiplicando posteriormente por el factor de dilución aplicado en cada caso. Los valores de concentración de proteínas se expresan en mg/mL.

#### *Protocolo*

- Dispensar 2 alícuotas de 4  $\mu$ L de cada una de las muestras problema previamente diluida para que la lectura esté comprendida entre los estándares inferior y superior.
- Añadir a todos los tubos tampón Tris 20 mM hasta completar 800  $\mu$ L.
- Dispensar 200  $\mu$ L de reactivo de Bradford de Bio-rad® (Azul brillante de Coomassie G-250 al 0,01%, etanol 4.7%, ácido ortofosfórico 8,5%, diluido en agua destilada).
- Agitar e incubar durante 10 min a temperatura ambiente y leer la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro. Utilizar como blanco 800  $\mu$ L Tris 20 mM y 200  $\mu$ L reactivo de Bradford.

- Para construir la recta de calibrado se realizan disoluciones de concentraciones conocidas (0-16  $\mu\text{g/mL}$ ) de seroalbúmina bovina (BSA) en tampón Tris 20 mM.



**Figura 23.** Protocolo de cuantificación de proteínas.

## CUANTIFICACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

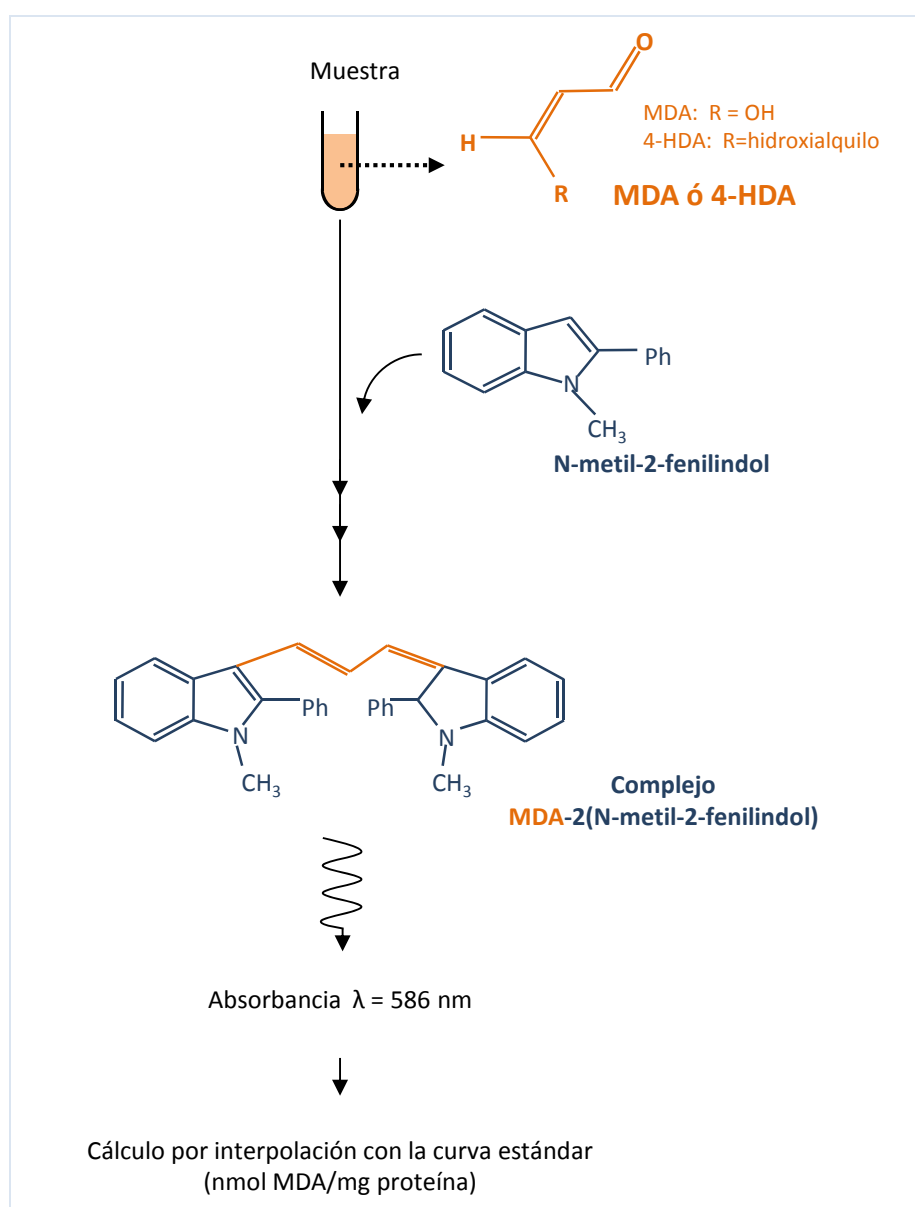
La acción de los radicales libres sobre los lípidos tiene lugar fundamentalmente sobre los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, provocando su peroxidación. Los productos finales de este proceso de peroxidación lipídica (LPO) son aldehídos, gases hidrocarbonados y varios residuos químicos, siendo mayoritarios el MDA y los 4-HDA. Por lo tanto la concentración de MDA+4-HDA es un indicador del grado de peroxidación de los lípidos de las membranas biológicas [Valenzuela, 1991]. La concentración de MDA+4-HDA se determinó por un método colorimétrico [Esterbauer y Cheeseman, 1990] basado en la reacción de un reactivo cromógeno, el N-metil-2-fenilindol, con el MDA o con los 4-HDA, a una temperatura de 45°C. La condensación de una molécula de MDA ó 4-HDA con dos moléculas de N-metil-2-fenilindol produce un cromóforo estable que, en presencia del ácido metanosulfónico presenta una absorbancia máxima a 586 nm (figura 24).

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Las concentraciones de MDA+4-HDA se corrigieron por las concentraciones de proteínas, expresando las concentraciones finales en nmol MDA+4-HDA / mg proteína.

### *Protocolo*

- Centrifugar las muestras a 3.000 xg durante 10 minutos a 4°C.
- Dispensar 2 alícuotas de 200 µL del sobrenadante y añadir 650 µL de N-metil-2-fenilindol 10,3 mM disuelto en acetonitrilo, y metanol, en relación 1:3 (v/v).
- Agitar y dispensar 150 µL de ácido metanosulfónico 15,4 M.
- Incubar los tubos durante 40 minutos a 45°C.
- Centrifugar a 3.000 xg durante 10 min a 4°C.
- Incubar 10 min a temperatura ambiente.
- Medir la absorbancia a 586 nm en el espectrofotómetro.

- Para obtener la recta de calibrado se utilizaron diluciones de concentración conocida (0 - 10  $\mu\text{mol/L}$ ), a partir de una disolución de 1,1,3,3-tetrametoxipropano 10 mM en TRIS 20 mM. El 1,1,3,3-tetrametoxipropano al hidrolizarse, libera MDA de forma estequiométrica [Nielsen y cols., 1997].



**Figura 24.** Protocolo de cuantificación de malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxialquenos (4-HDA).

## CUANTIFICACIÓN DE RESTOS CARBONILO

Para valorar el daño oxidativo a las proteínas de los homogenizados y de las membranas, se utilizó la determinación de los restos carbonilo de las proteínas [Davies y Goldberg, 1987; Dean y cols., 1997]. Para ello se siguió el protocolo descrito por Levine y cols. [1990] con modificaciones mínimas. Este método está basado en la reacción de los restos carbonilo de las proteínas con la DNPH, formándose un derivado que se cuantifica midiendo su absorbancia en el rango 360-390 nm. Durante el procedimiento se utiliza el TCA para la precipitación de las proteínas, los lavados para la eliminación del exceso de DNPH que no ha reaccionado con restos carbonilo, y la guanidina para redissolver las proteínas y poder realizar la lectura en el espectrofotómetro (figura 25).

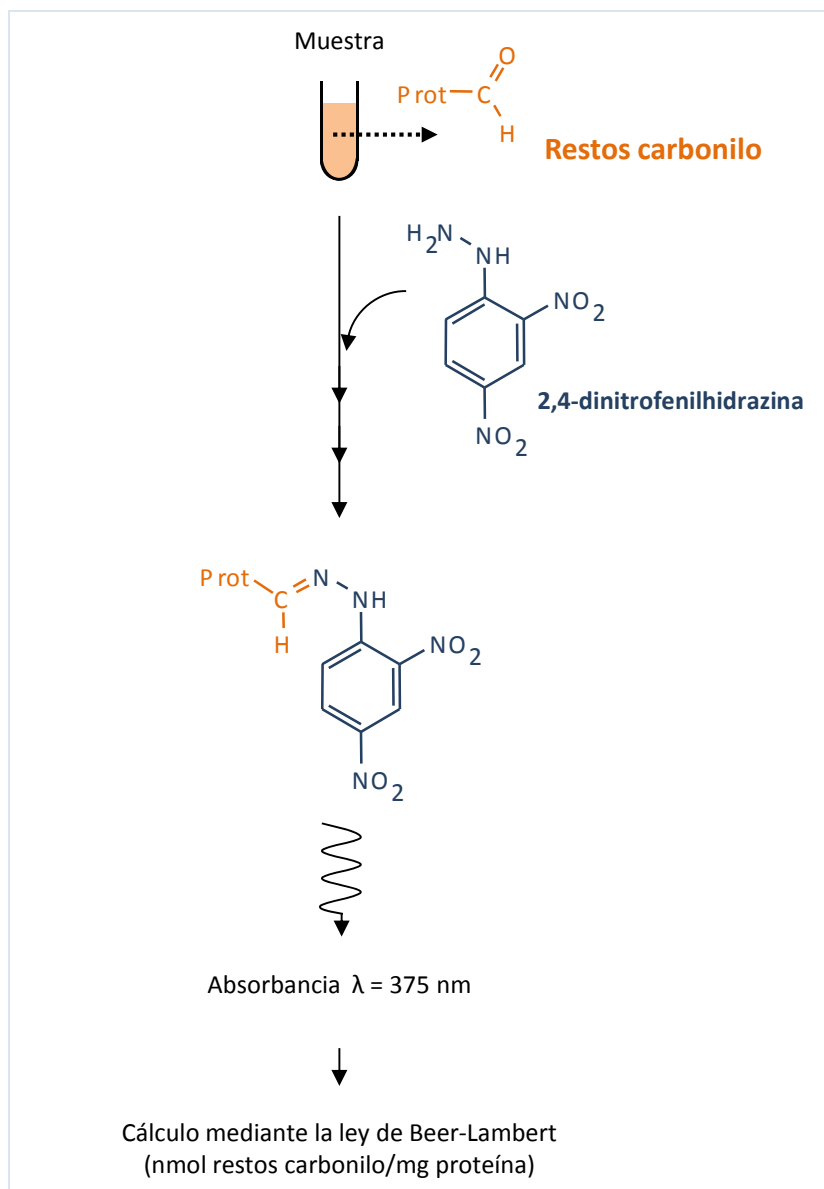
A partir de la absorbancia obtenida se calculó la concentración de restos carbonilo empleando la ley de Beer-Lambert y el coeficiente de absorción molar de la DNPH ( $\epsilon = 22.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Finalmente, tras la determinación de las proteínas totales, los resultados se expresaron en nmol de restos carbonilo / mg de proteínas totales.

### Protocolo

- Añadir a 1 mL de las muestras: 100  $\mu\text{L}$  de TRIS 20 mM pH 7,4 y 200 $\mu\text{L}$  de DNPH 10 mM en HCl 2N.
- Agitar e incubar durante 1h a 37°C.
- Dispensar 325  $\mu\text{L}$  TCA 50% frío e incubar en hielo durante 10 min.
- Centrifugar a 3.000 xg 10 min a 4°C.
- Lavar el precipitado 3 veces, resuspendiendo con 1 mL de etanol:acetato de etilo 1:1, v:v y centrifugando a 11.000 xg durante 3 min a 4°C.
- Disolver el precipitado final en 700  $\mu\text{L}$  de guanidina-HCl 6 M pH = 2,00.
- Agitar e incubar, a 37°C durante 15 min.
- Centrifugar a 12.000 xg durante 10 min a 4°C.



- Leer la absorbancia del sobrenadante a 375 nm (lámpara ultravioleta) en cubeta de cuarzo a temperatura ambiente. Utilizar como blanco una disolución de guanidina 6 M.



**Figura 25.** Fundamento de la cuantificación de restos carbonilo en las proteínas.

## MÉTODOS ESTADÍSTICOS

### ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LOS DATOS

Las variables cuantitativas se definieron mediante dos parámetros, la media aritmética, como medida de la tendencia central, y el error estándar, como una medida de la dispersión. Por ello, los resultados son expresados siempre como media aritmética  $\pm$  error estándar.

En cada grupo de estudio se comprobó la hipótesis de normalidad de las distribuciones mediante el test de Shapiro-Wilk. El valor de significación estadística se estableció en  $p \leq 0,05$ .

### INFERENCIA ESTADÍSTICA

Dependiendo del resultado de las pruebas de normalidad, para estudiar las diferencias entre los distintos grupos, por tratarse de datos relacionados, se realizó un análisis de la varianza para muestras repetidas, paramétrico, o el test de Friedman, no paramétrico. La hipótesis nula fue aceptada para todos aquellos datos de los grupos en los que F no fue significativa para un valor de  $p \leq 0,05$ .

Para la comparación estadística entre las medias de los grupos de datos en los que F fue significativa se aplicó el test de la t de Student para datos pareados, paramétrico, o el test de Wilcoxon, no paramétrico, con un nivel de significación aceptado en  $p \leq 0,05$ .

### CÁLCULO DE DAÑO OXIDATIVO INDUCIDO O POTENCIADO

Para poder comparar las potencias prooxidantes de cada uno de los ácidos biliares incluidos en este estudio, se calculó el porcentaje de daño oxidativo inducido por cada ácido. Para ello se utilizó la ecuación (14):

$$(14) \quad \% \text{ daño inducido} = \frac{X_a - X_c}{X_c} \cdot 100$$

Donde  $X_c$  es la concentración de MDA+4-HDA o restos carbonilo en las muestras en ausencia de ácido biliar, o controles y  $X_a$  es la concentración de MDA+4-HDA o de restos carbonilo en las muestras incubadas con una concentración 1 mM de cada ácido biliar.

Posteriormente se utilizó como sistema conocido generador de radicales libres la adición a la muestra de hierro ferroso. En este caso, se estudió en los diversos ácidos biliares su efecto potenciador del daño oxidativo producido. Para calcular el porcentaje de daño oxidativo potenciado por cada ácido se empleó la siguiente ecuación (15):

$$(15) \quad \% \text{ daño potenciado} = \frac{X_{a+} - X_{c+}}{X_{c+}} \cdot 100$$

Donde  $X_{c+}$  es la concentración de MDA+4-HDA o restos carbonilo en las muestras en ausencia de ácido biliar y en presencia de 0,1 mM de  $\text{FeCl}_3$  y 0,1 mM de ácido ascórbico, o controles positivos y  $X_{a+}$  es la concentración de MDA+4-HDA o de restos carbonilo en las muestras incubadas con una concentración 1 mM de cada ácido biliar, 0,1 mM de  $\text{FeCl}_3$  y 0,1 mM de ácido ascórbico.

## CÁLCULO DE LA $\text{IC}_{50}$

En este estudio se define  $\text{IC}_{50}$  como la concentración de melatonina necesaria para inhibir al 50% la formación, debida al TLC, inducida o no por hierro ferroso, de MDA+4-HDA y de restos carbonilo en los homogeneizados y membranas aisladas. Se calculó gráficamente tras la representación de los porcentajes de inhibición en la formación de estos dos marcadores de lesión oxidativa para cada concentración de melatonina. Para ello se utilizó la ecuación (16):

$$(16) \quad \% \text{ inhibición} = \frac{X_1 - X_2}{X_1 - X_0} \cdot 100$$

Donde  $X_0$  es la concentración de MDA+4-HDA o restos carbonilo en las muestras en ausencia de TLC, o controles;  $X_1$  es la concentración de MDA+4-HDA o de restos carbonilo en las muestras incubadas con TLC 1 mM;  $X_2$  es la concentración de MDA+4-HDA o de restos carbonilo en las muestras incubadas con TLC 1 mM y melatonina a distintas concentraciones.



## RESULTADOS



## ESTUDIO DEL DAÑO POR ÁCIDOS BILIARES

En primer lugar, para el desarrollo de este estudio se llevó a cabo una clasificación de todos los ácidos biliares analizados según su efecto como inductores o potenciadores de daño oxidativo. Posteriormente, se seleccionó el ácido biliar que mayor potenciación de daño oxidativo produjo. La tabla 4 resume el efecto de distintos ácidos biliares en la formación de MDA+4-HDA y restos carbonilo proteicos en homogeneizados y membranas de hígado.

**Tabla 4.** Efecto de distintos ácidos biliares en la formación de MDA+4-HDA y carbonilación proteica en homogeneizados y membranas de hígado. La incubación se realizó a 37°C durante 2h con 1 mM de cada ácido biliar, en presencia y ausencia de FeCl<sub>3</sub> 0,1 mM y ácido ascórbico 0,1 mM. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de al menos seis observaciones independientes,  $p \leq 0,05$  vs control (\*) o vs control en presencia de FeCl<sub>3</sub> 0,1 mM y ácido ascórbico 0,1 mM (#).

Fe <sup>2+</sup>	Ácido biliar	Homogeneizados		Membranas	
		MDA + 4-HDA (nmol/mg proteína)	Restos Carbonilo (nmol/mg proteína)	MDA + 4-HDA (nmol/mg proteína)	Restos Carbonilo (nmol/mg proteína)
Ausencia	Control	0,25 $\pm$ 0,05	2,16 $\pm$ 0,35	1,47 $\pm$ 0,30	3,83 $\pm$ 1,30
	QCA	0,33 $\pm$ 0,02	3,33 $\pm$ 0,24 (*)	1,72 $\pm$ 0,15	8,16 $\pm$ 2,99 (*)
	TQA	0,80 $\pm$ 0,15 (*)	4,56 $\pm$ 0,27 (*)	1,98 $\pm$ 0,22	9,46 $\pm$ 1,84 (*)
	DCA	0,45 $\pm$ 0,05	5,50 $\pm$ 0,74 (*)	2,53 $\pm$ 0,30 (*)	9,59 $\pm$ 1,77 (*)
	TDA	0,83 $\pm$ 0,13 (*)	5,90 $\pm$ 0,72 (*)	2,47 $\pm$ 0,38	11,51 $\pm$ 1,97 (*)
	UDA	0,39 $\pm$ 0,05	5,92 $\pm$ 0,86 (*)	2,52 $\pm$ 0,21 (*)	10,55 $\pm$ 1,99 (*)
	LCA	0,36 $\pm$ 0,06	4,78 $\pm$ 0,43 (*)	2,46 $\pm$ 0,17 (*)	8,92 $\pm$ 2,01 (*)
	TLC	1,93 $\pm$ 0,40 (*)	5,93 $\pm$ 0,58 (*)	6,59 $\pm$ 0,40 (*)	15,73 $\pm$ 2,77 (*)
Presencia	Control+	3,94 $\pm$ 1,13 (*)	6,05 $\pm$ 0,78 (*)	69,26 $\pm$ 2,89 (*)	38,23 $\pm$ 13,63 (*)
	QCA+	4,24 $\pm$ 0,84 (*)	6,95 $\pm$ 0,67 (*)	67,37 $\pm$ 2,36 (*)	45,37 $\pm$ 11,94 (*)
	TQA+	4,60 $\pm$ 0,94 (*)	7,93 $\pm$ 0,83 (*)	83,55 $\pm$ 3,92 (*, #)	53,72 $\pm$ 14,65 (*, #)
	DCA+	4,17 $\pm$ 0,72 (*)	7,60 $\pm$ 0,78 (*)	68,61 $\pm$ 2,33 (*)	49,60 $\pm$ 12,19 (*, #)
	TDA+	4,49 $\pm$ 0,90 (*)	8,25 $\pm$ 0,86 (*, #)	86,13 $\pm$ 3,25 (*, #)	51,03 $\pm$ 14,53 (*, #)
	UDA+	3,60 $\pm$ 0,81 (*)	6,99 $\pm$ 0,52 (*)	76,40 $\pm$ 3,49 (*, #)	48,38 $\pm$ 12,02 (*, #)
	LCA+	3,42 $\pm$ 0,94 (*)	7,57 $\pm$ 0,78 (*)	73,50 $\pm$ 3,59 (*)	47,37 $\pm$ 12,47 (*, #)
	TLC+	4,75 $\pm$ 1,10 (*, #)	9,90 $\pm$ 1,74 (*)	89,57 $\pm$ 3,32 (*, #)	66,43 $\pm$ 9,25 (*, #)

Tras incubar los homogeneizados de hígado durante 2h en presencia de 1 mM de distintos ácidos biliares, se estudió la formación de MDA+4-HDA (figura 26). Como puede observarse, tanto el TQA como el TDA y el TLC aumentaron significativamente la LPO con respecto al control. Expresando estos resultados como porcentaje de daño

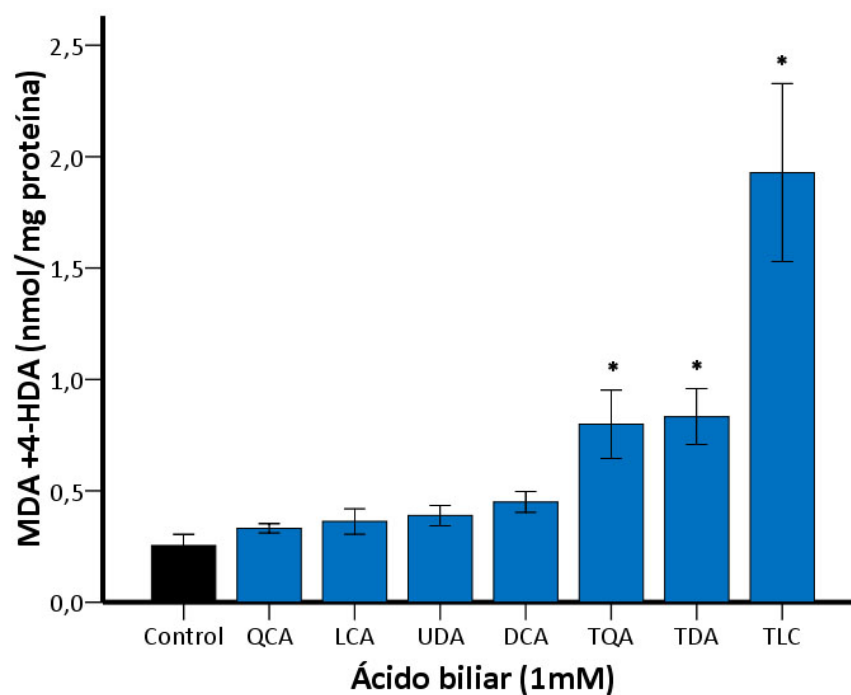
oxidativo inducido, tenemos que TQA, TDA y TLC aumentaron significativamente los valores de LPO respecto al control un 214%, 227% y 657% respectivamente (tabla 5). La figura 27 ilustra los cambios en la oxidación de proteínas en homogeneizados de hígado en presencia de los ácidos biliares evaluados. QCA, TQA, LCA, DCA, TDA, UDA y TLC aumentaron significativamente los valores de restos carbonilo respecto al control un 55%, 111%, 122%, 155%, 174%, 174% y 175 % respectivamente. De la observación de las figuras 26 y 27 y la tabla 4, se deduce que los ácidos biliares conjugados con taurina (TQA, TDA y TLC) aumentaron significativamente tanto los niveles de LPO como la oxidación de proteínas en homogeneizados.

En membranas, el efecto prooxidante de los ácidos biliares fue superior al de homogeneizados, especialmente en el TLC. Así, LCA, UDA, DCA y TLC aumentaron significativamente los valores de LPO respecto al control un 68%, 72%, 73% y 350% respectivamente (figura 28). También QCA, LCA, TQA, DCA, UDA, TDA y TLC aumentaron significativamente los valores de restos carbonilo respecto el control un 113%, 133%, 147%, 150%, 175%, 201% y 311% respectivamente (figura 29).

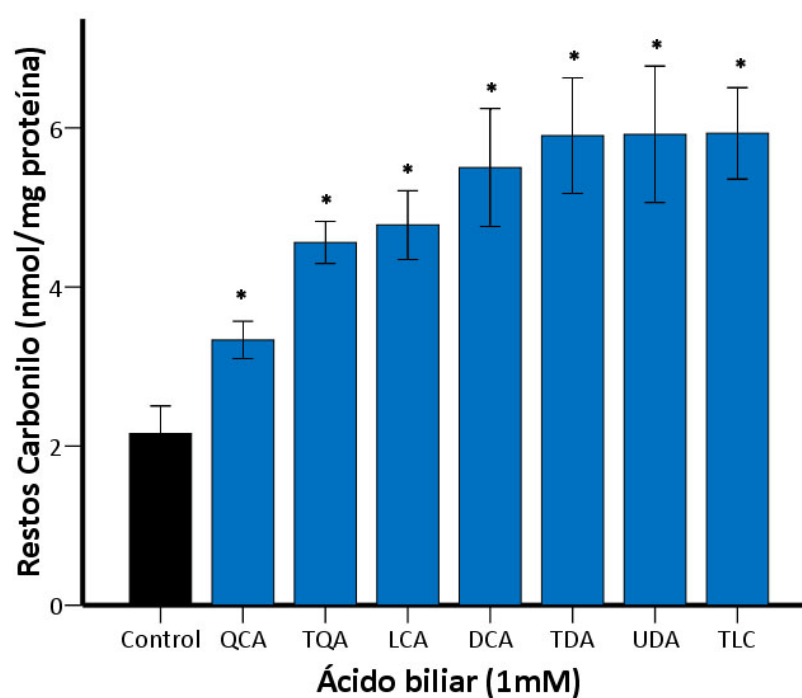
**Tabla 5.** Incremento porcentual de daño oxidativo a lípidos y proteínas hepáticas causado por ácidos biliares (1mM).

Fe <sup>2+</sup>	Ácido biliar	Homogeneizados		Membranas	
		MDA + 4-HDA	Restos Carbonilo	MDA + 4-HDA	Restos Carbonilo
Ausencia	QCA	30	55	18	113
	TQA	214	111	35	147
	DCA	77	155	73	150
	TDA	227	174	69	201
	UDA	53	174	72	175
	LCA	42	122	68	133
	TLC	657	175	350	311
Presencia	Control+	1.447	180	4.626	899
	QCA+	8	15	-3	19
	TQA+	17	31	21	41
	DCA+	6	26	-1	30
	TDA+	14	36	24	33
	UDA+	-9	16	10	27
	LCA+	-13	25	6	24
	TLC+	21	64	29	74

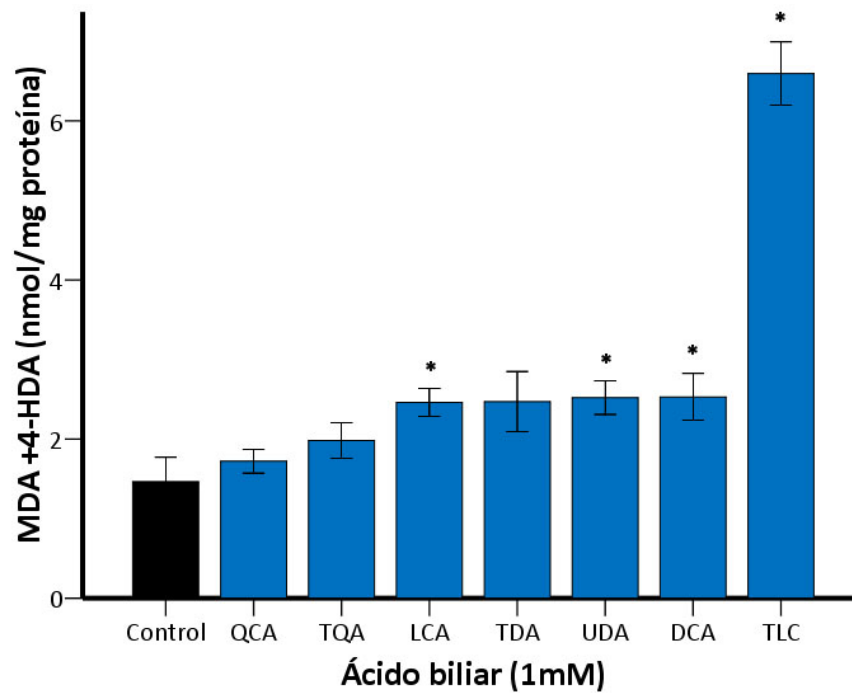




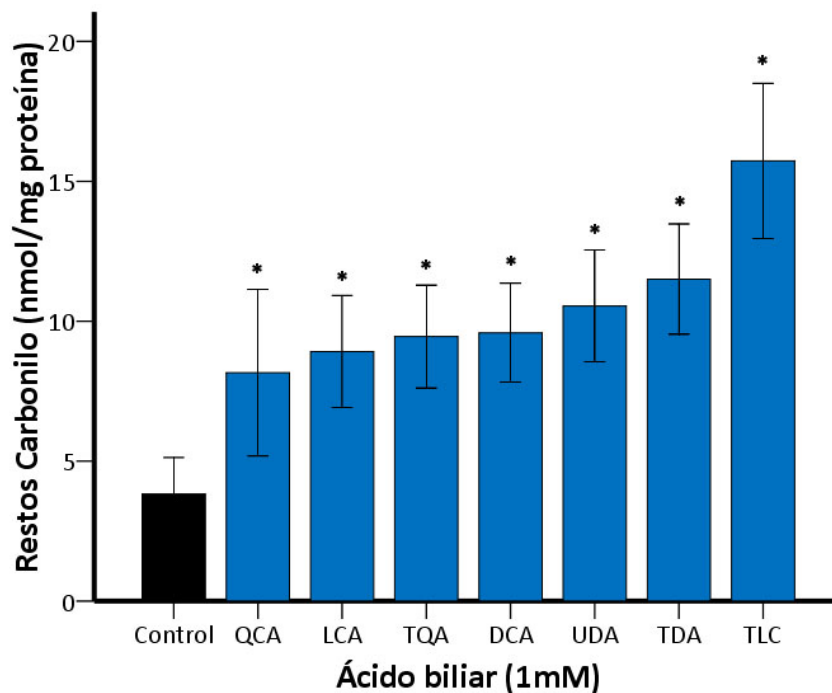
**Figura 26.** Efecto de los ácidos biliares en la formación de MDA+4-HDA en homogeneizados de hígado. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de al menos seis observaciones independientes,  $p \leq 0,05$  vs control (\*).



**Figura 27.** Efecto de los ácidos biliares en la formación de restos carbonilo en homogeneizados de hígado. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de al menos seis observaciones independientes,  $p \leq 0,05$  vs control (\*).



**Figura 28.** Efecto de distintos ácidos biliares en la formación de MDA+4-HDA en membranas hepáticas aisladas. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de al menos seis observaciones independientes,  $p \leq 0,05$  vs control (\*).



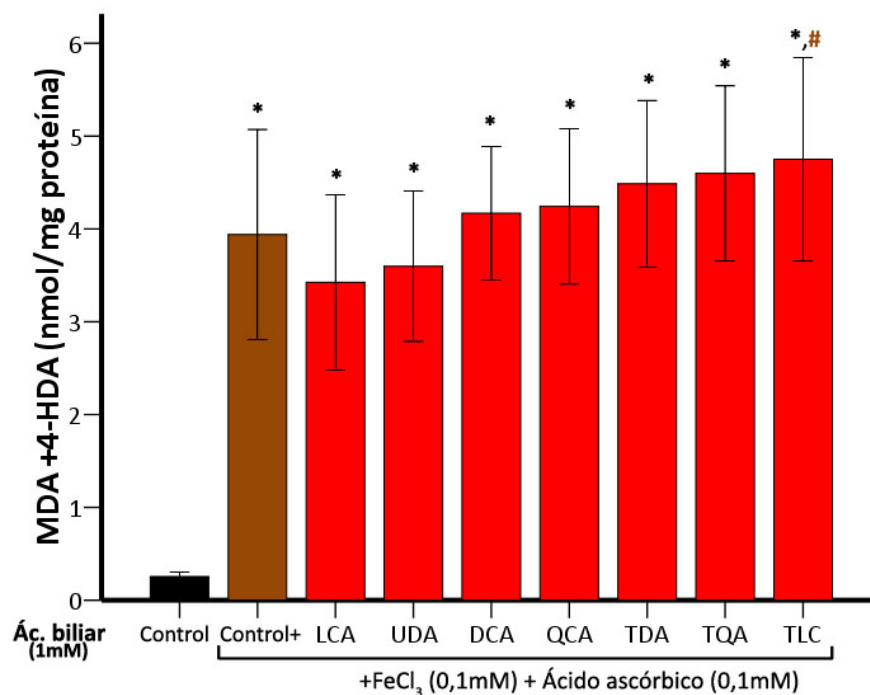
**Figura 29.** Efecto de distintos ácidos biliares en la formación de restos carbonilo en membranas de hígado. La incubación se realizó a 37°C durante 2h en presencia de una concentración 1 mM de cada ácido biliar. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de al menos seis observaciones independientes,  $p \leq 0,05$  vs control (\*).

Al añadir al medio de incubación cloruro férrico y ácido ascórbico aumentó significativamente la oxidación de lípidos y de proteínas comparado con el control en ausencia de hierro, tanto en homogeneizados como en membranas (figuras 30 a 33). Así, los valores de la LPO son 15 y 46 veces superiores que los valores control en homogeneizados y en las membranas respectivamente (figuras 30 y 32). En los estudios de oxidación de las proteínas, tras la adición de cloruro férrico y ácido ascórbico, los carbonilos proteicos fueron 2 y 9 veces superiores que los obtenidos sin hierro en los homogeneizados y en las membranas respectivamente (figuras 31 y 33).

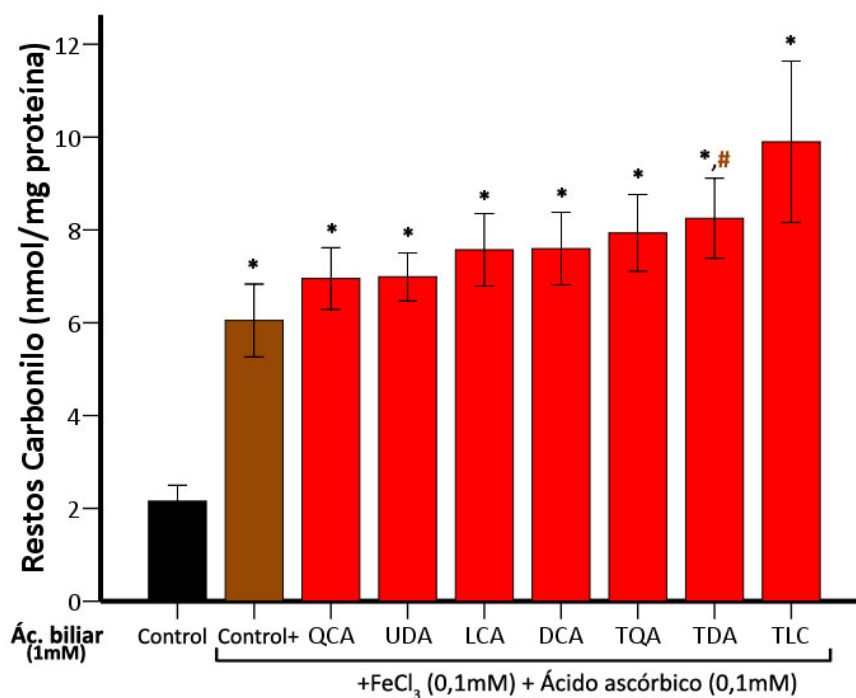
La mayoría de los ácidos biliares aumentó la peroxidación lipídica en los homogeneizados hepáticos producida por la reacción de Fenton, si bien las diferencias tan sólo fueron estadísticamente significativas respecto al control oxidado en presencia del TLC (figura 30), con un 21 % de incremento. Este ácido ya fue el que obtuvo la mayor significancia en ausencia de hierro (figura 26).

En términos del estrés oxidativo proteico de los homogeneizados, se obtuvieron resultados similares. La mayor carbonilación la alcanzaron el TDA, 36% de incremento respecto al control positivo, y el TLC, 64% (tabla 5), si bien tan sólo se obtuvo significación estadística en el contraste del control positivo con el TDA, por la mayor dispersión de resultados obtenidos en los experimentos del TLC (figura 31).

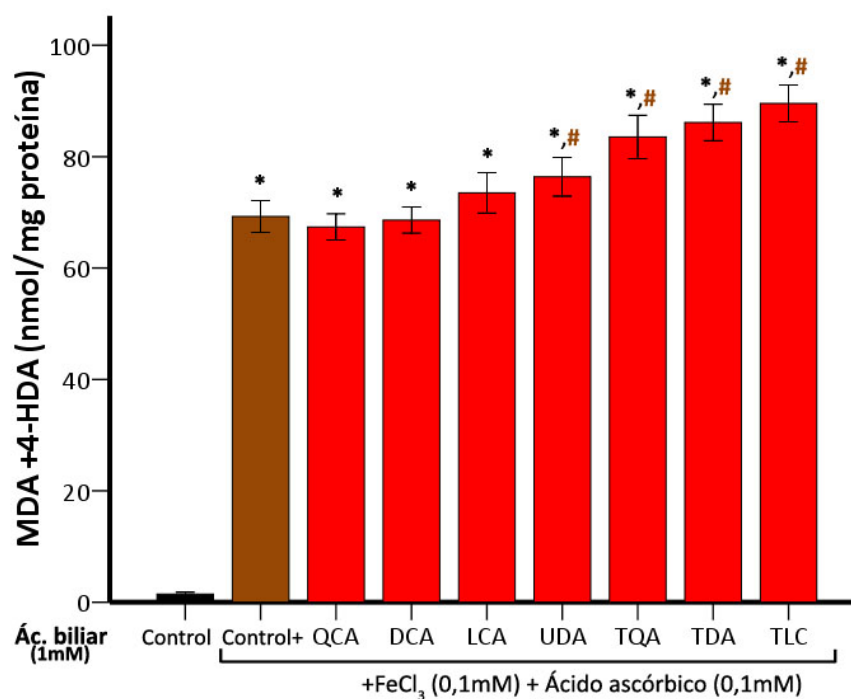
Al igual que sucedió en los homogeneizados, los resultados fueron más evidentes cuando la muestra utilizada fue la membrana. En éstas, UDA, TQA, TDA, y TLC potenciaron significativamente la LPO presente en el control positivo en un 10%, 21%, 24% y 29%, respectivamente (figura 32). Respecto a la oxidación proteica causada por el hierro, los ácidos que potenciaron significativamente la aparición de restos carbonilo fueron LCA, UDA, DCA, TDA, TQA y TLC con incrementos de 24%, 27%, 30%, 33%, 41% y 74% respectivamente (figura 33).



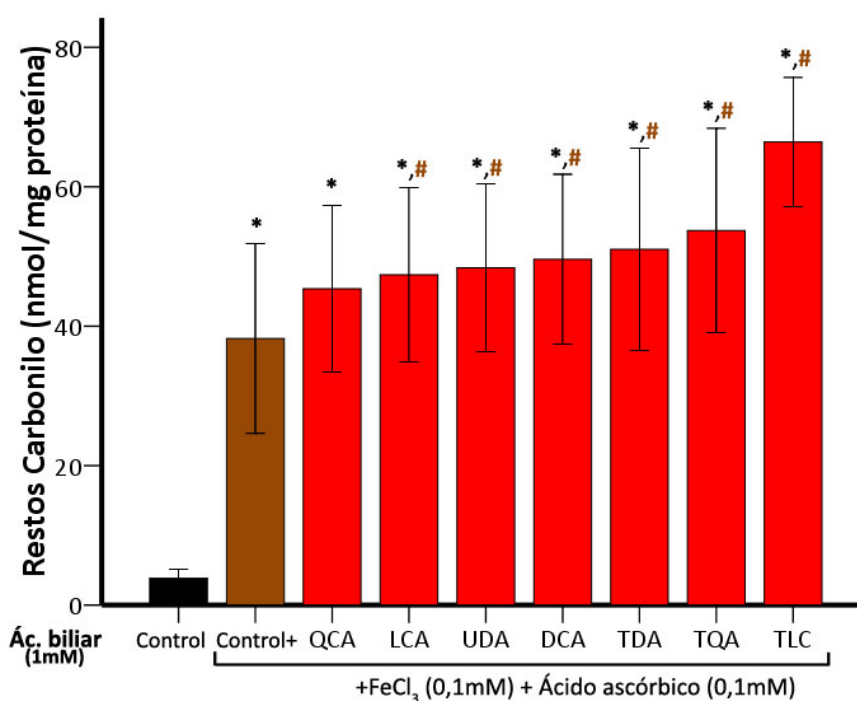
**Figura 30.** Efecto de los ácidos biliares en la formación de MDA+4-HDA en homogeneizados de hígado en el sistema generador de radicales libres del FeCl<sub>3</sub> y ácido ascórbico. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de al menos seis observaciones,  $p \leq 0,05$  vs control (\*) o vs control + (#).



**Figura 31.** Los ácidos biliares aumentaron la formación de restos carbonilo causada por hierro y ácido ascórbico en homogeneizados de hígado. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de al menos seis observaciones,  $p \leq 0,05$  vs control (\*) o vs control + (#).



**Figura 32.** Los ácidos UDA, TQA, TDA y TLC potencian la peroxidación lipídica inducida por  $\text{Fe}^{2+}$  en las membranas aisladas del tejido hepático. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de al menos seis observaciones,  $p \leq 0,05$  vs control (\*) o vs control + (#).



**Figura 33.** Efecto de los ácidos biliares en la carbonilación proteica en membranas aisladas de hígado. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de al menos seis observaciones,  $p \leq 0,05$  vs control (\*) o vs control + (#).

Del estudio de los resultados expuestos en la tabla 5 y las figuras 26 a 33, se seleccionó para su posterior evaluación el TLC por ser el ácido biliar que mayor inducción de daño oxidativo en lípidos y proteínas produjo, tanto en homogeneizados como en membranas. En presencia de hierro, el TLC también potenció la LPO tanto en homogeneizados como en las membranas, en las que TLC también potenció la formación de restos carbonilo debida a hierro. Únicamente no se observó una acción significativa en la oxidación de proteínas debida a hierro en homogeneizados aunque se evidenció una clara tendencia (figura 31).

## CINÉTICAS DE TIEMPO DE DAÑO OXIDATIVO

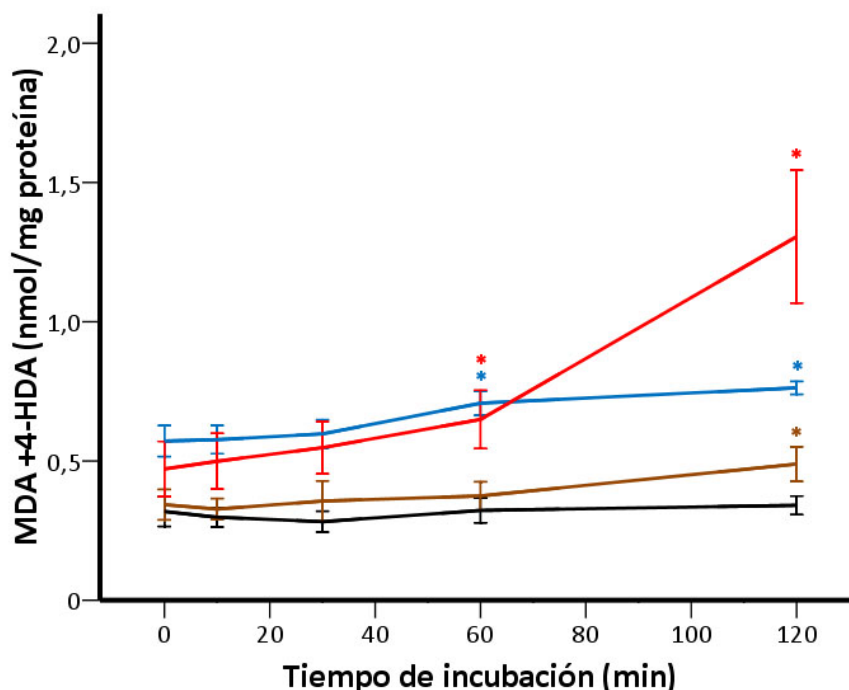
Con el fin de establecer unas condiciones experimentales comunes del modelo generador y potenciador de daño oxidativo, se realizó un estudio cinético de tiempo en cuatro grupos diferentes. Se determinaron las concentraciones de MDA+4-HDA y de restos carbonilo en los homogeneizados y las membranas aisladas hepáticas, manteniendo una agitación y temperatura constante de 37°C y modificando la duración de la incubación (0, 10, 30, 60 y 120 min). Un primer grupo del estudio, denominado “control”, valoró la oxidación lipídica y proteica, en homogeneizados y membranas en ausencia de TLC, cloruro férrico y ácido ascórbico. El segundo grupo, denominado “TLC”, determinó los efectos del tiempo de incubación cuando se añadió al medio TLC 1 mM. Un tercer grupo, denominado “control+”, valoró los efectos del tiempo de incubación cuando se añadió cloruro férrico y ácido ascórbico. El cuarto grupo, denominado “TLC+”, analizó la presencia conjunta de incubación de TLC 1 mM con cloruro férrico 0,1 mM y ácido ascórbico 0,1 mM. Los resultados obtenidos en las cinéticas de tiempo se resumen en la tabla 6 y las figuras 34 a 37 .

**Tabla 6.** Efecto del tiempo de incubación en la formación de MDA+4-HDA y restos carbonilo en homogeneizados y membranas de hígado. La incubación se realizó a 37°C en presencia y ausencia de ácido taurolitocólico (TLC) 1 mM, en presencia (+) y ausencia de FeCl<sub>3</sub> 0,1 mM y ácido ascórbico 0,1mM. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de al menos seis observaciones independientes, \*:  $p \leq 0,05$  vs control correspondiente (tiempo de incubación: 0 min).

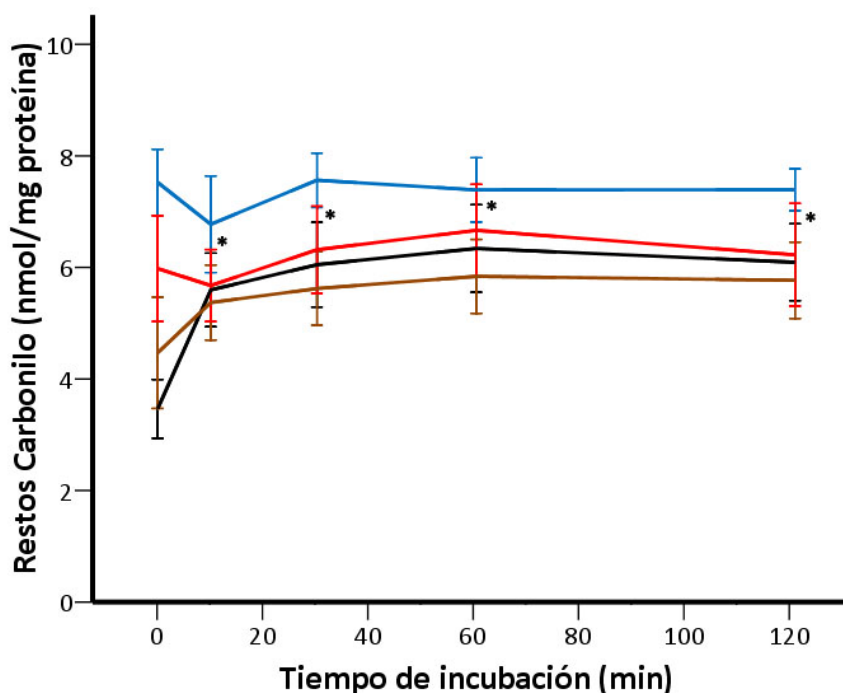
Fe <sup>2+</sup>	TUBO	Tiempo (min)	Homogeneizados		Membranas	
			MDA + 4-HDA (nmol/mg proteína)	Restos Carbonilo (nmol/mg proteína)	MDA + 4-HDA (nmol/mg proteína)	Restos Carbonilo (nmol/mg proteína)
Ausencia	Control	0	0,32 $\pm$ 0,05	3,46 $\pm$ 0,53	0,09 $\pm$ 0,05	2,15 $\pm$ 0,98
		10	0,30 $\pm$ 0,04	5,60 $\pm$ 0,66 <sup>(*)</sup>	0,10 $\pm$ 0,06	4,30 $\pm$ 1,59
		30	0,28 $\pm$ 0,04	6,05 $\pm$ 0,76 <sup>(*)</sup>	0,11 $\pm$ 0,07	6,89 $\pm$ 0,93 <sup>(*)</sup>
		60	0,32 $\pm$ 0,04	6,34 $\pm$ 0,78 <sup>(*)</sup>	0,45 $\pm$ 0,30	7,40 $\pm$ 0,91 <sup>(*)</sup>
		120	0,34 $\pm$ 0,03	6,09 $\pm$ 0,69 <sup>(*)</sup>	0,76 $\pm$ 0,56	5,50 $\pm$ 0,45 <sup>(*)</sup>
	TLC	0	0,57 $\pm$ 0,06	7,53 $\pm$ 0,59	7,54 $\pm$ 0,74	6,58 $\pm$ 0,38
		10	0,58 $\pm$ 0,05	6,77 $\pm$ 0,86	4,95 $\pm$ 0,56	8,77 $\pm$ 1,08 <sup>(*)</sup>
		30	0,60 $\pm$ 0,05	7,56 $\pm$ 0,49	5,25 $\pm$ 0,68	11,39 $\pm$ 2,22 <sup>(*)</sup>
		60	0,71 $\pm$ 0,04 <sup>(*)</sup>	7,39 $\pm$ 0,58	5,34 $\pm$ 0,34 <sup>(*)</sup>	12,53 $\pm$ 2,79 <sup>(*)</sup>
		120	0,76 $\pm$ 0,02 <sup>(*)</sup>	7,39 $\pm$ 0,37	6,39 $\pm$ 0,30 <sup>(*)</sup>	12,74 $\pm$ 1,50 <sup>(*)</sup>
Presencia	Control+	0	0,34 $\pm$ 0,05	4,47 $\pm$ 0,10	2,10 $\pm$ 0,77	5,86 $\pm$ 1,98
		10	0,33 $\pm$ 0,04	5,37 $\pm$ 0,67	11,62 $\pm$ 2,60 <sup>(*)</sup>	9,62 $\pm$ 2,37 <sup>(*)</sup>
		30	0,36 $\pm$ 0,07	5,62 $\pm$ 0,66	30,10 $\pm$ 2,88 <sup>(*)</sup>	12,29 $\pm$ 2,48 <sup>(*)</sup>
		60	0,37 $\pm$ 0,05	5,84 $\pm$ 0,66	38,16 $\pm$ 1,88 <sup>(*)</sup>	12,17 $\pm$ 2,20 <sup>(*)</sup>
		120	0,49 $\pm$ 0,06 <sup>(*)</sup>	5,77 $\pm$ 0,68	47,72 $\pm$ 1,40 <sup>(*)</sup>	21,61 $\pm$ 8,44 <sup>(*)</sup>
	TLC+	0	0,47 $\pm$ 0,10	5,98 $\pm$ 0,95	14,92 $\pm$ 5,59	15,04 $\pm$ 2,25
		10	0,50 $\pm$ 0,10	5,68 $\pm$ 0,64	28,68 $\pm$ 9,30	20,83 $\pm$ 2,42 <sup>(*)</sup>
		30	0,55 $\pm$ 0,09	6,32 $\pm$ 0,78	41,21 $\pm$ 3,04 <sup>(*)</sup>	27,46 $\pm$ 4,16 <sup>(*)</sup>
		60	0,65 $\pm$ 0,10 <sup>(*)</sup>	6,67 $\pm$ 0,82	49,51 $\pm$ 2,06 <sup>(*)</sup>	38,86 $\pm$ 3,56 <sup>(*)</sup>
		120	1,31 $\pm$ 0,24 <sup>(*)</sup>	6,23 $\pm$ 0,92	65,51 $\pm$ 7,77 <sup>(*)</sup>	46,45 $\pm$ 5,61 <sup>(*)</sup>

En primer lugar se realizó un estudio de la evolución temporal de la peroxidación lipídica en los homogeneizados hepáticos. La figura 34 ilustra los resultados y de su observación puede deducirse que un tiempo de incubación de hasta dos horas no alteró las concentraciones de MDA+4-HDA de las muestras controles. Por el contrario, se requirieron dos horas de incubación de los homogeneizados en presencia de FeCl<sub>3</sub> y ácido ascórbico, controles positivo, para que aumentara la peroxidación lipídica de forma significativa, mientras que bastó con una hora para que se obtuviera significación estadística cuando se utilizó el TLC, ya fuera en ausencia o presencia de hierro y ácido ascórbico. En el daño oxidativo a las proteínas de los homogeneizados no se obtuvieron diferencias en función de la duración de la

incubación para ninguno de los modelos oxidativos estudiados, ni el de TLC ni el de  $\text{FeCl}_3$  y ácido ascórbico, ya fueran utilizados de forma aislada o combinada (figura 35).

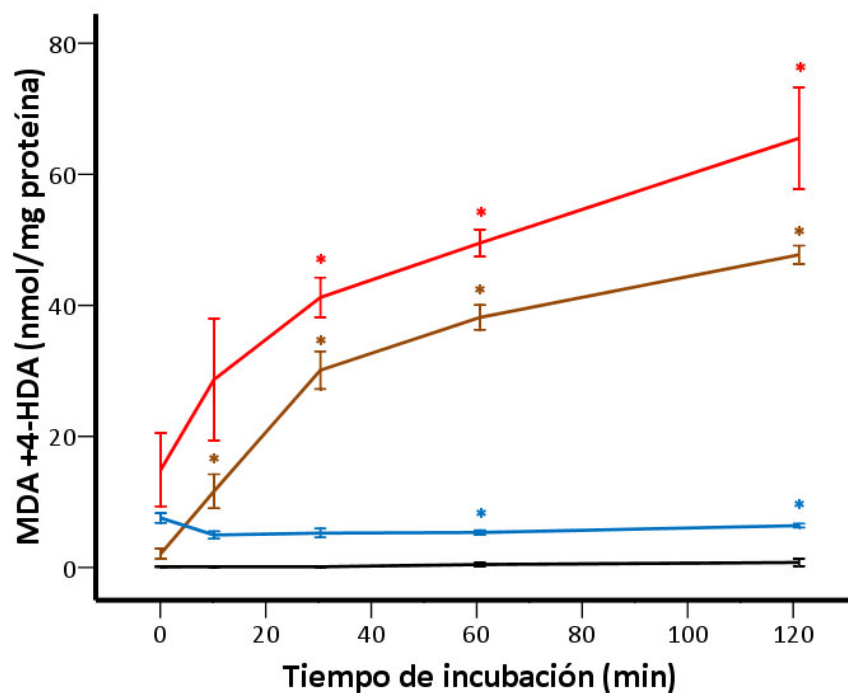


**Figura 34.** Efecto del tiempo de incubación en la formación de MDA+4-HDA en homogeneizados de hígado. La incubación se realizó a 37°C en presencia de ácido taurolitocólico 1 mM (—), en presencia de  $\text{FeCl}_3$  0,1 mM y ácido ascórbico 0,1 mM (—) y en presencia (—) de ácido taurolitocólico 1 mM,  $\text{FeCl}_3$  0,1 mM y ácido ascórbico 0,1 mM y en ausencia de todos ellos (—). Los valores son la media  $\pm$  error estándar de al menos seis observaciones independientes, \* $p \leq 0,05$  vs 0 minutos.

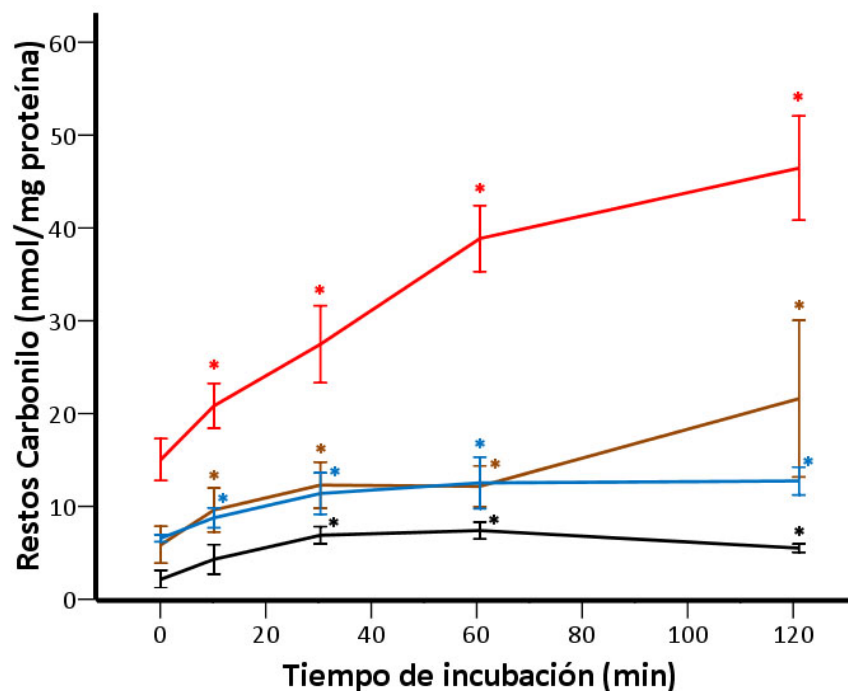


**Figura 35.** Papel del tiempo de incubación en la oxidación proteica en homogeneizados de hígado. La incubación se realizó en presencia de ácido taurolitocólico 1 mM (—), en presencia de  $\text{FeCl}_3$  0,1 mM y ácido ascórbico 0,1 mM (—) y en presencia (—) de ácido taurolitocólico 1 mM,  $\text{FeCl}_3$  0,1 mM y ácido ascórbico 0,1 mM y en ausencia de todos ellos (—). Los valores son las medias  $\pm$  errores estándares.  $n=6$ , \* $p \leq 0,05$  vs 0 minutos.





**Figura 36.** Influencia del tiempo de incubación en la formación de MDA+4-HDA en membranas de hepatocitos. La incubación se realizó a 37°C en presencia de ácido taurolitocólico 1 mM (—), en presencia de FeCl<sub>3</sub> 0,1 mM y ácido ascórbico 0,1 mM (—) y en presencia (—) de ácido taurolitocólico 1 mM, FeCl<sub>3</sub> 0,1 mM y ácido ascórbico 0,1 mM y en ausencia de todos ellos (—). Los valores son la media  $\pm$  error estándar de al menos seis observaciones \* $p \leq 0,05$  vs 0 minutos.



**Figura 37.** Efecto del tiempo de incubación en la formación de restos carbonilo en membranas de hígado. La incubación se realizó a 37°C en presencia de ácido taurolitocólico 1 mM (—), en presencia de FeCl<sub>3</sub> 0,1 mM y ácido ascórbico 0,1 mM (—) y en presencia (—) de ácido taurolitocólico 1 mM, FeCl<sub>3</sub> 0,1 mM y ácido ascórbico 0,1 mM y en ausencia de todos ellos (—). Los valores son la media  $\pm$  error estándar de al menos seis observaciones independientes, \* $p \leq 0,05$  vs 0 minutos.

Los estudios cinéticos tercero y cuarto se realizaron en membranas aisladas de tejido hepático. El tercero valoró la concentración de MDA + 4-HDA y el cuarto la determinación de restos carbonilo. En los dos se produjeron aumentos de la lesión oxidativa directamente relacionados con la duración de la incubación. La peroxidación lipídica en membranas aisladas (figura 36) apenas se modificó en las muestras controles. Aunque el TLC provocó un ligero aumento significativo a partir de una hora de incubación, los resultados más espectaculares se produjeron en el modelo fentoniano ya sea aplicado solo o con TLC, con significación a partir de los 10 y 30 minutos respectivamente. Respecto a la oxidación de proteínas de las membranas aisladas, los incrementos significativos en su carbonilación fueron a partir de los 30 minutos para los controles y de 10 minutos para el TLC y los dos estudios con hierro (figura 37).

Tras el análisis conjunto de los cuatro estudios cinéticos, se decidió utilizar un tiempo de incubación de dos horas para las siguientes fases experimentales de esta investigación, dado que éste fue el tiempo en el que se detectaron los mayores cambios significativos.

## CINÉTICAS DE CONCENTRACIÓN

En primer lugar se estudiaron los efectos del TLC en concentraciones de 0,001 - 0,01 - 0,1 - 0,3 - 1 y 3 mM para valorar su capacidad de generar daño oxidativo. A continuación se estudiaron sus efectos, en presencia de cloruro férrico y ácido ascórbico. La tabla 7 recoge las concentraciones de MDA+4-HDA y de restos carbonilo obtenidas.

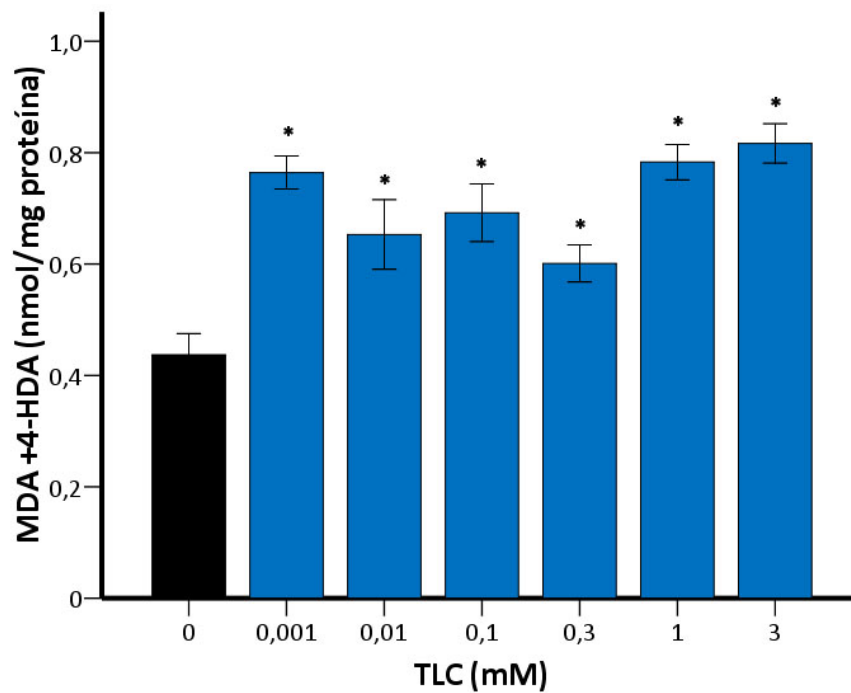
Las figuras 38 y 39 ilustran los efectos del TLC sobre la oxidación lipídica y proteica respectivamente en los homogeneizados hepáticos. Todas las concentraciones de TLC aumentaron significativamente tanto los niveles de MDA+4-HDA como la carbonilación proteica, lo que sugiere que incluso a pequeñas

concentraciones como 0,001 mM ya se produce lesión oxidativa en los homogeneizados, indicando que estas muestras son muy sensibles al TLC.

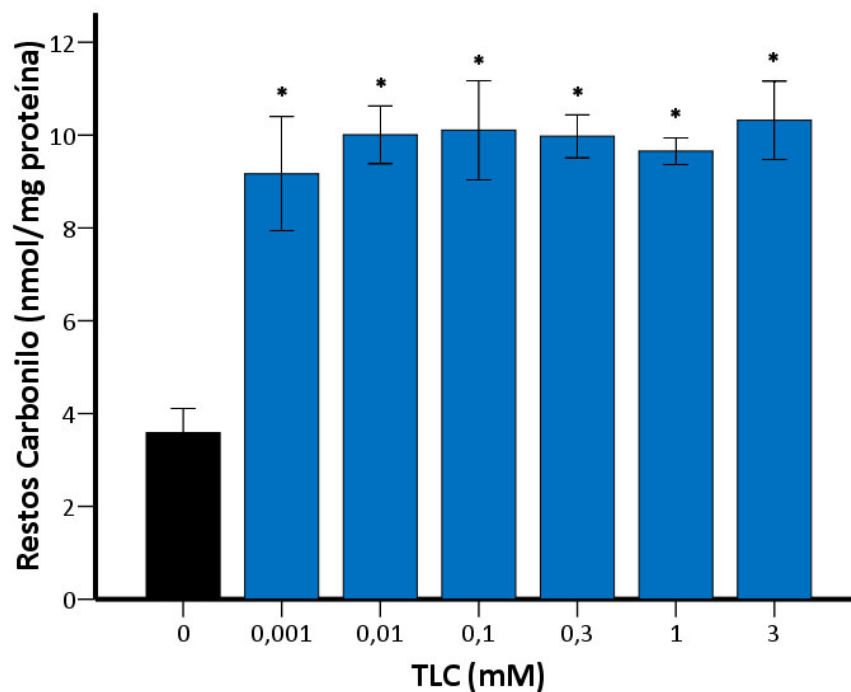
Por el contrario, en las membranas, el daño oxidativo a lípidos y proteínas al añadir TLC aumentó de forma concentración dependiente, observándose un aumento significativo de MDA + 4-HDA y de la carbonilación proteica, desde concentraciones iguales o superiores a 0,3 mM de TLC (figuras 40 y 41).

**Tabla 7.** Efecto del ácido taurolitocólico (TLC) en la formación de MDA+4-HDA y restos carbonilo en homogeneizados y membranas de hígado. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de al menos seis observaciones independientes,  $p \leq 0,05$  vs control (\*) o vs control + (#).

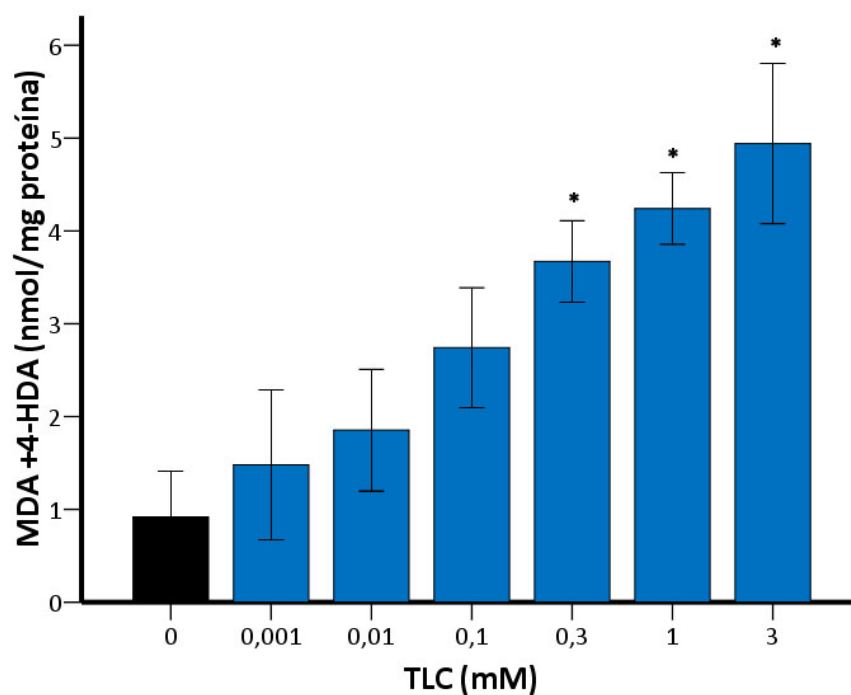
Fe <sup>2+</sup>	TLC (mM)	Homogeneizados		Membranas	
		MDA + 4-HDA (nmol/mg proteína)	Restos Carbonilo (nmol/mg proteína)	MDA + 4-HDA (nmol/mg proteína)	Restos Carbonilo (nmol/mg proteína)
Ausencia	Control	0,44 $\pm$ 0,04	3,59 $\pm$ 0,52	0,92 $\pm$ 0,49	5,42 $\pm$ 2,69
	0,001	0,76 $\pm$ 0,03 (*)	9,17 $\pm$ 1,23 (*)	1,48 $\pm$ 0,81	9,06 $\pm$ 1,15
	0,01	0,65 $\pm$ 0,06 (*)	10,01 $\pm$ 0,63 (*)	1,85 $\pm$ 0,66	10,01 $\pm$ 1,00
	0,1	0,69 $\pm$ 0,05 (*)	10,11 $\pm$ 1,07 (*)	2,74 $\pm$ 0,65	10,16 $\pm$ 1,32
	0,3	0,60 $\pm$ 0,03 (*)	9,98 $\pm$ 0,47 (*)	3,67 $\pm$ 0,44 (*)	11,58 $\pm$ 1,87 (*)
	1	0,78 $\pm$ 0,03 (*)	9,66 $\pm$ 0,29 (*)	4,24 $\pm$ 0,39 (*)	14,91 $\pm$ 3,41 (*)
	3	0,82 $\pm$ 0,04 (*)	10,32 $\pm$ 0,84 (*)	4,94 $\pm$ 0,86 (*)	17,10 $\pm$ 4,40 (*)
Presencia	Control+	0,51 $\pm$ 0,04 (*)	7,15 $\pm$ 0,98 (*)	35,38 $\pm$ 3,81 (*)	17,98 $\pm$ 1,75 (*)
	0,001+	0,52 $\pm$ 0,06 (*)	6,91 $\pm$ 0,85 (*)	38,20 $\pm$ 4,17 (*, #)	24,08 $\pm$ 3,70 (*, #)
	0,01+	0,54 $\pm$ 0,05 (*)	7,61 $\pm$ 0,77 (*)	38,61 $\pm$ 4,24 (*, #)	26,52 $\pm$ 2,60 (*, #)
	0,1+	0,53 $\pm$ 0,06 (*)	7,24 $\pm$ 0,66 (*)	40,47 $\pm$ 3,96 (*, #)	32,37 $\pm$ 2,23 (*, #)
	0,3+	0,76 $\pm$ 0,13 (*)	7,92 $\pm$ 0,80 (*)	44,57 $\pm$ 4,60 (*, #)	35,49 $\pm$ 0,89 (*, #)
	1+	0,99 $\pm$ 0,19 (*, #)	6,70 $\pm$ 0,83 (*)	49,30 $\pm$ 5,39 (*, #)	39,32 $\pm$ 2,48 (*, #)
	3+	1,82 $\pm$ 0,33 (*, #)	8,16 $\pm$ 0,42 (*)	46,10 $\pm$ 5,50 (*, #)	42,08 $\pm$ 3,09 (*, #)



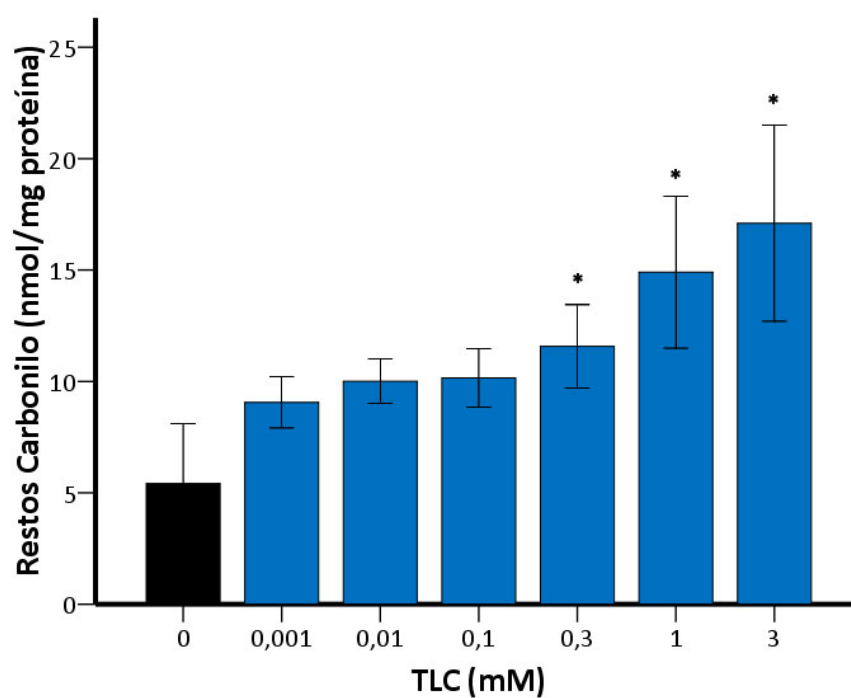
**Figura 38.** El ácido taurolitocólico (TLC) aumentó la peroxidación lipídica en homogeneizados de hígado. La incubación se realizó a 37°C durante 2h. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de al menos seis observaciones independientes, \*:  $p \leq 0,05$  vs control.



**Figura 39.** El ácido taurolitocólico (TLC) modificó la formación restos carbonilo en homogeneizados de hígado. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de al menos seis observaciones independientes, \*:  $p \leq 0,05$  vs control.



**Figura 40.** Efecto concentración dependiente del ácido taurolitocólico (TLC) de la formación de MDA+4-HDA en membranas de hígado. La incubación se realizó a 37°C durante 2h. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de al menos seis observaciones independientes, \*:  $p \leq 0,05$  vs control.



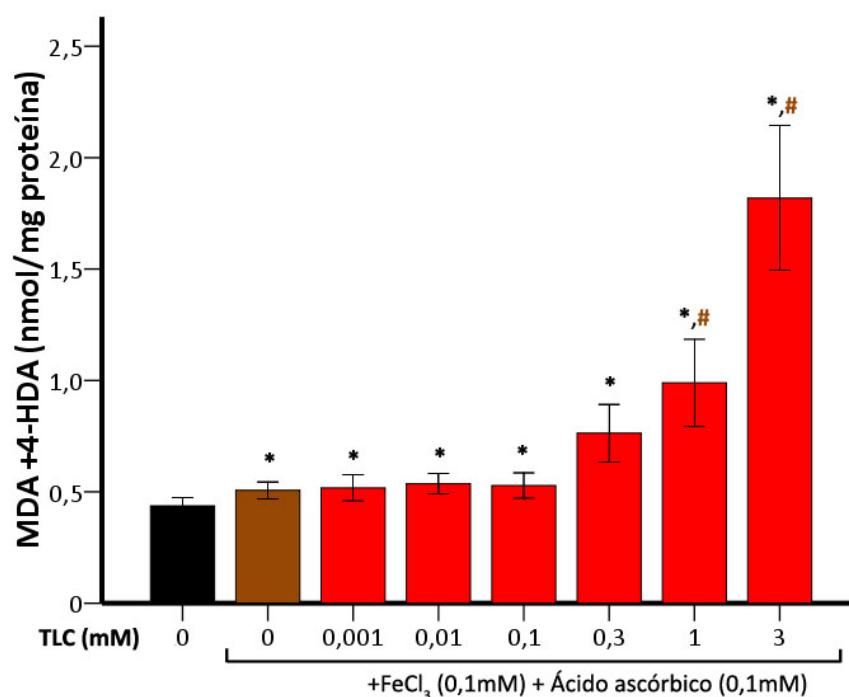
**Figura 41.** Respuesta concentración dependiente del ácido taurolitocólico (TLC) en la carbonilación proteica en membranas aisladas de hígado. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de al menos seis observaciones independientes, \*:  $p \leq 0,05$  vs control.

La incubación de homogeneizados y membranas hepáticas con  $\text{FeCl}_3$  y ácido ascórbico, provocó un aumento significativo de las concentraciones de MDA+4-HDA y de restos carbonilo, lo que indicó la presencia de peroxidación lipídica y proteica en el hígado (tabla 7 y figuras 39 a 45). Los radicales  $\cdot\text{OH}$  y  $\text{ROO}\cdot$  generados *in vitro* por la reacción de Fenton incrementaron un 16% y un 3.746% la peroxidación lipídica de los homogeneizados y de las membranas respectivamente (figuras 42 y 44). En el caso de las proteínas, la oxidación se aumentó en un 99% y un 232% respectivamente (figuras 43 y 45).

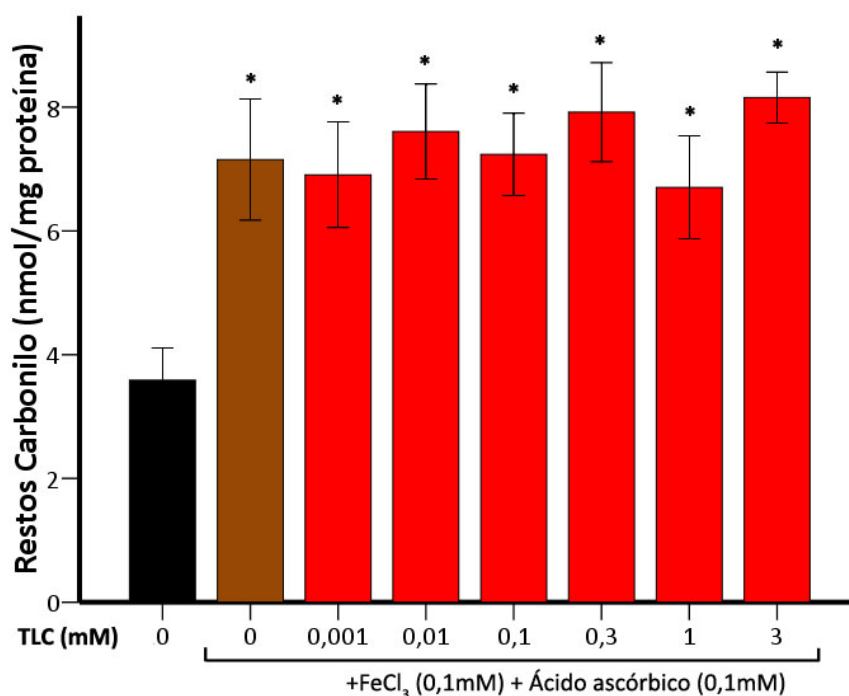
La adición de TLC a los homogeneizados a concentraciones iguales o mayores a 1mM, potenció significativamente la peroxidación lipídica respecto a la obtenida solo en presencia del sistema Fenton (figura 42). Esta respuesta fue dependiente de la concentración de TLC. Por el contrario, ninguna de sus concentraciones modificó significativamente la oxidación proteica que había inducido el  $\text{FeCl}_3$  y ácido ascórbico (figura 43).

En las membranas celulares aisladas del tejido hepático, el TLC potenció de forma significativa tanto la peroxidación lipídica (figura 44) como la carbonilación de las proteínas (figura 45) desde su concentración más pequeña, 0,001 mM de TLC.

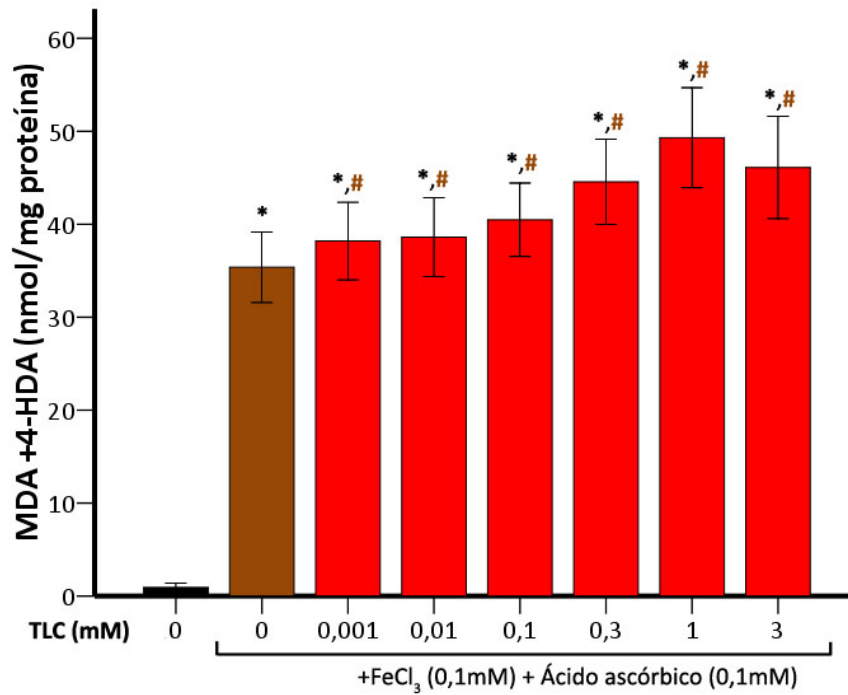
Considerando todos estos resultados de forma global, se decidió mantener una concentración 1 mM de TLC para realizar la última fase experimental con melatonina.



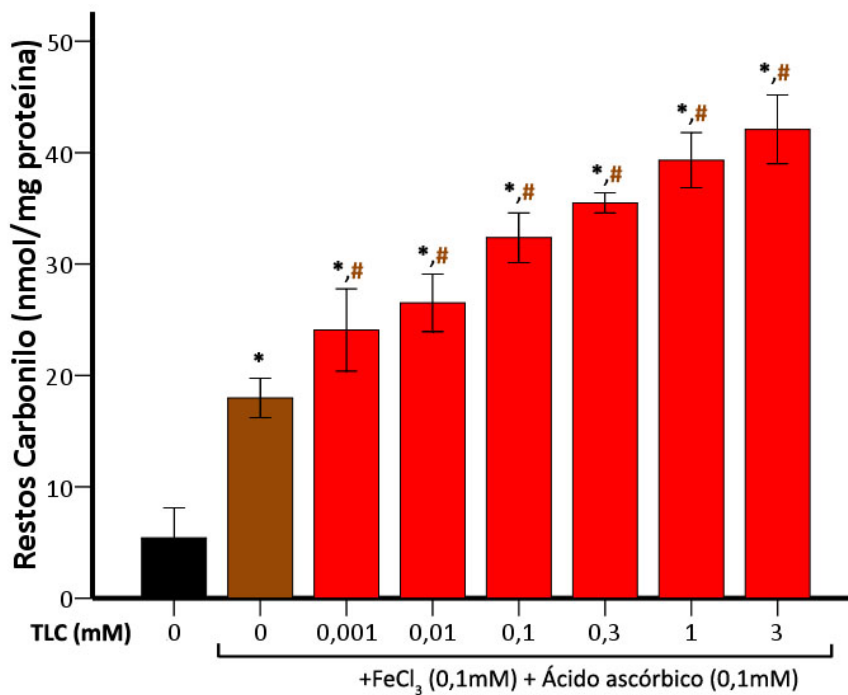
**Figura 42.** Efectos del ácido taurolitocólico (TLC) en la formación de MDA+4-HDA en homogeneizados de hígado. La incubación se realizó a 37°C durante 2 con TLC (0,001 – 3 mM), en ausencia o presencia de  $\text{FeCl}_3$  0,1 mM y ácido ascórbico 0,1 mM. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de al menos seis observaciones independientes,  $p \leq 0,05$  vs control (\*) o vs control + (#).



**Figura 43.** Cinética de concentración de ácido taurolitocólico (TLC) para la formación de restos carbonilo en homogeneizados de hígado. La incubación se realizó a 37°C durante 2h con TLC (0,001 – 3 mM), en ausencia o presencia de  $\text{FeCl}_3$  0,1 mM y ácido ascórbico 0,1 mM. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de al menos seis observaciones independientes,  $p \leq 0,05$  vs control (\*) o vs control + (#).



**Figura 44.** El TLC potenció la peroxidación lipídica en membranas de hígado. La incubación se realizó a 37°C durante 2h con TLC (0,001 – 3 mM), ausencia o presencia de  $\text{FeCl}_3$  0,1 mM y ácido ascórbico 0,1 mM. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de al menos seis observaciones,  $p \leq 0,05$  vs control (\*) o vs control + (#).



**Figura 45.** Efecto del ácido taurolitólico (TLC) en la oxidación de las proteínas de las membranas de hígado. La incubación se realizó a 37°C durante 2h con TLC (0,001 – 3 mM), en ausencia o presencia de  $\text{FeCl}_3$  0,1 mM y ácido ascórbico 0,1 mM. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de al menos seis observaciones independientes,  $p \leq 0,05$  vs control (\*) o vs control + (#).



## VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA MELATONINA

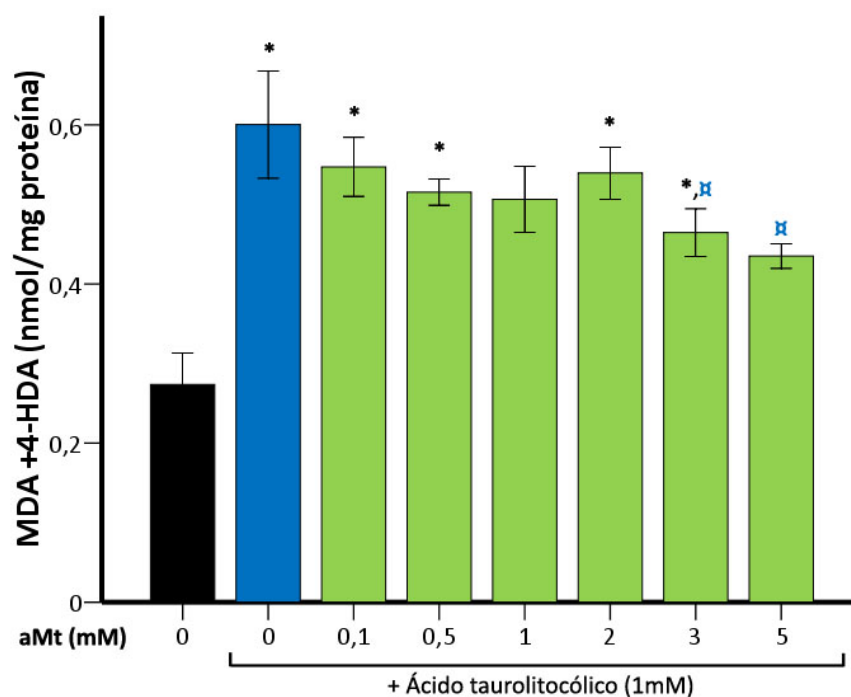
En este apartado se han evaluado los efectos antioxidantes de la melatonina en un rango de concentraciones de 0,1 a 5 mM. De los ocho modelos utilizados en la fase experimental anterior, se han utilizado todos con la excepción de la oxidación de proteínas en homogeneizados hepáticos en presencia de  $\text{FeCl}_3$  y ácido ascórbico, ya que la adición de TLC incluso hasta concentraciones de 3mM, no indujo cambios significativos en relación a los niveles de carbonilación proteica respecto a los obtenidos sólo por  $\text{FeCl}_3$  y ácido ascórbico (figura 43). Las concentraciones de MDA+4-HDA y de restos carbonilo obtenidas en los homogeneizados y membranas se resumen en la tabla 8.

**Tabla 8.** Efecto protector de la melatonina (aMT) en la oxidación de lípidos y proteínas inducida por ácido taurolítico (TLC) 1 mM, en ausencia y presencia de  $\text{FeCl}_3$  0,1 mM y ácido ascórbico 0,1 mM en homogeneizados y membranas aisladas de hígado. Los valores son las medias  $\pm$  errores estándares.  $n=6$ ,  $p \leq 0,05$  vs control (\*), vs control + (#), vs TLC (H) o vs TLC+ (S).

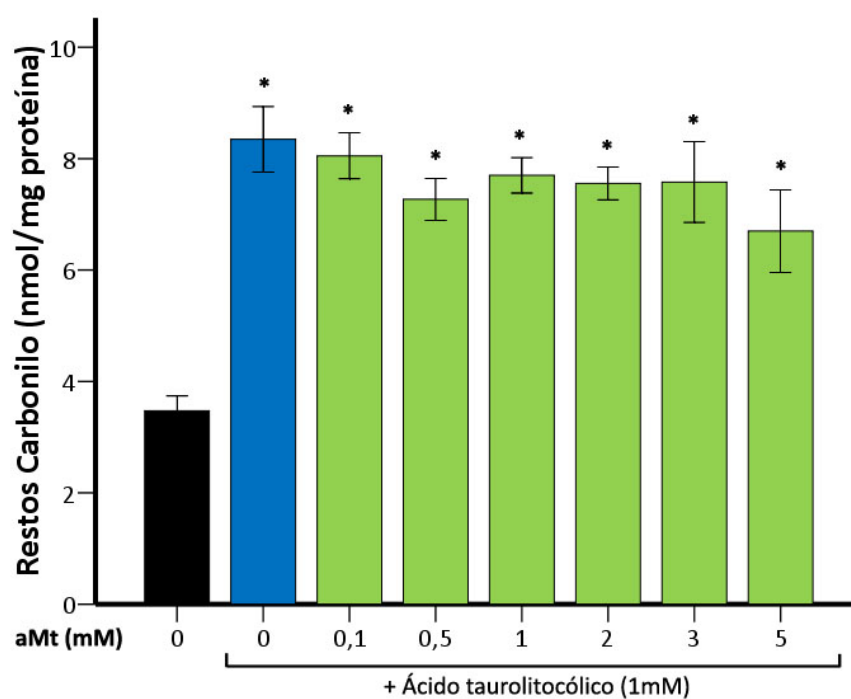
$\text{Fe}^{2+}$	TUBO	Homogeneizados		Membranas	
		MDA + 4-HDA (nmol/mg proteína)	Restos Carbonilo (nmol/mg proteína)	MDA + 4-HDA (nmol/mg proteína)	Restos Carbonilo (nmol/mg proteína)
Ausencia	Control	0,27 $\pm$ 0,04	3,47 $\pm$ 0,27	0,35 $\pm$ 0,18	6,66 $\pm$ 1,62
	TLC	0,60 $\pm$ 0,07 (*)	8,35 $\pm$ 0,59 (*)	5,36 $\pm$ 0,58 (*)	10,94 $\pm$ 2,45 (*)
	aMT 0,1	0,54 $\pm$ 0,04 (*)	8,05 $\pm$ 0,41 (*)	5,65 $\pm$ 0,51 (*)	9,14 $\pm$ 1,12 (*)
	aMT 0,5	0,52 $\pm$ 0,02 (*)	7,27 $\pm$ 0,38 (*)	5,86 $\pm$ 0,30 (*)	7,84 $\pm$ 0,73
	aMT 1	0,51 $\pm$ 0,04	7,70 $\pm$ 0,32 (*)	5,44 $\pm$ 0,68 (*)	6,27 $\pm$ 0,96
	aMT 2	0,54 $\pm$ 0,03 (*)	7,56 $\pm$ 0,29 (*)	5,03 $\pm$ 0,42 (*)	6,62 $\pm$ 0,98
	aMT 3	0,46 $\pm$ 0,03 (*, H)	7,58 $\pm$ 0,72 (*)	4,99 $\pm$ 0,44 (*)	6,43 $\pm$ 0,93
	aMT 5	0,44 $\pm$ 0,02 (H)	6,70 $\pm$ 0,74 (*)	4,46 $\pm$ 0,52 (*, H)	5,88 $\pm$ 1,55 (H)
Presencia	Control+	0,44 $\pm$ 0,04 (*)	--	39,98 $\pm$ 5,88 (*)	18,14 $\pm$ 4,16 (*)
	TLC +	0,82 $\pm$ 0,14 (*, #)	--	52,06 $\pm$ 6,04 (*, #)	43,71 $\pm$ 4,67 (*, #)
	aMT+ 0,1	0,85 $\pm$ 0,21 (*, #)	--	48,32 $\pm$ 5,09 (*, #, S)	47,53 $\pm$ 5,11 (*, #)
	aMT+ 0,5	0,49 $\pm$ 0,06 (*, #, S)	--	41,94 $\pm$ 4,94 (*, S)	30,47 $\pm$ 3,15 (*, #, S)
	aMT+ 1	0,39 $\pm$ 0,05 (*, S)	--	27,27 $\pm$ 8,65 (*, S)	20,30 $\pm$ 4,15 (*, S)
	aMT+ 2	0,38 $\pm$ 0,06 (*, S)	--	10,74 $\pm$ 6,32 (*, #, S)	9,95 $\pm$ 2,29 (#, S)
	aMT+ 3	0,35 $\pm$ 0,06 (S)	--	3,88 $\pm$ 1,44 (*, #, S)	6,15 $\pm$ 0,83 (#, S)
	aMT+ 5	0,33 $\pm$ 0,05 (#, S)	--	2,02 $\pm$ 0,52 (*, #, S)	2,71 $\pm$ ,94 (#, S)

La figura 46 ilustra los efectos de la adición de melatonina en la oxidación lipídica causada por el TLC 1 mM en homogeneizados hepáticos. En esta gráfica se muestra que la melatonina tuvo un comportamiento antioxidante a concentraciones superiores a 2 mM, ya que 3 mM y 5 mM redujeron significativamente las concentraciones de MDA+4-HDA en un 42% y un 51% con respecto a las de TLC 1mM. A partir de estos datos pudimos calcular gráficamente que la concentración de melatonina necesaria para prevenir el 50% de la oxidación lipídica en los homogeneizados,  $IC_{50}$ , fue 4,73 mM. Respecto al modelo de la carbonilación proteica causado por el TLC 1 mM, aunque la melatonina redujo la oxidación, los resultados no fueron estadísticamente significativos (figura 47).

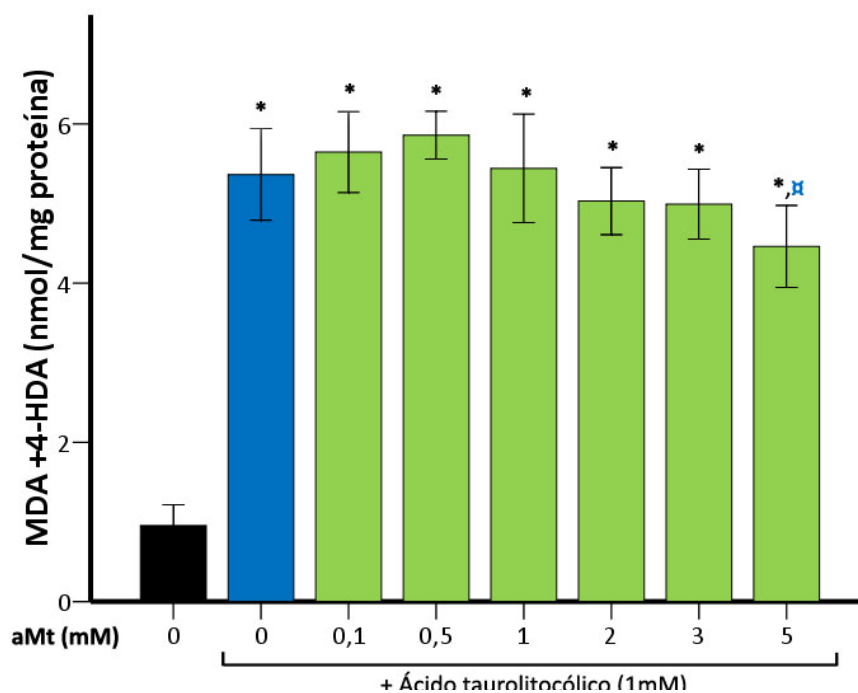
En membranas aisladas del tejido hepático se obtuvieron resultados muy discretos en la preservación de la toxicidad oxidativa del TLC. Tan solo melatonina 5 mM redujo un 18% las concentraciones de MDA + 4-HDA obtenidas tras la incubación con TLC 1 mM (figura 48). Una mayor actividad antioxidante de la melatonina se observó frente a la oxidación de proteínas, ya que los niveles de carbonilación del control se incrementaron significativamente con la exposición a TLC 1 mM, sin embargo, fueron similares a los detectados en aquellas muestras que además del ácido biliar recibieron un cotratamiento con melatonina a concentraciones iguales o superiores a 0,5 mM (figura 49). De esta última representación gráfica puede deducirse que, bajo nuestras condiciones experimentales, la  $IC_{50}$  de melatonina para reducir la oxidación de las proteínas de las membranas inducida por el TLC 1 mM fue de tan solo 0,15 mM.



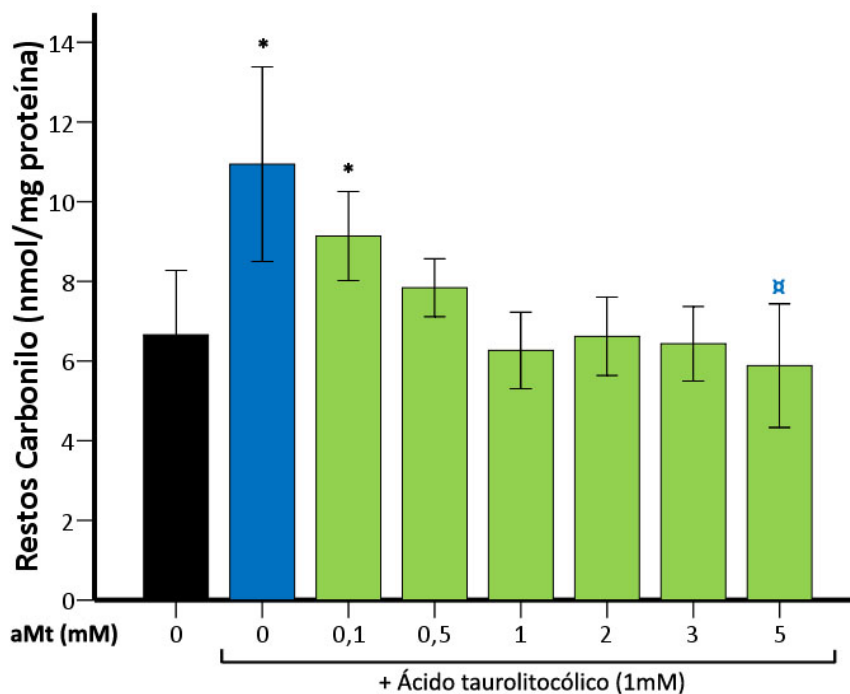
**Figura 46.** Efecto protector de la melatonina (aMT) en la oxidación de lípidos inducida por ácido taurolítico en homogeneizados de hígado. La incubación se realizó a 37°C durante 2h. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de al menos seis observaciones,  $p \leq 0,05$  vs control (\*) o vs TLC 1 mM (□).



**Figura 47.** Efecto de la melatonina (aMT) en la oxidación de proteínas inducida por ácido taurolítico en homogeneizados de hígado. La incubación se realizó a 37°C durante 2h. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de al menos seis observaciones independientes,  $p \leq 0,05$  vs control (\*).



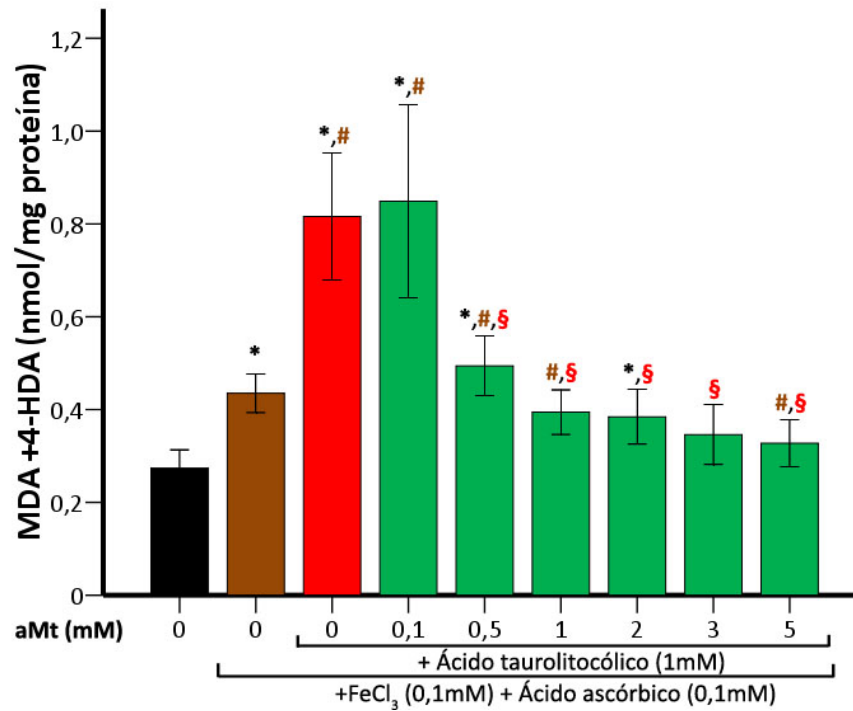
**Figura 48.** Cinética de la melatonina (aMT) en la oxidación de lípidos inducida por ácido taurolitocólico 1mM en membranas de hígado. La incubación se realizó a 37°C durante 2h. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de al menos seis observaciones independientes,  $p \leq 0,05$  vs control (\*) o vs TLC 1 mM (x).



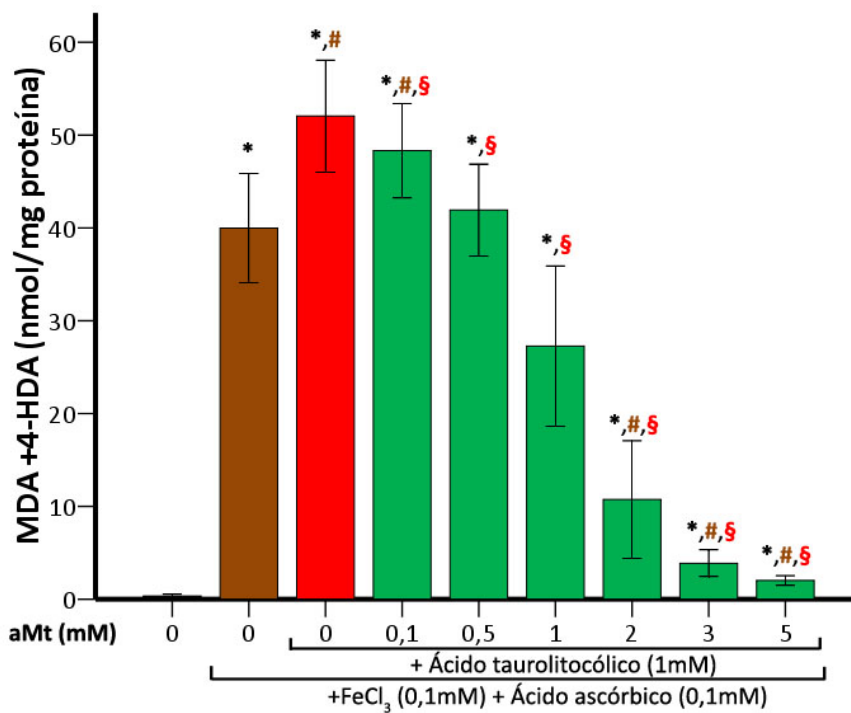
**Figura 49.** La melatonina (aMT) reduce la oxidación de proteínas inducida por ácido taurolitocólico en membranas de hígado. La incubación se realizó a 37°C durante 2h con diferentes concentraciones de melatonina. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de al menos seis observaciones independientes,  $p \leq 0,05$  vs control (\*) o vs TLC 1 mM (x).

La oxidación lipídica inducida por  $\text{FeCl}_3$  y ácido ascórbico, y potenciada por TLC 1 mM también fue reducida significativamente por la adición de melatonina tanto en homogeneizados como en membranas, de una forma directamente dependiente de la concentración (tabla 8).

En homogeneizados, la oxidación lipídica inducida por  $\text{FeCl}_3$  y ácido ascórbico, fue casi el doble que el control basal (figura 50). Dicha oxidación se potenció en presencia de TLC, obteniendo niveles de oxidación tres veces superiores al control. En presencia de bajas concentraciones de melatonina (0,5 mM), los valores de MDA + 4-HDA cayeron drásticamente y se observó una reducción significativa con respecto a los homogeneizados tratados con TLC en presencia de hierro. En los homogeneizados con TLC y hierro tratados con concentraciones iguales o superiores a 1 mM de melatonina, los niveles de LPO caen por debajo de la mitad de los valores de los homogeneizados con TLC y hierro, recuperándose a concentraciones iguales o superiores a 3 mM de melatonina, hasta los valores basales de LPO en ausencia tanto de TLC como de hierro. La  $\text{IC}_{50}$  de la melatonina para inhibir la formación de MDA+4-HDA en homogeneizados hepáticos en presencia de TLC 1mM,  $\text{FeCl}_3$  y ácido ascórbico fue de 0,40 mM. Por último, en las membranas, la oxidación lipídica inducida por  $\text{FeCl}_3$  y ácido ascórbico fue 40 veces superior al control (figura 51). Dicha oxidación se potenció en presencia de TLC, obteniendo niveles de oxidación más de 50 veces superiores al control. Desde la concentración de melatonina más baja estudiada (0,1 mM) se observó una reducción significativa de la LPO con respecto a las membranas tratadas con TLC en presencia de hierro y ascórbico. Los niveles de MDA + 4-HDA en las membranas con TLC y hierro tratadas con concentraciones de 0,5 a 1 mM de melatonina son similares a los controles positivos de peroxidación lipídica. El tratamiento con melatonina 5 mM en membranas con TLC y hierro ferroso, consiguió valores de LPO más de 25 veces inferiores a los observados en la muestras tratadas con TLC y hierro ferroso (tabla 8), observándose tendencia de recuperación a los niveles basales, aunque se mantienen diferencias significativas con respecto a los niveles control en ausencia de TLC y hierro ferroso. La  $\text{IC}_{50}$  de la melatonina en la inhibición de la formación de MDA+4-HDA en membranas hepáticas en presencia de TLC 1 mM,  $\text{FeCl}_3$  y ácido ascórbico fue de 1,06 mM.

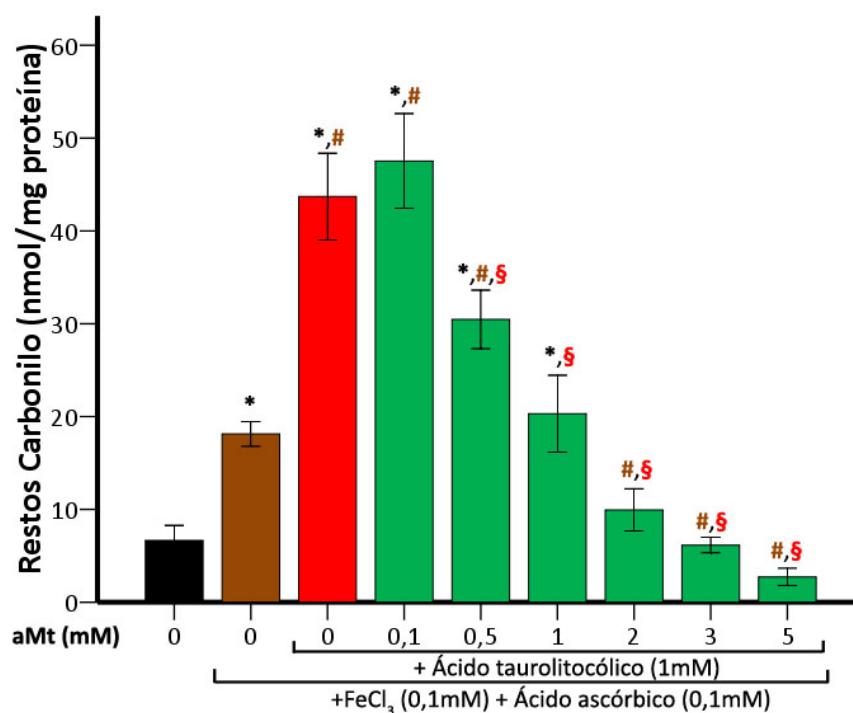


**Figura 50.** Efecto de melatonina (aMT) en la oxidación de lípidos potenciada por ácido taurolitocólico (TLC) en homogeneizados de hígado. La incubación se realizó, en ausencia o presencia de TLC 1mM, FeCl<sub>3</sub> 0,1 mM y ácido ascórbico 0,1 mM. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de al menos seis observaciones independientes,  $p \leq 0,05$  vs control (\*), vs control + (#), o vs TLC 1 mM (\$).



**Figura 51.** Melatonina (aMT) redujo la oxidación de lípidos potenciada por ácido taurolitocólico (TLC) en membranas de hígado. La incubación se realizó a 37°C durante 2h, en ausencia o presencia de TLC 1mM, FeCl<sub>3</sub> 0,1 mM y ácido ascórbico 0,1 mM. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de al menos seis observaciones independientes  $p \leq 0,05$  vs control (\*), vs control + (#), o vs TLC 1 mM (\$).

En la carbonilación proteica de las membranas, se observó que el daño oxidativo inducido por  $\text{FeCl}_3$  y ácido ascórbico fue 3 veces superior al control basal (figura 52). Dicha oxidación se potenció en presencia de TLC 1 mM, incrementado la carbonilación proteica hasta más de 5 veces que el control. La oxidación de proteínas inducida por  $\text{FeCl}_3$  y ácido ascórbico y potenciada por TLC en membranas también fue reducida significativamente por la adición de concentraciones de melatonina iguales o superiores a 0,5 mM. Los niveles de restos carbonilo en las membranas con TLC y hierro ferroso tratadas con 1 mM de melatonina son similares al control positivo. Concentraciones de melatonina iguales o superiores a 2 mM presentaron niveles de oxidación de proteínas significativamente inferiores al control positivo y recuperaron los niveles de carbonilación proteica basales ya que no se observan diferencias con los controles. El tratamiento con melatonina 5 mM a las membranas con 1 mM TLC y 0,1 mM hierro ferroso, consiguió valores de carbonilación proteica más de 15 veces menores que los observados en las membranas con TLC 1 mM, hierro y ácido ascórbico. La  $\text{IC}_{50}$  de la melatonina en la inhibición de la formación de restos carbonilo en membranas hepáticas en presencia de TLC,  $\text{FeCl}_3$  y ácido ascórbico fue 0,79 mM.



**Figura 52.** Cinética de concentraciones de melatonina (aMT) en la oxidación de proteínas potenciada por ácido taurolitocólico en membranas de hígado. La incubación se realizó a 37°C durante 2h, en ausencia o presencia de TLC 1mM, FeCl<sub>3</sub> 0,1 mM y ácido ascórbico 0,1 mM. Los valores son la media ± error estándar de al menos seis observaciones independientes  $p \leq 0,05$  vs control (\*), vs control + (#), o vs TLC 1 mM (\$).

Finalmente para facilitar la comparación global de los resultados de este estudio, incluimos una tabla con las concentraciones IC<sub>50</sub> obtenidas para melatonina previniendo el daño oxidativo a lípidos o proteínas y en homogeneizados o membranas celulares aisladas del hígado (tabla 9).

**Tabla 9.** Concentraciones de melatonina necesarias para inhibir el 50% del daño oxidativo (IC<sub>50</sub>) debido a la presencia de ácido taurolitocólico 1mM, en ausencia y presencia de FeCl<sub>3</sub> 0,1 mM y ácido ascórbico 0,1 mM en homogeneizados y membranas de hígado.

Fe <sup>2+</sup>	IC <sub>50</sub> (mM)			
	Homogeneizados		Membranas	
	MDA + 4-HDA	Restos Carbonilo	MDA + 4-HDA	Restos Carbonilo
Ausencia	4,73	>5	>5	0,15
Presencia	0,40	--	1,06	0,79



**DISCUSIÓN**



Los desórdenes hepáticos colestáticos son un grupo heterogéneo de enfermedades que cursan con una alteración del flujo biliar. Entre otras y a modo de ejemplo la atresia biliar, la cirrosis biliar primaria, la colangitis esclerosante primaria y todas las tumoraciones que en su crecimiento ocluyan las vías biliares pueden generar colestasis. El tratamiento debe ser fundamentalmente etiológico y en numerosas ocasiones, esta patología es responsable de que deba recurrirse al trasplante hepático en un elevado porcentaje de pacientes [Starzl, 1989; Whittington y Balistreri, 1991].

La alteración del flujo biliar puede deberse a un defecto funcional en la formación de la bilis a nivel del hepatocito, colestasis intrahepática, o a una alteración de la secreción o el transporte de la bilis a nivel del árbol biliar, colestasis extrahepática. Anatomopatológicamente es obvio que en las dos modalidades de colestasis y de forma invariable se produce lesión hepatocelular y que ésta, al menos en parte, debe producirse por la acumulación de alguno de los componentes de la bilis. A pesar de que no se conoce completamente su fisiopatología, se considera que el principal hecho funcional responsable de la hepatotoxicidad celular durante la colestasis, es la acumulación de ácidos biliares en el hígado [Greim y cols., 1973; Attili y cols., 1986; Schmuckler y cols., 1990; Heuman y cols., 1991; Fischer y cols., 1996; Bove, 2000]. Es evidente que para poder aplicar con éxito terapéutico un tratamiento en la colestasis se requiere entender los mecanismos moleculares y celulares que se desencadenan en este proceso patológico.

Aunque las teorías fisiopatológicas que implican a los ácidos biliares en la colestasis son muy numerosas, básicamente podemos agruparlas en dos grandes categorías que no son excluyentes: la primera en la que el daño hepático está mediado por la acción detergente de las sales biliares y la segunda por su acción prooxidante.

Por su estructura química y en el rango de concentraciones fisiológicas, los ácidos biliares desempeñan una importante función detergente que facilita la absorción intestinal de lípidos. Estas moléculas aunque carecen de actividad enzimática, no son proteínas sino derivados del ciclopentanoperhidrofenantreno, emulsionan las grasas ingeridas en la dieta en una suspensión de gotas de pequeño tamaño en el medio acuoso integrado por los líquidos ingeridos, los jugos digestivos y

la propia bilis. Generar esta emulsión lipídica favorecerá la acción posterior de las lipasas pancreática e intestinal. Sin embargo, si las concentraciones intracelulares de sales biliares se elevan, hecho propio de la colestasis, su acción detergente puede concentrarse en las bicapas lipídicas de las membranas celulares, unas estructuras que están integradas mayoritariamente por fosfolípidos unidos entre sí casi exclusivamente por enlaces electrostáticos débiles. Aunque esta acción detergente directa que provoca la disrupción de la membrana sea posible [Billington y cols., 1980], su contribución fisiopatológica relativa durante la colestasis es muy discutida, ya que se requieren concentraciones intracelulares de sales biliares muy elevadas para que la repercusión funcional sea realmente significativa [Fischer y cols., 1996]. Sin embargo, es también probable que actúen de forma más focalizada sobre el anillo de lípidos que rodea a las proteínas de la membrana, pudiendo modificarlas, activarlas e inhibirlas, como sucede con la fosfolipasa A<sub>2</sub> que libera ácido araquidónico y éste a su vez, a través de las enzimas ciclooxigenasa y lipoxigenasa, reduce parcialmente el oxígeno molecular liberando EROs y formando prostaglandinas y leucotrienos [DeRubertis y cols., 1984; Craven y cols., 1986; 1987; Booth y cols., 1997]. Del mismo modo los ácidos biliares pueden activar a la fosfolipasa C que forma inositoltrifosfato [Chung y cols., 1985; Nakanishi y cols., 1990] y éste libera Ca<sup>2+</sup> desde el retículo endoplásmico al espacio intracelular, lo que terminará activando la eNOS Ca<sup>2+</sup>/calmodulina dependiente [Schmidt y cols., 1992].

El segundo grupo de teorías sobre la fisiopatología de los ácidos biliares, los involucra en la producción de daño oxidativo y nitrosativo mediado por radicales libres [Dahm y cols., 1988; Sokol y cols., 1991; 2001]. La acumulación de estos ácidos altera procesos tan esenciales para la célula como la producción de energía por la mitocondria, aumentando la formación de más EROs que son capaces de oxidar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos deteriorando de esta forma la función celular [Sokol y cols., 1991; 1993; Krahenbuhl y cols., 1994; Sokol y cols., 1995; 1998b; 2001]. En la actualidad se ha descrito que los ácidos biliares pueden inducir daño oxidativo *in vitro* en hepatocitos aislados [Sokol y cols., 1993; 1995], cultivos primarios de hepatocitos [Rodrigues y cols., 1998a], homogeneizados hepáticos [Sokol y cols., 1998b] y en mitocondrias hepáticas [Sokol y cols., 1993; 1995; Rodrigues y cols.,

1998b]. También la administración intravenosa de ácidos biliares [Sokol y cols., 1998a] y la ligadura del conducto biliar inducen daño oxidativo *in vivo* [Sokol y cols., 1991; Singh y cols., 1992; Krahenbuhl y cols., 1995; Panozzo y cols., 1995; Parola y cols., 1996; Alptekin y cols., 1997; González-Correa y cols., 1997; Tsai y cols., 1997; Sokol y cols., 1998b; Tsai y cols., 1998; Orellana y cols., 2000]. Es necesario señalar que si bien en la colestasis se observa una acumulación de ácidos biliares, también sucede a la inversa ya que la perfusión intravenosa de ácidos biliares es capaz de reducir el flujo biliar y generar un proceso colestático [Sokol y cols., 1998a].

La mitocondria, principal lugar de formación de radicales libres en la célula, y el retículo endoplásmico, son dos de las organelas más afectadas por la acumulación intracelular de ácidos biliares durante la colestasis [Krahenbuhl y cols., 1994; Sokol y cols., 1995; 1998a; Yerushalmi y cols., 2001; Washo-Stultz y cols., 2002; Crowley-Weber y cols., 2003; Rolo y cols., 2003]. Durante la colestasis los ácidos biliares se acumulan intracelularmente e interfieren con el transporte mitocondrial de electrones, reduciendo la síntesis de ATP, inhibiendo el estado 3 de la respiración y reduciendo la actividad de los complejos I y II de la cadena de respiración mitocondrial [Krahenbuhl y cols., 1994]. La alteración del flujo de electrones conduce a los complejos I y III a generar cantidades considerables de anión superóxido. [García-Ruiz y cols., 1995]. Los ácidos biliares por tanto, aceleran la generación de  $\cdot\text{O}_2^-$  a estos niveles, desbordando las defensas antioxidantes mitocondriales. El  $\cdot\text{O}_2^-$  formado en exceso en la mitocondria es reducido a  $\text{H}_2\text{O}_2$  por la SOD y éste puede salir de la mitocondria y acceder a otros compartimientos celulares donde o bien será tóxico o bien reducirse a  $\text{H}_2\text{O}$  por el glutatión o lo que es mucho peor, puede reaccionar con hierro o cobre y generar  $\cdot\text{OH}$ , el radical libre más tóxico que se conoce por ser el de vida media más corta. Por eso, los niveles mitocondriales de glutatión descienden durante la colestasis lo que limita esta vía defensiva antioxidante [Sokol y cols., 1998a]. El glutatión reducido es el sustrato de enzimas antioxidantes esenciales para el mantenimiento del equilibrio oxidativo, la homeostasis oxidativa, y además por su elevada concentración intracelular se le considera un antioxidante clave. Estudios recientes describen que en ratas con obstrucción biliar quirúrgica hay una disminución tanto en el glutatión reducido del tejido hepático como en el plasmático [Montilla y cols., 2001]. Incluso en

este mismo modelo quirúrgico se han observado deficiencias en el sistema enzimático antioxidante de otros territorios extrahepáticos como el riñón, donde se describieron descensos en las actividades de la glutatión reductasa, GPx, glutatión transferasa, SOD y de la CAT [Cruz y cols., 2001], y el estómago y muy posiblemente esta minusvalía antioxidante puede contribuir a explicar por qué la mucosa gástrica de animales con colestasis se ulcera con mayor facilidad en presencia de diversos agentes facilitadores de la lesión [Dehpour y cols., 1999; Ekblad y cols., 2000; Zeuzem, 2000].

Otras causas por las que los ácidos biliares inducen lesión oxidativa son: 1) la generación endógena de ácido araquidónico [Cocco y cols., 1999]; 2) la activación del receptor de muerte Fas, que corta a través de la caspasa 8 la proteína proapoptótica Bid, y el Bid truncado se inserta en la mitocondria causando un cambio conformacional en la proteína proapoptótica BAK que permite la permeabilización de la membrana externa y la liberación de citocromo C [Faubion y cols., 1999; Higuchi y cols., 2001]; 3) el aumento de la liberación de calcio a nivel del retículo endoplásmico mediante la proteína BAK; 4) la disminución de los niveles de  $\text{NAD}^+$ .

Además de la implicación mitocondrial en la génesis de la lesión oxidativa mediada por ácidos biliares, se ha descrito que éstos pueden activar varias isoformas de las NADPH oxidasas [Lambeth, 2002], un enzima complejo con varias subunidades localizadas en el citosol y en la membrana que genera  $\cdot\text{O}_2^-$  y que en el hígado se encuentran en muchas extirpes celulares, como en las células de Kupffer [Ljubuncic y cols., 1996], en los hepatocitos [Reinehr y cols., 2005] e incluso en los neutrófilos que alcanzan el tejido hepático como consecuencia de la lesión inflamatoria mediada por la colestasis inducida por la ligadura del conducto biliar [Parola y cols., 1996; Casini y cols., 1997; Zimmerman y cols., 1997].

Los ácidos biliares a concentraciones bajas (25-100  $\mu\text{M}$ ) inducen apoptosis en cultivos de hepatocitos de rata [Patel y cols., 1994], hepatocitos aislados [Gumprich y cols., 2000; Yerushalmi y cols., 2001] y en líneas celulares hepáticas expuestas a ácidos biliares hidrofóbicos [Jones y cols., 1997; Rodrigues y cols., 1998a; Faubion y cols., 1999; Rust y cols., 2000; Reinehr y cols., 2005]. También inducen apoptosis *in vivo* en el hígado de ratas alimentadas con dietas ricas en ácidos biliares hidrofóbicos

[Rodrigues y cols., 1998b], o si éstas son perfundidas con ácidos biliares [Chieco y cols., 1997; Sokol y cols., 1998a], o si se les practica la ligadura del conducto biliar [Miyoshi y cols., 1999; Graf y cols., 2002]. Concentraciones mayores de ácidos biliares (500-1000  $\mu\text{M}$ ) producen muerte celular por necrosis en hepatocitos aislados y cultivos primarios de hepatocitos [Galle y cols., 1990; Patel y cols., 1994; Sokol y cols., 1995]. Se considera que ambas formas de muerte celular inducida por ácidos biliares, son importantes en la patogénesis de los desórdenes colestáticos hepáticos mediante la generación de daño oxidativo [Sokol y cols., 1995; 2001]. Se cree que el mecanismo por el que los ácidos biliares hidrofóbicos inducen apoptosis tanto *in vivo* como *in vitro* se debe principalmente a la activación de los receptores de muerte Fas [Faubion y cols., 1999; Miyoshi y cols., 1999; Sodeman y cols., 2000; Takikawa y cols., 2001; Graf y cols., 2002]. Los ácidos biliares proapoptóticos activan la NADPH oxidasa produciendo un estrés oxidativo que desencadena la fosforilación de las quinasas c-Jun-N-terminal (JNK) [Leppa y Bohmann, 1999] y el miembro Yes de la familia de las Src quinasas [Reinehr y cols., 2004], activando a los receptores de muerte Fas y conduciendo a la apoptosis.

En el mecanismo propuesto de apoptosis inducida por ácidos biliares, la producción de EROs sería inicialmente a través de la activación de la NADPH oxidasa y posteriormente la mitocondria actuaría de amplificador de la señal de estrés oxidativo. Algunos estudios sobre la apoptosis y/o necrosis inducida por ácidos biliares se han centrado en la permeabilidad transitoria mitocondrial (MPT) como un evento crítico previo a la muerte celular [Botla y cols., 1995; Gores y cols., 1998; Rodrigues y cols., 1998a; Yerushalmi y cols., 2001]. La MPT es un rápido aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial causado por la apertura de un megacanal, el poro de permeabilidad transitoria mitocondrial, que atraviesa las membranas mitocondriales interna y externa [Pastorino y cols., 1993; Crompton, 1999]. Cuando se activa el poro, se produce el hinchamiento mitocondrial, la pérdida del potencial electroquímico a través de su membrana, la reducción de la fosforilación oxidativa, la generación de EROs [Lemasters y cols., 1998] y la ruptura de la membrana mitocondrial externa, permitiendo que diversas proteínas del espacio intermembranoso sean liberadas al citosol, incluyendo la señal proapoptótica citocromo C y diversos inhibidores de la

apoptosis [Ott y cols., 2002]. Particularmente interesantes son los hallazgos que correlacionan un aumento en la generación de EROs con la inducción de la MPT por los ácidos biliares [Patel y Gores, 1997; 1998b; Rodrigues y cols., 1998a; Sokol y cols., 2001; Yerushalmi y cols., 2001; Sokol y cols., 2005], probablemente a través de la modificación oxidativa de las proteínas del poro de MPT.

Rodrigues y cols. observaron que el efecto citoprotector del UDA, un ácido biliar hidrofílico, probablemente se debe a su capacidad para inhibir la MPT [1998b; Rodrigues y cols., 1998a]. Otros fármacos, los 21-aminosteroides o lazaroides, que están diseñados para localizarse en el interior de las membranas celulares y actuar depurando EROs, tienen una potente capacidad de inhibir la peroxidación lipídica y han sido capaces de proteger frente a la apoptosis inducida por ácido glicoquenodesoxicólico en cultivos de hepatocito de rata, sugiriendo una estrecha relación entre estrés oxidativo y apoptosis en la toxicidad inducida por ácidos biliares [Patel y Gores, 1997]. También Yerushalmi y cols. [2001] demostraron que bajas concentraciones de ácido glicoquenodesoxicólico son capaces de estimular la producción de EROs en 15-30 minutos en hepatocitos aislados y en 1 hora de desencadenar la permeabilidad de transición mitocondrial que es seguida en unas horas por una significativa apoptosis hepatocelular. También estudiaron cómo los antioxidantes son capaces de inhibir tanto la apoptosis como la inducción de la MPT en este modelo, hecho que sugiere que el estrés oxidativo dentro del hepatocito debe de ser una señal necesaria en la inducción de la MPT, que precede y es requerida para la cascada de eventos que conducen a la apoptosis inducida por ácidos biliares [Rodrigues y Steer, 2000].

Se cree que la inducción de la MPT *per se* aumenta la producción de EROs en la cadena respiratoria a través de la liberación del citocromo C mitocondrial [Zamzami y cols., 1995], lo que alteraría la transferencia de electrones del complejo III al complejo IV. La alteración resultante podría tener el mismo efecto que la inhibición directa del complejo III por los ácidos biliares [Krahenbuhl y cols., 1994] y conducir al complejo III a generar cantidades considerables de anión superóxido. El aumento de las EROs puede causar de nuevo la modificación por oxidación de las proteínas del poro de



MPT, causando mayor MPT con la consiguiente liberación del citocromo C de la mitocondria [Lemasters y cols., 1998]. Así, se forma un bucle autoamplificado de eventos en la mitocondria, inicialmente estimulada por estrés oxidativo de los ácidos biliares o por liberación del citocromo C, que puede perpetuar, y magnificar el estrés oxidativo intracelular [Yerushalmi y cols., 2001]. Estos mismos autores han propuesto que el estrés oxidativo agudo estimula la MPT en mayor proporción en la mitocondria limitando la síntesis de ATP y las funciones de las bombas catiónicas ATP-dependientes de la membrana plasmática produciendo alteraciones de la homeostasis del calcio, activación de las proteasas celulares, y alteraciones de la membrana que en combinación con el fallo energético mitocondrial culminan en la necrosis hepatocelular [Yerushalmi y cols., 2001]. Los agentes químicos que bloquean la MPT disminuyen la necrosis hepatocelular inducida por ácidos biliares [Sokol y cols., 2001].

Finalmente, otra fuente importante de EROs generadas por los ácidos biliares es la microflora de la luz intestinal. Las cepas bacterianas que toleran la bilis, sintetizan y utilizan menaquinonas y vitamina K<sub>1</sub> como un cofactor en la deshidrogenación de los sustratos de los ácidos biliares para formar vitaminas K reducidas [Valko y cols., 2001]. Se cree que estas vitaminas K reducidas pueden transportarse al interior de las células de la mucosa colónica en forma de micelas donde iniciarían reacciones de oxido-reducción que generan  $\cdot\text{O}_2^-$  [Valko y cols., 2001].

A la hora de plantear nuestro estudio fue necesario tomar una serie de decisiones importantes para la consecución de los objetivos. En primer lugar tuvimos que decidir el tipo de muestra utilizada: el homogeneizado y la membrana celular purificada, en ambos casos procedentes del tejido hepático. Bajo nuestras condiciones experimentales, los ácidos biliares produjeron elevaciones de los indicadores de lesión oxidativa mucho mayores en membranas aisladas que en homogeneizados. Las muestras de homogeneizados conservan todos los componentes celulares incluyendo los niveles endógenos de antioxidantes del tejido hepático. Por el contrario las membranas purificadas en su proceso de aislamiento del resto de organelas sufrieron varios lavados con tampón, por lo que se reduce a la mínima expresión la interferencia de los antioxidantes endógenos, lo que podría explicar su mayor susceptibilidad a la

lesión oxidativa. Otra ventaja adicional de las membranas es que con ellas simplificamos la composición de las muestras, ya que las membranas en torno al 90% están formadas por lípidos y proteínas. En el caso de los homogeneizados están presentes todas las biomoléculas.

La elección de los indicadores de lesión oxidativa vino marcada por su utilización en la bibliografía científica. Para valorar la lesión oxidativa en los lípidos el método más utilizado, casi de forma unánime, es la cuantificación del MDA, un fragmento final de los restos acilos de los fosfolípidos [Halliwell, 1991]. Se ha demostrado que en ratas a las que se les practicó la ligadura del conducto biliar se observó un incremento de la peroxidación lipídica y que ésta está involucrada en el desarrollo del daño del tejido hepático [Singh y cols., 1992; Krahenbuhl y cols., 1995; Panozzo y cols., 1995; Parola y cols., 1996; Alptekin y cols., 1997; Tsai y cols., 1997; 1998; Orellana y cols., 2000]. Además la obstrucción biliar es la responsable la aparición de lesiones oxidativas en los lípidos de otras localizaciones extrahepáticas como el riñón, el intestino, el corazón e incluso cruza barreras protectoras como la hematoencefálica alcanzando el tejido cerebral [Ljubuncic y cols., 2000; Montilla y cols., 2001; Assimakopoulos y cols., 2006; Cruz y cols., 2007], lo que sugiere que la lesión oxidativa que inicialmente estaba confinada al hígado deriva en sistémica.

Así, las concentraciones de MDA en el tejido renal aumentan en los modelos de colestasis [Tajiri y cols., 1995; Ljubuncic y cols., 2000; Cruz y cols., 2001] y se cree que el estrés oxidativo puede desempeñar un papel esencial en la disfunción renal asociada a la ictericia obstructiva, posiblemente por una acción indirecta a través de la formación de varios mediadores vasoactivos que pueden modificar la microcirculación glomerular [Bomzon y cols., 1997]. A nivel intestinal, la acumulación de ácidos biliares altera la circulación enterohepática [Ljubuncic y cols., 2000], hecho que se ha propuesto puede explicarse por su capacidad para unirse a lipoproteínas de baja densidad [Ceryak y cols., 1993]. En el corazón se ha descrito que durante la colestasis hay una acumulación de ácidos biliares en las mitocondrias cardíacas, sobre todo los más lipofílicos (LCA, DCA, y QDA) y que son responsables de una disminución en el control de la cadena respiratoria y en el potencial de membrana, causando la

inducción de MPT [Ferreira y cols., 2005]. Por último, estudios recientes demuestran que en pacientes con ictericia obstructiva aumenta el estrés oxidativo en el cerebro, y se cree que es al menos parcialmente responsable de la patogénesis de la encefalopatía hepática [Norenberg y cols., 2004; Chroni y cols., 2006]. Nuestros resultados coinciden con todas estas observaciones previas sobre las implicaciones de los radicales libres en la fisiopatología de la colestasis y demuestran que varios ácidos biliares pueden producir lesión oxidativa de los lípidos tanto a nivel de homogeneizados como en membranas aisladas.

Elegimos la determinación de los restos carbonilo proteicos como indicador del daño oxidativo a proteínas producido por radicales libres [Cao y Cutler, 1995a; b; Adams y cols., 2001]. Nuestro estudio es el primero que demuestra que la exposición *in vitro* a los ácidos biliares conlleva carbonilación proteica tanto en los homogeneizados como en las membranas, lo que es un signo de sufrimiento oxidativo por parte de las proteínas.

Otra cuestión clave fue las decisiones sobre el modelo experimental. En el caso de una acción de los ácidos biliares cabía la posibilidad de que no tuvieran suficiente actividad como para inducir la lesión directa y que sin embargo fueran capaces de potenciar el estrés oxidativo desencadenado por cualquier situación oxidativa. En consecuencia decidimos probar su efecto utilizando un sistema generador de radicales  $\cdot\text{OH}$  y  $\text{ROO}\cdot$  mediante la reacción de Fenton que combina el hierro férrico con el ácido ascórbico [Cadenas y cols., 1989; Sahu y Washington, 1992; Wiseman y Halliwell, 1994; Millán-Plano y cols., 2003; Guajardo y cols., 2006]. Tanto el hierro como la vitamina C están presentes a altas concentraciones en el hígado sano [Baskin y Salem, 1997]. En nuestro estudio el hierro ferroso aumentó las concentraciones de MDA+4-HDA y restos carbonilo con respecto al control en homogeneizados como en membranas (tablas 4, 7 y 8). Esto fue especialmente evidente en las membranas aisladas utilizando el indicador del MDA+4-HDA. Estas diferencias observadas según el tipo de muestra e indicador biológico parecen lógicas si consideramos que los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares son muy susceptibles a la lesión oxidativa

por radicales libres, iniciando una reacción en cadena de oxidación de los lípidos, peroxidación lipídica, de devastadoras consecuencias para las membranas biológicas.

En ausencia del daño oxidativo inducido por el hierro, todos los ácidos biliares que estudiamos aumentaron los niveles de restos carbonilo tanto en homogeneizados como en membranas. Sin embargo en la oxidación lipídica el incremento fue estadísticamente significativo tan sólo al añadir los ácidos biliares conjugados con taurina: TQA, TDA y TLC, en el caso de los homogeneizados y de LCA, UDA, DCA y sobre todo TLC en las membranas aisladas. Una primera conclusión interesante que se puede desprender de estos resultados es que todos los ácidos biliares tuvieron cierta capacidad prooxidante. Además el daño inducido por sales biliares a las proteínas fue independiente de su grado de solubilidad en medios acuosos o hidrófobos. Sin embargo, a nivel de los lípidos y dado que los ácidos biliares que están conjugados con la taurina son más hidrofílicos en relación a las formas no conjugadas [Natalini y cols., 2007] y que dentro de los no conjugados la hidrosolubilidad del UDA es mayor que la de LCA, DCA y QCA [Natalini y cols., 2007], puede proponerse que la solubilidad en el medio acuoso sea un condicionante importante en la inducción del daño lipídico en los homogeneizados, un requisito que no fue necesario en el caso de las membranas. Esto posiblemente se deba a que utilizando membranas aisladas purificadas, hasta los ácidos biliares más hidrofóbicos pueden acumularse en el core hidrofóbico de las bicapas y de esta manera potenciar su acción prooxidante.

Tras la inducción con hierro los resultados fueron algo más discretos. En el caso de los homogeneizados nuevamente fue el tratamiento con los ácidos conjugados con la taurina los que más elevaron los niveles de oxidación de lípidos y proteínas, aunque la significación estadística solo se registró para TLC y TDA respectivamente. En las membranas aisladas las significaciones fueron obtenidas en todos los conjugados con taurina, y en UDA en el caso de la oxidación a lípidos, y de todos los ácidos a excepción del QCA en la oxidación a proteínas. Estos resultados que están en la misma línea de lo sucedido en ausencia de hierro, refuerzan la importancia de la naturaleza hidrofílica o no, expuesta anteriormente. Nuestros resultados están en concordancia con los de Sreejayan y cols., quienes demostraron que los ácidos biliares son capaces de

potenciar la peroxidación lipídica inducida por hierro y que ésta se relaciona de forma directa con su hidrofiliidad/hidrofobicidad, encontrando que los mayores efectos prooxidantes en los lípidos se alcanzaron con el TLC, [Sreejayan y von Ritter, 1998]; sin embargo no encontraron actividad prooxidante de los ácidos biliares en ausencia de hierro, posiblemente esta pequeña discrepancia se deba a que utilizaron modelos de membranas artificiales, liposomas [Sreejayan y von Ritter, 1998]. El TLC disminuye selectivamente la fluidez de la membrana canicular, alterando la actividad transportadora canalicular de ácidos biliares y probablemente otros solutos [Mills y cols., 1987]; también altera la localización canalicular de los transportadores de proteínas, incluyendo proteínas de resistencia a múltiples fármacos (Mrp2), transportador de aniones orgánicos en la membrana apical del hepatocito y del enterocito [Beuers y cols., 2001], y la bomba exportadora de ácidos biliares (Bsep), transportador canalicular de ácidos biliares [Crocenzi y cols., 2003b], que normalmente están interiorizados en la membrana en estructuras vesiculares.

Otro ácido biliar contrastado en la literatura es el UDA. En condiciones fisiológicas este ácido está en la bilis humana y representa aproximadamente el 2% del total de ácidos biliares. Este ácido ha sido ampliamente utilizado en la terapéutica humana [Leuschner y cols., 1989; Poupon y cols., 1991; Beuers y cols., 1992; Rubin y cols., 1994; Paumgartner y Beuers, 2002]. Aunque inicialmente la FDA estadounidense aprobó su utilidad clínica en la disolución de los cálculos vesiculares, hoy no se utiliza con este propósito ya que ha sido desplazado por el éxito de la colecistectomía laparoscópica. Posteriormente la FDA lo aprobó para el tratamiento de la cirrosis biliar primaria, ya que el UDA demora la progresión de la fibrosis hepática y mejora la supervivencia [Angulo y cols., 1999]. También tiene indicaciones terapéuticas en otros trastornos como las colestasis asociadas al embarazo y a la nutrición parenteral [Beuers y cols., 1998] y se ha propuesto su uso en combinación con antioxidantes lipofílicos para proteger a los hepatocitos frente a la toxicidad por amiodarona [Ouazzani-Chahdi y cols., 2007]. El objetivo del tratamiento con UDA se apoya en que tras su administración oral, el UDA se acumula en el pool circulante de ácidos biliares y desplaza a los ácidos biliares endógenos [Marteau y cols., 1990] lo que permite alterar la composición del pool de ácidos biliares disminuyendo la citotoxicidad de los

ácidos biliares endógenos y reduciendo la secreción biliar de colesterol. Su administración a dosis terapéuticas eleva su concentración hasta alcanzar el 40% de todos los ácidos biliares presentes en la bilis [Beuers y cols., 1998]. Además y a diferencia de los ácidos biliares hidrofóbicos, el UDA, mejora la función mitocondrial en pacientes con alteraciones hepatobiliares [Lazaridis y cols., 2001] y junto con el tauroursodesoxicólico son potentes inhibidores de la apoptosis inducida por ácidos biliares a las células hepáticas [1998b; Rodrigues y cols., 1998a; Rodrigues y Steer, 1999; Benz y cols., 2000; Graf y cols., 2002]. Se cree que la acción protectora del UDA depende no sólo de su efecto colerético [Kurz y cols., 2000; Kurz y cols., 2001], sino también de la modulación de la permeabilidad mitocondrial y la inhibición de la producción de EROs [1998b; Rodrigues y cols., 1998a; Rodrigues y Steer, 1999]. El UDA reduce la permeabilidad de transición mitocondrial y evita la translocación de la proteína proapoptótica BAX a la mitocondria, la liberación del citocromo C mitocondrial y la activación de la cascada de caspasas [1998b; Rodrigues y cols., 1998a; 1999; 2003]. El UDA inhibe la apoptosis modulando la expresión génica de la ruta apoptótica E" F-1/Mdm-2/p53/BAX [Sola y cols., 2003; Amaral y cols., 2007]. El UDA activa la rutas de supervivencia de la fosfatidilinositol 3-quinasa y las MAPK [Schoemaker y cols., 2004].

El UDA mejoró las defensas antioxidantes endógenas en hepatocitos de rata [Mitsuyoshi y cols., 1999]. En este mismo sentido su administración en modelos de cirrosis biliar primaria *in vivo*, mejoró los niveles de glutatión, aunque fue ineficaz reduciendo la peroxidación lipídica [Pemberton y cols., 2006]. También en la cirrosis biliar primaria, el tratamiento con UDA corrigió parcialmente el nivel sanguíneo de glutatión, pero fracasó en la prevención de la peroxidación lipídica [Pemberton y cols., 2006]. Sin embargo se ha demostrado que *in vitro* reduce la oxidación lipídica inducida por DCA [Mitsuyoshi y cols., 1999] y por TDA, posiblemente por un desplazamiento competitivo de este ácido biliar hidrofóbico de la superficie lipídica [Sreejayan y von Ritter, 1998]. En modelos fentonianos, aunque el UDA ha mostrado cierta interacción con hierro (III) [Lapenna y cols., 2002], ha resultado ineficaz frente a la oxidación lipídica producida por hierro (II) [Sreejayan y von Ritter, 1998]. Bajo nuestras condiciones experimentales, el UDA sin ser muy potente, sí ha generado daño

oxidativo en lípidos y proteínas de membranas aisladas y en proteínas de homogeneizados. Posiblemente su acción estimulante de los antioxidantes endógenos haya sido suficiente para que en los homogeneizados no se haya detectado lesión oxidativa en los lípidos. En los experimentos en los que se indujo estrés oxidativo mediante hierro ferroso, el UDA potenció el daño oxidativo a lípidos y proteínas en membranas aisladas pero no en los homogeneizados, hecho que refuerza la hipótesis anterior.

También merece la pena destacar las observaciones realizadas con QCA, un estereoisómero del UDA con una hidrofobicidad y unas actividades biológicas completamente distintas. Se trata de un ácido biliar hidrofóbico que es mayoritario en la bilis humana llegando a representar el 35% de los ácidos biliares totales y cuya administración presenta toxicidad en una gran parte de estudios realizados aunque los mecanismos por los que actúa son bastante desconocidos [Rolo y cols., 2000; 2001; Yerushalmi y cols., 2001; Graf y cols., 2002; Gumprich y cols., 2004; Boucherie y cols., 2005; Sokol y cols., 2005]. En nuestros experimentos, QCA produjo daño oxidativo sólo a proteínas tanto en homogeneizados como en membranas y en ausencia de hierro. Siendo que el QCA es uno de los ácidos biliares más tóxicos conocido y que alcanza una concentración tan elevada en condiciones fisiológicas, los resultados prooxidantes de nuestro estudio a nivel de las proteínas tienen una especial relevancia para explicar su toxicidad. Al conjugarlo con la taurina, TQA, aumenta la solubilidad en agua del QCA [Natalini y cols., 2007]. En nuestro estudio en ausencia de hierro TQA produjo daño oxidativo a proteínas tanto en homogeneizados como en membranas, incluso con mayores niveles de oxidación que los detectados para QCA, y un aumento significativo de la peroxidación lipídica en homogeneizados. Además el TQA potenció el daño oxidativo a lípidos y proteínas generado por hierro en membranas, donde el QCA apenas presentaba diferencias con respecto al control con hierro. Estos resultados novedosos en el daño oxidativo a las proteínas inducido por QCA y TQA están en la línea de las observaciones realizadas por la perfusión intravenosa del TQA en ratas que produjo una lesión hepática asociada a incrementos de la oxidación lipídica [Sokol y cols., 1998a]. Además en hepatocitos aislados el tratamiento con altas concentraciones

(>0,5 mM) del conjugado con glicina del QCA, el ácido glicoquenodesoxicólico, produjeron una mayor oxidación lipídica y necrosis celular [Gumprich y cols., 2000].

También el DCA se comportó como prooxidante, circunstancia que tiene gran interés porque representa el 25% de todos los ácidos biliares en el ser humano. Bajo nuestras condiciones de laboratorio, el DCA produjo daño oxidativo a proteínas en homogeneizados y membranas, y oxidación de los lípidos de las membranas aisladas. En presencia de hierro y ascórbico, DCA potenció la carbonilación proteica causada por la reacción de Fenton en las membranas de los hepatocitos. Esta diferencia con QCA podría explicarse por su hidrofilia, ya que DCA es más hidrofóbico que QCA [Natalini y cols., 2007]. Por otra parte el TDA es el DCA conjugado con taurina. Su actividad prooxidante fue similar a la observada para TQA, con la diferencia de que el TDA potencia el daño oxidativo a proteínas generado por hierro ferroso en homogeneizados, lo que podría relacionarse con que TDA es más hidrofóbico que TQA y por lo tanto puede producir mayor daño a las proteínas. Nuestros resultados están en la misma línea que la potenciación que el TDA ejerce sobre la oxidación lipídica inducida por hierro en liposomas de fosfatidilcolina [Sreejayan y von Ritter, 1998].

Finalmente señalar que el LCA es el ácido biliar más hidrofóbico de todos los evaluados en este trabajo. Representa el 1% del total de ácidos biliares. El LCA, disminuye tanto el flujo biliar dependiente como el independiente de los ácidos biliares [King y Schoenfield, 1971]. El mecanismo de reducción del flujo biliar independiente de ácidos biliares se ha explicado por la inhibición de la  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPasa [Reichen y Paumgartner, 1979; Kakis y cols., 1980], la inhibición de la permeabilidad de las uniones comunicantes [Boucherie y cols., 2005], y el desacoplamiento de los transportadores hepáticos como Bsep [Akita y cols., 2001; Yu y cols., 2002; Crocenzi y cols., 2003b]. En pacientes con enfermedad colestática crónica se encuentran niveles elevados de LCA [Murphy y cols., 1972; Fischer y cols., 1996]. Al igual que DCA, el LCA generó daño oxidativo a proteínas tanto en homogeneizados como en membranas, y aumentos de MDA+4-HDA en las membranas aisladas. También potenció el daño oxidativo a proteínas generado por hierro ferroso en membranas. Su conjugado con taurina es el TLC, que fue el ácido biliar que mayor oxidación lipídica y carbonilación



proteica produjo en todas las posibilidades estudiadas, homogeneizados o membranas y ausencia o presencia de hierro y ascórbico. Tan solo falló al intentar potenciar la oxidación a proteínas producida por hierro ferroso en los homogeneizados. Esto sugiere que la conjugación con taurina del LCA, lo que aumenta su hidrofilia [Sarbu y cols., 2001] aumenta de forma significativa su capacidad oxidativa lesiva de lípidos y proteínas.

Dado que el TLC fue el ácido biliar de todos los estudiados que más estrés oxidativo generó, tanto para lípidos como para proteínas y en homogeneizados y membranas, lo elegimos para estudiar el efecto protector de la melatonina en la toxicidad biliar, sin embargo antes de realizar esos estudios decidimos conocer mejor su habilidad prooxidante utilizando dos modelos cinéticos, uno de tiempo y otro de concentración. Las cinéticas de tiempo se realizaron en cuatro modalidades experimentales: sólo con muestra biológica o muestras control, otras añadiendo TLC, otras en presencia de hierro y ascórbico que se consideran muestras control +, y un último grupo de muestras en exposición de hierro y ascórbico, con TLC. Como era previsible los controles en ausencia de hierro no obtuvieron diferencias significativas de los indicadores de oxidación lipídica entre los distintos tiempos de incubación ni en homogeneizados ni en membranas, tan solo un pequeño aumento a partir de los 10 y 30 minutos para homogeneizado y membranas respectivamente, circunstancia que podría indicarnos una mayor susceptibilidad basal de las proteínas a tiempos de incubación prolongados. En las cinéticas realizadas en presencia de oxidantes, se obtuvieron cambios significativos desde los 10 minutos en el caso de la oxidación proteica inducida por TLC, solo o combinado con hierro hasta las dos horas en el daño oxidativo a los lípidos causado por el hierro y el ácido ascórbico. En general, la aparición de lesión oxidativa fue anterior en las proteínas que en los lípidos, hecho coincidente con la cinética de los controles y en las membranas que en los homogeneizados. A la vista de estos resultados elegimos un tiempo de dos horas ya que era óptimo para inducir la mayor cantidad posible de modelos estudiados. En el estudio realizado en liposomas de fosfatidilcolina expuestos a varios ácidos biliares incluyendo el TLC, al igual que nosotros también utilizaron un tiempo de dos horas [Sreejayan y von Ritter, 1998]. En lo que se refiere al estudio cinético de

concentración, observamos que TLC produjo un aumento en todos los casos estudiados, con excepción de la potenciación de la carbonilación proteica inducida por hierro y ascórbico en homogeneizados hepáticos. La existencia de una relación toxicidad oxidativa-concentración de TLC fue muy evidente en las experiencias con membranas. La mayor susceptibilidad de éstas podría asociarse a que los homogeneizados mantienen sus niveles basales de antioxidantes endógenos.

El mecanismo de acción propuesto para la toxicidad de los ácidos biliares, donde la mitocondria hepática es a la vez un blanco importante [Krahenbuhl y cols., 1995] y una fuente potencial de radicales libres [Sokol y cols., 1995], así como la reducción de las defensas mitocondriales antioxidantes endógenas como el glutatión y la ubiquinona, en ratas con ligadura crónica del conducto biliar [Krahenbuhl y cols., 1995], y de la Cu,Zn-SOD y CAT en el hígado de pacientes con diversas hepatopatías [Togashi y cols., 1990], sugieren fuertemente que los antioxidantes puedan desempeñar un papel hepatoprotector. De hecho, varios estudios presentan efectos beneficiosos de los antioxidantes en el daño hepático [Pastor y cols., 1997; Sokol y cols., 1998a; Montilla y cols., 2001; Yerushalmi y cols., 2001; Crocenzi y cols., 2003a; Cruz y cols., 2003; Gumprich y cols., 2004; Ara y cols., 2005; Gumprich y cols., 2005].

Recientemente se ha descrito que además de la melatonina sintetizada en la glándula pineal sometida al control circadiano, se puede sintetizar en muchos otros tejidos, como las células enterocromafines de la mucosa intestinal [Polat y Emre, 2006] y se conoce que en condiciones de salud las concentraciones de melatonina en la bilis de las ratas y otros mamíferos son más de 100 veces mayores que en el plasma [Tan y cols., 1999a], proponiéndose que estos niveles tan altos de melatonina en la bilis puedan desempeñar una función hepatoprotectora [Calvo y cols., 2001; Messner y cols., 2001]. Sin lugar a dudas, la N-acetil-5-metoxitriptamina o melatonina es la indolamina pineal cuya función antioxidante está mejor contrastada en la literatura científica, ya que más de un millar de publicaciones realizadas por numerosos grupos de investigación con un amplio repertorio de modelos experimentales oxidativos la avalan [para revisión véase Reiter y cols., 2003a; 2007; Koppiseti y cols., 2008]. La melatonina ejerce un efecto protector de la lesión hepática causado por la colestasis

inducida por la ligadura del conducto biliar en la rata, una acción que seguramente esté mediada por sus habilidades antioxidantes y antiinflamatorias [Ohta y cols., 2003; Mayo y cols., 2005]. Sin embargo, el mecanismo íntimo por el cual la melatonina ejerce un efecto terapéutico en el hígado colestático es todavía desconocido.

Nuestros resultados indican que la melatonina redujo la oxidación lipídica producida por ácido TLC tanto en homogeneizados como en membranas ya fuera en ausencia o presencia del hierro y del ácido ascórbico. Estas observaciones concuerdan con numerosos estudios en los que melatonina fue protectora frente a la peroxidación lipídica en varios modelos experimentales. Así, a modo de ejemplo, la melatonina redujo la LPO en diferentes modelos experimentales con membranas aisladas. Así, estabilizó las membranas microsómicas hepáticas expuestas a  $\text{FeCl}_3/\text{ADP}/\text{NADPH}$  e incluso potenció la función antioxidante de otras moléculas como el tamoxifeno y la pinolina [García y cols., 1997; 1998; 1999]. En modelos de hepatotoxicidad *in vivo*, la melatonina ha demostrado su eficacia frente a la toxicidad del alfa-naftilisotiocianato [Ohta y cols., 2000; Calvo y cols., 2001; Ohta y cols., 2001], el shock endotóxico y no endotóxico [Sewerynek y cols., 1995; El-Sokkary y cols., 1999a], la isquemia-reperfusión hepática [Sewerynek y cols., 1996], la administración de etanol [El-Sokkary y cols., 1999b] y la inyección de tetracloruro de carbono [Ohta y cols., 2000].

En cobayas a las que se les practicó la ligadura del conducto biliar, la melatonina redujo la aparición de cálculos pigmentarios y revirtió los cambios que la oclusión quirúrgica provocó en la concentración de sales biliares, el pH biliar, las concentraciones de MDA y el estatus antioxidante total [Shiesh y cols., 2000]. La melatonina también redujo el daño oxidativo hepático y la apoptosis en la colestasis y la cirrosis [Ohta y cols., 1999; López y cols., 2000; Cruz y cols., 2003; Ohta y cols., 2003; Padillo y cols., 2004; Cruz y cols., 2005; Esrefoglu y cols., 2005]. Cabe destacar que su acción frente a la necrosis/apoptosis inducida por isquemia/reperfusión en ratas, está mediada porque disminuye el estrés oxidativo e inhibe la vía apoptótica al limitar la liberación del citocromo C hacia el citosol y la activación de la caspasa 3 [Kim y Lee, 2008]. El tratamiento con melatonina aumentó el nivel antioxidante total del suero y redujo la concentración sérica de MDA, además de mejorar los parámetros del daño

renal en ratas con ligadura del conducto biliar [Chen y cols., 2001], e incluso minimizó la oxidación lipídica en tejidos extrahepáticos causada por la colestasis, como diversas regiones cerebrales [Cruz y cols., 2007], el riñón [Cruz y cols., 2001; Bulbulla y cols., 2002] y el estómago [Polat y Emre, 2006].

En nuestro estudio se demuestra por primera vez que la melatonina protege de la oxidación proteica inducida por TLC en membranas celulares aisladas, una acción que se realiza con una eficacia superior a la desarrollada a nivel lipídico, ya que revirtió los niveles de restos carbonilo a los valores basales, no observándose diferencias significativas con respecto al control desde concentraciones de 0,5 mM de melatonina (figura 52).

A diferencia de los lípidos existen muy pocas evidencias de la actividad protectora de la melatonina a nivel de las proteínas. Aunque poco tiempo después del descubrimiento de la acción antioxidante de la melatonina se estudiaron sus efectos protectores, manteniendo los niveles de glutatión tras la administración de butionin sulfoximina, un tóxico que provoca la aparición de cataratas [Abe y cols., 1994], no fue hasta el año 2000 cuando Kim y cols., demostraron que la melatonina redujo la carbonilación de la albúmina sérica bovina causada por la acción del hierro y el ácido ascórbico, con una  $IC_{50}$  aproximada de 1,4 mM [Kim y cols., 2000]. En este sentido, la melatonina también evitó la fragmentación y carbonilación de la albúmina bovina debida a  $Cu^{2+}$  y  $H_2O_2$  [Mayo y cols., 2003]. Resultados protectores se obtuvieron con otras proteínas como la lisozima, la albúmina sérica humana y la  $\beta$ -lactoglobulina A [Salvi y cols., 2001]. En cultivos celulares, la melatonina redujo de una forma concentración dependiente la pérdida de bandas de espectrina y la disminución de restos sulfhidrilo que causa el  $ONOO^-$  en las membranas de eritrocitos [Di Mascio y cols., 2000]. En modelos *in vivo*, la melatonina redujo la carbonilación proteica en riñón e hígado de animales tratados con fármacos como la gentamicina y el paracetamol [Sener y cols., 2002b; 2003b] y amortiguó el daño oxidativo en modelos de isquemia-reperfusión hepática y renal y en quemaduras [2002a; Sener y cols., 2002c; 2003a; 2003b].

El mecanismo de acción de la melatonina protegiendo frente a la toxicidad oxidativa de los ácidos biliares, posiblemente se realice porque la melatonina es capaz de reaccionar de forma directa con varios radicales libres y EROs, en la actualidad sabemos que al menos  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{ROO}\cdot$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$  y  $\text{HClO}$  [Tan y cols., 1993b; Pieri y cols., 1994; Reiter, 2000; Tan y cols., 2000a]. De todos ellos, los dos primeros son los más implicados en el modelo experimental de  $\text{FeCl}_3$  y ácido ascórbico que hemos utilizado en este trabajo. Poeggeler y cols. [1993] en un amplio estudio en el que compararon varias moléculas antioxidantes, demostraron que la melatonina tiene una tasa de reacción con  $\cdot\text{OH}$  y  $\text{ROO}\cdot$  elevada:  $0,60 \cdot 10^{11}$  y  $0,75 \cdot 10^{11} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ , respectivamente. Otra posible vía de acción de la melatonina es aumentando la actividad de las enzimas antioxidantes: GPx, glutatión reductasa, glutatión transferasa, CAT y SOD en el tejido hepático [Montilla y cols., 2001; Ohta y cols., 2005], un mecanismo que en nuestro modelo experimental solo puede tener especial interés en aquellos casos en los que hemos utilizado homogeneizados, ya que en las membranas aisladas con los lavados se pierde casi completamente esta actividad.

Podemos considerar a la melatonina como uno de los antioxidantes de mayor espectro [Poeggeler y cols., 1994] que además posee una serie de ventajas sobre otros antioxidantes clásicos: 1) Tiene propiedades farmacológicas excelentes tras administración oral o parenteral. Atraviesa bien las membranas biológicas [Shida y cols., 1994; Costa y cols., 1995], lo que le permite alcanzar todos los compartimientos celulares, pudiendo de esta manera actuar como antioxidante en el núcleo y en la mitocondria, dos lugares donde además la melatonina se concentra [Menéndez-Peláez y cols., 1993]. 2) No se ha detectado ningún efecto adverso importante en los tratamientos con melatonina, ni se ha podido calcular su dosis letal 50 en el animal de experimentación [Reiter, 1997]. 3) Protege a las moléculas de ADN, proteínas y lípidos utilizando mecanismos de acción frente a radicales libres muy variados, ya sean directos por interacción con ellos o indirectos a través de la potenciación de otros antioxidantes como enzimas antioxidantes endógenas que son a su vez, capaces de depurar radicales libres [Reiter y cols., 1999; 2003a]. 4) Algunos de los productos de la interacción de la melatonina con radicales libres a su vez tienen propiedades antioxidantes, lo que prolonga la actividad antioxidante [Seegar y cols., 1997; Tan y

cols., 2000a; Burkhardt y cols., 2001; Tan y cols., 2001; 2003a; Maharaj y cols., 2003b; Ressmeyer y cols., 2003; Tan y cols., 2003].

A la vista de todas nuestras experiencias podemos resumir que la melatonina previene tanto la oxidación lipídica como proteica, inducidas por el ácido biliar TLC en homogeneizados y membranas aisladas hepáticas. Estos resultados amplían las experiencias previas sobre la peroxidación lipídica que se produce durante la patología colestática y aportan las primeras evidencias sobre los efectos protectores de la melatonina ante la oxidación proteica inducida por sales biliares, contribuyendo a explicar su mecanismo fisiopatológico y planteando nuevas estrategias terapéuticas frente a esta patología hepática de amplia incidencia en nuestra sociedad.

## CONCLUSIONES





Tras el análisis de los resultados obtenidos y su discusión, podemos concluir que:

- Primera:** La exposición *in vitro* de homogeneizados o membranas aisladas de tejido hepático a siete ácidos biliares provocó ataque por radicales libres a sus lípidos y proteínas. En todos los casos se constató carbonilación proteica, mientras que sólo los conjugados con taurina indujeron lipoperoxidación en homogeneizados y DCA, UDA, LCA y TLC en las membranas hepáticas. El TLC fue el ácido biliar que implicó mayores niveles de MDA+4-HDA y carbonilación. Las potencias relativas de cada ácido biliar pueden deberse a su estructura química, que rige su grado de hidroliposolubilidad y su capacidad de transferencia electrónica.
- Segunda:** Todos los ácidos biliares estudiados potenciaron el efecto prooxidante del hierro salvo el QCA. Esta acción se observó mejor en las membranas que en los homogeneizados. Nuevamente el mayor efecto lo produjo el TLC con excepción de la oxidación proteica de los homogeneizados, en las que sólo el TDA modificó las concentraciones de restos carbonilo con significación estadística.
- Tercera:** La incubación con TLC de las membranas hepáticas en presencia y ausencia de cloruro férrico y ácido ascórbico aumentó las oxidaciones lipídica y proteica de forma tiempo y concentración dependiente. En los homogeneizados esta acción del TLC sólo se observó potenciando la peroxidación lipídica causada por el hierro.
- Cuarta:** La melatonina previno de forma concentración dependiente el daño oxidativo a los lípidos y proteínas causado por el TLC, especialmente a nivel de las proteínas de las membranas hepáticas. También redujo con gran eficiencia el efecto potenciador del TLC en la oxidación causada por hierro y ascórbico.
- Quinta:** La acción protectora de la melatonina *in vitro* frente a la lesión oxidativa causada por ácidos biliares refuerza la necesidad de realizar más estudios farmacológicos que evalúen el papel de la melatonina en la prevención de la hepatotoxicidad de las patologías colestáticas mediada por radicales libres.



## BIBLIOGRAFÍA



- Abe M, Reiter RJ, Orhii PB, Hara M y Poeggeler B (1994). "Inhibitory effect of melatonin on cataract formation in newborn rats: evidence for an antioxidative role for melatonin". *J Pineal Res.* **17**: 94-100.
- Absi E, Ayala A, Machado A y Parrado J (2000). "Protective effect of melatonin against the 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced inhibition of complex I of the mitochondrial respiratory chain". *J Pineal Res.* **29**: 40-47.
- Acuña-Castroviejo D, Pablos MI, Menéndez-Peláez A y Reiter RJ (1993). "Melatonin receptors in purified cell nuclei of liver". *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* **82**: 253-256.
- Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ, Menéndez-Peláez A, Pablos MI y Burgos A (1994). "Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver". *J Pineal Res.* **16**: 100-112.
- Acuña-Castroviejo D, Martín M, Macías M, Escames G, León J, Khaldy H y Reiter RJ (2001). "Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics". *J Pineal Res.* **30**: 65-74.
- Acuña-Castroviejo D, Escames G, Carazo A, León J, Khaldy H y Reiter RJ (2002). "Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases". *Curr Top Med Chem.* **2**: 133-151.
- Acuña-Castroviejo D, Escames G, León J, Carazo A y Khaldy H (2003). "Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites". *Adv Exp Med Biol.* **527**: 549-557.
- Acuña-Castroviejo D, Escames G, López LC, Hitos AB y León J (2005). "Melatonin and nitric oxide: two required antagonists for mitochondrial homeostasis". *Endocrine.* **27**: 159-168.
- Adams S, Green P, Claxton R, Simcox S, Williams MV, Walsh K y Leeuwenburgh C (2001). "Reactive carbonyl formation by oxidative and non-oxidative pathways". *Front Biosci.* **6**: A17-24.
- Aderem A (1992). "Signal transduction and the actin cytoskeleton: the roles of MARCKS and profilin". *Trends Biochem Sci.* **17**: 438-443.
- Aimoto T, Rohde BH, Chiou GC y Lauber JK (1985). "N-acetyltransferase activity and melatonin level in the eyes of glaucomatous chickens". *J Ocul Pharmacol.* **1**: 149-160.
- Airaksinen MM, Huang JT, Ho BT, Taylor D y Walker K (1978). "The uptake of 6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline and its effect on 5-hydroxytryptamine uptake and release in blood platelets". *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* **43**: 375-380.
- Akita H, Suzuki H, Ito K, Kinoshita S, Sato N, Takikawa H y Sugiyama Y (2001). "Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump". *Biochim Biophys Acta.* **1511**: 7-16.
- Albertini R, Rindi S, Passi A, Bardoni A, Salvini R, Pallavicini G y De Luca G (1996). "The effect of cornea proteoglycans on liposome peroxidation". *Arch Biochem Biophys.* **327**: 209-214.
- Alberts DS, Einspahr JG, Earnest DL, Krutzsch MF, Lin P, Hess LM, Heddens DK, Roe DJ, Martínez ME, Salen G y Batta AK (2003). "Fecal bile acid concentrations in a subpopulation of the wheat bran fiber colon polyp trial". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **12**: 197-200.
- Alptekin N, Mehmetcik G, Uysal M y Aykac-toker G (1997). "Evidence for oxidative stress in the hepatic mitochondria of bile duct ligated rats". *Pharmacol Res.* **36**: 243-247.
- Allgayer H, Kolb M, Stuber V y Kruis W (1999). "Modulation of base hydroxylation by bile acids and salicylates in a model of human colonic mucosal DNA: putative implications in colonic cancer". *Dig Dis Sci.* **44**: 761-767.
- Allgayer H, Kolb M, Stuber V y Kruis W (2002). "Effects of bile acids on base hydroxylation in a model of human colonic mucosal DNA". *Cancer Detect Prev.* **26**: 85-89.
- Amaral JD, Castro RE, Sola S, Steer CJ y Rodrigues CM (2007). "p53 is a key molecular target of ursodeoxycholic acid in regulating apoptosis". *J Biol Chem.* **282**: 34250-34259.

- Ames BN, Cathcart R, Schwiers E y Hochstein P (1981). "Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis". *Proc Natl Acad Sci U S A*. **78**: 6858-6862.
- Ames BN, Shigenaga MK y Hagen TM (1993). "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging". *Proc Natl Acad Sci U S A*. **90**: 7915-7922.
- Andrabi SA, Sayeed I, Siemen D, Wolf G y Horn TF (2004). "Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin". *FASEB J*. **18**: 869-871.
- Andre E, Conquet F, Steinmayr M, Stratton SC, Porciatti V y Becker-Andre M (1998). "Disruption of retinoid-related orphan receptor beta changes circadian behavior, causes retinal degeneration and leads to vacillans phenotype in mice". *EMBO J*. **17**: 3867-3877.
- Andrew PJ y Mayer B (1999). "Enzymatic function of nitric oxide synthases". *Cardiovasc Res*. **43**: 521-531.
- Angelín B, Bjorkhem I, Einarsson K y Ewerth S (1982). "Hepatic uptake of bile acids in man. Fasting and postprandial concentrations of individual bile acids in portal venous and systemic blood serum". *J Clin Invest*. **70**: 724-731.
- Angulo P, Batts KP, Therneau TM, Jorgensen RA, Dickson ER y Lindor KD (1999). "Long-term ursodeoxycholic acid delays histological progression in primary biliary cirrhosis". *Hepatology*. **29**: 644-647.
- Antolín I, Rodríguez C, Sáinz RM, Mayo JC, Uriá H, Kotler ML, Rodríguez-Colunga MJ, Tolivia D y Menéndez-Peláez A (1996). "Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes". *FASEB J*. **10**: 882-890.
- Antolín I, Mayo JC, Sáinz RM, del Brio MA, Herrerías F, Martín V y Rodríguez C (2002). "Protective effect of melatonin in a chronic experimental model of Parkinson's disease". *Brain Res*. **943**: 163-173.
- Anton-Tay F, Ramirez G, Martínez I y Benitez-King G (1998). "In vitro stimulation of protein kinase C by melatonin". *Neurochem Res*. **23**: 601-606.
- Ara C, Kirimlioglu H, Karabulut AB, Coban S, Ay S, Harputluoglu M, Kirimlioglu V y Yilmaz S (2005). "Protective effect of resveratrol against oxidative stress in cholestasis". *J Surg Res*. **127**: 112-117.
- Araki Y, Katoh T, Ogawa A, Bamba S, Andoh A, Koyama S, Fujiyama Y y Bamba T (2005). "Bile acid modulates transepithelial permeability via the generation of reactive oxygen species in the Caco-2 cell line". *Free Radic Biol Med*. **39**: 769-780.
- Arendt J, Symons AM y Laud C (1981). "Pineal function in the sheep: evidence for a possible mechanism mediating seasonal reproductive activity". *Experientia*. **37**: 584-586.
- Arendt J (1986). "Role of the pineal gland and melatonin in seasonal reproductive function in mammals". *Oxf Rev Reprod Biol*. **8**: 266-320.
- Ariznavarreta C, Cardinali DP, Villanua MA, Granados B, Martín M, Chiesa JJ, Golombek DA y Tresguerres JA (2002). "Circadian rhythms in airline pilots submitted to long-haul transmeridian flights". *Aviat Space Environ Med*. **73**: 445-455.
- Aslan M y Ozben T (2003). "Oxidants in receptor tyrosine kinase signal transduction pathways". *Antioxid Redox Signal*. **5**: 781-788.
- Assimakopoulos SF, Thomopoulos KC, Patsoukis N, Georgiou CD, Scopa CD, Nikolopoulou VN y Vagianos CE (2006). "Evidence for intestinal oxidative stress in patients with obstructive jaundice". *Eur J Clin Invest*. **36**: 181-187.
- Attili AF, Angelico M, Cantafora A, Alvaro D y Capocaccia L (1986). "Bile acid-induced liver toxicity: relation to the hydrophobic-hydrophilic balance of bile acids". *Med Hypotheses*. **19**: 57-69.
- Babior BM (1978). "Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts)". *N Engl J Med*. **298**: 659-668.

- Badura LL y Goldman BD (1992). "Central sites mediating reproductive responses to melatonin in juvenile male Siberian hamsters". *Brain Res.* **598**: 98-106.
- Bai J y Cederbaum AI (2001). "Mitochondrial catalase and oxidative injury". *Biol Signals Recept.* **10**: 189-199.
- Baler R, Coon S y Klein DC (1996). "Orphan nuclear receptor RZRbeta: cyclic AMP regulates expression in the pineal gland". *Biochem Biophys Res Commun.* **220**: 975-978.
- Barjavel MJ, Mamdouh Z, Raghbati N y Bakouche O (1998). "Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes". *J Immunol.* **160**: 1191-1197.
- Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Menéndez-Peláez A, Chen LD y Poeggeler B (1995). "Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity". *Neurochem Int.* **26**: 497-502.
- Baskin SI y Salem H (1997). *Oxidants, Antioxidants, and Free Radicals*. Washington, DC.
- Bates GW y Schlabach MR (1973). "The reaction of ferric salts with transferrin". *J Biol Chem.* **248**: 3228-3232.
- Baydas G, Reiter RJ, Akbulut M, Tuzcu M y Tamer S (2005). "Melatonin inhibits neural apoptosis induced by homocysteine in hippocampus of rats via inhibition of cytochrome c translocation and caspase-3 activation and by regulating pro- and anti-apoptotic protein levels". *Neuroscience.* **135**: 879-886.
- Becker-Andre M, Andre E y DeLamarter JF (1993). "Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences". *Biochem Biophys Res Commun.* **194**: 1371-1379.
- Becker-Andre M, Wiesenberger I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat JH y Carlberg C (1994). "Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily". *J Biol Chem.* **269**: 28531-28534.
- Beckman JS y Koppenol WH (1996). "Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly". *Am J Physiol.* **271**: C1424-C1437.
- Beckman KB y Ames BN (1998). "The free radical theory of aging matures". *Physiol Rev.* **78**: 547-581.
- Beckmann JS, Ye YZ, Anderson PG, Chen J, Accavitti MA, Tarpey MM y White CR (1994). "Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry". *Biol Chem Hoppe Seyler.* **375**: 81-88.
- Benitez-King G, Huerto-Delgadillo L y Anton-Tay F (1993). "Binding of 3H-melatonin to calmodulin". *Life Sci.* **53**: 201-207.
- Benitez-King G, Rios A, Martínez A y Anton-Tay F (1996). "In vitro inhibition of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin". *Biochim Biophys Acta.* **1290**: 191-196.
- Benz C, Angermuller S, Otto G, Sauer P, Stremmel W y Stiehl A (2000). "Effect of tauroursodeoxycholic acid on bile acid-induced apoptosis in primary human hepatocytes". *Eur J Clin Invest.* **30**: 203-209.
- Benzi G y Moretti A (1995). "Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system". *Free Radic Biol Med.* **19**: 77-101.
- Bernstein C, Bernstein H, Payne CM y Garewal H (2002). "DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis". *Mutat Res.* **511**: 145-178.
- Bernstein H, Bernstein C, Payne CM, Dvorakova K y Garewal H (2005). "Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers". *Mutat Res.* **589**: 47-65.
- Beuers U, Spengler U, Zwiebel FM, Pauletzki J, Fischer S y Paumgartner G (1992). "Effect of ursodeoxycholic acid on the kinetics of the major hydrophobic bile acids in health and in chronic cholestatic liver disease". *Hepatology.* **15**: 603-608.
- Beuers U, Boyer JL y Paumgartner G (1998). "Ursodeoxycholic acid in cholestasis: potential mechanisms of action and therapeutic applications". *Hepatology.* **28**: 1449-1453.

- Beuers U, Bilzer M, Chittattu A, Kullak-Ublick GA, Keppler D, Paumgartner G y Dombrowski F (2001). "Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver". *Hepatology*. **33**: 1206-1216.
- Biesalski HK, Hemmes C, Hopfenmuller W, Schmid C y Gollnick HP (1996). "Effects of controlled exposure of sunlight on plasma and skin levels of beta-carotene". *Free Radic Res*. **24**: 215-224.
- Billington D, Evans CE, Godfrey PP y Coleman R (1980). "Effects of bile salts on the plasma membranes of isolated rat hepatocytes". *Biochem J*. **188**: 321-327.
- Bindoli A (1988). "Lipid peroxidation in mitochondria". *Free Radic Biol Med*. **5**: 247-261.
- Bittman EL y Weaver DR (1990). "The distribution of melatonin binding sites in neuroendocrine tissues of the ewe". *Biol Reprod*. **43**: 986-993.
- Blazynski C y Dubocovich ML (1991). "Localization of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in mammalian retina". *J Neurochem*. **56**: 1873-1880.
- Blickenstaff RT, Brandstadter SM, Reddy S y Witt R (1994). "Potential radioprotective agents. 1. Homologs of melatonin". *J Pharm Sci*. **83**: 216-218.
- Bohr VA y Anson RM (1999). "Mitochondrial DNA repair pathways". *J Bioenerg Biomembr*. **31**: 391-398.
- Bomzon A, Holt S y Moore K (1997). "Bile acids, oxidative stress, and renal function in biliary obstruction". *Semin Nephrol*. **17**: 549-562.
- Booth LA, Gilmore IT y Bilton RF (1997). "Secondary bile acid induced DNA damage in HT29 cells: are free radicals involved?" *Free Radic Res*. **26**: 135-144.
- Bosin TR, Holmstedt B, Lundman A y Beck O (1983). "Presence of formaldehyde in biological media and organic solvents: artifactual formation of tetrahydro-beta-carbolines". *Anal Biochem*. **128**: 287-293.
- Botla R, Spivey JR, Aguilar H, Bronk SF y Gores GJ (1995). "Ursodeoxycholate (UDCA) inhibits the mitochondrial membrane permeability transition induced by glycochenodeoxycholate: mechanism of UDCA cytoprotection". *J Pharmacol Exp Ther*. **272**: 930-938.
- Boucherie S, Koukoui O, Nicolas V y Combettes L (2005). "Cholestatic bile acids inhibit gap junction permeability in rat hepatocyte couplets and normal rat cholangiocytes". *J Hepatol*. **42**: 244-251.
- Bove KE (2000). "Liver disease caused by disorders of bile acid synthesis". *Clin Liver Dis*. **4**: 831-848.
- Boveris A, Oshino N y Chance B (1972). "The cellular production of hydrogen peroxide". *Biochem J*. **128**: 617-630.
- Boveris A y Cadenas E (1975). "Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration". *FEBS Lett*. **54**: 311-314.
- Boveris A, Cadenas E y Stoppani AO (1976). "Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide". *Biochem J*. **156**: 435-444.
- Bradford MM (1976). "A rapid and sensitive Method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical biochemistry*. **72**: 248-254.
- Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM y Snyder SH (1991). "Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase". *Neuron*. **7**: 615-624.
- Breen AP y Murphy JA (1995). "Reactions of oxy radicals with DNA". *Free Radic Biol Med*. **18**: 1033-1077.
- Bruch RC y Thayer WS (1983). "Differential effect of lipid peroxidation on membrane fluidity as determined by electron spin resonance probes". *Biochim Biophys Acta*. **733**: 216-222.



- Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Pajdo R, Bielanski W, Brzozowska I, Stachura J y Hahn EG (1997). "The role of melatonin and L-tryptophan in prevention of acute gastric lesions induced by stress, ethanol, ischemia, and aspirin". *J Pineal Res.* **23**: 79-89.
- Bubenik GA (1980). "Localization of melatonin in the digestive tract of the rat. Effect of maturation, diurnal variation, melatonin treatment and pinealectomy". *Horm Res.* **12**: 313-323.
- Bubenik GA, Hacker RR, Brown GM y Bartos L (1999). "Melatonin concentrations in the luminal fluid, mucosa, and muscularis of the bovine and porcine gastrointestinal tract". *J Pineal Res.* **26**: 56-63.
- Bubenik GA (2002). "Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance". *Dig Dis Sci.* **47**: 2336-2348.
- Buettner GR y Jurkiewicz BA (1996). "Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid". *Radiat Res.* **145**: 532-541.
- Bulbuler N, Akkus MA, Cetinkaya Z, Ilhan YS, Ozercan I, Kirkil C y Dogru O (2002). "Effects of melatonin and lactulose on the liver and kidneys in rats with obstructive jaundice". *Pediatr Surg Int.* **18**: 677-680.
- Burkhardt S, Reiter RJ, Tan DX, Hardeland R, Cabrera J y Karbownik M (2001). "DNA oxidatively damaged by chromium(III) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is protected by the antioxidants melatonin, N(1)-acetyl-N(2)-formyl-5-methoxykynuramine, resveratrol and uric acid". *Int J Biochem Cell Biol.* **33**: 775-783.
- Bush PA, González NE y Ignarro LJ (1992). "Biosynthesis of nitric oxide and citrulline from L-arginine by constitutive nitric oxide synthase present in rabbit corpus cavernosum". *Biochem Biophys Res Commun.* **186**: 308-314.
- Buzzell GR, Chen Z, Vaughan MK y Reiter RJ (1989). "Effects of inhibition of thyroid function and of cold on melatonin synthesis and porphyrin content in the Harderian glands of male Syrian hamsters, *Mesocricetus auratus*". *Comp Biochem Physiol A.* **94**: 427-429.
- Cadenas E, Boveris A, Ragan CI y Stoppani AO (1977). "Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome C reductase from beef-heart mitochondria". *Arch Biochem Biophys.* **180**: 248-257.
- Cadenas E, Simic MG y Sies H (1989). "Antioxidant activity of 5-hydroxytryptophan, 5-hydroxyindole, and DOPA against microsomal lipid peroxidation and its dependence on vitamin E". *Free Radic Res Commun.* **6**: 11-17.
- Cagnoli CM, Atabay C, Kharlamova E y Manev H (1995). "Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis". *J Pineal Res.* **18**: 222-226.
- Calvo JR, Reiter RJ, García JJ, Ortiz GG, Tan DX y Karbownik M (2001). "Characterization of the protective effects of melatonin and related indoles against alpha-Naphthylisothiocyanate-induced liver injury in rats". *Journal of Cellular Biochemistry.* **80**: 461-470.
- Callaway JC, Gynther J, Poso A, Vepsäläinen J y Airaksinen MM (1994). "The Pictet-Spengler reaction and biogenic tryptamines: formation of tetrahydro-beta-carbolines at physiological pH". *J Heterocycl Chem.* **31**: 431 - 435.
- Canturk NZ, Canturk Z, Utkan NZ, Yenisey C, Ozbilim G, Yildirim C y Yalman Y (1998). "Cytoprotective effects of alpha tocopherol against liver injury induced by extrahepatic biliary obstruction". *East Afr Med J.* **75**: 77-80.
- Cao G y Cutler RG (1995a). "Protein oxidation and aging. I. Difficulties in measuring reactive protein carbonyls in tissues using 2,4-dinitrophenylhydrazine". *Arch Biochem Biophys.* **320**: 106-114.
- Cao G y Cutler RG (1995b). "Protein oxidation and aging. II. Difficulties in measuring alkaline protease activity in tissues using the fluorescamine procedure". *Arch Biochem Biophys.* **320**: 195-201.
- Cardinali DP, Vacas MI y Gejman PV (1981). "The sympathetic superior cervical ganglia as peripheral neuroendocrine centers". *J Neural Transm.* **52**: 1-21.

- Carlberg C, Hooft van Huijsduijnen R, Staple JK, DeLamarter JF y Becker-Andre M (1994). "RZR, a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers". *Mol Endocrinol*. **8**: 757-770.
- Carlberg C y Wiesenberg I (1995). "The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: an unexpected relationship". *J Pineal Res*. **18**: 171-178.
- Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ y Reiter RJ (2005). "A review of the multiple actions of melatonin on the immune system". *Endocrine*. **27**: 189-200.
- Casini A, Ceni E, Salzano R, Biondi P, Parola M, Galli A, Foschi M, Caligiuri A, Pinzani M y Surrenti C (1997). "Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide". *Hepatology*. **25**: 361-367.
- Cassone VM, Chesworth MJ y Armstrong SM (1986). "Dose-dependent entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin". *J Biol Rhythms*. **1**: 219-229.
- Cerutti PA (1985). "Prooxidant states and tumor promotion". *Science*. **227**: 375-381.
- Ceryak S, Bouscarel B y Fromm H (1993). "Comparative binding of bile acids to serum lipoproteins and albumin". *J Lipid Res*. **34**: 1661-1674.
- Cocco T, Di Paola M, Papa S y Lorusso M (1999). "Arachidonic acid interaction with the mitochondrial electron transport chain promotes reactive oxygen species generation". *Free Radic Biol Med*. **27**: 51-59.
- Colell A, García-Ruiz C, Roman J, Ballesta A y Fernández-Checa JC (2001). "Ganglioside GD3 enhances apoptosis by suppressing the nuclear factor-kappa B-dependent survival pathway". *FASEB J*. **15**: 1068-1070.
- Cook JW, Kennaway EL y Kennaway NM (1940). "Production of tumours in mice by deoxycholic acid". *Nature*. **145**: 627-627.
- Cosentino F y Luscher TF (1998). "Tetrahydrobiopterin and endothelial function". *Eur Heart J*. **19 Suppl G**: G3-8.
- Cosentino F y Luscher TF (1999). "Tetrahydrobiopterin and endothelial nitric oxide synthase activity". *Cardiovasc Res*. **43**: 274-278.
- Costa EJX, Lopes RL y Lamy-Freund MT (1995). "Permeability of pure lipid bilayers to melatonin". *Journal of Pineal Research*. **19**: 123-126.
- Coto-Montes A y Hardeland R (1999). "Antioxidative effects of melatonin in *Drosophila melanogaster*: antagonization of damage induced by the inhibition of catalase". *J Pineal Res*. **27**: 154-158.
- Craven PA, Pfanstiel J y DeRubertis FR (1986). "Role of reactive oxygen in bile salt stimulation of colonic epithelial proliferation". *J Clin Invest*. **77**: 850-859.
- Craven PA, Pfanstiel J y DeRubertis FR (1987). "Role of activation of protein kinase C in the stimulation of colonic epithelial proliferation and reactive oxygen formation by bile acids". *J Clin Invest*. **79**: 532-541.
- Crespo E, Macías M, Pozo D, Escames G, Martín M, Vives F, Guerrero JM y Acuña-Castroviejo D (1999). "Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats". *FASEB J*. **13**: 1537-1546.
- Crocenzi FA, Sánchez Pozzi EJ, Pellegrino JM, Rodríguez Garay EA, Mottino AD y Roma MG (2003a). "Preventive effect of silymarin against tauroolithocholate-induced cholestasis in the rat". *Biochem Pharmacol*. **66**: 355-364.
- Crocenzi FA, Mottino AD, Sánchez Pozzi EJ, Pellegrino JM, Rodríguez Garay EA, Milkiewicz P, Vore M, Coleman R y Roma MG (2003b). "Impaired localisation and transport function of canalicular Bsep in tauroolithocholate induced cholestasis in the rat". *Gut*. **52**: 1170-1177.
- Crocenzi FA, Basiglio CL, Pérez LM, Portesio MS, Sánchez-Pozzi EJ y Roma MG (2005). "Silibinin prevents cholestasis-associated retrieval of the bile salt export pump, Bsep, in isolated rat hepatocyte couplets: possible involvement of cAMP". *Biochemical Pharmacology*. **69**: 1113-1120.

- Crompton M (1999). "The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death". *Biochem J.* **341** ( Pt 2): 233-249.
- Cross AR y Jones OT (1991). "Enzymic mechanisms of superoxide production". *Biochim Biophys Acta.* **1057**: 281-298.
- Crowley-Weber CL, Payne CM, Gleason-Guzman M, Watts GS, Futscher B, Waltmire CN, Crowley C, Dvorakova K, Bernstein C, Craven M, Garewal H y Bernstein H (2002). "Development and molecular characterization of HCT-116 cell lines resistant to the tumor promoter and multiple stress-inducer, deoxycholate". *Carcinogenesis.* **23**: 2063-2080.
- Crowley-Weber CL, Dvorakova K, Crowley C, Bernstein H, Bernstein C, Garewal H y Payne CM (2003). "Nicotine increases oxidative stress, activates NF-kappaB and GRP78, induces apoptosis and sensitizes cells to genotoxic/xenobiotic stresses by a multiple stress inducer, deoxycholate: relevance to colon carcinogenesis". *Chem Biol Interact.* **145**: 53-66.
- Cruz A, Padillo FJ, Túnez I, Muñoz C, Granados J, Pera-Madrado C y Montilla P (2001). "Melatonin protects against renal oxidative stress after obstructive jaundice in rats". *Eur J Pharmacol.* **425**: 135-139.
- Cruz A, Padillo FJ, Granados J, Túnez I, Muñoz MC, Briceno J, Pera-Madrado C y Montilla P (2003). "Effect of melatonin on cholestatic oxidative stress under constant light exposure". *Cell Biochem Funct.* **21**: 377-380.
- Cruz A, Padillo FJ, Torres E, Navarrete CM, Muñoz-Castaneda JR, Caballero FJ, Briceno J, Marchal T, Túnez I, Montilla P, Pera C y Muntane J (2005). "Melatonin prevents experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in rats". *J Pineal Res.* **39**: 143-150.
- Cruz A, Túnez I, Martínez R, Muñoz-Castaneda JR, Ramirez LM, Recio M, Ochoa L, Arjona A, Montilla P, Muntane J y Padillo FJ (2007). "Melatonin prevents brain oxidative stress induced by obstructive jaundice in rats". *J Neurosci Res.*
- Curtis MT, Gilfor D y Farber JL (1984). "Lipid peroxidation increases the molecular order of microsomal membranes". *Arch Biochem Biophys.* **235**: 644-649.
- Czapski G y Goldstein S (1995). "The role of the reactions of ·NO with superoxide and oxygen in biological systems: a kinetic approach". *Free Radic Biol Med.* **19**: 785-794.
- Chance B, Sies H y Boveris A (1979). "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs". *Physiol Rev.* **59**: 527-605.
- Chawla A, Repa JJ, Evans RM y Mangelsdorf DJ (2001). "Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files". *Science.* **294**: 1866-1870.
- Cheeseman KH y Slater TF (1993). "An introduction to free radical biochemistry". *Br Med Bull.* **49**: 481-493.
- Chen CY, Shiesh SC, Tsao HC, Chen FF y Lin XZ (2001). "Protective effect of melatonin on renal injury of rats induced by bile duct ligation". *Dig Dis Sci.* **46**: 927-931.
- Chen JJ y Yu BP (1994). "Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products". *Free Radic Biol Med.* **17**: 411-418.
- Chen K, Suh J, Carr AC, Morrow JD, Zeind J y Frei B (2000). "Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload". *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **279**: E1406-1412.
- Chen LD, Tan DX, Reiter RJ, Yaga K, Poeggeler B, Kumar P, Manchester LC y Chambers JP (1993). "In vivo and in vitro effects of the pineal gland and melatonin on [Ca(2+) + Mg2+]-dependent ATPase in cardiac sarcolemma". *J Pineal Res.* **14**: 178-183.
- Cherbonnel-Lasserre C, Gauny S y Kronenberg A (1996). "Suppression of apoptosis by Bcl-2 or Bcl-xL promotes susceptibility to mutagenesis". *Oncogene.* **13**: 1489-1497.
- Cherbonnel-Lasserre C y Dosanjh MK (1997). "Suppression of apoptosis by overexpression of Bcl-2 or Bcl-xL promotes survival and mutagenesis after oxidative damage". *Biochimie.* **79**: 613-617.

- Cheung WY (1970). "Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Demonstration of an activator". *Biochem Biophys Res Commun.* **38**: 533-538.
- Cheung WY, Bradham LS, Lynch TJ, Lin YM y Tallant EA (1975). "Protein activator of cyclic 3':5'-nucleotide phosphodiesterase of bovine or rat brain also activates its adenylate cyclase". *Biochem Biophys Res Commun.* **66**: 1055-1062.
- Chiarugi P, Pani G, Giannoni E, Taddei L, Colavitti R, Raugei G, Symons M, Borrello S, Galeotti T y Ramponi G (2003). "Reactive oxygen species as essential mediators of cell adhesion: the oxidative inhibition of a FAK tyrosine phosphatase is required for cell adhesion". *J Cell Biol.* **161**: 933-944.
- Chieco P, Romagnoli E, Aicardi G, Suozzi A, Forti GC y Roda A (1997). "Apoptosis induced in rat hepatocytes by in vivo exposure to taurochenodeoxycholate". *Histochem J.* **29**: 875-883.
- Chiueh CC, Miyake H y Peng MT (1993). "Role of dopamine autooxidation, hydroxyl radical generation, and calcium overload in underlying mechanisms involved in MPTP-induced parkinsonism". *Adv Neurol.* **60**: 251-258.
- Chroni E, Patsoukis N, Karageorgos N, Konstantinou D y Georgiou C (2006). "Brain oxidative stress induced by obstructive jaundice in rats". *J Neuropathol Exp Neurol.* **65**: 193-198.
- Chuang JI, Mohan N, Meltz ML y Reiter RJ (1996). "Effect of melatonin on NF-kappa-B DNA-binding activity in the rat spleen". *Cell Biol Int.* **20**: 687-692.
- Chung SM, Proia AD, Klintworth GK, Watson SP y Lapetina EG (1985). "Deoxycholate induces the preferential hydrolysis of polyphosphoinositides by human platelet and rat corneal phospholipase C". *Biochem Biophys Res Commun.* **129**: 411-416.
- Dahm LJ, Hewett JA y Roth RA (1988). "Bile and bile salts potentiate superoxide anion release from activated, rat peritoneal neutrophils". *Toxicol Appl Pharmacol.* **95**: 82-92.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Milzani A, Di Simplicio P y Colombo R (2001). "The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself". *Free Radic Biol Med.* **31**: 1624-1632.
- Dardes RC, Baracat EC y Simoes MJ (2000). "Modulation of estrous cycle and LH, FSH and melatonin levels by pinealectomy and sham-pinealectomy in female rats". *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* **24**: 441-453.
- Davies KJ, Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF y Hochstein P (1986). "Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid". *Biochem J.* **235**: 747-754.
- Davies KJ y Goldberg AL (1987). "Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells". *J Biol Chem.* **262**: 8227-8234.
- Davies KJ, Delsignore ME y Lin SW (1987). "Protein damage and degradation by oxygen radicals.II.Modification of amino acids". *Journal of Biological Chemistry.* **262** 9902-9907.
- Davies KJ (1995). "Oxidative stress: the paradox of aerobic life". *Biochem Soc Symp.* **61**: 1-31.
- Davies MJ (2003). "Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences". *Biochem Biophys Res Commun.* **305**: 761-770.
- De Almeida EA, Martínez GR, Klitzke CF, de Medeiros MH y Di Mascio P (2003). "Oxidation of melatonin by singlet molecular oxygen (O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g)) produces N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynurenine". *J Pineal Res.* **35**: 131-137.</sub>
- De La Lastra CA, Cabeza J, Motilva V y Martín MJ (1997). "Melatonin protects against gastric ischemia-reperfusion injury in rats". *J Pineal Res.* **23**: 47-52.
- Deacon S y Arendt J (1995). "Melatonin-induced temperature suppression and its acute phase-shifting effects correlate in a dose-dependent manner in humans". *Brain Res.* **688**: 77-85.

- Dean RT, Fu S, Stocker R y Davies MJ (1997). "Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation". *Biochem J.* **324** (Pt 1): 1-18.
- Debruyne PR, Bruyneel EA, Li X, Zimmer A, Gespach C y Mareel MM (2001). "The role of bile acids in carcinogenesis". *Mutat Res.* **480-481**: 359-369.
- Decker JF y Quay WB (1982). "Stimulatory effects of melatonin on ependymal epithelium of choroid plexuses in golden hamsters". *J Neural Transm.* **55**: 53-67.
- Dehpour AR, Mani AR, Amanlou M, Nahavandi A, Amanpour S y Bahadori M (1999). "Naloxone is protective against indomethacin-induced gastric damage in cholestatic rats". *J Gastroenterol.* **34**: 178-181.
- Dellegar SM, Murphy SA, Bourne AE, DiCesare JC y Purser GH (1999). "Identification of the factors affecting the rate of deactivation of hypochlorous acid by melatonin". *Biochem Biophys Res Commun.* **257**: 431-439.
- Demple B y Halbrook J (1983). "Inducible repair of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*". *Nature.* **304**: 466-468.
- Deno H, Kato A, Shinozaki K y Sugiura M (1982). "Nucleotide sequences of tobacco chloroplast genes for elongator tRNAMet and tRNAVal (UAC): the tRNAVal (UAC) gene contains a long intron". *Nucleic Acids Res.* **10**: 7511-7520.
- DeRubertis FR, Craven PA y Saito R (1984). "Bile salt stimulation of colonic epithelial proliferation. Evidence for involvement of lipoxygenase products". *J Clin Invest.* **74**: 1614-1624.
- Di Mascio P, Dewez B y García CR (2000). "Ghost protein damage by peroxynitrite and its protection by melatonin". *Braz J Med Biol Res.* **33**: 11-17.
- Díaz E, Fernández C, Castrillon PO, Esquifino AI, Marin B y Díaz Lopez B (1999). "Effect of exogenous melatonin on neuroendocrine-reproductive function of middle-aged female rats". *J Reprod Fertil.* **117**: 331-337.
- Dizdaroglu M (1993). "Quantitative determination of oxidative base damage in DNA by stable isotope-dilution mass spectrometry". *FEBS Lett.* **315**: 1-6.
- Do TQ, Schultz JR y Clarke CF (1996). "Enhanced sensitivity of ubiquinone-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae* to products of autoxidized polyunsaturated fatty acids". *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**: 7534-7539.
- Dobretsov GE, Borschevskaya TA, Petrov VA y Vladimirov YA (1977). "The increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxidation". *FEBS Lett.* **84**: 125-128.
- Dubocovich ML y Takahashi JS (1987). "Use of 2-[125I]iodomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina". *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84**: 3916-3920.
- Dubocovich ML, Rivera-Bermudez MA, Gerdin MJ y Masana MI (2003). "Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors". *Front Biosci.* **8**: d1093-d1108.
- Dubocovich ML y Markowska M (2005). "Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals". *Endocrine.* **27**: 101-110.
- Duncan MJ, Takahashi JS y Dubocovich ML (1989). "Characteristics and autoradiographic localization of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in Djungarian hamster brain". *Endocrinology.* **125**: 1011-1018.
- Ebadi M y Govitrapong P (1986). "Neural pathways and neurotransmitters affecting melatonin synthesis". *J Neural Transm Suppl.* **21**: 125-155.
- Ebisawa T, Karne S, Lerner MR y Reppert SM (1994). "Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores". *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**: 6133-6137.
- Edmonds KE y Stetson MH (1994). "Photoperiod and melatonin affect testicular growth in the marsh rice rat (*Oryzomys palustris*)". *J Pineal Res.* **17**: 86-93.



- Ehrenwald E y Fox PL (1994). "Isolation of nonlabile human ceruloplasmin by chromatographic removal of a plasma metalloproteinase". *Arch Biochem Biophys.* **309**: 392-395.
- Ekblad E, Mei Q y Sundler F (2000). "Innervation of the gastric mucosa". *Microsc Res Tech.* **48**: 241-257.
- El-Sokkary G, Reiter RJ, Cuzzocrea S, Caputi AP, Hassanein AFMM y Tan DX (1999a). "Role of melatonin in reduction of lipid peroxidation and peroxynitrite formation in non-septic shock induced by zymosan". *Shock.* **12**: 402-408.
- El-Sokkary GH, Reiter RJ, Tan DX, Kim SJ y Cabrera J (1999b). "Inhibitory effect of melatonin on products of lipid peroxidation resulting from chronic ethanol administration". *Alcohol Alcohol.* **34**: 842-850.
- Elledge SJ (1996). "Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis". *Science.* **274**: 1664-1672.
- Escames G, Guerrero JM, Reiter RJ, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A, Ortiz GG y Oh CS (1997). "Melatonin and vitamin E limit nitric oxide-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates". *Neurosci Lett.* **230**: 147-150.
- Escames G, Macías M, León J, García J, Khaldy H, Martín M, Vives F y Acuña-Castroviejo D (2001). "Calcium-dependent effects of melatonin inhibition of glutamatergic response in rat striatum". *J Neuroendocrinol.* **13**: 459-466.
- Escames G, León J, Macías M, Khaldy H y Acuña-Castroviejo D (2003). "Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats". *FASEB J.* **17**: 932-934.
- Escames G, López LC, Tapias V, Utrilla P, Reiter RJ, Hitos AB, León J, Rodríguez MI y Acuña-Castroviejo D (2006). "Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice". *J Pineal Res.* **40**: 71-78.
- Esrefoglu M, Gul M, Emre MH, Polat A y Selimoglu MA (2005). "Protective effect of low dose of melatonin against cholestatic oxidative stress after common bile duct ligation in rats". *World J Gastroenterol.* **11**: 1951-1956.
- Esterbauer H y Cheeseman KH (1990). "Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-Hydroxynonenal". *Methods in Enzymology.* **186**: 407-421.
- Esterbauer H, Schaur RJ y Zollner H (1991). "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes". *Free Radic Biol Med.* **11**: 81-128.
- Estrela JM, Saez GT, Such L y Viña J (1983). "The effect of cysteine and N-acetyl cysteine on rat liver glutathione (GSH)". *Biochem Pharmacol.* **32**: 3483-3485.
- Fahn S y Cohen G (1992). "The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it". *Ann Neurol.* **32**: 804-812.
- Falany CN, Johnson MR, Barnes S y Diasio RB (1994). "Glycine and taurine conjugation of bile acids by a single enzyme. Molecular cloning and expression of human liver bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase". *J Biol Chem.* **269**: 19375-19379.
- Farr SB, D'Ari R y Touati D (1986). "Oxygen-dependent mutagenesis in Escherichia coli lacking superoxide dismutase". *Proc Natl Acad Sci U S A.* **83**: 8268-8272.
- Faubion WA, Guicciardi ME, Miyoshi H, Bronk SF, Roberts PJ, Svingen PA, Kaufmann SH y Gores GJ (1999). "Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas". *J Clin Invest.* **103**: 137-145.
- Feig DI, Reid TM y Loeb LA (1994). "Reactive oxygen species in tumorigenesis". *Cancer Res.* **54**: 1890s-1894s.
- Fenton HJH (1894). "Oxidation of tartaric acid in the presence of iron". *J Chem Soc Trans.* **65**: 899.
- Ferreira M, Coxito PM, Sardao VA, Palmeira CM y Oliveira PJ (2005). "Bile acids are toxic for isolated cardiac mitochondria: a possible cause for hepatic-derived cardiomyopathies?" *Cardiovasc Toxicol.* **5**: 63-73.

- Fischer S, Beuers U, Spengler U, Zwiebel FM y Koebe HG (1996). "Hepatic levels of bile acids in end-stage chronic cholestatic liver disease". *Clin Chim Acta*. **251**: 173-186.
- Fiske VM y Huppert LC (1968). "Melatonin action on pineal varies with photoperiod". *Science*. **162**: 279.
- Forcada F, Abecia JA, Casao A, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T y Palacin I (2007). "Effects of ageing and exogenous melatonin on pituitary responsiveness to GnRH in ewes during anestrus and the reproductive season". *Theriogenology*. **67**: 855-862.
- Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P y Ames BN (1990). "Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine". *Proc Natl Acad Sci U S A*. **87**: 4533-4537.
- Freeman BA y Crapo JD (1982). "Biology of disease: free radicals and tissue injury". *Lab Invest*. **47**: 412-426.
- Frei B (1994). "Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action". *Am J Med*. **97**: 5S-13S.
- Fridovich I (1974). "Superoxide dismutases". *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. **41**: 35-97.
- Fridovich I (1978). "The biology of oxygen radicals". *Science*. **201**: 875-880.
- Fridovich I y Freeman B (1986). "Antioxidant defenses in the lung". *Annu Rev Physiol*. **48**: 693-702.
- Fridovich I (1997). "Superoxide anion radical ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), superoxide dismutases, and related matters". *J Biol Chem*. **272**: 18515-18517.
- Fukuzawa K, Chida H, Tokumura A y Tsukatani H (1981). "Antioxidative effect of alpha-tocopherol incorporation into lecithin liposomes on ascorbic acid- $\text{Fe}^{2+}$ -induced lipid peroxidation". *Arch Biochem Biophys*. **206**: 173-180.
- Galzin AM, Eon MT, Esnaud H, Lee CR, Pevet P y Langer SZ (1988). "Day-night rhythm of 5-methoxytryptamine biosynthesis in the pineal gland of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*)". *J Endocrinol*. **118**: 389-397.
- Galle PR, Theilmann L, Raedsch R, Otto G y Stiehl A (1990). "Ursodeoxycholate reduces hepatotoxicity of bile salts in primary human hepatocytes". *Hepatology*. **12**: 486-491.
- García-Maurino S, González-Haba MG, Calvo JR, Goberna R y Guerrero JM (1998). "Involvement of nuclear binding sites for melatonin in the regulation of IL-2 and IL-6 production by human blood mononuclear cells". *J Neuroimmunol*. **92**: 76-84.
- García-Perganeda A, Guerrero JM, Rafii-El-Idrissi M, Paz Romero M, Pozo D y Calvo JR (1999). "Characterization of membrane melatonin receptor in mouse peritoneal macrophages: inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein". *J Neuroimmunol*. **95**: 85-94.
- García-Ruiz C, Colell A, Morales A, Kaplowitz N y Fernández-Checa JC (1995). "Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor-kappa B: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes". *Mol Pharmacol*. **48**: 825-834.
- García JJ, Reiter RJ, Guerrero JM, Escames G, Yu BP, Oh CS y Muñoz-Hoyos A (1997). "Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation". *FEBS Lett*. **408**: 297-300.
- García JJ, Reiter RJ, Ortiz GG, Oh CS, Tang L, Yu BP y Escames G (1998). "Melatonin enhances tamoxifen's ability to prevent the reduction in microsomal membrane fluidity induced by lipid peroxidation". *J Membr Biol*. **162**: 59-65.
- García JJ, Reiter RJ, Pié J, Ortiz GG, Cabrera J, Sáinz RM y Acuña-Castroviejo D (1999). "Role of pinoline and melatonin in stabilizing hepatic microsomal membranes against oxidative stress". *J Bioenerg Biomembr*. **31**: 609-616.
- Garzetti GG, Tranquilli AL, Cugini AM, Mazzanti L, Cester N y Romanini C (1993). "Altered lipid composition, increased lipid peroxidation, and altered fluidity of the membrane as evidence of platelet damage in preeclampsia". *Obstet Gynecol*. **81**: 337-340.

- Genova ML, Pich MM, Bernacchia A, Bianchi C, Biondi A, Bovina C, Falasca AI, Formiggini G, Castelli GP y Lenaz G (2004). "The mitochondrial production of reactive oxygen species in relation to aging and pathology". *Ann N Y Acad Sci.* **1011**: 86-100.
- Gerster H (1999). "High-dose vitamin C: a risk for persons with high iron stores?" *Int J Vitam Nutr Res.* **69**: 67-82.
- Ghosh MK, Mukhopadhyay M y Chatterjee IB (1997). "NADPH-initiated cytochrome P450-dependent free iron-independent microsomal lipid peroxidation: specific prevention by ascorbic acid". *Mol Cell Biochem.* **166**: 35-44.
- Giguere V, Tini M, Flock G, Ong E, Evans RM y Otulakowski G (1994). "Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors". *Genes Dev.* **8**: 538-553.
- Gilad E, Cuzzocrea S, Zingarelli B, Salzman AL y Szabo C (1997). "Melatonin is a scavenger of peroxynitrite". *Life Sciences.* **60**: PL169-PL174.
- Gilad E, Wong HR, Zingarelli B, Virag L, O'Connor M, Salzman AL y Szabo C (1998). "Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NFkappaB activation". *FASEB J.* **12**: 685-693.
- Giulivi C y Davies KJ (1990). "A novel antioxidant role for hemoglobin. The comproportionation of ferrylhemoglobin with oxyhemoglobin". *J Biol Chem.* **265**: 19453-19460.
- Giusti P, Gusella M, Lipartiti M, Milani D, Zhu W, Vicini S y Manev H (1995). "Melatonin protects primary cultures of cerebellar granule neurons from kainate but not from N-methyl-D-aspartate excitotoxicity". *Exp Neurol.* **131**: 39-46.
- Glinghammar B, Inoue H y Rafter JJ (2002). "Deoxycholic acid causes DNA damage in colonic cells with subsequent induction of caspases, COX-2 promoter activity and the transcription factors NF-kB and AP-1". *Carcinogenesis.* **23**: 839-845.
- Goeptar AR, Scheerens H y Vermeulen NP (1995). "Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450". *Crit Rev Toxicol.* **25**: 25-65.
- González-Correa JA, De La Cruz JP, Martín-Aurioles E, López-Egea MA, Ortiz P y Sánchez de la Cuesta F (1997). "Effects of S-adenosyl-L-methionine on hepatic and renal oxidative stress in an experimental model of acute biliary obstruction in rats". *Hepatology.* **26**: 121-127.
- González-Haba MG, García-Maurino S, Calvo JR, Goberna R y Guerrero JM (1995). "High-affinity binding of melatonin by human circulating T lymphocytes (CD4+)" *FASEB J.* **9**: 1331-1335.
- Gores GJ, Miyoshi H, Botla R, Aguilar HI y Bronk SF (1998). "Induction of the mitochondrial permeability transition as a mechanism of liver injury during cholestasis: a potential role for mitochondrial proteases". *Biochim Biophys Acta.* **1366**: 167-175.
- Grace MS, Cahill GM y Besharse JC (1991). "Melatonin deacetylation: retinal vertebrate class distribution and *Xenopus laevis* tissue distribution". *Brain Res.* **559**: 56-63.
- Graf D, Kurz AK, Reinehr R, Fischer R, Kircheis G y Haussinger D (2002). "Prevention of bile acid-induced apoptosis by betaine in rat liver". *Hepatology.* **36**: 829-839.
- Granger DN, Rutili G y McCord JM (1981). "Superoxide radicals in feline intestinal ischemia". *Gastroenterology.* **81**: 22-29.
- Granger DN y Kubes P (1996). "Nitric oxide as antiinflammatory agent". *Methods Enzymol.* **269**: 434-442.
- Greenwald RA y Moy WW (1980). "Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid". *Arthritis Rheum.* **23**: 455-463.
- Greim H, Czygan P, Schaffner F y Popper H (1973). "Determination of bile acids in needle biopsies of human liver". *Biochem Med.* **8**: 280-286.
- Grisham MB, Jourdain D y Wink DA (1999). "Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation". *Am J Physiol.* **276**: G315-G321.



- Grootveld M, Claxson AW, Furst A y Blake DR (1991). "Application of a novel 1:1 gold(I)-chromophoric thiolate complex as a spectrophotometric probe for the thiol-exchange reactions of anti-arthritis gold drugs in biological fluids". *Agents Actions Suppl.* **32**: 77-81.
- Gryglewski RJ, Palmer RM y Moncada S (1986). "Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor". *Nature*. **320**: 454-456.
- Guajardo MH, Terrasa AM y Catalá A (2006). "Lipid-protein modifications during ascorbate-Fe<sup>2+</sup> peroxidation of photoreceptor membranes: protective effect of melatonin". *J Pineal Res.* **41**: 201-210.
- Guerrero JM y Reiter RJ (2002). "Melatonin-immune system relationships". *Curr Top Med Chem.* **2**: 167-179.
- Gumprich E, Devereaux MW, Dahl RH y Sokol RJ (2000). "Glutathione status of isolated rat hepatocytes affects bile acid-induced cellular necrosis but not apoptosis". *Toxicol Appl Pharmacol.* **164**: 102-111.
- Gumprich E, Dahl R, Devereaux MW y Sokol RJ (2004). "Beta-carotene prevents bile acid-induced cytotoxicity in the rat hepatocyte: Evidence for an antioxidant and anti-apoptotic role of beta-carotene in vitro". *Pediatr Res.* **55**: 814-821.
- Gumprich E, Dahl R, Devereaux MW y Sokol RJ (2005). "Licorice compounds glycyrrhizin and 18beta-glycyrrhetic acid are potent modulators of bile acid-induced cytotoxicity in rat hepatocytes". *J Biol Chem.* **280**: 10556-10563.
- Gutteridge JM (1995). "Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage". *Clin Chem.* **41**: 1819-1828.
- Guyton KZ y Kensler TW (1993). "Oxidative mechanisms in carcinogenesis". *Br Med Bull.* **49**: 523-544.
- Haber F y Weiss J (1934). "The catalytic compensation of hydrogen peroxide by iron salts". *Proc R Soc London.* **147**: 332-351.
- Halliwell B y Gutteridge JM (1986). "Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts". *Arch Biochem Biophys.* **246**: 501-514.
- Halliwell B y Grootveld M (1987). "The measurement of free radical reactions in humans. Some thoughts for future experimentation". *FEBS Lett.* **213**: 9-14.
- Halliwell B y Gutteridge JM (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, Reino Unido, Clarendon Press.
- Halliwell B (1990). "How to characterize a biological antioxidant". *Free Radical Research Communications.* **9**: 1-32.
- Halliwell B y Gutteridge JM (1990). "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview". *Methods Enzymol.* **186**: 1-85.
- Halliwell B (1991). "Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease". *Am J Med.* **91**: 14S-22S.
- Halliwell B y Aruoma OI (1991). "DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems". *FEBS Lett.* **281**: 9-19.
- Halliwell B (1993). "The chemistry of free radicals". *Toxicol Ind Health.* **9**: 1-21.
- Halliwell B (1994). "Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?" *Lancet.* **344**: 721-724.
- Halliwell B, Aeschbach R, Loliger J y Aruoma OI (1995). "The characterization of antioxidants". *Food Chem Toxicol.* **33**: 601-617.
- Halliwell B y Gutteridge JM (1999). *Free radicals in biology and medicine*. 3<sup>rd</sup> Ed. New York, Oxford University Press.
- Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B y Tan DX (1993). "The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances". *Neurosci Biobehav Rev.* **17**: 347-357.

- Hardeland R, Balzer I, Poeggeler B, Fuhrberg B, Uria H, Behrmann G, Wolf R, Meyer TJ y Reiter RJ (1995). "On the primary functions of melatonin in evolution: mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation, and scavenging of free radicals". *J Pineal Res.* **18**: 104-111.
- Hardeland R, Coto-Montes A y Poeggeler B (2003). "Circadian rhythms, oxidative stress, and antioxidative defense mechanisms". *Chronobiol Int.* **20**: 921-962.
- Hardeland R (2005). "Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance". *Endocrine.* **27**: 119-130.
- Hardeland R y Pandi-Perumal SR (2005). "Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug". *Nutr Metab (Lond).* **2**: 22.
- Hardeland R y Poeggeler B (2007). "Actions of Melatonin, Its Structural and Functional Analogs in the Central Nervous System and the Significance of Metabolism ". *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* **7**: 289-303.
- Hardeland R (2008). "Melatonin, hormone of darkness and more - occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites". *Cell Mol Life Sci.*
- Harman D (1972). "The biologic clock: the mitochondria?" *J Am Geriatr Soc.* **20**: 145-147.
- Headlam HA y Davies MJ (2003). "Cell-mediated reduction of protein and peptide hydroperoxides to reactive free radicals". *Free Radic Biol Med.* **34**: 44-55.
- Herrero A y Barja G (1997). "Sites and mechanisms responsible for the low rate of free radical production of heart mitochondria in the long-lived pigeon". *Mech Ageing Dev.* **98**: 95-111.
- Heubner O (1898). "Tumor der glandula pinealis". *Detsch Med Wochenschr.* **24**: 214-220.
- Heuman DM, Mills AS, McCall J, Hylemon PB, Pandak WM y Vlahce ZR (1991). "Conjugates of ursodeoxycholate protect against cholestasi and hepatocellular necrosis caused by more hydrophobic bile salt in vivo studies in the rat". *Gastroenterology.* **100** 203-211.
- Heymes C, Vanderheyden M, Bronzwaer JG, Shah AM y Paulus WJ (1999). "Endomyocardial nitric oxide synthase and left ventricular preload reserve in dilated cardiomyopathy". *Circulation.* **99**: 3009-3016.
- Higuchi H, Miyoshi H, Bronk SF, Zhang H, Dean N y Gores GJ (2001). "Bid antisense attenuates bile acid-induced apoptosis and cholestatic liver injury". *J Pharmacol Exp Ther.* **299**: 866-873.
- Hill MJ (1990). "Bile flow and colon cancer". *Mutat Res.* **238**: 313-320.
- Hirata F, Hayaishi O, Tokuyama T y Seno S (1974). "In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin". *J Biol Chem.* **249**: 1311-1313.
- Hirose T, Smith RJ y Jetten AM (1994). "ROR gamma: the third member of ROR/RZR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle". *Biochem Biophys Res Commun.* **205**: 1976-1983.
- Hoffman RA y Reiter RJ (1965). "Pineal Gland: Influence on Gonads of Male Hamsters". *Science.* **148**: 1609-1611.
- Hofmann AF (1994). "Maximal bile acid biosynthesis in humans". *Gastroenterology.* **106**: 273-274.
- Hofmann AF (1999). "The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease". *Arch Intern Med.* **159**: 2647-2658.
- Holaska JM, Black BE, Love DC, Hanover JA, Leszyk J y Paschal BM (2001). "Calreticulin Is a receptor for nuclear export". *J Cell Biol.* **152**: 127-140.
- Hopkins FG y Elliott KAC (1931). "The Relation of Glutathione to Cell Respiration with Special Reference to Hepatic Tissue". *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character (1905-1934).* **109**: 58-88.
- Hori S (1975). "Effects of sulfhydryl agents on the activation of tryptophan-5-monooxygenase from bovine pineal glands". *Biochim Biophys Acta.* **384**: 58-68.
- Hoyal CR, Giron-Calle J y Forman HJ (1998). "The alveolar macrophage as a model of calcium signaling in oxidative stress". *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* **1**: 117-134.

- Huerto-Delgadillo L, Anton-Tay F y Benitez-King G (1994). "Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: role of melatonin as a calmodulin antagonist". *J Pineal Res.* **17**: 55-62.
- Huether G, Poeggeler B, Reimer A y George A (1992). "Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract". *Life Sci.* **51**: 945-953.
- Hunt JV, Simpson JA y Dean RT (1988). "Hydroperoxide-mediated fragmentation of proteins". *Biochem J.* **250**: 87-93.
- Hussain SP, Aguilar F, Amstad P y Cerutti P (1994). "Oxy-radical induced mutagenesis of hotspot codons 248 and 249 of the human p53 gene". *Oncogene.* **9**: 2277-2281.
- Ianas O, Olinescu R y Badescu I (1991). "Melatonin involvement in oxidative processes". *Endocrinologie.* **29**: 147-153.
- Ianas O, Manda D, Campean D, Ionescu M y Soare G (1999). "Effects of melatonin and its relation to the hypothalamic-hypophyseal-gonadal axis". *Adv Exp Med Biol.* **460**: 321-328.
- Iles KE y Forman HJ (2002). "Macrophage signaling and respiratory burst". *Immunol Res.* **26**: 95-105.
- Illnerova H, Vanecek J, Krecek J, Wetterberg L y Saaf J (1979). "Effect of one minute exposure to light at night on rat pineal serotonin N-acetyltransferase and melatonin". *J Neurochem.* **32**: 673-675.
- Imlay JA y Linn S (1988). "DNA damage and oxygen radical toxicity". *Science.* **240**: 1302-1309.
- Itoh MT, Ishizuka B, Kudo Y, Fusama S, Amemiya A y Sumi Y (1997). "Detection of melatonin and serotonin N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase activities in rat ovary". *Mol Cell Endocrinol.* **136**: 7-13.
- Jaiswal M, LaRusso NF, Burgart LJ y Gores GJ (2000). "Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism". *Cancer Res.* **60**: 184-190.
- Jansen PL (2007). "Endogenous bile acids as carcinogens". *J Hepatol.* **47**: 434-435.
- Janssen YM, Van Houten B, Borm PJ y Mossman BT (1993). "Cell and tissue responses to oxidative damage". *Lab Invest.* **69**: 261-274.
- Jaruga P, Zastawny TH, Skokowski J, Dizdaroglu M y Olinski R (1994). "Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer". *FEBS Lett.* **341**: 59-64.
- Javitt NB, Schiff L y Schiff ER (1982). Bile acids and hepatobiliary disease. *Diseases of the liver.* Philadelphia, Lippincott: 119-150.
- Jenkins GJ, Harries K, Doak SH, Wilmes A, Griffiths AP, Baxter JN y Parry JM (2004). "The bile acid deoxycholic acid (DCA) at neutral pH activates NF-kappaB and induces IL-8 expression in oesophageal cells in vitro". *Carcinogenesis.* **25**: 317-323.
- Jenkins GJ, D'Souza FR, Suzen SH, Eltahir ZS, James SA, Parry JM, Griffiths PA y Baxter JN (2007). "Deoxycholic acid at neutral and acid pH, is genotoxic to oesophageal cells through the induction of ROS: The potential role of antioxidants in Barrett's oesophagus". *Carcinogenesis.* **28**: 136-142.
- Jensen PK (1966). "Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles. II. Steroid effects". *Biochim Biophys Acta.* **122**: 167-174.
- Jethmalani SM, Henle KJ, Gazitt Y, Walker PD y Wang SY (1997). "Intracellular distribution of heat-induced stress glycoproteins". *J Cell Biochem.* **66**: 98-111.
- Jin X, von Gall C, Pieschl RL, Gribkoff VK, Stehle JH, Reppert SM y Weaver DR (2003). "Targeted disruption of the mouse Mel(1b) melatonin receptor". *Mol Cell Biol.* **23**: 1054-1060.
- Jobin C y Sartor RB (2000). "The I kappa B/NF-kappa B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection". *Am J Physiol Cell Physiol.* **278**: C451-462.
- Jones BA, Rao YP, Stravitz RT y Gores GJ (1997). "Bile salt-induced apoptosis of hepatocytes involves activation of protein kinase C". *Am J Physiol.* **272**: G1109-1115.

- Kakis G, Phillips MJ y Yousef IM (1980). "The respective roles of membrane cholesterol and of sodium potassium adenosine triphosphatase in the pathogenesis of lithocholate-induced cholestasis". *Lab Invest.* **43**: 73-81.
- Kanner J, German JB y Kinsella JE (1987). "Initiation of lipid peroxidation in biological systems". *Crit Rev Food Sci Nutr.* **25**: 317-364.
- Karbownik M, Reiter RJ, García JJ, Tan DX, Qi W y Manchester LC (2000). "Melatonin reduces rat hepatic macromolecular damage due to oxidative stress caused by delta-aminolevulinic acid". *Biochim Biophys Acta.* **1523**: 140-146.
- Kari I (1981). "6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline in pineal gland of chicken and cock". *FEBS Lett.* **127**: 277-280.
- Kasai H y Nishimura S (1984). "Hydroxylation of deoxy guanosine at the C-8 position by polyphenols and aminophenols in the presence of hydrogen peroxide and ferric ion". *Gann.* **75**: 565-566.
- Kennaway DJ, Royles P, Webb H y Carbone F (1988). "Effects of protein restriction, melatonin administration, and short daylength on brain benzodiazepine receptors in prepubertal male rats". *J Pineal Res.* **5**: 455-467.
- Kim GW, Copin JC, Kawase M, Chen SF, Sato S, Gobbel GT y Chan PH (2000). "Excitotoxicity is required for induction of oxidative stress and apoptosis in mouse striatum by the mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid". *J Cereb Blood Flow Metab.* **20**: 119-129.
- Kim SH y Lee SM (2008). "Cytoprotective effects of melatonin against necrosis and apoptosis induced by ischemia/reperfusion injury in rat liver". *J Pineal Res.* **44**: 165-171.
- King JE y Schoenfield LJ (1971). "Cholestasis induced by sodium tauroolithocholate in isolated hamster liver". *J Clin Invest.* **50**: 2305-2312.
- Kinnula VL, Crapo JD y Raivio KO (1995). "Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung". *Lab Invest.* **73**: 3-19.
- Koop DR (1992). "Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1". *FASEB J.* **6**: 724-730.
- Kopin IJ, Pare CM, Axelrod J y Weissbach H (1961). "The fate of melatonin in animals". *J Biol Chem.* **236**: 3072-3075.
- Koppiseti S, Jenigiri B, Terron MP, Tengattini S, Tamura H, Flores LJ, Tan DX y Reiter RJ (2008). "Reactive Oxygen Species and the Hypomotility of the Gall Bladder as Targets for the Treatment of Gallstones with Melatonin: A Review". *Dig Dis Sci.*
- Koster-van Hoffen GC, Mirmiran M, Bos NP, Witting W, Delagrange P y Guardiola-Lemaitre B (1993). "Effects of a novel melatonin analog on circadian rhythms of body temperature and activity in young, middle-aged, and old rats". *Neurobiol Aging.* **14**: 565-569.
- Kotler M, Rodríguez C, Sáinz RM, Antolín I y Menéndez-Peláez A (1998). "Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex". *J Pineal Res.* **24**: 83-89.
- Krahenbuhl S, Talos C, Fischer S y Reichen J (1994). "Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria". *Hepatology.* **19**: 471-479.
- Krahenbuhl S, Talos C, Lauterburg BH y Reichen J (1995). "Reduced antioxidative capacity in liver mitochondria from bile duct ligated rats". *Hepatology.* **22**: 607-612.
- Kucuk C, Sozuer E, Ikizceli I, Avsarogullari L, Keceli M, Akgun H y Muhtaroglu S (2003). "Role of oxygen free radical scavengers in acute renal failure complicating obstructive jaundice". *Eur Surg Res.* **35**: 143-147.
- Kullak-Ublick GA, Stieger B y Meier PJ (2004). "Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease". *Gastroenterology.* **126**: 322-342.
- Kurz AK, Block C, Graf D, Dahl SV, Schliess F y Haussinger D (2000). "Phosphoinositide 3-kinase-dependent Ras activation by tauroursodesoxycholate in rat liver". *Biochem J.* **350 Pt 1**: 207-213.

- Kurz AK, Graf D, Schmitt M, Vom Dahl S y Haussinger D (2001). "Tauroursodesoxycholate-induced choleresis involves p38(MAPK) activation and translocation of the bile salt export pump in rats". *Gastroenterology*. **121**: 407-419.
- Kveder S y Mc IW (1961). "The metabolism of melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) and 5-methoxytryptamine". *J Biol Chem*. **236**: 3214-3220.
- Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P y Michel T (1992). "Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform". *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**: 6348-6352.
- Lambeth JD (2002). "Nox/Duox family of nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) oxidases". *Curr Opin Hematol*. **9**: 11-17.
- Lapenna D, Ciofani G, Festi D, Neri M, Pierdomenico SD, Giamberardino MA y Cuccurullo F (2002). "Antioxidant properties of ursodeoxycholic acid". *Biochem Pharmacol*. **64**: 1661-1667.
- LaRue JM, Stratagoules ED y Martínez JD (2000). "Deoxycholic acid-induced apoptosis is switched to necrosis by bcl-2 and calphostin C". *Cancer Lett*. **152**: 107-113.
- Laudet V, Hanni C, Coll J, Catzeflis F y Stehelin D (1992). "Evolution of the nuclear receptor gene superfamily". *EMBO J*. **11**: 1003-1013.
- Laudon M, Nir I y Zisapel N (1988). "Melatonin receptors in discrete brain areas of the male rat. Impact of aging on density and on circadian rhythmicity". *Neuroendocrinology*. **48**: 577-583.
- Lazaridis KN, Gores GJ y Lindor KD (2001). "Ursodeoxycholic acid 'mechanisms of action and clinical use in hepatobiliary disorders'". *J Hepatol*. **35**: 134-146.
- Leino M, Kari I, Airaksinen MM y Gynther J (1983). "6-Methoxy-tetrahydro-beta-carboline in the retinae of rabbits and pigs". *Exp Eye Res*. **36**: 135-138.
- Leino M, Airaksinen MM, Antikainen R, Gynther J, Kari E, Kari I y Peura P (1984). "Distribution of 1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline and 6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline in mice". *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. **54**: 361-371.
- Leino M (1984). "6-Methoxy-tetrahydro-beta-carboline and melatonin in the human retina". *Exp Eye Res*. **38**: 325-330.
- Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA y Herman B (1998). "The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy". *Biochim Biophys Acta*. **1366**: 177-196.
- León J, Acuña-Castroviejo D, Sáinz RM, Mayo JC, Tan DX y Reiter RJ (2004). "Melatonin and mitochondrial function". *Life Sci*. **75**: 765-790.
- Leppa S y Bohmann D (1999). "Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response and apoptosis". *Oncogene*. **18**: 6158-6162.
- Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH y Mori W (1958). "Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes". *J Am Chem Soc*. **80**: 2587-2587.
- Leuschner U, Fischer H, Kurtz W, Guldutuna S, Hubner K, Hellstern A, Gatzert M y Leuschner M (1989). "Ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: results of a controlled double-blind trial". *Gastroenterology*. **97**: 1268-1274.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S y Stadtman ER (1990). "Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins". *Methods Enzymol*. **186**: 464-478.
- Lewy AJ, Wehr TA, Goodwin FK, Newsome DA y Markey SP (1980). "Light suppresses melatonin secretion in humans". *Science*. **210**: 1267-1269.
- Lewy AJ y Newsome DA (1983). "Different types of melatonin circadian secretory rhythms in some blind subjects". *J Clin Endocrinol Metab*. **56**: 1103-1107.



- Lindroos OF, Veilähti J, Leinonen LM y Laakso ML (1993). "Characterization of melatonin binding to the anteroventral and anterodorsal thalamic nuclei of the rat". *Eur J Pharmacol.* **250**: 161-163.
- Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ y Stamler JS (1993). "A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds". *Nature.* **364**: 626-632.
- Ljubuncic P, Fuhrma B, Oiknine J, Aviram M y Bomzon A (1996). "Effect of deoxycholic acid and ursodeoxycholic acid on lipid peroxidation in cultured macrophages". *Gut.* **39** 475-478.
- Ljubuncic P, Tanne Z y Bomzon A (2000). "Evidence of a systemic phenomenon for oxidative stress in cholestatic liver disease". *Gut.* **47**: 710-716.
- López PM, Fiñana IT, De Agueda MC, Sánchez EC, Muñoz MC, Álvarez JP y De La Torre Lozano EJ (2000). "Protective effect of melatonin against oxidative stress induced by ligation of extra-hepatic biliary duct in rats: comparison with the effect of S-adenosyl-L-methionine". *J Pineal Res.* **28**: 143-149.
- Lowenstein CJ y Snyder SH (1992). "Nitric oxide, a novel biologic messenger". *Cell.* **70**: 705-707.
- Lu T, Sathe SS, Swiatkowski SM, Hampole CV y Stark GR (2004). "Secretion of cytokines and growth factors as a general cause of constitutive NFκB activation in cancer". *Oncogene.* **23**: 2138-2145.
- Ma X, Idle JR, Krausz KW y González FJ (2005). "Metabolism of melatonin by human cytochromes p450". *Drug Metab Dispos.* **33**: 489-494.
- Macías M, Rodríguez-Cabezas MN, Reiter RJ, Osuna A y Acuña-Castroviejo D (1999). "Presence and effects of melatonin in Trypanosoma cruzi". *J Pineal Res.* **27**: 86-94.
- Macías M, Escames G, León J, Coto A, Sbihi Y, Osuna A y Acuña-Castroviejo D (2003). "Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship". *Eur J Biochem.* **270**: 832-840.
- MacMicking J, Xie QW y Nathan C (1997). "Nitric oxide and macrophage function". *Annu Rev Immunol.* **15**: 323-350.
- Maestroni GJ, Covacci V y Conti A (1994a). "Hematopoietic rescue via T-cell-dependent, endogenous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induced by the pineal neurohormone melatonin in tumor-bearing mice". *Cancer Res.* **54**: 2429-2432.
- Maestroni GJ, Conti A y Lissoni P (1994b). "Colony-stimulating activity and hematopoietic rescue from cancer chemotherapy compounds are induced by melatonin via endogenous interleukin 4". *Cancer Res.* **54**: 4740-4743.
- Maestroni GJ y Conti A (1996). "Melatonin and the immune-hematopoietic system therapeutic and adverse pharmacological correlates". *Neuroimmunomodulation.* **3**: 325-332.
- Maharaj DS, Walker RB, Glass BD y Daya S (2003a). "6-Hydroxymelatonin protects against cyanide induced oxidative stress in rat brain homogenates". *J Chem Neuroanat.* **26**: 103-107.
- Maharaj DS, Limson JL y Daya S (2003b). "6-Hydroxymelatonin converts Fe (III) to Fe (II) and reduces iron-induced lipid peroxidation". *Life Sci.* **72**: 1367-1375.
- Malpoux B, Viguie C, Skinner DC, Thierry JC y Chemineau P (1997). "Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe". *Brain Res Bull.* **44**: 431-438.
- Manalan AS y Klee CB (1984). "Calmodulin". *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* **18**: 227-278.
- Manchester LC, Poeggeler B, Alvares FL, Ogden GB y Reiter RJ (1995). "Melatonin immunoreactivity in the photosynthetic prokaryote Rhodospirillum rubrum: implications for an ancient antioxidant system". *Cell Mol Biol Res.* **41**: 391-395.
- Marshall KA, Reiter RJ, Poeggeler B, Aruoma OI y Halliwell B (1996). "Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro". *Free Radic Biol Med.* **21**: 307-315.

- Marteau P, Chazouilleres O, Myara A, Jian R, Rambaud JC y Poupon R (1990). "Effect of chronic administration of ursodeoxycholic acid on the ileal absorption of endogenous bile acids in man". *Hepatology*. **12**: 1206-1208.
- Martensson J y Meister A (1991). "Glutathione deficiency decreases tissue ascorbate levels in newborn rats: ascorbate spares glutathione and protects". *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**: 4656-4660.
- Martín JE, McKeel DW, Jr. y Sattler C (1982). "Melatonin directly inhibits rat gonadotroph cells". *Endocrinology*. **110**: 1079-1084.
- Martín M, Macías M, Escames G, León J y Acuña-Castroviejo D (2000a). "Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress". *FASEB J*. **14**: 1677-1679.
- Martín M, Macías M, Escames G, Reiter RJ, Agapito MT, Ortiz GG y Acuña-Castroviejo D (2000b). "Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo". *J Pineal Res*. **28**: 242-248.
- Martín M, Macías M, León J, Escames G, Khaldy H y Acuña-Castroviejo D (2002). "Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria". *Int J Biochem Cell Biol*. **34**: 348-357.
- Mattson MP (2005). "NF-kappaB in the survival and plasticity of neurons". *Neurochem Res*. **30**: 883-893.
- May JM, Qu ZC y Mendiratta S (1998). "Protection and recycling of alpha-tocopherol in human erythrocytes by intracellular ascorbic acid". *Arch Biochem Biophys*. **349**: 281-289.
- Mayo JC, Sáinz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V y Rodríguez C (2002). "Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression". *Cell Mol Life Sci*. **59**: 1706-1713.
- Mayo JC, Tan DX, Sáinz RM, Natarajan M, López-Burillo S y Reiter RJ (2003). "Protection against oxidative protein damage induced by metal-catalyzed reaction or alkylperoxyl radicals: comparative effects of melatonin and other antioxidants". *Biochim Biophys Acta*. **1620**: 139-150.
- Mayo JC, Sáinz RM, Tan DX, Hardeland R, León J, Rodríguez C y Reiter RJ (2005). "Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages". *J Neuroimmunol*. **165**: 139-149.
- McCord JM y Fridovich I (1969). "The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen". *J Biol Chem*. **244**: 6056-6063.
- McCord JM (1989). "Free radicals and heart disease". *Bibl Nutr Dieta*: 327-337.
- McIsaac WM, Taylor D, Walker KE y Ho BT (1972). "6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydro- -carboline--a serotonin elevator". *J Neurochem*. **19**: 1203-1206.
- Meier PJ y Stieger B (2002). "Bile salt transporters". *Annu Rev Physiol*. **64**: 635-661.
- Meister A (1992). "On the antioxidant effects of ascorbic acid and glutathione". *Biochem Pharmacol*. **44**: 1905-1915.
- Meister A (1994). "Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals". *J Biol Chem*. **269**: 9397-9400.
- Melchiorri D, Reiter RJ, Attia AM, Hara M, Burgos A y Nistico G (1995). "Potent protective effect of melatonin on in vivo paraquat-induced oxidative damage in rats". *Life Sci*. **56**: 83-89.
- Mendiratta S, Qu Z y May JM (1998). "Erythrocyte defenses against hydrogen peroxide: the role of ascorbic acid". *Biochim Biophys Acta*. **1380**: 389-395.

- Menéndez-Peláez A, Howes KA, González-Brito A y Reiter RJ (1987). "N-acetyltransferase activity, hydroxyindole-O-methyltransferase activity, and melatonin levels in the Harderian glands of the female Syrian hamster: changes during the light:dark cycle and the effect of 6-parachlorophenylalanine administration". *Biochem Biophys Res Commun.* **145**: 1231-1238.
- Menéndez-Peláez A, Rodríguez C y Domínguez P (1991). "5-aminolevulinate synthase mRNA levels in the Harderian gland of Syrian hamsters: correlation with porphyrin concentrations and regulation by androgens and melatonin". *Mol Cell Endocrinol.* **80**: 177-182.
- Menéndez-Peláez A, Poeggeler B, Reiter RJ, Barlow-Walden L, Pablos MI y Tan DX (1993). "Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence". *J Cell Biochem.* **53**: 373-382.
- Mennenga K, Ueck M y Reiter RJ (1991). "Immunohistological localization of melatonin in the pineal gland and retina of the rat". *J Pineal Res.* **10**: 159-164.
- Messner M, Huether G, Lorf T, Ramadori G y Schworer H (2001). "Presence of melatonin in the human hepatobiliary-gastrointestinal tract". *Life Sci.* **69**: 543-551.
- Mhatre MC, van Jaarsveld AS y Reiter RJ (1988). "Melatonin in the lacrimal gland: first demonstration and experimental manipulation". *Biochem Biophys Res Commun.* **153**: 1186-1192.
- Milczarek R, Klimek J y Zelewski L (2000). "Melatonin inhibits NADPH-dependent lipid peroxidation in human placental mitochondria". *Horm Metab Res.* **32**: 84-85.
- Miles AM, Bohle DS, Glassbrenner PA, Hansert B, Wink DA y Grisham MB (1996). "Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide". *J Biol Chem.* **271**: 40-47.
- Millán-Plano S, García JJ, Martínez-Ballarín E, Reiter RJ, Ortega-Gutiérrez S, Lázaro RM y Escanero JF (2003). "Melatonin and pinoline prevent aluminium-induced lipid peroxidation in rat synaptosomes". *J Trace Elem Med Biol.* **17**: 39-44.
- Mills GC (1957). "Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown". *J Biol Chem.* **229**: 189-197.
- Mills PR, Meier PJ, Smith DJ, Ballatori N, Boyer JL y Gordon ER (1987). "The effect of changes in the fluid state of rat liver plasma membrane on the transport of taurocholate". *Hepatology.* **7**: 61-66.
- Miquel J (1992). "An update on the mitochondrial-DNA mutation hypothesis of cell aging". *Mutat Res.* **275**: 209-216.
- Mistry P, Deacon K, Mistry S, Blank J y Patel R (2004). "NF-kappaB promotes survival during mitotic cell cycle arrest". *J Biol Chem.* **279**: 1482-1490.
- Mitsuyoshi H, Nakashima T, Sumida Y, Yoh T, Nakajima Y, Ishikawa H, Inaba K, Sakamoto Y, Okanou T y Kashima K (1999). "Ursodeoxycholic acid protects hepatocytes against oxidative injury via induction of antioxidants". *Biochem Biophys Res Commun.* **263**: 537-542.
- Miyoshi H, Rust C, Roberts PJ, Burgart LJ y Gores GJ (1999). "Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas". *Gastroenterology.* **117**: 669-677.
- Moldovan L y Moldovan NI (2004). "Oxygen free radicals and redox biology of organelles". *Histochem Cell Biol.* **122**: 395-412.
- Monboisse JC y Borel JP (1992). "Oxidative damage to collagen". *Exs.* **62**: 323-327.
- Moncada S y Higgs EA (1991). "Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance". *Eur J Clin Invest.* **21**: 361-374.
- Moncada S, Palmer RM y Higgs EA (1991). "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology". *Pharmacol Rev.* **43**: 109-142.



- Monks NR, Biswas DK y Pardee AB (2004). "Blocking anti-apoptosis as a strategy for cancer chemotherapy: NF-kappaB as a target". *J Cell Biochem.* **92**: 646-650.
- Montilla P, Cruz A, Padillo FJ, Túnez I, Gascon F, Muñoz MC, Gomez M y Pera C (2001). "Melatonin versus vitamin E as protective treatment against oxidative stress after extra-hepatic bile duct ligation in rats". *J Pineal Res.* **31**: 138-144.
- Montilla PL, Vargas JF, Túnez IF, Muñoz de Agueda MC, Valdelvira ME y Cabrera ES (1998). "Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: protective effects of melatonin". *J Pineal Res.* **25**: 94-100.
- Moore RY (1999). "A clock for the ages". *Science.* **284**: 2102-2103.
- Mor M, Plazzi PV, Spadoni G y Tarzia G (1999). "Melatonin". *Curr Med Chem.* **6**: 501-518.
- Morrey KM, McLachlan JA, Serkin CD y Bakouche O (1994). "Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin". *J Immunol.* **153**: 2671-2680.
- Moslen MT (1994). "Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis". *Adv Exp Med Biol.* **366**: 17-27.
- Muller M y Jansen PL (1997). "Molecular aspects of hepatobiliary transport". *Am J Physiol.* **272**: G1285-1303.
- Murphy GM, Jansen FH y Billing BH (1972). "Unsaturated monohydroxy bile acids in cholestatic liver disease". *Biochem J.* **129**: 491-494.
- Nagengast FM, Grubben MJ y van Munster IP (1995). "Role of bile acids in colorectal carcinogenesis". *Eur J Cancer.* **31A**: 1067-1070.
- Nakamura Y, Gindhart TD, Winterstein D, Tomita I, Seed JL y Colburn NH (1988). "Early superoxide dismutase-sensitive event promotes neoplastic transformation in mouse epidermal JB6 cells". *Carcinogenesis.* **9**: 203-207.
- Nakanishi H, Takeyama Y, Ohyanagi H, Saitoh Y y Takai Y (1990). "Mode of stimulatory action of deoxycholate in signal transduction system of isolated rat pancreatic acini". *Biochem Biophys Res Commun.* **170**: 111-118.
- Natalini B, Sardella R, Camaioni E, Gioiello A y Pellicciari R (2007). "Correlation between CMC and chromatographic index: simple and effective evaluation of the hydrophobic/hydrophilic balance of bile acids". *Anal Bioanal Chem.* **388**: 1681-1688.
- Nathan C (2003). "Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling". *J Clin Invest.* **111**: 769-778.
- Nathanson MH y Boyer JL (1991). "Mechanisms and regulation of bile secretion". *Hepatology.* **14**: 551-566.
- Neuzil J y Stocker R (1993). "Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin". *FEBS Lett.* **331**: 281-284.
- Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR y Grandjean P (1997). "Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors". *Clin Chem.* **43**: 1209-1214.
- Niki E (1991). "Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals". *Am J Clin Nutr.* **54**: 1119S-1124S.
- Nohl H y Hegner D (1978). "Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo?" *Eur J Biochem.* **82**: 563-567.
- Nohl H y Jordan W (1986). "The mitochondrial site of superoxide formation". *Biochem Biophys Res Commun.* **138**: 533-539.
- Norenberg MD, Jayakumar AR y Rama Rao KV (2004). "Oxidative stress in the pathogenesis of hepatic encephalopathy". *Metab Brain Dis.* **19**: 313-329.
- Ogawa A, Murate T, Suzuki M, Nimura Y y Yoshida S (1998). "Lithocholic acid, a putative tumor promoter, inhibits mammalian DNA polymerase beta". *Jpn J Cancer Res.* **89**: 1154-1159.
- Ohki K, Takamura T y Nozawa Y (1984). "Effect of alpha-tocopherol on lipid peroxidation and acyl chain mobility of liver microsomes from vitamin E-difficient rat". *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* **30**: 221-234.

- Ohta Y, Kongo M, Sasaki E, Nishida K y Ishiguro I (1999). "Preventive effect of melatonin on the progression of carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats". *Adv Exp Med Biol.* **467**: 327-332.
- Ohta Y, Kongo M, Sasaki E, Nishida K y Ishiguro I (2000). "Therapeutic effect of melatonin on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats". *J Pineal Res.* **28**: 119-126.
- Ohta Y, Kongo M y Kishikawa T (2001). "Effect of melatonin on changes in hepatic antioxidant enzyme activities in rats treated with alpha-naphthylisothiocyanate". *J Pineal Res.* **31**: 370-377.
- Ohta Y, Kongo M y Kishikawa T (2003). "Melatonin exerts a therapeutic effect on cholestatic liver injury in rats with bile duct ligation". *J Pineal Res.* **34**: 119-126.
- Ohta Y, Imai Y, Matsura T, Yamada K y Tokunaga K (2005). "Successively postadministered melatonin prevents disruption of hepatic antioxidant status in rats with bile duct ligation". *J Pineal Res.* **39**: 367-374.
- Okatani Y, Wakatsuki A y Reiter RJ (2002a). "Melatonin protects hepatic mitochondrial respiratory chain activity in senescence-accelerated mice". *J Pineal Res.* **32**: 143-148.
- Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ y Miyahara Y (2002b). "Hepatic mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice: correction by long-term, orally administered physiological levels of melatonin". *J Pineal Res.* **33**: 127-133.
- Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, Enzan H y Miyahara Y (2003a). "Protective effect of melatonin against mitochondrial injury induced by ischemia and reperfusion of rat liver". *Eur J Pharmacol.* **469**: 145-152.
- Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ y Miyahara Y (2003b). "Acutely administered melatonin restores hepatic mitochondrial physiology in old mice". *Int J Biochem Cell Biol.* **35**: 367-375.
- Olinski R, Zastawny T, Budzbon J, Skokowski J, Zegarski W y Dizdaroglu M (1992). "DNA base modifications in chromatin of human cancerous tissues". *FEBS Lett.* **309**: 193-198.
- Orellana M, Rodrigo R, Thielemann L y Guajardo V (2000). "Bile duct ligation and oxidative stress in the rat: effects in liver and kidney". *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* **126**: 105-111.
- Ortiz de Montellano PR y De Voss JJ (2002). "Oxidizing species in the mechanism of cytochrome P450". *Nat Prod Rep.* **19**: 477-493.
- Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B y Orrenius S (2002). "Cytochrome C release from mitochondria proceeds by a two-step process". *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**: 1259-1263.
- Ouazzani-Chahdi A, Elimadi A, Chabli A, Spenard J, Colin P y Haddad PS (2007). "Combining ursodeoxycholic acid or its NO-releasing derivative NCX-1000 with lipophilic antioxidants better protects mouse hepatocytes against amiodarone toxicity". *Can J Physiol Pharmacol.* **85**: 233-242.
- Ouyang H y Vogel HJ (1998). "Melatonin and serotonin interactions with calmodulin: NMR, spectroscopic and biochemical studies". *Biochim Biophys Acta.* **1383**: 37-47.
- Pablos MI, Chuang J, Reiter RJ, Ortiz GG, Daniels WM, Sewerynek E, Melchiorri D y Poeggeler B (1995). "Time course of the melatonin-induced increase in glutathione peroxidase activity in chick tissues". *Biol Signals.* **4**: 325-330.
- Pablos MI, Reiter RJ, Ortiz GG, Guerrero JM, Agapito MT, Chuang JI y Sewerynek E (1998). "Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light". *Neurochem Int.* **32**: 69-75.
- Padillo FJ, Cruz A, Navarrete C, Bujalance I, Briceno J, Gallardo JI, Marchal T, Caballero R, Túnez I, Muntane J, Montilla P y Pera-Madrado C (2004). "Melatonin prevents oxidative stress and hepatocyte cell death induced by experimental cholestasis". *Free Radic Res.* **38**: 697-704.
- Palmeira CM y Rolo AP (2004). "Mitochondrially-mediated toxicity of bile acids". *Toxicology.* **203**: 1-15.

- Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B y Hardeland R (2006). "Melatonin: Nature's most versatile biological signal?" *FEBS J.* **273**: 2813-2838.
- Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Poeggeler B, Hardeland R y Cardinali DP (2007). "Drug Insight: the use of melatonergic agonists for the treatment of insomnia-focus on ramelteon". *Nat Clin Pract Neurol.* **3**: 221-228.
- Pang CS, Tang PL, Pang SF y Brown GM (1995). "Comparison of the pharmacological characteristics of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in the lung, spleen, brain and kidney of chicken". *Biol Signals.* **4**: 311-324.
- Pang SF, Yu HS, Suen HC y Brown GM (1980). "Melatonin in the retina of rats: a diurnal rhythm". *J Endocrinol.* **87**: 89-93.
- Panozzo MP, Basso D, Balint L, Biasin MR, Bonvicini P, Metus P, Infantolino D y Plebani M (1995). "Altered lipid peroxidation/glutathione ratio in experimental extrahepatic cholestasis". *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **22**: 266-271.
- Park SY, Chang I, Kim JY, Kang SW, Park SH, Singh K y Lee MS (2004). "Resistance of mitochondrial DNA-depleted cells against cell death: role of mitochondrial superoxide dismutase". *J Biol Chem.* **279**: 7512-7520.
- Parola M, Leonarduzzi G, Robino G, Albano E, Poli G y Dianzani MU (1996). "On the role of lipid peroxidation in the pathogenesis of liver damage induced by long-standing cholestasis". *Free Radic Biol Med.* **20**: 351-359.
- Pastor A, Collado PS, Almar M y González-Gallego J (1997). "Antioxidant enzyme status in biliary obstructed rats: effects of N-acetylcysteine". *J Hepatol.* **27**: 363-370.
- Pastorino JG, Snyder JW, Serroni A, Hoek JB y Farber JL (1993). "Cyclosporin and carnitine prevent the anoxic death of cultured hepatocytes by inhibiting the mitochondrial permeability transition". *J Biol Chem.* **268**: 13791-13798.
- Patel T, Bronk SF y Gores GJ (1994). "Increases of intracellular magnesium promote glycodeoxycholate-induced apoptosis in rat hepatocytes". *J Clin Invest.* **94**: 2183-2192.
- Patel T y Gores GJ (1997). "Inhibition of bile-salt-induced hepatocyte apoptosis by the antioxidant lazaroid U83836E". *Toxicol Appl Pharmacol.* **142**: 116-122.
- Paumgartner G y Beuers U (2002). "Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited". *Hepatology.* **36**: 525-531.
- Paumgartner G y Beuers U (2004). "Mechanisms of action and therapeutic efficacy of ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease". *Clin Liver Dis.* **8**: 67-81, vi.
- Payne CM, Crowley C, Washo-Stultz D, Briehl M, Bernstein H, Bernstein C, Beard S, Holubec H y Warneke J (1998). "The stress-response proteins poly(ADP-ribose) polymerase and NF-kappaB protect against bile salt-induced apoptosis". *Cell Death Differ.* **5**: 623-636.
- Payne CM, Weber C, Crowley-Skillicorn C, Dvorak K, Bernstein H, Bernstein C, Holubec H, Dvorakova B y Garewal H (2007). "Deoxycholate induces mitochondrial oxidative stress and activates NF-kappaB through multiple mechanisms in HCT-116 colon epithelial cells". *Carcinogenesis.* **28**: 215-222.
- Pemberton PW, Aboutwerat A, Smith A y Warnes TW (2006). "Ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis improves glutathione status but fails to reduce lipid peroxidation". *Redox Rep.* **11**: 117-123.
- Pérez MJ, Castano B, González-Buitrago JM y Marin JJ (2007). "Multiple protective effects of melatonin against maternal cholestasis-induced oxidative stress and apoptosis in the rat fetal liver-placenta-maternal liver trio". *J Pineal Res.* **43**: 130-139.
- Petrie K, Conaglen JV, Thompson L y Chamberlain K (1989). "Effect of melatonin on jet lag after long haul flights". *BMJ.* **298**: 705-707.
- Philpot RM (1991). "Characterization of cytochrome P450 in extrahepatic tissues". *Methods Enzymol.* **206**: 623-631.
- Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R y Marcheselli F (1994). "Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E". *Life Sci.* **55**: PL271-276.

- Pierrefiche G, Topall G, Courboin G, Henriët I y Laborit H (1993). "Antioxidant activity of melatonin in mice". *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. **80**: 211-223.
- Pierrefiche G y Laborit H (1995). "Oxygen free radicals, melatonin, and aging". *Exp Gerontol*. **30**: 213-227.
- Pietraforte D y Minetti M (1997). "One-electron oxidation pathway of peroxynitrite decomposition in human blood plasma: evidence for the formation of protein tryptophan-centred radicals". *Biochem J*. **321**: 743-750.
- Platet N, Cunat S, Chalbos D, Rochefort H y García M (2000). "Unliganded and liganded estrogen receptors protect against cancer invasion via different mechanisms". *Mol Endocrinol*. **14**: 999-1009.
- Poeggeler B, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD y Manchester LC (1993). "Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis". *J Pineal Res*. **14**: 151-168.
- Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC y Barlow-Walden LR (1994). "Melatonin - a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro". *Ann N Y Acad Sci*. **738**: 419-420.
- Poeggeler B y Hardeland R (1994). "Detection and quantification of melatonin in a dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra*: solutions to the problem of methoxyindole destruction in non-vertebrate material". *J Pineal Res*. **17**: 1-10.
- Polat A y Emre MH (2006). "Effects of melatonin or acetylsalicylic acid on gastric oxidative stress after bile duct ligation in rats". *J Gastroenterol*. **41**: 433-439.
- Portincasa P, Grattagliano I, Testini M, Caruso ML, Wang DQ, Moschetta A, Calamita G, Vacca M, Valentini AM, Renna G, Lissidini G y Palasciano G (2007). "Parallel intestinal and liver injury during early cholestasis in the rat: modulation by bile salts and antioxidants". *Free Radic Biol Med*. **42**: 1381-1391.
- Postlethwait EM, Langford SD, Jacobson LM y Bidani A (1995). "NO<sub>2</sub> reactive absorption substrates in rat pulmonary surface lining fluids". *Free Radic Biol Med*. **19**: 553-563.
- Poupon RE, Balkau B, Eschwege E y Poupon R (1991). "A multicenter, controlled trial of ursodiol for the treatment of primary biliary cirrhosis. UDCA-PBC Study Group". *N Engl J Med*. **324**: 1548-1554.
- Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR y Guerrero JM (1994). "Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum". *Life Sci*. **55**: PL455-460.
- Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR y Guerrero JM (1997). "Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin". *J Cell Biochem*. **65**: 430-442.
- Qi W, Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Siu AW y García JJ (2000). "Increased levels of oxidatively damaged DNA induced by chromium(III) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: protection by melatonin and related molecules". *J Pineal Res*. **29**: 54-61.
- Qiao D, Chen W, Stratagoules ED y Martínez JD (2000). "Bile acid-induced activation of activator protein-1 requires both extracellular signal-regulated kinase and protein kinase C signaling". *J Biol Chem*. **275**: 15090-15098.
- Qiao L, Studer E, Leach K, McKinstry R, Gupta S, Decker R, Kukreja R, Valerie K, Nagarkatti P, El Deiry W, Molkentin J, Schmidt-Ullrich R, Fisher PB, Grant S, Hylemon PB y Dent P (2001). "Deoxycholic acid (DCA) causes ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) and FAS receptor in primary hepatocytes: inhibition of EGFR/mitogen-activated protein kinase-signaling module enhances DCA-induced apoptosis". *Mol Biol Cell*. **12**: 2629-2645.
- Quay W (1980). General biochemistry of the pineal gland of mammals. *The Pineal Gland*. Reiter, RJ, Boca Ratón: CRC Press Inc. **Vol I**.
- Radi R, Beckman JS, Bush KM y Freeman BA (1991). "Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide". *J Biol Chem*. **266**: 4244-4250.

- Radi R, Tan S, Prodanov E, Evans RA y Parks DA (1992). "Inhibition of xanthine oxidase by uric acid and its influence on superoxide radical production". *Biochim Biophys Acta*. **1122**: 178-182.
- Ramón y Cajal S (1904). *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados*. Madrid, Moya, N.
- Redinger RN (2003). "The coming of age of our understanding of the enterohepatic circulation of bile salts". *Am J Surg*. **185**: 168-172.
- Refsgaard HH, Tsai L y Stadtman ER (2000). "Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products". *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**: 611-616.
- Regnault C, Postaire ER, Rousset GJ, Bejot M y Hazebroucq GF (1993). "Influence of beta carotene, vitamin E, and vitamin C on endogenous antioxidant defenses in erythrocytes". *Ann Pharmacother*. **27**: 1349-1350.
- Reichen J y Paumgartner G (1979). "Inhibition of hepatic  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -adenosinetriphosphatase in taurolithocholate-induced cholestasis in the rat". *Experientia*. **35**: 1186-1188.
- Reinehr R, Becker S, Wettstein M y Haussinger D (2004). "Involvement of the Src family kinase yes in bile salt-induced apoptosis". *Gastroenterology*. **127**: 1540-1557.
- Reinehr R, Becker S, Keitel V, Eberle A, Grether-Beck S y Haussinger D (2005). "Bile salt-induced apoptosis involves NADPH oxidase isoform activation". *Gastroenterology*. **129**: 2009-2031.
- Reinheckel T, Nedelev B, Prause J, Augustin W, Schulz HU, Lippert H y Halangk W (1998). "Occurrence of oxidatively modified proteins: an early event in experimental acute pancreatitis". *Free Radic Biol Med*. **24**: 393-400.
- Reiter R, Tang L, García JJ y Muñoz-Hoyos A (1997). "Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology". *Life Sci*. **60**: 2255-2271.
- Reiter RJ y Fraschini F (1969). "Endocrine aspects of the mammalian pineal gland: a review". *Neuroendocrinology*. **5**: 219-255.
- Reiter RJ (1973a). "Comparative physiology: pineal gland". *Annu Rev Physiol*. **35**: 305-328.
- Reiter RJ (1973b). "Pineal control of a seasonal reproductive rhythm in male golden hamsters exposed to natural daylight and temperature". *Endocrinology*. **92**: 423-430.
- Reiter RJ (1981). "The mammalian pineal gland: structure and function". *Am J Anat*. **162**: 287-313.
- Reiter RJ (1991a). "Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions". *Endocr Rev*. **12**: 151-180.
- Reiter RJ (1991b). "Melatonin: That ubiquitously acting pineal hormone". *NIPS*: 223-227.
- Reiter RJ (1991c). "Pineal gland interface between the photoperiodic environment and the endocrine system". *Trends in Endocrinology and Metabolism*. **2**: 13-19.
- Reiter RJ (1993). "The melatonin rhythm: both a clock and a calendar". *Experientia*. **49**: 654-664.
- Reiter RJ, Tan DX, Poeggeler B, Menéndez-Peláez A, Chen LD y Saarela S (1994). "Melatonin as a free radical scavenger: implications for aging and age-related diseases". *Ann N Y Acad Sci*. **719**: 1-12.
- Reiter RJ (1995a). "Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: antioxidant protection and neuroendocrine regulation". *Front Neuroendocrinol*. **16**: 383-415.
- Reiter RJ (1995b). "The role of the neurohormone melatonin as a buffer against macromolecular oxidative damage". *Neurochem Int*. **27**: 453-460.
- Reiter RJ (1997). "Antioxidant actions of melatonin". *Adv Pharmacol*. **38**: 103-117.
- Reiter RJ (1998). "Melatonin and human reproduction". *Ann Med*. **30**: 103-108.
- Reiter RJ, Tan DX, Cabrera J, D'Arpa D, Sáinz RM, Mayo JC y Ramos S (1999). "The oxidant/antioxidant network: role of melatonin". *Biol Signals Recept*. **8**: 56-63.
- Reiter RJ (2000). "Melatonin: Lowering the high price of free radicals". *News Physiol.Sci*. **15**: 246-250.



- Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sáinz RM, León J y Czarnocki Z (2003a). "Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans". *Acta Biochim Pol.* **50**: 1129-1146.
- Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, López-Burillo S, Sáinz RM y Mayo JC (2003b). "Melatonin: detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants". *Adv Exp Med Biol.* **527**: 539-548.
- Reiter RJ y Tan DX (2003). "What constitutes a physiological concentration of melatonin?" *J Pineal Res.* **34**: 79-80.
- Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Pilar Terron M, Flores LJ y Koppisepi S (2007). "Medical implications of melatonin: receptor-mediated and receptor-independent actions". *Adv Med Sci.* **52**: 11-28.
- Reppert SM, Weaver DR, Cassone VM, Godson C y Kolakowski LF, Jr. (1995a). "Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain". *Neuron.* **15**: 1003-1015.
- Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA y Gusella JF (1995b). "Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor". *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**: 8734-8738.
- Reppert SM, Weaver DR y Godson C (1996). "Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes". *Trends Pharmacol Sci.* **17**: 100-102.
- Ressmeyer AR, Mayo JC, Zelosko V, Sáinz RM, Tan DX, Poeggeler B, Antolín I, Zsizsik BK, Reiter RJ y Hardeland R (2003). "Antioxidant properties of the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction". *Redox Rep.* **8**: 205-213.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM y Pridham JB (1995). "The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids". *Free Radic Res.* **22**: 375-383.
- Rice-Evans CA y Miller NJ (1996). "Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food". *Biochem Soc Trans.* **24**: 790-795.
- Richmond A (2002). "Nf-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth". *Nat Rev Immunol.* **2**: 664-674.
- Richter C, Park JW y Ames BN (1988). "Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive". *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85**: 6465-6467.
- Ridlon JM, Kang DJ y Hylemon PB (2006). "Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria". *J Lipid Res.* **47**: 241-259.
- Roberts JE, Hu D-N y Wishart JF (1998). "Pulse radiolysis studies of melatonin and chloromelatonin". *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* **42**: 125-132.
- Roberts LR, Kurosawa H, Bronk SF, Fesmier PJ, Agellon LB, Leung WY, Mao F y Gores GJ (1997). "Cathepsin B contributes to bile salt-induced apoptosis of rat hepatocytes". *Gastroenterology.* **113**: 1714-1726.
- Roderick HL, Campbell AK y Llewellyn DH (1997). "Nuclear localisation of calreticulin in vivo is enhanced by its interaction with glucocorticoid receptors". *FEBS Lett.* **405**: 181-185.
- Rodrigues CM, Fan G, Ma X, Kren BT y Steer CJ (1998a). "A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation". *J Clin Invest.* **101**: 2790-2799.
- Rodrigues CM, Fan G, Wong PY, Kren BT y Steer CJ (1998b). "Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production". *Mol Med.* **4**: 165-178.
- Rodrigues CM, Ma X, Linehan-Stieers C, Fan G, Kren BT y Steer CJ (1999). "Ursodeoxycholic acid prevents cytochrome c release in apoptosis by inhibiting mitochondrial membrane depolarization and channel formation". *Cell Death Differ.* **6**: 842-854.
- Rodrigues CM y Steer CJ (1999). "Bile acids and hepatocyte apoptosis: living/leaving life in the Fas lane". *Gastroenterology.* **117**: 732-736.

- Rodrigues CM y Steer CJ (2000). "Mitochondrial membrane perturbations in cholestasis". *J Hepatol*. **32**: 135-141.
- Rodrigues CM, Sola S, Sharpe JC, Moura JJ y Steer CJ (2003). "Tauroursodeoxycholic acid prevents Bax-induced membrane perturbation and cytochrome C release in isolated mitochondria". *Biochemistry*. **42**: 3070-3080.
- Rolo AP, Oliveira PJ, Moreno AJ y Palmeira CM (2000). "Bile acids affect liver mitochondrial bioenergetics: possible relevance for cholestasis therapy". *Toxicol Sci*. **57**: 177-185.
- Rolo AP, Oliveira PJ, Moreno AJ y Palmeira CM (2001). "Protective effect of carvedilol on chenodeoxycholate induction of the permeability transition pore". *Biochem Pharmacol*. **61**: 1449-1454.
- Rolo AP, Oliveira PJ, Moreno AJ y Palmeira CM (2003). "Chenodeoxycholate induction of mitochondrial permeability transition pore is associated with increased membrane fluidity and cytochrome C release: protective role of carvedilol". *Mitochondrion*. **2**: 305-311.
- Rolo AP, Palmeira CM, Holy JM y Wallace KB (2004). "Role of mitochondrial dysfunction in combined bile acid-induced cytotoxicity: the switch between apoptosis and necrosis". *Toxicol Sci*. **79**: 196-204.
- Romero JA y Axelrod J (1974). "Pineal beta-adrenergic receptor: diurnal variation in sensitivity". *Science*. **184**: 1091-1092.
- Rouault TA y Klausner RD (1996). "The impact of oxidative stress on eukaryotic iron metabolism". *Exs*. **77**: 183-197.
- Rousseau EJ, Davison AJ y Dunn B (1992). "Protection by beta-carotene and related compounds against oxygen-mediated cytotoxicity and genotoxicity: implications for carcinogenesis and anticarcinogenesis". *Free Radic Biol Med*. **13**: 407-433.
- Rowley DA y Halliwell B (1983a). "Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of copper salts: a physiologically significant reaction?" *Arch Biochem Biophys*. **225**: 279-284.
- Rowley DA y Halliwell B (1983b). "Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide and iron salts by superoxide- and ascorbate-dependent mechanisms: relevance to the pathology of rheumatoid disease". *Clin Sci (Lond)*. **64**: 649-653.
- Rubin RA, Kowalski TE, Khandelwal M y Malet PF (1994). "Ursodiol for hepatobiliary disorders". *Ann Intern Med*. **121**: 207-218.
- Russell DW y Setchell KD (1992). "Bile acid biosynthesis". *Biochemistry*. **31**: 4737-4749.
- Rust C, Karnitz LM, Paya CV, Moscat J, Simari RD y Gores GJ (2000). "The bile acid taurochenodeoxycholate activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade". *J Biol Chem*. **275**: 20210-20216.
- Sack RL y Lewy AJ (1997). "Melatonin as a chronobiotic: treatment of circadian desynchrony in night workers and the blind". *J Biol Rhythms*. **12**: 595-603.
- Sahu SC y Washington MC (1991). "Quercetin-induced lipid peroxidation and DNA damage in isolated rat-liver nuclei". *Cancer Lett*. **58**: 75-79.
- Sahu SC y Washington MC (1992). "Effect of ascorbic acid and curcumin on quercetin-induced nuclear DNA damage, lipid peroxidation and protein degradation". *Cancer Lett*. **63**: 237-241.
- Saintigny Y, Dumay A, Lambert S y Lopez BS (2001). "A novel role for the Bcl-2 protein family: specific suppression of the RAD51 recombination pathway". *EMBO J*. **20**: 2596-2607.
- Sáinz RM, Mayo JC, Reiter RJ, Antolín I, Esteban MM y Rodríguez C (1999). "Melatonin regulates glucocorticoid receptor: an answer to its antiapoptotic action in thymus". *FASEB J*. **13**: 1547-1556.
- Salim AS (1993). "The permissive role of oxygen-derived free radicals in the development of colonic cancer in the rat. A new theory for carcinogenesis". *Int J Cancer*. **53**: 1031-1035.

- Salvi A, Carrupt P, Tillement J y Testa B (2001). "Structural damage to proteins caused by free radicals: assessment, protection by antioxidants, and influence of protein binding". *Biochem Pharmacol.* **61**: 1237-1242.
- Samuni A, Aronovitch J, Godinger D, Chevion M y Czapski G (1983). "On the cytotoxicity of vitamin C and metal ions. A site-specific Fenton mechanism". *Eur J Biochem.* **137**: 119-124.
- Sarbu C, Kuhajda K y Kevresan S (2001). "Evaluation of the lipophilicity of bile acids and their derivatives by thin-layer chromatography and principal component analysis". *J Chromatogr A.* **917**: 361-366.
- Sastre J, Pallardó FV, García de la Asunción J y Viña J (2000). "Mitochondria, oxidative stress and aging". *Free Radic Res.* **32**: 189-198.
- Saugstad OD (1990). "Oxygen toxicity in the neonatal period". *Acta Paediatr Scand.* **79**: 881-892.
- Sawyer DT (1988). "The redox thermodynamics for dioxygen species ( $O_2$ ,  $\cdot O_2^-$ ,  $HOO\cdot$ ,  $HOOH$ , and  $HOO^-$ ) and monooxygen species ( $O$ ,  $\cdot O^-$ ,  $\cdot OH$ , and  $\cdot OH^-$ ) in water and aprotic solvents". *Basic Life Sci.* **49**: 11-20.
- Scates DK, Spigelman AD y Venitt S (1994). "Bile acids do not form adducts when incubated with DNA in vitro". *Carcinogenesis.* **15**: 2945-2948.
- Schapira AH y Cooper JM (1992). "Mitochondrial function in neurodegeneration and ageing". *Mutat Res.* **275**: 133-143.
- Schmid RM y Adler G (2000). "NF-kappaB/rel/IkappaB: implications in gastrointestinal diseases". *Gastroenterology.* **118**: 1208-1228.
- Schmidt HH, Pollock JS, Nakane M, Forstermann U y Murad F (1992). " $Ca^{2+}$ /calmodulin-regulated nitric oxide synthases". *Cell Calcium.* **13**: 427-434.
- Schmuckler DL, Ohta M, Kanai S, Sato Y y Kitani K (1990). "Hepatic injury induced by bile salts: correlation between biochemical and morphological events". *Hepatology.* **12**: 1216-1221.
- Schoemaker MH, Conde de la Rosa L, Buist-Homan M, Vrenken TE, Havinga R, Poelstra K, Haisma HJ, Jansen PL y Moshage H (2004). "Tauroursodeoxycholic acid protects rat hepatocytes from bile acid-induced apoptosis via activation of survival pathways". *Hepatology.* **39**: 1563-1573.
- Schottelius AJ y Baldwin AS, Jr. (1999). "A role for transcription factor NF-kappa B in intestinal inflammation". *Int J Colorectal Dis.* **14**: 18-28.
- Schreck R, Albermann K y Baeuerle PA (1992). "Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review)". *Free Radic Res Commun.* **17**: 221-237.
- Schreck R y Baeuerle PA (1994). "Assessing oxygen radicals as mediators in activation of inducible eukaryotic transcription factor NF-kappa B". *Methods Enzymol.* **234**: 151-163.
- Schroeder F (1984). "Role of membrane lipid asymmetry in aging". *Neurobiol Aging.* **5**: 323-333.
- Seegar H, Mueck AO y Lippert TH (1997). "Effect of melatonin and metabolites on copper-mediated oxidation of flow density lipoprotein". *Br J Clin Pharmacol.* **44**: 283-284.
- Seever K y Hardeland R (2008). "Novel pathway for N(1)-acetyl-5-methoxykynuramine: UVB-induced liberation of carbon monoxide from precursor N(1)-acetyl-N(2)-formyl-5-methoxykynuramine". *J Pineal Res.*
- Sellinger M y Boyer JL (1990). "Physiology of bile secretion and cholestasis". *Prog Liver Dis.* **9**: 237-259.
- Sener G, Sehirli AO, Keyer-Uysal M, Arbak S, Ersoy Y y Yegen BC (2002a). "The protective effect of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in the rat". *J Pineal Res.* **32**: 120-126.
- Sener G, Sehirli AO, Altunbas HZ, Ersoy Y, Paskaloglu K, Arbak S y Ayanoglu-Dulger G (2002b). "Melatonin protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats". *J Pineal Res.* **32**: 231-236.
- Sener G, Paskaloglu K, Sehirli AO, Dulger GA y Alican I (2002c). "The effects of melatonin on ischemia-reperfusion induced changes in rat corpus cavernosum". *J Urol.* **167**: 2624-2627.



- Sener G, Sehirli AO, Paskaloglu K, Dulger GA y Alican I (2003a). "Melatonin treatment protects against ischemia/reperfusion-induced functional and biochemical changes in rat urinary bladder". *J Pineal Res.* **34**: 226-230.
- Sener G, Tosun O, Sehirli AO, Kacmaz A, Arbak S, Ersoy Y y Ayanoglu-Dulger G (2003b). "Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion". *Life Sci.* **72**: 2707-2718.
- Sevanian A y Kim E (1985). "Phospholipase A2 dependent release of fatty acids from peroxidized membranes". *J Free Radic Biol Med.* **1**: 263-271.
- Sewerynek E, Melchiorri D, Reiter RJ, Ortiz GG y Lewinski A (1995). "Lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity is inhibited by the antioxidant melatonin". *Eur J Pharmacol.* **293**: 327-334.
- Sewerynek E, Reiter RJ, Melchiorri D, Ortiz GG y Lewinski A (1996). "Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: protection by melatonin". *Hepato-Gastroenterology.* **43**: 898-905.
- Shida CS, Castrucci AM y Lamy-Freund MT (1994). "High melatonin solubility in aqueous medium". *J Pineal Res.* **16**: 198-201.
- Shiesh SC, Chen CY, Lin XZ, Liu ZA y Tsao HC (2000). "Melatonin prevents pigment gallstone formation induced by bile duct ligation in guinea pigs". *Hepatology.* **32**: 455-460.
- Sies H y Mehlhorn R (1986). "Mutagenicity of nitroxide-free radicals". *Arch Biochem Biophys.* **251**: 393-396.
- Sik RH, Paschall CS y Chignell CF (1983). "The phototoxic effect of benoxaprofen and its analogs on human erythrocytes and rat peritoneal mast cells". *Photochem Photobiol.* **38**: 411-415.
- Silverman SJ y Andrews AW (1977). "Bile acids: co-mutagenic activity in the Salmonella-mammalian-microsome mutagenicity test: brief communication". *J Natl Cancer Inst.* **59**: 1557-1559.
- Singh S, Shackleton G, Ah-Sing E, Chakraborty J y Bailey ME (1992). "Antioxidant defenses in the bile duct-ligated rat". *Gastroenterology.* **103**: 1625-1629.
- Sitaram BR y Lees GJ (1978). "Diurnal rhythm and turnover of tryptophan hydroxylase in the pineal gland of the rat". *J Neurochem.* **31**: 1021-1026.
- Siu AW, Reiter RJ y To CH (1998). "The efficacy of vitamin E and melatonin as antioxidants against lipid peroxidation in rat retinal homogenates". *J Pineal Res.* **24**: 239-244.
- Siu AW, Reiter RJ y To CH (1999). "Pineal indoleamines and vitamin E reduce nitric oxide-induced lipid peroxidation in rat retinal homogenates". *J Pineal Res.* **27**: 122-128.
- Smith JA, O'Hara J y Schiff AA (1981). "Altered diurnal serum melatonin rhythm in blind men". *Lancet.* **2**: 933.
- Snyder SH, Axelrod J, Fischer JE y Wurtman RJ (1964). "Neural and Photic Regulation of 5-Hydroxytryptophan Decarboxylase in the Rat Pineal Gland". *Nature.* **203**: 981-982.
- Sodeman T, Bronk SF, Roberts PJ, Miyoshi H y Gores GJ (2000). "Bile salts mediate hepatocyte apoptosis by increasing cell surface trafficking of Fas". *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **278**: G992-999.
- Soden JS, Devereaux MW, Haas JE, Gumprich E, Dahl R, Gralla J, Traber MG y Sokol RJ (2007). "Subcutaneous vitamin E ameliorates liver injury in an in vivo model of steatocholestasis". *Hepatology.* **46**: 485-495.
- Sohal RS y Brunk UT (1992). "Mitochondrial production of pro-oxidants and cellular senescence". *Mutat Res.* **275**: 295-304.
- Sokol RJ, Devereaux M y Khandwala RA (1991). "Effect of dietary lipid and vitamin E on mitochondrial lipid peroxidation and hepatic injury in the bile duct-ligated rat". *J Lipid Res.* **32**: 1349-1357.
- Sokol RJ, Devereaux MW, Khandwala R y O'Brien K (1993). "Evidence for involvement of oxygen free radical in bile acid toxicity to isolated rat hepatocytes". *Hepatology.* **17**: 869-881.

- Sokol RJ, Winkhofer-Roob BM, Devereaux MW y McKim JM, Jr. (1995). "Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids". *Gastroenterology*. **109** 1249-1256.
- Sokol RJ, McKim JM, Jr., Goff MC, Ruyle SZ, Devereaux MW, Han D, Packer L y Everson G (1998a). "Vitamin E reduces oxidant injury to mitochondria and the hepatotoxicity of taurochenodeoxycholic acid in the rat". *Gastroenterology*. **114**: 164-174.
- Sokol RJ, Devereaux M y Khandwala R (1998b). "Effect of oxypurinol, a xantine oxidase inhibitor, on hepatic injury in the bile duct-ligated rat". *Pediatr Res*. **44** 397-401.
- Sokol RJ, Straka MS, Dahl R, Devereaux MW, Yerushalmi B, Gumprecht E, Elkins N y Everson G (2001). "Role of oxidant stress in the permeability transition induced in rat hepatic mitochondria by hydrophobic bile acids". *Pediatr Res*. **49**: 519-531.
- Sokol RJ, Dahl R, Devereaux MW, Yerushalmi B, Kobak GE y Gumprecht E (2005). "Human hepatic mitochondria generate reactive oxygen species and undergo the permeability transition in response to hydrophobic bile acids". *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. **41**: 235-243.
- Sola S, Ma X, Castro RE, Kren BT, Steer CJ y Rodrigues CM (2003). "Ursodeoxycholic acid modulates E2F-1 and p53 expression through a caspase-independent mechanism in transforming growth factor beta1-induced apoptosis of rat hepatocytes". *J Biol Chem*. **278**: 48831-48838.
- Song S, Guha S, Liu K, Buttar N y Bresalier RS (2007). "COX-2 Induction by Unconjugated Bile Acids Involves Reactive Oxygen Species-Mediated Signaling Pathways in Barrett's Oesophagus and Oesophageal Adenocarcinoma". *Gut*.
- Song Y, Chan CW, Brown GM, Pang SF y Silverman M (1997). "Studies of the renal action of melatonin: evidence that the effects are mediated by 37 kDa receptors of the Mel1a subtype localized primarily to the basolateral membrane of the proximal tubule". *FASEB J*. **11**: 93-100.
- Sourdeval M, Lemaire C, Deniaud A, Taysse L, Daulon S, Breton P, Brenner C, Boisvieux-Ulrich E y Marano F (2006). "Inhibition of caspase-dependent mitochondrial permeability transition protects airway epithelial cells against mustard-induced apoptosis". *Apoptosis*. **11**: 1545-1559.
- Sparrow CP y Olszewski J (1993). "Cellular oxidation of low density lipoprotein is caused by thiol production in media containing transition metal ions". *J Lipid Res*. **34**: 1219-1228.
- Sreejayan N y von Ritter C (1998). "Effect of bile acids on lipid peroxidation: the role of iron". *Free Radic Biol Med*. **25**: 50-56.
- Stadtman ER (1992). "Protein oxidation and aging". *Science*. **257**: 1220-1224.
- Stadtman ER (1993). "Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions". *Annual Review of Biochemistry*. **62** 797-821.
- Stadtman ER (2001). "Protein oxidation in aging and age-related diseases". *Ann N Y Acad Sci*. **928** 22-38.
- Stankov B, Cozzi B, Lucini V, Fumagalli P, Scaglione F y Fraschini F (1991). "Characterization and mapping of melatonin receptors in the brain of three mammalian species: rabbit, horse and sheep. A comparative in vitro binding study". *Neuroendocrinology*. **53**: 214-221.
- Starzl TE (1989). "Transplantation". *JAMA*. **261**: 2894-2895.
- Stasica P, Paneth P y Rosiak JM (2000). "Hydroxyl radical reaction with melatonin molecule: a computational study". *J Pineal Res*. **29**: 125-127.
- Stefulj J, Hortner M, Ghosh M, Schauenstein K, Rinner I, Wolfner A, Semmler J y Liebmman PM (2001). "Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat". *J Pineal Res*. **30**: 243-247.
- Stetson MH y Watson-Whitmyre M (1986). "Effects of exogenous and endogenous melatonin on gonadal function in hamsters". *J Neural Transm Suppl*. **21**: 55-80.
- Studnicka F (1905). *Die Parietalorgane*, S.G. Fischer Verlag, Jena.

- Subramaniam R, Roediger F, Jordan B, Mattson MP, Keller JN, Waeg G y Butterfield DA (1997). "The lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-trans-nonenal, alters the conformation of cortical synaptosomal membrane proteins". *J Neurochem.* **69**: 1161-1169.
- Szmuszkowicz J, Anthony W y Heinzelman R (1960). "Notes- Synthesis of N-Acetyl-5-methoxytryptamine". *J. Org. Chem.* **25**: 857-859.
- Tajiri K, Miyakawa H, Marumo F y Sato C (1995). "Increased renal susceptibility to gentamicin in the rat with obstructive jaundice. Role of lipid peroxidation". *Dig Dis Sci.* **40**: 1060-1064.
- Takahashi T, Sasaki M, Itoh H, Yamadera W, Ozone M, Obuchi K, Hayashida K, Matsunaga N y Sano H (2002). "Melatonin alleviates jet lag symptoms caused by an 11-hour eastward flight". *Psychiatry Clin Neurosci.* **56**: 301-302.
- Takikawa Y, Miyoshi H, Rust C, Roberts P, Siegel R, Mandal PK, Millikan RE y Gores GJ (2001). "The bile acid-activated phosphatidylinositol 3-kinase pathway inhibits Fas apoptosis upstream of bid in rodent hepatocytes". *Gastroenterology.* **120**: 1810-1817.
- Tan D, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Hanes MA y Farley NJ (1999a). "High physiological levels of melatonin in the bile of mammals". *Life Sci.* **65**: 2523-2529.
- Tan DX, Poeggeler B, Reiter RJ, Chen LD, Chen S, Manchester LC y Barlow-Walden LR (1993a). "The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo". *Cancer Lett.* **70**: 65-71.
- Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC y Reiter RJ (1993b). "Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger". *Endocrine J.* **1**: 57-60.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Hardies LJ, Weintraub ST, Vijayalaxmi y Shepherd AM (1998). "A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation". *Biochem Biophys Res Commun.* **253**: 614-620.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Zhang M, Weintraub ST, Cabrera J, Sainz RM y Mayo JC (1999b). "Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance". *Biochim Biophys Acta.* **1472**: 206-214.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Karbownik M y Calvo JR (2000a). "Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products". *Biol Signals Recept.* **9**: 137-159.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Limson J, Weintraub ST y Qi W (2000b). "Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation". *Free Radic Biol Med.* **29**: 1177-1185.
- Tan DX, Manchester LC, Burkhardt S, Sáinz RM, Mayo JC, Kohen R, Shohami E, Huo YS, Hardeland R y Reiter RJ (2001). "N<sub>1</sub>-acetyl-N<sub>2</sub>-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant". *FASEB J.* **15**: 2294-2296.
- Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Poeggeler B, López-Burillo S, Mayo JC, Sáinz RM y Reiter RJ (2003). "Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical". *J Pineal Res.* **34**: 249-259.
- Tchou J y Grollman AP (1993). "Repair of DNA containing the oxidatively-damaged base, 8-oxoguanine". *Mutat Res.* **299**: 277-287.
- Telfer A, Dhami S, Bishop SM, Phillips D y Barber J (1994). "beta-Carotene quenches singlet oxygen formed by isolated photosystem II reaction centers". *Biochemistry.* **33**: 14469-14474.
- Teo TS y Wang JH (1973). "Mechanism of activation of a cyclic adenosine 3':5'-monophosphate phosphodiesterase from bovine heart by calcium ions. Identification of the protein activator as a Ca<sup>2+</sup> binding protein". *J Biol Chem.* **248**: 5950-5955.
- Tilden AR, Becker MA, Amma LL, Arciniega J y McGaw AK (1997). "Melatonin production in an aerobic photosynthetic bacterium: an evolutionarily early association with darkness". *J Pineal Res.* **22**: 102-106.

- Tirosch O, Aronis A y Melendez JA (2003). "Mitochondrial state 3 to 4 respiration transition during Fas-mediated apoptosis controls cellular redox balance and rate of cell death". *Biochem Pharmacol*. **66**: 1331-1334.
- Togashi H, Shinzawa H, Wakabayashi H, Nakamura T, Yamada N, Takahashi T y Ishikawa M (1990). "Activities of free oxygen radical scavenger enzymes in human liver". *J Hepatol*. **11**: 200-205.
- Trauner M, Meier PJ y Boyer JL (1998). "Molecular pathogenesis of cholestasis". *N Engl J Med*. **339**: 1217-1227.
- Tresguerres JA, Ariznavarreta C, Granados B, Martin M, Villanua MA, Golombek DA y Cardinali DP (2001). "Circadian urinary 6-sulphatoxymelatonin, cortisol excretion and locomotor activity in airline pilots during transmeridian flights". *J Pineal Res*. **31**: 16-22.
- Tsai LY, Lee KT y Lu FJ (1997). "Biochemical events associated with ligation of the common bile duct in Wistar rats". *J Formos Med Assoc*. **96**: 17-22.
- Tsai LY, Lee KT y Liu TZ (1998). "Evidence for accelerated generation of hydroxyl radicals in experimental obstructive jaundice of rats". *Free Radic Biol Med*. **24**: 732-737.
- Tselepis C, Morris CD, Wakelin D, Hardy R, Perry I, Luong QT, Harper E, Harrison R, Attwood SE y Jankowski JA (2003). "Upregulation of the oncogene c-myc in Barrett's adenocarcinoma: induction of c-myc by acidified bile acid in vitro". *Gut*. **52**: 174-180.
- Turrens JF y Boveris A (1980). "Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria". *Biochem J*. **191**: 421-427.
- Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Iida T, Cho S, Honma K y Kondo T (1999). "Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells". *Free Radic Biol Med*. **27**: 838-847.
- Vaezi MF y Richter JE (2000). "Duodenogastro-oesophageal reflux". *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol*. **14**: 719-729.
- Vakkuri O, Rintamaki H y Leppaluoto J (1985a). "Presence of immunoreactive melatonin in different tissues of the pigeon (*Columba livia*)". *Gen Comp Endocrinol*. **58**: 69-75.
- Vakkuri O, Rintamaki H y Leppaluoto J (1985b). "Plasma and tissue concentrations of melatonin after midnight light exposure and pinealectomy in the pigeon". *J Endocrinol*. **105**: 263-268.
- Valcavi R, Zini M, Maestroni GJ, Conti A y Portioli I (1993). "Melatonin stimulates growth hormone secretion through pathways other than the growth hormone-releasing hormone". *Clin Endocrinol (Oxf)*. **39**: 193-199.
- Valenzuela A (1991). "The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress". *Life Sciences*. **48**: 301-309.
- Valko M, Morris H, Mazur M, Rapta P y Bilton RF (2001). "Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: do the semiquinones of vitamin K play a role in the aetiology of colon cancer?" *Biochim Biophys Acta*. **1527**: 161-166.
- Vanecek J, Pavlik A y Illnerova H (1987). "Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography". *Brain Res*. **435**: 359-362.
- Vanecek J (1988). "Melatonin binding sites". *J Neurochem*. **51**: 1436-1440.
- Vanecek J (1998). "Cellular mechanisms of melatonin action". *Physiol Rev*. **78**: 687-721.
- Vanhoutte PM (1997). "Endothelial dysfunction and atherosclerosis". *Eur Heart J*. **18 Suppl E**: E19-29.
- Venturi M, Hambly RJ, Glinghammar B, Rafter JJ y Rowland IR (1997). "Genotoxic activity in human faecal water and the role of bile acids: a study using the alkaline comet assay". *Carcinogenesis*. **18**: 2353-2359.
- Vergeres G y Waskell L (1995). "Cytochrome b5, its functions, structure and membrane topology". *Biochimie*. **77**: 604-620.
- Vijayalaxmi, Reiter RJ y Meltz ML (1995). "Melatonin protects human blood lymphocytes from radiation-induced chromosome damage". *Mutat Res*. **346**: 23-31.

- Vollrath L (1985). "Mammalian pinealocytes: ultrastructural aspects and innervation". *Ciba Found Symp.* **117**: 9-22.
- Wakatsuki A, Okatani Y, Shinohara K, Ikenoue N y Fukaya T (2001). "Melatonin protects against ischemia/reperfusion-induced oxidative damage to mitochondria in fetal rat brain". *J Pineal Res.* **31**: 167-172.
- Waldhauser F, Ehrhart B y Forster E (1993). "Clinical aspects of the melatonin action: impact of development, aging, and puberty, involvement of melatonin in psychiatric disease and importance of neuroimmunoendocrine interactions". *Experientia.* **49**: 671-681.
- Washo-Stultz D, Hoglen N, Bernstein H, Bernstein C y Payne CM (1999). "Role of nitric oxide and peroxynitrite in bile salt-induced apoptosis: relevance to colon carcinogenesis". *Nutr Cancer.* **35**: 180-188.
- Washo-Stultz D, Crowley-Weber CL, Dvorakova K, Bernstein C, Bernstein H, Kunke K, Waltmire CN, Garewal H y Payne CM (2002). "Role of mitochondrial complexes I and II, reactive oxygen species and arachidonic acid metabolism in deoxycholate-induced apoptosis". *Cancer Lett.* **177**: 129-144.
- Weaver DR, Namboodiri MA y Reppert SM (1988). "Iodinated melatonin mimics melatonin action and reveals discrete binding sites in fetal brain". *FEBS Lett.* **228**: 123-127.
- Weaver DR, Rivkees SA y Reppert SM (1989). "Localization and characterization of melatonin receptors in rodent brain by in vitro autoradiography". *J Neurosci.* **9**: 2581-2590.
- Weaver DR y Reppert SM (1990). "Melatonin receptors are present in the ferret pars tuberalis and pars distalis, but not in brain". *Endocrinology.* **127**: 2607-2609.
- Werck-Reichhart D y Feyereisen R (2000). "Cytochromes P450: a success story". *Genome Biol.* **1**: Reviews3003.
- White KA y Marletta MA (1992). "Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein". *Biochemistry.* **31**: 6627-6631.
- Whittington PF y Balistreri WF (1991). "Liver transplantation in pediatrics: indications, contraindications, and pretransplant management". *J Pediatr.* **118**: 169-177.
- Williams LM y Morgan PJ (1988). "Demonstration of melatonin-binding sites on the pars tuberalis of the rat". *J Endocrinol.* **119**: R1-3.
- Wink DA y Mitchell JB (1998). "Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide". *Free Radic Biol Med.* **25**: 434-456.
- Winterbourn CC y Vissers MC (1983). "Changes in ascorbate levels on stimulation of human neutrophils". *Biochim Biophys Acta.* **763**: 175-179.
- Wiseman H y Halliwell B (1994). "Tamoxifen and related compounds protect against lipid peroxidation in isolated nuclei: relevance to the potential anticarcinogenic benefits of breast cancer prevention and therapy with tamoxifen?" *Free Radic Biol Med.* **17**: 485-488.
- Withyachumnarnkul B, Limpanawattanukul M y Trakulrunsi W (1986). "Retention of radioactive substances in the hypothalamus, anterior pituitary, and reproductive organs of male rats after 3H-melatonin administration". *Life Sci.* **38**: 1757-1765.
- Wurtman RJ, Axelrod J y Chu EW (1963). "Melatonin, a pineal substance: effect on the rat ovary". *Science.* **141**: 277-278.
- Wurtman RJ, Shein HM y Larin F (1971). "Mediation by -adrenergic receptors of effect of norepinephrine on pineal synthesis of ( 14 C)serotonin and ( 14 C)melatonin". *J Neurochem.* **18**: 1683-1687.
- Xu M y Ashraf M (2002). "Melatonin protection against lethal myocyte injury induced by doxorubicin as reflected by effects on mitochondrial membrane potential". *J Mol Cell Cardiol.* **34**: 75-79.
- Yamamoto H y Tang HW (1996). "Antagonistic effect of melatonin against cyanide-induced seizures and acute lethality in mice". *Toxicol Lett.* **87**: 19-24.



- Yamamoto HA y Mohanan PV (2002). "Melatonin attenuates brain mitochondria DNA damage induced by potassium cyanide in vivo and in vitro". *Toxicology*. **179**: 29-36.
- Yamamoto HA y Mohanan PV (2003). "Ganglioside GT1B and melatonin inhibit brain mitochondrial DNA damage and seizures induced by kainic acid in mice". *Brain Res*. **964**: 100-106.
- Yerushalmi B, Dahl R, Devereaux MW, Gumprich E y Sokol RJ (2001). "Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition". *Hepatology*. **33**: 616-626.
- Yi MJ, Park SH, Cho HN, Yong Chung H, Kim JI, Cho CK, Lee SJ y Lee YS (2002). "Heat-shock protein 25 (Hspb1) regulates manganese superoxide dismutase through activation of Nfkb (NF-kappaB)". *Radiat Res*. **158**: 641-649.
- Yoon GS, Lee H, Jung Y, Yu E, Moon HB, Song K y Lee I (2000). "Nuclear matrix of calreticulin in hepatocellular carcinoma". *Cancer Res*. **60**: 1117-1120.
- Yoon IY y Song BG (2002). "Role of morning melatonin administration and attenuation of sunlight exposure in improving adaptation of night-shift workers". *Chronobiol Int*. **19**: 903-913.
- Yu BP, Suescun EA y Yang SY (1992). "Effect of age-related lipid peroxidation on membrane fluidity and phospholipase A2: modulation by dietary restriction". *Mech Ageing Dev*. **65**: 17-33.
- Yu BP (1994). "Cellular defenses against damage from reactive oxygen species". *Physiol Rev*. **74**: 139-162.
- Yu J, Lo JL, Huang L, Zhao A, Metzger E, Adams A, Meinke PT, Wright SD y Cui J (2002). "Lithocholic acid decreases expression of bile salt export pump through farnesoid X receptor antagonist activity". *J Biol Chem*. **277**: 31441-31447.
- Yui Y, Hattori R, Kosuga K, Eizawa H, Hiki K, Ohkawa S, Ohnishi K, Terao S y Kawai C (1991). "Calmodulin-independent nitric oxide synthase from rat polymorphonuclear neutrophils". *J Biol Chem*. **266**: 3369-3371.
- Zalewski B (2004). "Levels of v5 and v6 CD44 splice variants in serum of patients with colorectal cancer are not correlated with pT stage, histopathological grade of malignancy and clinical features". *World J Gastroenterol*. **10**: 583-585.
- Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T, Susin SA, Petit PX, Mignotte B y Kroemer G (1995). "Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death". *J Exp Med*. **182**: 367-377.
- Zarkovic K (2003). "4-hydroxynonenal and neurodegenerative diseases". *Mol Aspects Med*. **24**: 293-303.
- Zeuzem S (2000). "Gut-liver axis". *Int J Colorectal Dis*. **15**: 59-82.
- Zhang H, Squadrito GL y Pryor WA (1998). "The reaction of melatonin with peroxynitrite: formation of melatonin radical cation and absence of stable nitrated products". *Biochem Biophys Res Commun*. **251**: 83-87.
- Zhang H, Squadrito GL, Uppu R y Pryor WA (1999). "Reaction of peroxynitrite with melatonin: A mechanistic study". *Chem Res Toxicol*. **12**: 526-534.
- Zhang P y Omaye ST (2000). "Beta-carotene and protein oxidation: effects of ascorbic acid and alpha-tocopherol". *Toxicology*. **146**: 37-47.
- Zigler JS, Jr. y Goosey JD (1981). "Photosensitized oxidation in the ocular lens: evidence for photosensitizers endogenous to the human lens". *Photochem Photobiol*. **33**: 869-874.
- Zimmer G, Thrigh T, Scheer B, Packer L y Fucks J (1993). Membrane fluidity and vitamin E. *Vitamin E in health and disease*. New York, Marcel Dekker, Inc.: 207-213.
- Zimmerman JJ, Ciesielski W y Lewandoski J (1997). "Neutrophil-mediated phospholipid peroxidation assessed by gas chromatography-mass spectroscopy". *Am J Physiol*. **273**: C653-661.