

Tesis
Doctoral



MELATONINA Y METABOLITOS DERIVADOS DEL TRIPTÓFANO COMO PROTECTORES
DE LA FLUIDEZ DE MEMBRANAS PLASMÁTICAS DE HEPATOCITOS FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO



UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLOGÍA



MELATONINA Y METABOLITOS DERIVADOS DEL TRIPTÓFANO COMO PROTECTORES DE LA FLUIDEZ DE MEMBRANAS PLASMÁTICAS DE HEPATOCITOS FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO

Marcos César Reyes González

2008



Marcos
Reyes
González

2008

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLOGÍA



**MELATONINA Y METABOLITOS DERIVADOS DEL
TRIPTÓFANO COMO PROTECTORES DE LA FLUIDEZ
DE MEMBRANAS PLASMÁTICAS DE HEPATOCITOS
FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR

D. Marcos César Reyes González

PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

Zaragoza, 2008

ENRIQUE MARTÍNEZ BALLARÍN, Profesor Titular del Área de Fisiología
de la Universidad de Zaragoza, y

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

CERTIFICAN:

Que D Marcos César Reyes Gonzáles, 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 y metabolitos derivados del triptófano como protectores de la fluidez de membranas plasmáticas de hepatocitos frente al estrés oxidativo**”. Consideramos que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para su presentación y defensa como Tesis Doctoral.

Zaragoza, 30 de Abril de 2008

José Joaquín García García

Enrique Martínez Ballarín

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



“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 2004 (INF2004-BIO-03) y 2007 (INF2007-BIO-05).



Beca de estancias para realizar estudios de Doctorado dirigida a estudiantes latinoamericanos. Universidad de Zaragoza en colaboración con el Banco Santander Central Hispano – Convocatoria 2003

Proyecto: **“Melatonina y fluidez de membranas plasmáticas de hepatocitos durante el envejecimiento.**



Universidad Nacional Agraria La Molina

Lima – Perú



**COLEGIO
OFICIAL DE
FARMACÉUTICOS DE
ZARAGOZA**

AGRADECIMIENTOS

La culminación de una Tesis Doctoral constituye no sólo el fin de un gran esfuerzo personal, profesional y de equipo; sino más bien, el inicio de una etapa muy importante y de grandes cambios en nuestras vidas; sin embargo, su logro sería difícilmente alcanzable si no se contara con la valiosa colaboración de muchas personas e instituciones. A todas ellas pretendo ahora agradecerles su inmensa contribución:

Al Gobierno de Aragón y al Instituto de Salud Carlos III, por el apoyo económico brindado a los proyectos de investigación que realiza nuestro grupo y del cual forma parte éste trabajo.

A la Universidad de Zaragoza, que en todo este tiempo ha sido mi segundo hogar, al Banco Santander Central Hispano, por su invalorable contribución económica y a la Universidad Nacional Agraria La Molina, por haberme brindado la oportunidad de llegar hasta aquí. Estas instituciones han hecho realidad el sueño que tenemos muchos profesionales peruanos, de consolidar nuestra formación con una capacitación de calidad en países europeos, aunque ello signifique alejarse de todo lo que más queremos. Al Colegio Oficial de Farmacéuticos, por su significativa aportación.

A mis tutores y amigos, profesores Enrique Martínez por todas sus valiosas enseñanzas y Joaquín García quienes sin conocerme personalmente tuvieron la gentileza de admitirme en su grupo de investigación al cual pertenezco y del que me siento gratamente satisfecho. Además por todas las horas que han dedicado para que esta investigación culmine con éxito.

A mis compañeros del área de Fisiología: Lorena y Sergio, con quienes inicié los trabajos de laboratorio y tuvieron la paciencia de enseñarme las técnicas analíticas; Eva, Fernando, Gerard, José Luís, Javier, Carlos, Santiago y Luismi, por su amistad y por todas las horas que hemos compartido juntos; César, Rubén, Miguel, nuevos integrantes del grupo, y a todas las personas del Departamento de Farmacología y Fisiología que de una u otra manera han contribuido para que este trabajo se materialice.

A mi padre, Ángel, aunque ahora ausente, conservo siempre sus enseñanzas como patrón de vida, a mi madre, Evangelina, quien con su dulzura y abnegación supo alentarme aún en la distancia. A Jean, a todos mis hermanos, por su preocupación permanente y por haberme acompañado fraternalmente en todo momento a pesar de la lejanía, y a mis sobrinos por ser uno de mis estímulos para avanzar.

A Carmen, mi mejor amiga y leal compañera, por su apoyo y dedicación permanente, con quien he compartido muchos de los mejores momentos de mi vida. A Maykoll, mi siempre pequeño, a quien le he restado el tiempo que dedique a este trabajo, por su gran amor y paciencia, por ser mi fortaleza y mayor estímulo para lograr grandes éxitos.

Al colectivo de becarios de la UNIZAR-SANTANDER CENTRAL HISPANO, especialmente a los de la convocatoria 2003, con quienes he cultivado una gran amistad. Al Vicerrectorado de Relaciones Internacionales, y a todo su personal quienes con la calidez de su trato me hicieron sentir como en casa. A mis jefes y compañeros de trabajo del Departamento de Química de la UNALM en Lima, por facilitar mi estancia. A mis nuevas amistades en Zaragoza, Pilar, Elena, grupo Lacalle-Oreja y a todos aquellos colegas y amigos que aunque no he mencionado expresamente, me han brindado permanentemente su aliento para que ésta investigación culmine con éxito.

Una vez más, a todos, mi eterna gratitud.

A Dios, esencia divina,

Mi familia,

Mi hogar.

No vayas por donde el camino
te lleve. Ve en cambio por donde no
hay camino y deja rastro.

Ralph Waldo Emerson

ABREVIATURAS UTILIZADAS

- ABTS: 2,2'-azino-bis(ácido-3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfónico)
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ADP: adenosin difosfato
- AFMK: N¹-acetil-N²-formil-5-metoxikinurenamina
- AMK: N¹-acetil-5-metoxikinurenamina
- AMPc: adenosin monofosfato cíclico
- ARN: ácido ribonucleico
- ATP: adenosin trifosfato
- CAT: catalasa
- CO₂: dióxido de carbono
- DNPH: 2,4-Dinitrofenilhidrazina
- e⁻: electrón
- EA: enfermedad de Alzheimer
- EDTA-Na₂: etilendiaminotetraacético disódico
- ELA: esclerosis lateral amiotrófica
- EROS: especies reactivas dependientes del oxígeno
- EP: enfermedad de Parkinson
- Fe: hierro
- Fe (II), Fe²⁺: ión ferroso
- Fe (III), Fe³⁺: ión férrico
- FeCl₃: cloruro férrico
- GPx: glutatión peroxidasa
- HCl: ácido clorhídrico
- HClO: ácido hipocloroso
- 4-HDA: 4-hidroxialquenos
- HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazina-1-etanosulfónico
- HIOMT: hidroxindol-O-metil transferasa
- H₂O₂: peróxido de hidrógeno
- IC₅₀: concentración para inhibir el 50% del efecto
- IDO: 2,3-dioxigenasa
- KCl: cloruro de potasio
- MAO: monoaminooxidasa
- MDA: malonildialdehído
- NADH: nicotin adenin dinucleótido reducido
- NADPH: nicotin adenin dinucleótido fosfato reducido
- NAT: N-acetil-transferasa
- NO: óxido nítrico
- NO[•]: radical óxido nítrico
- O₂: oxígeno molecular
- ¹O₂: oxígeno singlete
- ·O₂⁻: radical anión superóxido
- ·OH: radical hidroxilo
- ONOO⁻: anión peroxinitrito
- P: polarización
- PKC: proteína kinasa C
- R[•]: radical alquilo
- RO[•]: radical alcoxilo
- ROO[•]: radical peroxilo
- SNC: sistema nervioso central
- SOD: superóxido dismutasa
- TBARS: ácido tiobarbitúrico
- TDO: triptófano 2,3-dioxigenasa
- THF: tetrahidrofurano
- TMA-DPH: 1-(4-trimetilamoniofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno-*p*-tolueno-sulfonato
- TRIS: tris[hidrometil]aminometano

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
MEMBRANAS BIOLÓGICAS	3
<i>Estructura.....</i>	<i>3</i>
<i>Composición bioquímica.....</i>	<i>10</i>
Lípidos	11
Proteínas.....	14
Hidratos de carbono	16
<i>Fluidez de membrana y función celular.....</i>	<i>17</i>
<i>Envejecimiento y fluidez de membrana.....</i>	<i>20</i>
<i>Patología y fluidez de membrana.....</i>	<i>21</i>
RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO.....	24
<i>Toxicidad del oxígeno y estrés oxidativo.....</i>	<i>24</i>
<i>Radical libre y especie reactiva dependiente del oxígeno.....</i>	<i>24</i>
<i>Reacciones químicas de los radicales libres.....</i>	<i>27</i>
<i>Fuentes de radicales libres en los seres vivos.....</i>	<i>28</i>
<i>Efecto nocivo de los radicales libres en las membranas biológicas.....</i>	<i>31</i>
Daño oxidativo a los lípidos.....	31
Daño oxidativo a las proteínas	32
Sistema de defensa antioxidante	35
GLÁNDULA PINEAL E INDOLAMINAS	38
<i>Estructura funcional de la glándula pineal.....</i>	<i>38</i>
<i>Síntesis de indolaminas en la glándula pineal.....</i>	<i>40</i>
Vía de los indoles bacterianos.....	41
Vía de las kinureninas	41
Vía de los hidroxindoles	43
Vía de los metoxindoles o de la melatonina.....	44
<i>Regulación de la síntesis de melatonina</i>	<i>46</i>

<i>Actividad biológica de la melatonina</i>	49
<i>Mecanismos de acción de la melatonina</i>	52
Mecanismos mediados por receptor de membrana.....	52
Unión a receptores nucleares.....	54
Interacción con proteínas intracelulares.....	56
Mecanismos antioxidantes de la melatonina.....	57
Reacción con radical hidroxilo.....	58
Reacción con peróxido de hidrógeno.....	58
Reacción con peroxinitrito.....	60
Reacción con ácido hipocloroso.....	60
<i>Actividad antioxidante de otras indolaminas y β-carbolinas</i>	61
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	65
JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO.....	67
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	68
MATERIAL Y MÉTODOS	71
MATERIAL BIOLÓGICO.....	73
REACTIVOS.....	73
MATERIAL DE LABORATORIO.....	75
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	77
MÉTODOS ANALÍTICOS.....	78
<i>Aislamiento de membranas de hepatocitos</i>	78
<i>Cuantificación de proteínas totales</i>	78
<i>Valoración de la concentración de MDA+4-HDA</i>	80
<i>Valoración de la concentración de restos carbonilo</i>	81
<i>Determinación de la fluidez de membrana</i>	82
MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....	84

RESULTADOS	87
ESTUDIOS CINÉTICOS DEL MODELO OXIDATIVO	89
EFFECTO ANTIOXIDANTE DE LAS INDOLAMINAS	92
<i>Triptófano y 5-hidroxitriptófano</i>	92
<i>Triptamina, 5-metoxitriptamina y N-acetilserotonina</i>	96
<i>Melatonina</i>	102
<i>Metoxiindoles de la vía de la monoaminoxidasa</i>	104
<i>β-carbolinas</i>	108
EFFECTOS EN AUSENCIA DE DAÑO OXIDATIVO	113
<i>Triptófano y 5-hidroxitriptófano</i>	113
<i>Triptamina, 5-metoxitriptamina y N-acetilserotonina</i>	115
<i>Melatonina</i>	117
<i>Metoxiindoles de la vía de la monoaminoxidasa</i>	117
<i>β-carbolinas</i>	119
DISCUSIÓN	121
CONCLUSIONES	139
BIBLIOGRAFÍA	143

INTRODUCCIÓN

Membranas Biológicas

Las células, unidades fundamentales de la vida, presentan una característica notable, su diversidad. Sin embargo con independencia de su forma, tamaño o función, son asombrosamente semejantes: todas están rodeadas por una membrana que las separa de su entorno y formadas por las mismas clases de moléculas.

Las membranas biológicas son estructuras laminares, finas, flexibles y relativamente estables que rodean a las células y sus orgánulos. Pueden considerarse como polímeros bidimensionales no covalentes que crean superficies químicas reactivas y que poseen funciones de transporte singulares entre los compartimientos. Son componentes versátiles y dinámicos, integrados de forma compleja en todos los procesos vivos, cuya función básica es actuar de barrera física selectiva impidiendo la salida de moléculas e iones fuera de la célula o de los orgánulos hacia sus alrededores, y permitiendo la entrada oportuna de nutrientes y la eliminación de los productos de desecho. Además las membranas desempeñan un papel clave en el procesamiento de la información y la generación de energía (Mckee y Mckee, 2003).

Estructura

La mayoría de las membranas biológicas poseen la misma estructura básica: una bicapa lipídica formada fundamentalmente por fosfolípidos en la que están insertadas diversas proteínas (Mckee y Mckee, 2003). La membrana plasmática tiene un espesor de unos 5 nm (Alberts y cols., 2006). Los fosfolípidos son los lípidos más abundantes y tienen dos características que los hacen óptimos para su función estructural: un grupo hidrófilo, denominado “grupo de cabeza”, y un grupo hidrófobo, compuesto por dos cadenas de ácido graso, denominadas frecuentemente “colas hidrocarbonadas” (Figura 1) (Alberts y cols., 2006). Las proteínas de la membrana le confieren capacidades funcionales, como son el transporte molecular, la transformación de energía y la

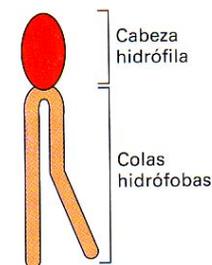


Figura 1. Una molécula de fosfolípido posee una cabeza hidrófila y dos colas hidrófobas.

transducción de señales. La cantidad y la clase de proteínas de una membrana celular específica dependen del ambiente en el que la célula actúe (Mckee y Mckee, 2003).

Las membranas de las células eucariotas son invisibles con el microscopio óptico, por eso su estudio se inició con métodos indirectos. La primera información de su naturaleza química la obtuvo Overton en 1895, quien presumió la existencia de una membrana de naturaleza lipídica en la célula debido a que la superficie celular es fácilmente traspasada por lípidos y muy resistente al paso de la corriente eléctrica. Descubrió una relación básica: cuanto más liposoluble era un compuesto, con más rapidez penetraba al interior de la célula. Poco después, en 1897, Irving Langmuir estudió las propiedades de los lípidos y el comportamiento de los lípidos anfipáticos como los fosfolípidos al extenderlos sobre el agua, y observó que los grupos polares de cada molécula de fosfolípido quedaban en contacto con la superficie acuosa, mientras que los grupos apolares se disponían perpendicularmente a ésta. Otra disposición típica de los fosfolípidos es en bicapa, se localizan enfrentados en dos capas para que los grupos polares y no polares queden en la misma relación respecto al agua. Este modelo se confirmó en 1925, cuando Gorter y Grendel extrajeron los lípidos de la membrana de eritrocitos calculando que, al extenderlos sobre el agua, ocupaban una superficie doble de la que debían ocupar las membranas de los eritrocitos. Concluyeron que la membrana es una capa lipídica bimolecular (Figura 2A) (Paniagua y cols., 2003; Singer, 2004).

En la década de 1920, los fisiólogos celulares obtuvieron evidencias de que las membranas eran mucho más que una simple capa lipídica. Se efectuaron experimentos de microcirugía, en especial los de Robert Chambers, quien picó y cortó la membrana plasmática con un instrumento de metal muy fino. De particular importancia fueron la permeabilidad y la tensión superficial de las membranas naturales que no parecían concordar con las esperadas para una simple frontera lipídica. En 1932, Cole estudió la tensión superficial en membranas de huevos de erizo de mar. El valor encontrado, $0,08 \text{ dinas/cm}^2$, fue inferior a la tensión superficial teórica para una capa de lípidos, $10\text{-}20 \text{ dinas/cm}^2$, por lo que se dedujo que los lípidos deberían ir acompañados de proteínas que disminuyan su tensión superficial. En 1935, James Danielli y Hugh Davson propusieron un modelo de estructura de la membrana plasmática en el que las proteínas se sitúan con los grupos polares, hidrófilos, de la bicapa lipídica (Singer, 2004).

Posteriormente incluyeron en su modelo poros o canales en la membrana para explicar el paso de sustancias (Figura 2B) (Paniagua y cols., 2003).

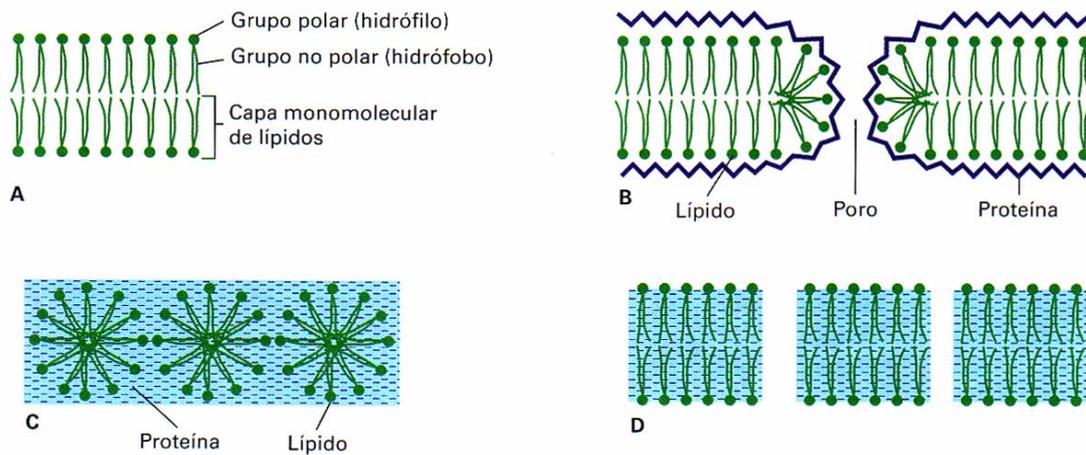


Figura 2. Primeros modelos de membrana plasmática. **A.** Bicapa lipídica, estructura básica de la membrana. **B.** Modelo de membrana plasmática propuesto por Danielli y Davson. Las proteínas rodean los lípidos. **C-D.** Otros modelos de membranas. Las proteínas no rodean los lípidos. Los lípidos se disponen formando esferas (**C**) o bicapas (**D**).

Al utilizar el microscopio electrónico, la membrana plasmática se vió como una línea densa a los electrones y se dedujo que el osmio se fijaba en los grupos hidrófobos de los lípidos. Posteriormente, cuando mejoró el poder de resolución de la microscopía electrónica, Robertson en 1959 observó que la membrana plasmática presentaba una estructura trilaminar, con un espesor de unos 7,5 nm, y dedujo la interpretación contraria, esto es que la fijación del osmio tenía lugar en los grupos polares de los fosfolípidos. No se ponía en duda el modelo de Danielli y Davson, sólo se adaptaron las observaciones a este modelo. Al comprobar la misma imagen trilaminar en las membranas de los orgánulos citoplasmáticos, se denominó a esta estructura unidad de membrana. En 1962, Stoeckenius elaboró una membrana artificial con dos capas de lípidos, la fijó con osmio y la observó con el microscopio electrónico. La imagen resultante era la estructura trilaminar. Al añadir proteínas a los lípidos y volver a observar con el microscopio electrónico, se repetía la imagen anterior pero con las

líneas densas más gruesas. Estos experimentos corroboraron el modelo de Danielli y Davson y la unidad de membrana (Paniagua y cols., 2003).

En la década de 1960, cuando la microscopía electrónica había alcanzado un gran desarrollo, Sjöstrand y Elvin llegaron a la conclusión de que, a diferencia de la membrana plasmática, la estructura de las membranas citoplasmáticas era globular y no trilaminar. Este aspecto era particularmente evidente en las mitocondrias y llevó a la confección de diferentes modelos en los que los lípidos se disponían radialmente formando glóbulos, con los grupos polares hacia el exterior (Figura 2C). Al mismo tiempo Lenard, Singer, Wallach y Zahaler, demostraron que el modelo de Danielli y Davson es imposible porque si la proteína se dispusiera en configuración beta, ocultaría los grupos polares de los lípidos, que no quedarían en contacto con el agua y, además, serían los grupos no polares los que estarían en contacto con el agua. Esto les llevó a pensar que las proteínas debían orientarse de forma diferente, de modo que sus grupos polares estén en contacto con la fase acuosa y los no polares queden en el interior de la membrana con las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos (Figuras 2C y D). En 1966, Benson, fruto de sus estudios en membranas de tilacoides de cloroplastos, propuso un modelo que reúne todas estas características. En éste pretendió explicar la estructura trilaminar de la membrana plasmática y la globular de otras membranas así como el paso de unas a otras, como es el proceso de secreción (Figuras 2C y D) (Paniagua y cols., 2003).

Todos estos modelos fueron desechados al comprobarse que el aspecto trilaminar o globular de la membrana depende en gran parte de la fijación. Con glutaraldehído, las mitocondrias muestran membranas de estructura globular. Con otros fijadores, como una mezcla de glutaraldehído y paraformaldehído, incluso las mitocondrias muestran estructura trilaminar. Sin embargo, estos modelos sirvieron para poner de manifiesto diferencias entre membranas, no sólo porque la membrana plasmática es más gruesa que las de las organelas citoplásmicas, sino porque además, existen variaciones considerables en la composición entre las diversas membranas celulares.

En los años setenta se produjeron grandes avances debido al desarrollo del concepto termodinámico de interacciones hidrófobas e hidrófilas entre moléculas,

enlaces no covalentes como puentes de hidrógeno y fuerzas electrostáticas. Por lo que respecta al avance en las técnicas de microscopía electrónica, la aparición de las dos siguientes tecnologías fue de gran valor:

1. El contraste negativo, que permitió observar protuberancias e irregularidades en la membrana, imposibles de apreciar en los cortes. La interpretación era difícil y tuvo que hacerse con el estudio paralelo de cortes. Con esta técnica, en algunas células se vio que la membrana plasmática está constituida por bloques o unidades poligonales.
2. La criofractura-réplica. Al romperse las membranas por las líneas de mínima resistencia, éstas quedan divididas en dos hemimembranas. La superficie interna de cada capa no es lisa y sobre ella resaltan partículas de 4 a 16 nm sobre un fondo liso. Estas partículas se corresponden con cavidades en el fragmento complementario de membrana y son debidas a proteínas, por lo que son más abundantes en membranas ricas en enzimas. Las dos partes de las bicapas son asimétricas, siendo las partículas más abundantes y mayores las de la hemimembrana interna.

Basándose en los resultados de estos y otros estudios, Singer y Nicolson en 1972 propusieron un modelo, actualmente aceptado, que establece la disposición espacial de los lípidos y las proteínas en las membranas celulares, modelo del *mosaico fluido de membrana* (Figura 3) (Singer y Nicolson, 1972; Paniagua y cols., 2003), en el que las proteínas, lípidos e hidratos de carbono, se sitúan en una configuración relativamente estable de baja energía libre. En éste modelo, la membrana está formada por una doble capa de lípidos, entre los que se intercalan proteínas que atraviesan total o parcialmente la bicapa. Los fosfolípidos se sitúan formando una bicapa con los restos acilo o colas hidrófobas situados en la parte central y las cabezas polares hidrófilas orientadas hacia los medios acuosos extra e intracelulares. Forman la matriz de la membrana. Hay unos cinco millones de moléculas lipídicas por μm^2 de membrana.

Entre los lípidos de las membranas de las células eucariotas destacan los fosfolípidos: fosfatidilcolina, esfingomiélin, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina. También hay una concentración importante de esteroides, principalmente colesterol, que se incrusta paralelo al eje mayor del fosfolípido, con su grupo hidroxilo del carbono 3 orientado hacia las regiones hidrófilas, mientras que la cadena lateral se dispone hacia la región hidrófoba de la bicapa de fosfolípidos. Las proteínas están intercaladas entre

los lípidos a intervalos irregulares y se mantienen gracias a interacciones entre los lípidos y los dominios hidrofóbicos de las proteínas.

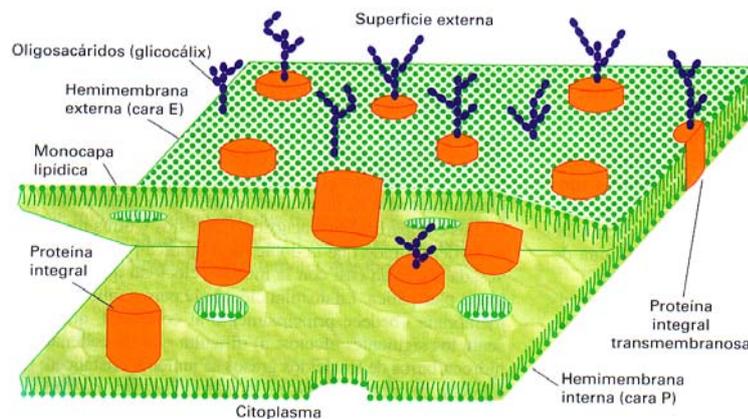


Figura 3. Representación tridimensional del modelo del mosaico fluido de membrana. La figura muestra a la membrana separada parcialmente en dos hemicapas, tal y como queda tras el tratamiento de criofractura-réplica.

Las proteínas adoptan una configuración en la membrana que permite su clasificación en dos tipos (Figura 4) (Singer y Nicolson, 1972):

1. **Integrales o transmembranosas.** Estas proteínas atraviesan por completo la membrana formando hélices α de paso único o múltiple por la membrana. Están unidas firmemente a los lípidos por interacciones hidrofóbicas. Algunas refuerzan la unión por enlaces covalentes con lípidos. Sólo se disocian de los lípidos por tratamientos drásticos como detergentes, agentes que desnaturalizan las proteínas y disolventes orgánicos que destruyen la integridad de las membranas.
2. **Periféricas.** Estas proteínas atraviesan una hemimembrana o parte de ésta. Están asociadas a la membrana únicamente por un enlace covalente con un ácido graso o por interacciones no covalentes, principalmente electrostáticas. Un tratamiento con la adición de un agente quelante, es decir, de tipo suave, basta para disociarlas enteras de la membrana. Se encuentran sobre todo en la hemimembrana interna o protoplásmica y corresponden en su mayoría a enzimas. Las proteínas periféricas de la hemimembrana

externa o ectoplásmica son muy escasas y pueden unirse a un oligosacárido que, a su vez, contacta con los dos ácidos grasos de una molécula de fosfatidilinositol.

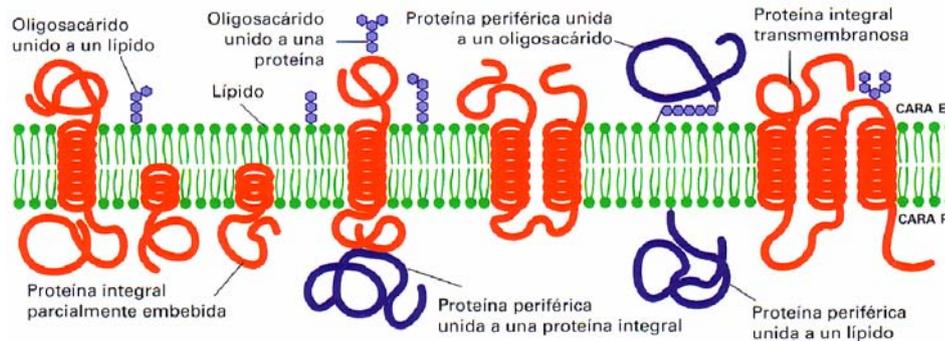


Figura 4. En el modelo de membrana del mosaico fluido, las proteínas integrales están embebidas en la bicapa lipídica formando helices de uno o varios pasos transmembrana. Las proteínas periféricas se unen a una proteína integral, un lípido o un oligosacárido. Los oligosacáridos se sitúan en la hemimembrana externa formando el glicocálix.

Las proteínas tienen una configuración de moléculas globulares parcialmente incluidas y sobresalientes en la membrana. Esto se debe a que al igual que los fosfolípidos son *anfipáticos*, es decir, presentan una distribución asimétrica de los grupos hidrófilos e hidrófobos. La extensión en que una proteína integral está embebida se regula por un equilibrio termodinámico, esto es, está determinada por la secuencia de aminoácidos y la estructura covalente de la molécula, así como por su interacción con las moléculas que la rodean. Los grupos polares de la proteína quedan generalmente en la superficie de la membrana, mientras que los residuos no polares permanecen embebidos entre las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos.

Los hidratos de carbono se distribuyen principalmente en el lado externo de la membrana. Forman el *glicocálix* y están unidos covalentemente a los lípidos, glucolípidos, o a las proteínas, glucoproteínas. Contribuyen eficazmente a la asimetría de la membrana plasmática y parecen intervenir en numerosas actividades reguladoras como el reconocimiento celular. La proporción exacta de todas estas moléculas varía según el tejido y el tipo de membrana celular y guarda una estrecha relación con su función.

Las membranas requieren que la matriz lipídica sea *fluida*, es decir, una membrana solamente es funcional cuando se mantiene por encima del punto de fusión de sus lípidos. La temperatura de fusión se relaciona con la longitud de la cadena hidrocarbonada de los fosfolípidos, el número de dobles enlaces y la concentración de colesterol. Los lípidos pueden hacer desplazamientos de difusión lateral, longitudinal, rotación y flexión con una constante de difusión lateral de 10^{-8} cm²/s. Las proteínas integrales también pueden realizar movimientos de rotación y de traslación con una constante de difusión de aproximadamente 5×10^{-9} cm²/s. Durante estos movimientos las proteínas integrales son capaces de mantener su orientación molecular y su grado de intercalación dentro de la membrana, como resultado de su estructura anfipática. En contraste con los movimientos de difusión lateral, los movimientos de salto (*flip-flop*) son muy lentos, esto es, inversión de la polaridad de las moléculas cruzando la membrana de una hemicapa a la otra.

Se considera que una membrana biológica es un mosaico de microdominios lipídicos, que se encuentran en fase de gel y están enriquecidos en glucolípidos insolubles en detergentes y colesterol, entremezclados con regiones lipídicas en fase fluida y carente de esos glucolípidos. Esos microdominios ocupan ambas capas, sirven para el anclaje de determinadas proteínas de membrana y se unen al citoesqueleto mediante la proteína anexina (Karp, 1987; Paniagua y cols., 2003).

Composición bioquímica

Los lípidos y proteínas de la membrana forman un mosaico fluido, teniendo libertad de movimiento las moléculas para difundir lateralmente en el plano de la membrana, rotar o incluso saltar de una hemicapa a la otra. La composición de la bicapa lipídica y la disposición de sus proteínas son asimétricas. Así, existe una mayor proporción de fosfatidilcolina y esfingomiélinina (fosfolípidos de colina y que poseen ácidos grasos saturados) en la cara exoplasmática, y mayor cantidad de fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina (fosfolípidos con ácidos grasos insaturados) en la cara citoplasmática (Figura 5). Esto significa que en una membrana celular se establecen dominios lipídicos y proteicos diferentes en ambas caras, lo que determina que en una misma membrana coexistan distintos grados de fluidez. La matriz lipídica

citoplasmática es más fluida que la exoplasmática debido a su mayor contenido de ácidos grasos insaturados. Las actividades biológicas específicas de las membranas se modulan por sus propiedades físicas. Su flexibilidad les permite adaptarse a los cambios que acompañan el movimiento, el crecimiento y la división celular (Lehninger y cols., 2001).

Aunque los principales componentes de las membranas biológicas son los lípidos y las proteínas, su relación exacta varía mucho en función del tipo de membrana, así la plasmática del eritrocito de la rata tiene un 60 % en masa de proteínas y un 40 % de lípidos. Esta proporción es similar a la encontrada en las membranas de la mayoría de las estirpes celulares; por ejemplo, la del hepatocito de rata tiene un 58 % de proteínas y un 42 % de lípidos. No obstante, existen membranas que se alejan mucho de esta proporción. Así, las membranas de las células de Schwann tienen un 20 % de proteínas y un 80 % de lípidos (Paniagua y cols., 2003).

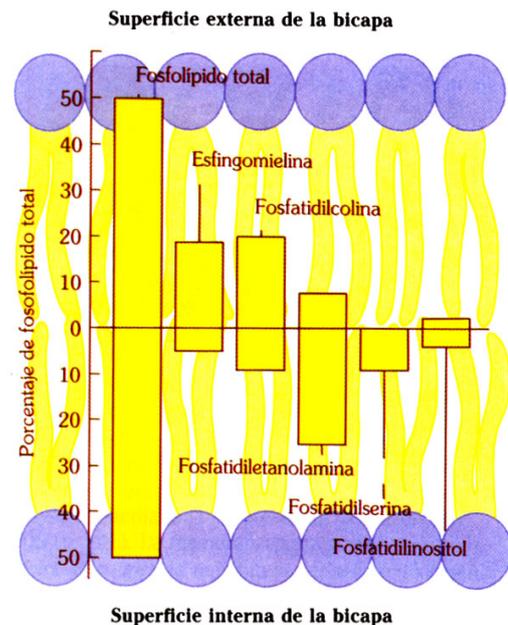


Figura 5. La distribución de lípidos de la membrana del eritrocito es asimétrica entre la cara externa e interna.

Las membranas de las organelas citoplásmicas, además de ser más delgadas que la plasmática, también difieren en la proporción proteínas/lípidos. La diferencia más extrema radica en la membrana mitocondrial interna, que tiene un 80 % de proteínas y un 20 % de lípidos. La tabla I establece una comparación en la composición de diferentes membranas celulares (Paniagua y cols., 2003).

Lípidos

Los principales componentes lipídicos son los fosfolípidos, los lípidos derivados de la esfingosina y el colesterol con sus derivados. Si los lípidos contienen hidratos de

carbono se denominan *glucolípidos*. Las principales características químicas de éstos son (Paniagua y cols., 2003):

❖ **Fosfolípidos:** son fosfoglicéridos, es decir, están formados por una molécula de glicerol esterificado con dos ácidos grasos de 16 a 20 carbonos de longitud; cada uno de ellos se encuentra unido por su extremo carboxilo a un hidroxilo del glicerol. El tercer hidroxilo del glicerol está esterificado con un fosfato. Si este fosfato no se une con ningún otro componente, el fosfolípido se denomina *ácido fosfatídico*. Si el fosfato se asocia a otros radicales, se denomina de acuerdo con el radical (Figura 6).

Tabla I. Porcentajes en masa del contenido en lípidos y proteínas en distintos tipos de membranas en el hígado y eritrocito (er) de rata. MP: membrana plasmática. RER: retículo endoplasmático rugoso. REL: retículo endoplasmático liso. EN: envoltura nuclear. Gol: complejo de golgi. Lis: lisosoma. Mi ex: membrana mitocondrial externa. Mi in: membrana mitocondrial interna.

	MP er	MP hep	RER hep	REL hep	EN hep	Gol hep	Lis hep	Mi ex hep	Mi in hep
PROTEÍNAS	60	58	70	70	70	65	70	60	80
LÍPIDOS TOTALES	40	42	30	30	30	35	30	40	20
<i>Ácido Fosfatídico</i>	-	1	-	-	1	-	-	1	0,5
<i>Fosfatidilcolina</i>	31	24	55	54	55	54	33	47	44
<i>Fosfatidil etanolamina</i>	15	11	16	19	20	15	13	23	24
<i>Fosfatidil serina</i>	7	9	3		3	3,5		2	1
<i>Fosfatidil inositol</i>	2	4	8	7	7	6	7	11	6
<i>Fosfatidil glicerol</i>	-	-	-	-	-	-	-	2	2
<i>Cardiolipina (diglicerol)</i>	-	-	-	-	-	-	5	3	16
<i>Esfingomielina</i>	13	14	3	10	3	10	24	5	2,5
<i>Glucolípidos</i>	3	7	-	-	-	-	-	-	-
<i>Colesterol</i>	24	25	6	9	10	7,5	14	5	3
<i>No detallados</i>	5	5	3	1	1	4	4	1	1

Los fosfolípidos más abundantes son los unidos a colina (*fosfatidilcolina* o *lecitina*), serina (*fosfatidilserina* o *cefalina*), etanolamina (*fosfatidiletanolamina*), inositol (*fosfatidilinositol*) o a otra molécula de glicerol (*fosfatidilglicerol*). También

hay otro fosfolípido formado por la unión de dos ácidos fosfatídicos a una molécula de glicerol (*difosfatidilglicerol* o *cardiolipina*).

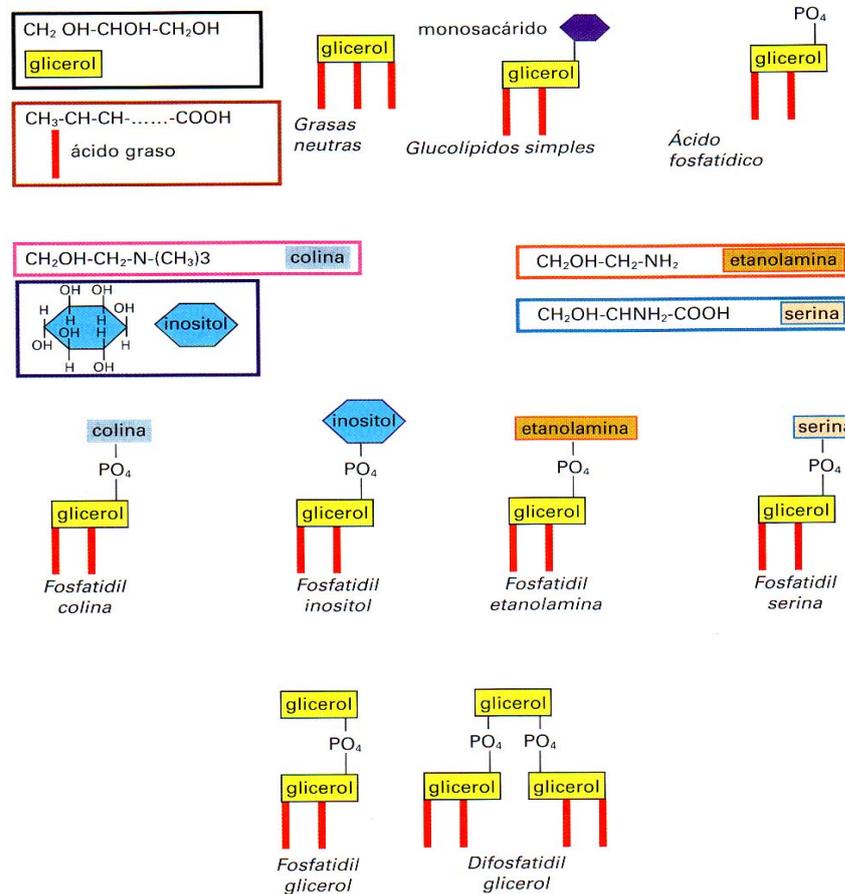


Figura 6. Representación esquemática de los tipos de fosfolípidos presentes en la membrana.

❖ **Esfingolípidos:** son derivados de la esfingosina, un aminodialcohol con un hidrocarburo terminal largo. La esfingosina unida a un ácido graso en su grupo amino forma la *ceramida*. Cuando la ceramida está esterificada con fosfato y colina en el grupo hidroxilo terminal forma la *esfingomielina*. Cuando la ceramida se une a hidratos de carbono (de 1 a 15 azúcares) forma *glucolípidos complejos*, abundantes en las membranas de células animales y si el hidrato de carbono es un monosacárido son *cerebrósidos*. Así en la mielina abunda el *galactocerebrósido*, que sólo tiene galactosa; o pueden ser *gangliósidos* si el hidrato de carbono es un oligosacárido con varios residuos de ácido siálico (N-acetil neuramínico) (Figura 7).

❖ **Esteroles:** son derivados del ciclopentano-perhidro-fenantreno, con un hidroxilo en un extremo y una cadena alifática corta en el otro. El más común es el *colesterol* (Figura 7).

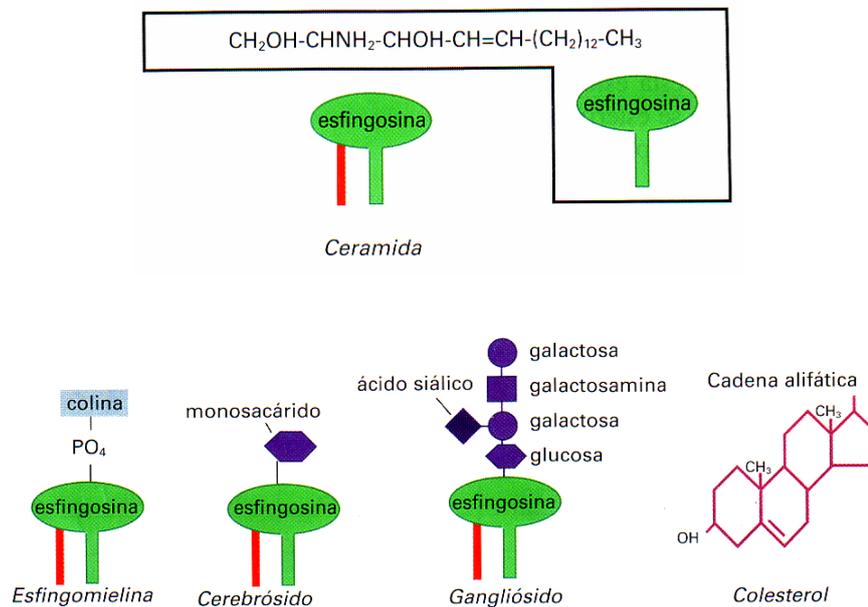


Figura 7. Representación esquemática de la composición de los esfingolípidos y colesterol de la membrana plasmática.

Proteínas

Si bien la bicapa lipídica representa la estructura fundamental de todas las membranas celulares y actúa como una barrera, la mayoría de las funciones de la membrana depende de sus proteínas. En las células animales éstas constituyen alrededor del 50% de la masa total de la membrana, mientras el 50% restante está compuesto por lípidos y una cantidad relativamente pequeña de hidratos de carbono. No obstante, como las moléculas lipídicas son mucho más pequeñas que las proteicas en una membrana típica se observan alrededor de 50 moléculas lipídicas por cada molécula de proteína (Alberts y cols., 2006).

Algunas proteínas de la membrana plasmática sirven de receptores que intervienen en procesos de reconocimiento y adhesión celular; otras actúan como transportadores o “carriers” hacia el interior o el exterior de la célula; otras son enzimas

que catalizan reacciones asociadas con la membrana, y otras son proteínas estructurales que conectan la membrana plasmática con el citoesqueleto, con otra célula adyacente o con la matriz extracelular.

Las proteínas mejor estudiadas son las de la membrana plasmática del eritrocito humano, debido a la facilidad con la que pueden obtenerse. El peso molecular de las proteínas eritrocíticas de membrana varía entre 20 y 240 kD (Macías y cols., 2003; Paniagua y cols., 2003). Entre ellas se incluyen la glucoforina, la proteína banda 3, la anquirina o proteína banda 2.1, la espectrina, actina y tropomiosina, las proteínas banda 4.1 y aducina, y la gliceraldehído-3-P-deshidrogenasa (Figura 8).

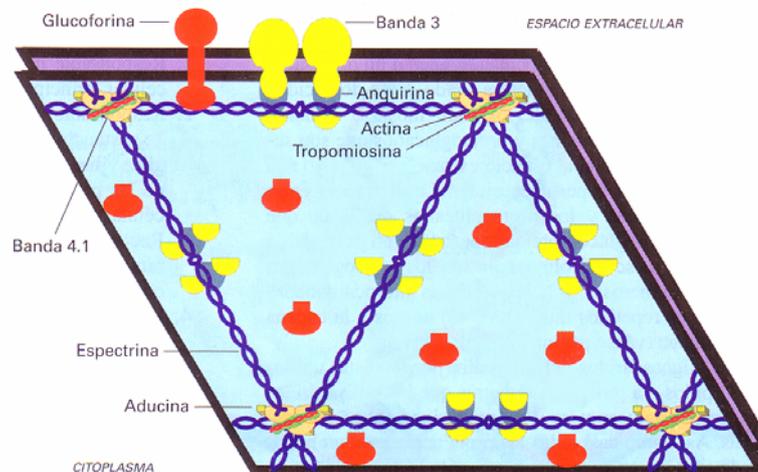


Figura 8. Representación de las proteínas asociadas a la membrana plasmática del eritrocito de mamífero.

Sin embargo, otras células eucariotas contienen proteínas diferentes en su membrana. Así, no se han encontrado glucoforina ni espectrina, aunque sí otras proteínas homólogas, muchas de las cuales intervienen en procesos de reconocimiento y adhesión celular o en el transporte de moléculas entre las células y el medio. El citoesqueleto asociado a la membrana plasmática de la célula eucariota también es diferente y consiste generalmente en filamentos de actina, de mayor longitud que los del eritrocito. Estos filamentos se entrecruzan formando una red que se une de diversas formas a la membrana. En estas uniones intervienen proteínas similares a la anquirina y banda 4.1.

Hidratos de carbono

Los hidratos de carbono están presentes en la membrana plasmática unidos covalentemente a proteínas o a lípidos. Se encuentran en el lado externo de la membrana y son mayoritariamente oligosacáridos. La célula queda así recubierta de una envoltura de material hidrocarbonado denominado *glicocáliz*, que es particularmente visible en algunas células (Figuras 3 y 4) y que llega a representar entre el 2 y el 10 % del peso de la membrana. En esta cubierta, además de los hidratos de carbono pueden encontrarse algunas proteínas. El grado de desarrollo del glicocáliz es muy variable, en la mayoría de las células forma una delicada capa difícilmente apreciable por microscopía electrónica, sin embargo, en algunas células epiteliales suele estar muy desarrollado.

También puede haber glucoproteínas y proteoglucanos que son secretados por la célula al espacio extracelular y luego adsorbidos por la superficie celular. La diferencia entre las glucoproteínas y los proteoglucanos reside en que mientras las glucoproteínas constan de un polipéptido unido a uno o escasos oligosacáridos, los proteoglucanos presentan numerosas y largas cadenas hidrocarbonadas ligadas a la cadena polipeptídica.

Los oligosacáridos del glicocáliz pueden estar unidos a los lípidos o a proteínas, mientras que los polisacáridos de los proteoglucanos lo hacen exclusivamente a las proteínas. Como en la membrana hay unas 50 veces más moléculas de lípidos que proteínas, habría que pensar que hay más oligosacáridos unidos a lípidos que a proteínas, en torno a unas cinco veces. Sin embargo, el peso total de los oligosacáridos unidos a proteínas es mayor que el de los unidos a lípidos pues mientras que cada molécula de lípido portadora de oligosacáridos posee una cadena de hidrato de carbono, cada molécula de proteína se une a varias cadenas.

Los oligosacáridos del glicocáliz se unen bien al nitrógeno en un residuo del aminoácido asparagina, oligosacáridos N, o al oxígeno en un residuo del aminoácido treonina o serina, oligosacáridos O. Los primeros poseen 12 azúcares y son ricos en manosa mientras que los segundos son más cortos, 4 azúcares. Una forma de reconocer los hidratos de carbono del glicocáliz son las lectinas, unas proteínas de origen tanto

vegetal como animal que se unen específicamente a secuencias determinadas de hidratos de carbono (Paniagua y cols., 2003).

Las principales funciones del glicocálix son: 1) Es responsable en parte de la carga negativa de la superficie celular, principalmente debida al ácido siálico. 2) Aporta selectividad en la incorporación a la célula de moléculas de bajo peso molecular. Además, contribuye al reconocimiento y fijación de las partículas que la célula debe fagocitar o pinocitar. 3) Contribuye al reconocimiento específico de células entre sí durante el desarrollo embrionario, contactos sinápticos, etc. 4) Mantiene las uniones intercelulares y de las células con la matriz extracelular y la membrana basal mediante glucoproteínas transmembranosas como cadherinas e integrinas. 5) Modifica la respuesta inmunológica; así, los antígenos responsables del rechazo en los trasplantes residen muchas veces en el glicocálix. También aporta el carácter antigénico que determinan los grupos sanguíneos del sistema ABO. 6) Es un punto de anclaje de enzimas; en el glicocálix de algunas células hay unidades globulares (5-6 nm de diámetro) que contienen enzimas, como leucoaminopeptidasas en los hepatocitos y maltasa en los enterococos. 7) Modifica la carga eléctrica del medio extracelular, actuando como una resina intercambiadora de iones.

Fluidez de membrana y función celular

La membrana se comporta como un fluido bidimensional anisotrópico donde las moléculas lipídicas y proteicas que lo constituyen se desplazan libremente en cualquier dirección del plano de la membrana, a diferencia de la viscosidad que es la resistencia al movimiento (Zimmer y Freisleben, 1988). La fluidez de una bicapa lipídica, es decir la facilidad con la que las moléculas que la constituyen se desplazan en ella, es un factor determinante para su función y debe preservarse dentro de ciertos límites. Así, existe una fluidez óptima para funciones específicas de las membranas y su alteración modifica su función y origina patología (Reiter, 1998c).

El grado de fluidez de una bicapa lipídica depende de su composición y, sobre todo, de la naturaleza de las colas hidrocarbonadas de sus fosfolípidos: cuanto más regular y compacto sea su agrupamiento, más viscosa será la bicapa. El grado de empaquetamiento de las colas hidrocarbonadas en la bicapa lipídica depende de dos

propiedades importantes: de su longitud y de su grado de insaturación, es decir, del número de enlaces dobles que contienen. Una menor longitud de la cadena reduce la interacción de las colas hidrocarbonadas entre sí y, por ende, aumenta la fluidez en la bicapa. La longitud de las colas hidrocarbonadas de los fosfolípidos varía entre 14 y 24 átomos de carbono. En cuanto a la insaturación, la mayoría de los fosfolípidos contienen una cola hidrocarbonada con uno o más enlaces dobles y una segunda que carece de ellos. Cada doble enlace en una cola insaturada determina la formación de una zona bisagra que dificulta el agrupamiento estrecho de las colas entre sí (Figura 9). Por ese motivo las bicapas lipídicas que contienen un alto porcentaje de colas hidrocarbonadas poliinsaturadas son más fluidas (Alberts y cols., 2006).

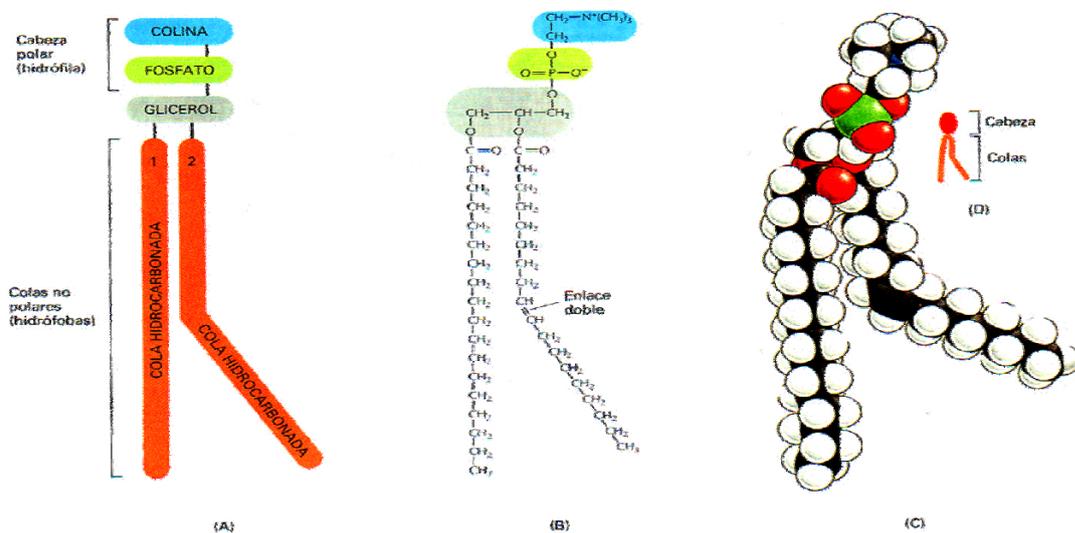


Figura 9. La fosfatidilcolina, el lípido más abundante en las membranas celulares. **A.** Forma esquemática. **B.** Fórmula química. **C.** Modelo espacial compacto. **D.** Forma simbólica. En el doble enlace entre átomos de carbono se observa una desviación del eje mayor de las cadenas hidrocarbonadas.

En las células eucariotas la fluidez de la membrana se modula por la inclusión de colesterol (Figura 10A). Las moléculas cortas y rígidas de colesterol están presentes en gran cantidad en la membrana plasmática, donde rellenan los espacios que separan a las moléculas de fosfolípidos (Figura 10B). Mediante este mecanismo el colesterol modifica a más rígida la bicapa lipídica, disminuyendo la fluidez de membrana.

Niveles óptimos de fluidez en las membranas son importantes para la fisiología celular por varios motivos. En primer lugar, porque permiten que las proteínas difundan con rapidez en el plano de la bicapa y que interactúen entre sí (Zimmer, 1984), dos fenómenos esenciales, por ejemplo, para la señalización celular. En segundo lugar, porque posibilitan que los lípidos y las proteínas difundan desde los sitios en los que se insertan en la bicapa lipídica después de su síntesis hacia otras regiones de la célula. En tercer lugar, es esencial en la fusión de las membranas entre sí para que difundan sus moléculas y garantiza que las moléculas de la membrana se distribuyan en forma equitativa entre las células hijas después de la mitosis (Lai y cols., 1980; Alberts y cols., 2006). De hecho, la tasa de crecimiento en ratones aumenta cuando es mayor el contenido de ácidos grasos insaturados en la membrana y que se asocia con incrementos de fluidez (Scott, 1982).

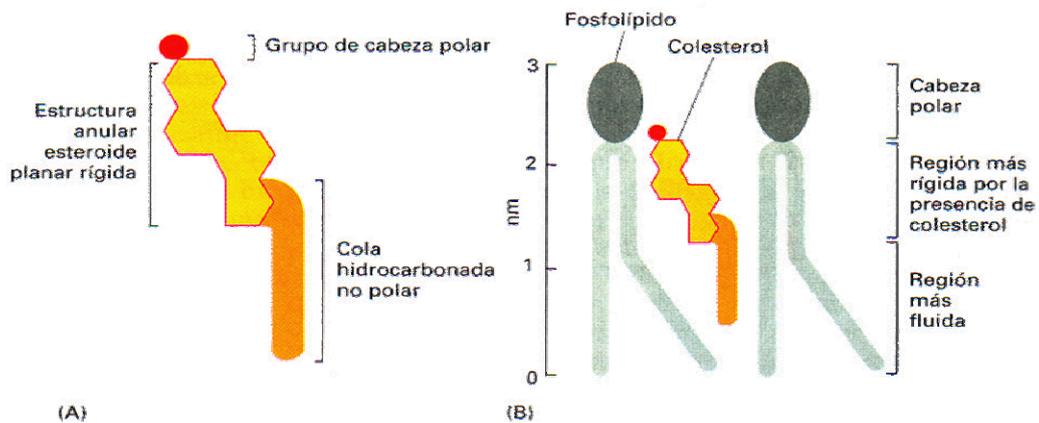


Figura 10. El colesterol aumenta la rigidez de las membranas celulares. **A.** Estructura del colesterol. **B.** Ubicación del colesterol entre los fosfolípidos en una bicapa lipídica.

La membrana plasmática se encuentra en un continuo proceso de reciclado. De ella se invaginan vesículas que suponen una pérdida de su superficie, y con ella se fusionan vesículas procedentes del citoplasma, principalmente del complejo de Golgi, lo que supone una recuperación de su extensión. Utilizando marcaje de proteínas con leucina tritiada, se ha visto que sus polipéptidos de alto peso molecular se renuevan cada 2-5 días, mientras que los de bajo peso molecular lo hacen cada 7-13 días. Los lípidos se renuevan cada 3-5 días (Paniagua y cols., 2003). Por último, la fluidez de las membranas biológicas modula numerosos procesos celulares incluyendo la actividad de enzimas asociadas a la membrana, que puede incrementarse al aumentar la fluidez (Schroeder y cols., 1976; Dobretsov y cols., 1977).

Envejecimiento y fluidez de membrana

El envejecimiento fisiológico es un proceso natural, complejo e irreversible, con múltiples manifestaciones, que tiene lugar a lo largo de la vida de un individuo y que se acompaña de un deterioro progresivo de la función celular (Yu, 1994; Crespo y cols., 1997). Existen dos grupos de teorías que intentan explicar las modificaciones biológicas asociadas al envejecimiento: las primeras son las de los cambios programados o teorías deterministas, que sostienen que las alteraciones de la edad están programadas genéticamente. El segundo grupo, el de las teorías estocásticas, que postulan que los cambios del envejecimiento son una consecuencia de la acumulación de daños aleatorios en moléculas vitales provocados por factores ambientales. Por ejemplo nuestro ácido desoxirribonucleico (ADN) experimenta cambios continuos en respuesta a agentes exógenos y factores intrínsecos, y se ha sugerido que el envejecimiento sería la consecuencia de mutaciones de ADN o de deficiencias de los mecanismos de su reparación.

La teoría del envejecimiento causado por radicales libres pertenece a las estocásticas y sostiene que el envejecimiento es el resultado irremediable de nuestro metabolismo oxidativo. Entre los productos secundarios del metabolismo oxidativo se forman radicales libres tóxicos que reaccionan con el ADN, el ácido ribonucleico, las proteínas y los lípidos, y son los responsables últimos del daño celular y de la pérdida de su función durante el envejecimiento (Harman, 1956).

Los lípidos de las membranas biológicas son muy sensibles a los efectos del envejecimiento. Entre sus cambios destacan: la peroxidación de los ácidos grasos insaturados, el aumento de los movimientos en *flip-flop*, el incremento del contenido en colesterol y la pérdida de la asimetría funcional en la bicapa lipídica (Paniagua y cols., 2003). Se ha observado que en las ratas hay declive gradual de la fluidez de sus membranas con la edad, y que paralelamente se incrementa su contenido de lípidos saturados (Hubbard y Garratt, 1980). La expresión en las membranas biológicas de la teoría del envejecimiento mediado por radicales libres (Harman, 1956; Barber y Bernheim, 1967; Harman, 1984; Sohal y Weindruch, 1996) es su peroxidación lipídica que conlleva disminución de su fluidez (Vladimirov y cols., 1980).

Patología y fluidez de membrana

La fluidez de membrana celular es un indicador de la homeostasis celular. El mantenimiento de niveles adecuados de fluidez es necesario para una función celular óptima; tanto los incrementos como las disminuciones de esos niveles pueden causar enfermedad. La restauración de los niveles en la fluidez constituye una novedosa y prometedora estrategia terapéutica de la Medicina Moderna (Scott, 1982). La alteración en la fluidez se ha observado en diversos procesos patológicos que incluyen el cáncer, las infecciones virales, la enfermedad coronaria y las enfermedades degenerativas (Butterfield y Leung, 1978; Scott, 1982).

Algunas evidencias sugieren que el citoesqueleto de los eritrocitos es defectuoso en la esferocitosis hereditaria. Los hematíes poseen un enrejado de proteínas periféricas en la región interna de la membrana que mantiene la forma y posibilita la deformabilidad y elasticidad de la célula. Las mayores proteínas de su citoesqueleto son la espectrina y la actina, que están fijadas a la membrana por proteínas banda 2.1 y 4.1 (Hill y cols., 1982). Presumiblemente, en la esferocitosis hereditaria hay defectos en las proteínas banda 4.1 y se ha observado aumentos en la viscosidad de la membrana por su interacción con elementos del citoesqueleto (Sawyer y cols., 1983).

El colestanol es un componente lipídico minoritario en el cuerpo humano. Una elevación de su concentración sérica induce la denominada xantomatosis cerebrotendinosa. Su mecanismo fisiopatológico es que reemplaza al colesterol de las membranas, lo que determina que la fluidez de la membrana se reduzca, y los canales de calcio no se abran, induciendo la muerte celular. Por ello, el colestanol tiene un efecto tóxico, y un desequilibrio de la ratio colesterol/colestanol en la membrana plasmática se cree responsable de las alteraciones funcionales del canal de calcio en la membrana celular (Seyama, 2003).

Las membranas de algunas estirpes de células tumorales poseen una alta fluidez respecto a las de células no tumorales (Van Blitterswijk y cols., 1981). La fluidez de la membrana plasmática de la célula tumoral se correlaciona con su potencial de malignidad. En general se describen aumentos de la fluidez de la bicapa en los tumores más invasivos (Jetten y cols., 1981). También se ha observado que las células tumorales

son más resistentes que las células sanas a la peroxidación lipídica por tener una mayor concentración de ácidos grasos insaturados (Slater, 1982). Así, los pacientes con mayor fluidez de membrana plasmática de las células tumorales tienen peor pronóstico que los que presentan menor fluidez de membrana, sugiriendo que la fluidez pueda ser utilizada como un factor pronóstico independiente y como una herramienta para identificar pacientes que puedan recibir un tratamiento postoperatorio más preciso (Sok y cols., 2002). Por ejemplo, la progesterona disminuye la fluidez de la membrana plasmática de las células SKOV-3 de adenocarcinoma humano. La tumorigénesis se suprimió por tratamiento con progesterona en ratones desnudos inmunocomprometidos inoculados intraperitonealmente con células SKOV-3. Los progestágenos podrían ser un beneficio en la prevención y/o tratamiento de etapas tempranas de carcinomatosis ovárica, un efecto que podría estar mediado por su papel regulador de la fluidez de membrana (Sherbet, 1989; McDonnell y cols., 2003).

También es importante la fluidez de la membrana en la célula huésped en la defensa frente a virus, ya que la fijación de éste puede facilitarse por un incremento en la dinámica de los fosfolípidos (Blenkham y Apostolov, 1980). Se ha demostrado que el interferón, un agente antiviral/antitumoral, altera el contenido de lípidos insaturados en la membrana y las alteraciones a corto plazo en la fluidez de la bicapa pueden desempeñar un papel importante en la resistencia a éstas enfermedades (Apostolov y Barker, 1981).

Dietas deficientes en ácidos grasos esenciales, se asocian con diversas enfermedades como las coronariopatías en las que se modifica la fluidez de las membranas celulares (Budowski, 1981), la esclerosis múltiple (Rivers y Frankel, 1981), la fibrosis quística (Rivers y Frankel, 1981) y la distrofia muscular (Butterfield y Leung, 1978). Recientemente se ha demostrado que el plomo causa estrés oxidativo tanto por generación de especies reactivas de oxígeno, como por reducción de los sistemas defensivos antioxidantes de las células. En un estudio que evaluó los efectos de las catequinas del té sobre el daño de la peroxidación lipídica en células HepG2 expuestas a plomo, se observó que éste disminuye la viabilidad celular, estimula la peroxidación lipídica de las membranas celulares y disminuye la fluidez en la superficie polar de las membranas celulares. El tratamiento con catequinas mejoró la viabilidad celular,

disminuyó los niveles de peroxidación lipídica y protegió la fluidez de membrana celular en las células HepG2 expuestas a plomo de forma concentración dependiente (Chen y cols., 2002).

Numerosas publicaciones de los últimos años también analizan la implicación de las reacciones oxidativas en las enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y enfermedad de Alzheimer (EA) (Gazulla y Cavero-Nagore, 2006), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la enfermedad cerebrovascular isquémica, los traumatismos craneales y medulares, etc. (Jiménez-Jiménez y cols., 2006). La mayoría de estos estudios han demostrado un aumento de los marcadores de peroxidación lipídica en los cerebros de pacientes con EA, incluidas las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), el malonildialdehído (MDA) (Hajimohammadreza y Brammer, 1990; Subbarao y cols., 1990; Palmer y Burns, 1994; Lovell y cols., 1995; Marcus y cols., 1998), el 4-hidroxi-2-nonenal (Sayre y cols., 1997; Markesbery y Lovell, 1998) y los isoprostanos (Pratico y cols., 1998), especialmente en el córtex temporal y el hipocampo. También se ha observado que la fluidez de membrana mitocondrial está disminuida en el córtex cerebral de los pacientes con EA, lo que parece deberse a un aumento de los procesos de peroxidación lipídica (Mecocci y cols., 1996; Mecocci y cols., 1997; Jiménez-Jiménez y cols., 2006). Los fosfolípidos de membrana derivados de fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol disminuyen en el hipocampo y los primeros también en la corteza parietal (Prasad y cols., 1998; Guan y cols., 1999; Jiménez-Jiménez y cols., 2006). El cociente lipofosfatidilcolina/fosfatidilcolina está reducido en el líquido cefalorraquídeo de estos pacientes (Mulder y cols., 2003; Jiménez-Jiménez y cols., 2006).

Radicales libres y estrés oxidativo

Toxicidad del oxígeno y estrés oxidativo

El estrés oxidativo, es consecuencia de la exposición de la materia viva a los radicales libres y especies reactivas dependientes del oxígeno (EROS), generadas como subproductos de su metabolismo aerobio y cuya producción aumenta ante cualquier lesión tisular. La sobreexposición a los radicales libres produce una ruptura del equilibrio que debe existir entre los factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes defensivos encargados de eliminar dichas especies químicas reactivas. Un déficit de estas defensas también causa mayor estrés oxidativo (Halliwell y Gutteridge, 1984; 1985; Halliwell, 1992; Halliwell y cols., 1992; Reiter, 1995; Jiménez-Jiménez y cols., 1996). Todo esto acarrea graves alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado del organismo; por lo tanto, se reconoce al estrés oxidativo como un mecanismo general de daño celular implicado en la etiopatogenia de numerosas enfermedades (Ames y cols., 1993).

Radical libre y especie reactiva dependiente del oxígeno

Las regiones del espacio atómico donde existe mayor probabilidad de encontrar un electrón (e^-) se denominan orbitales atómicos. Existen varios tipos de orbitales, que se ubican en diferentes niveles energéticos alrededor del núcleo. En cada orbital hay parejas de electrones, que se distribuyen según su nivel energético. Éstos al girar sobre su propio eje producen una energía magnética definida por su número cuántico “*spin*”, que posee los valores, $+1/2$ o $-1/2$, según el sentido de giro horario o antihorario respectivamente. Los e^- del par de cada orbital tienen sentidos de giro opuestos, por lo que sus *spines* o campos magnéticos se anulan mutuamente, denominándose a ese átomo o molécula, diamagnética.

Desde el punto de vista químico un radical libre es toda especie química, átomo, molécula o parte de ésta, cargada o no, que en su estructura presenta uno o varios e^- desapareados o impares en su orbital más externo, dándole una configuración electrónica que genera gran inestabilidad (Venero Gutiérrez, 2002). El e^- desapareado o solitario tiene un momento magnético o *spin* no compensado llamado “magnetón Bohr”,

determinando que el átomo o molécula sea paramagnética. Los electrones tienden a la configuración energética más estable pareándose en su orbital. 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 e⁻ desapareado, agente reductor, o bien captando un e⁻, agente oxidante. Son muy reactivos, tienen una vida media corta (Tabla II) que depende del tiempo que tardan en reaccionar con otro átomo para conseguir captar o ceder su electrón desapareado y así compensar el spin de su orbital más externo, por eso actúan cerca del sitio en que se forman ya que no tienen mucho tiempo para difundir (Basaga, 1989; Cheeseman y Slater, 1998a,b). En este proceso, el átomo atacado pierde o gana electrones, pudiendo convertirse a su vez en otro radical libre.

Tabla II. *Vida media de los principales radicales libres y del oxígeno molecular.*

Especie	Denominación	Vida media a 37 °C (s)
Superóxido	$\cdot\text{O}_2^-$	$1 \cdot 10^{-6}$
Hidroxilo	$\cdot\text{OH}$	$1 \cdot 10^{-9}$
Alcoxilo	$\text{RO}\cdot$	$1 \cdot 10^{-6}$
Peroxilo	$\text{ROO}\cdot$	$1 \cdot 10^{-2}$
Oxígeno singlete	$^1\text{O}_2$	$1 \cdot 10^{-6}$
Oxígeno molecular	O_2	$> 10^2$

El oxígeno molecular (O_2), también es considerado como un radical libre ya que cada átomo de la molécula posee un e⁻ desapareado en su orbital externo (Figura 11). Ambos electrones tienen el mismo número cuántico de spin y, debido a esta configuración, la molécula de O_2 sólo interactuará con radicales cuyos electrones tengan spines complementarios a él, fenómeno denominado “restricción de spin” que implica que su reactividad como radical sea muy baja en comparación con la de otras especies reactivas dependientes del oxígeno (Reiter, 1998c).

El término EROS, incluye tanto a los radicales libres relacionados con el oxígeno como a otras especies no radicálicas que siendo precursores y derivados de éstos, participan en reacciones que causan elevación de los agentes prooxidantes (Beckman y Koppenol, 1996; Naqui y cols., 1996). Aproximadamente, del 1 al 3 % del

oxígeno consumido en el organismo deriva en la formación de especies reactivas dependientes del oxígeno (Crespo y cols., 1997; Beckman y Ames, 1998; Reiter, 1998c).

Las principales especies reactivas del oxígeno son (Halliwell, 1992; Reiter, 1995; Jiménez-Jiménez y cols., 1996) (Tabla III): el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), el óxido nítrico (NO), el peroxilo ($\text{ROO}\cdot$), el alcoxilo ($\text{RO}\cdot$) y el ozono. Producen la oxidación de lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ADN (Halliwell y Gutteridge, 1984; 1985; Halliwell, 1992; Halliwell y cols., 1992; Reiter, 1995; Jiménez-Jiménez y cols., 1996).

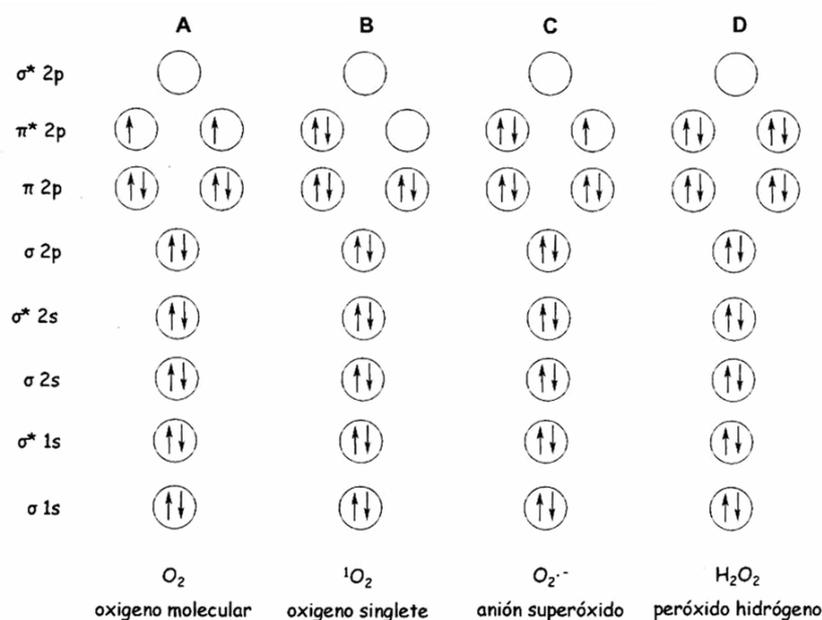


Figura 11. Configuración electrónica de los orbitales moleculares de diferentes especies reactivas dependientes del oxígeno.

Las EROS se clasifican en: *inorgánicos o primarios*, que se originan por transferencia de electrones sobre el átomo de oxígeno, representan por tanto distintos estados en la reducción de éste y se caracterizan por tener una vida media muy corta. Son el $\cdot\text{O}_2^-$, el $\cdot\text{OH}$ y el NO. *Orgánicos o secundarios*, que se pueden originar por la transferencia de un e^- de un radical primario a un átomo de una molécula orgánica o por la reacción de dos radicales primarios entre sí. Poseen una vida media un poco más larga que los primarios. Los *intermediarios estables relacionados con los radicales*

libres del oxígeno, incluyen un grupo de especies químicas que son generadoras de radicales libres o resultan de la reducción o metabolismo de ellas, entre las que están el $^1\text{O}_2$, el H_2O_2 , el HClO , el peroxinitrito y los hidroperóxidos orgánicos (Diplock, 1991).

Tabla III. Algunas características de las principales especies reactivas dependientes del oxígeno.

Especie	Fórmula	Propiedades
Superóxido	$\cdot\text{O}_2^-$	Buen reductor
Hidroxilo	$\cdot\text{OH}$	Extremadamente reactivo, velocidad de difusión muy baja
Perhidroxilo	$\text{HO}_2\cdot$	Más oxidante y más liposoluble que $\cdot\text{O}_2^-$
Peroxilo	$\text{ROO}\cdot$	Menor capacidad de oxidación que $\cdot\text{OH}$ y mayor capacidad de difusión
Alcoxilo	$\text{RO}\cdot$	Reactividad intermedia entre $\text{ROO}\cdot$ y $\cdot\text{OH}$
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Oxidante, pero lento. Alta capacidad de difusión, atraviesa membranas
Oxígeno singlete	$^1\text{O}_2$	Poderoso oxidante

Reacciones químicas de los radicales libres

Dependiendo de su configuración electrónica y de la molécula con la que interactúa, los radicales libres participan en los siguientes tipos de reacciones químicas:

1. Un radical libre ($\cdot\text{X}$) reacciona con otra molécula no radical (Y), generándose un producto final (X-Y) que mantiene un e^- desapareado (1).



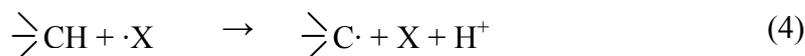
2. Un $\cdot\text{X}$ actúa como agente reductor, donando un e^- a un (Y). Este adquiere el e^- convirtiéndose en otro radical libre (2).



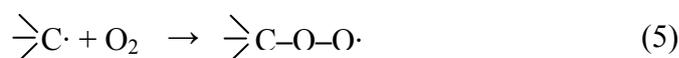
3. $\cdot\text{X}$ actúa como agente oxidante, aceptando un e^- de un Y . El no radical acaba con un e^- desapareado, y el radical ya no tiene un e^- desapareado (3).



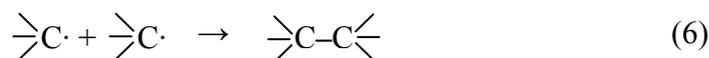
4. El $\cdot X$ extrae un hidrógeno del átomo de carbono. El carbono queda con un e^- desapareado, ya que el hidrógeno posee sólo un e^- (4).



Debido a que la mayoría de las moléculas biológicas no son radicales libres, su reacción *in vivo* con radicales como el $\cdot OH$ genera con frecuencia reacciones en cadena. Así por ejemplo, el ataque a las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos de las membranas y de las lipoproteínas plasmáticas puede abstraer un hidrógeno, produciendo un radical centrado en el carbono. Posteriormente, los radicales centrados en el carbono reaccionan con el O_2 y producen radicales $ROO\cdot$ (5).



Estos radicales $ROO\cdot$ pueden propagar la reacción en cadena de la peroxidación lipídica. En ausencia de O_2 , los radicales de carbono pueden reaccionar entre sí, formando un enlace covalente (6):



Fuentes de radicales libres en los seres vivos

Probablemente el oxígeno se formó por la fotólisis del agua debido a la radiación solar y su porcentaje en la atmósfera se estabilizó por la aparición de los organismos unicelulares fotosintéticos en la corteza terrestre. Consecuentemente se generaron moléculas de oxígeno que eran innecesarias para la célula y por ello expulsadas al agua de los océanos primitivos, y de allí a la atmósfera, que fue enriqueciéndose en oxígeno hasta alcanzar en la actualidad el 21% de la mezcla gaseosa total.

El oxígeno es utilizado por los organismos aerobios como aceptor final de electrones durante el proceso de la respiración mitocondrial. En ésta se genera energía en forma de adenosin trifosfato (ATP) y es inevitable la formación de subproductos a partir del oxígeno: “radicales libres tóxicos”. Este hecho es conocido como “la paradoja del oxígeno”, debido a que el mismo oxígeno imprescindible para la vida en los

organismos aerobios produce sustancias que son letales, es decir, el O₂ da y quita la vida.

La principal fuente de radicales libres en las células eucariotas es la mitocondria (Yu, 1994). Se producen principalmente durante la fosforilación oxidativa, una cadena de reacciones acopladas catalizadas enzimáticamente por una serie de complejos situados en la membrana interna. Dichos complejos se enumeran del I al IV, aunque a la enzima ATP-sintasa a veces se la designa como complejo V. Los radicales libres se producen principalmente en los complejos I y III (Cross y Jones, 1991). El oxígeno puede generar $\cdot\text{O}_2^-$ al recibir un único e⁻, en la transferencia ocurrida en el cuarto paso de la respiración mitocondrial (Nohl y Hegner, 1978). Las enzimas dependientes de nicotin adenin dinucleótido reducido (NADH) son otra fuente de radicales libres en la mitocondria. La interacción de algunos metales, los hidroperóxidos o el ¹O₂ con estas enzimas produce la alteración de estos sistemas, y provoca el envejecimiento mitocondrial (Bindoli, 1988).

Otras fuentes son la β-oxidación de los ácidos grasos, el metabolismo de la enzima citocromo P₄₅₀ y los procesos de fagocitosis (Fang y cols., 2002) (Figura 12). La β-oxidación de ácidos grasos se realiza principalmente en la matriz mitocondrial, aunque hay enzimas capaces de oxidar los ácidos grasos a acetyl-CoA en otros compartimientos celulares. La β-oxidación en el peroxisoma es muy importante para el hepatocito, que contiene grandes peroxisomas responsables del metabolismo de sustancias tóxicas, como por ejemplo el acetaldehído producido por la oxidación del etanol (Halliwell y Gutteridge, 1999).

La citocromo P₄₅₀, es una amplia familia de enzimas muy similares; actualmente se conocen más de 2000 isoformas diferentes, cada una con un sustrato específico. Se localizan en el retículo endoplásmico y catalizan reacciones de hidroxilación de diversos sustratos endógenos y exógenos, consiguiendo que muchas sustancias tóxicas sean más hidrosolubles, facilitando su eliminación por la orina. La citocromo P₄₅₀, utiliza como cofactor el nicotin adenin dinucleótido fosfato reducido (NADPH). Se ha propuesto que algunas isoenzimas de la citocromo P₄₅₀ participan en la formación del $\cdot\text{O}_2^-$ mediante la reducción directa del O₂ (Koop, 1992; Goepfert y cols., 1995).

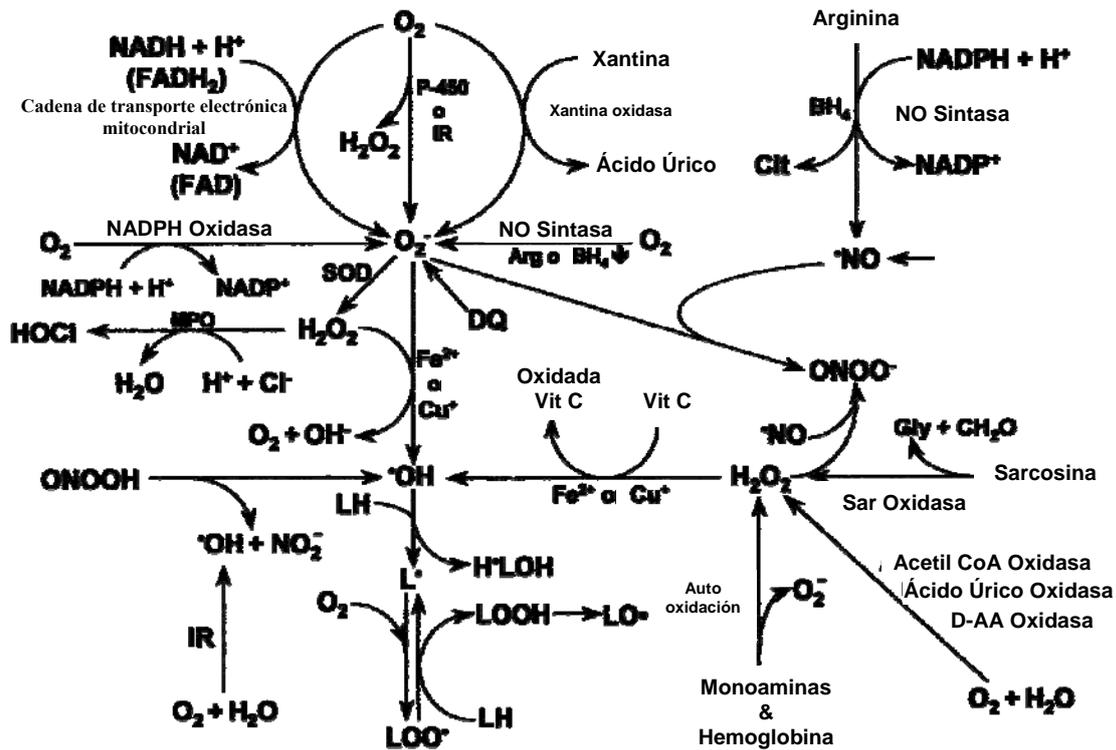


Figura 12. Síntesis de las principales reacciones químicas en las que se forman radicales libres en el ser humano (Fang y cols., 2002).

Durante la fagocitosis se producen grandes cantidades de $\cdot O_2^-$, H_2O_2 , $\cdot OH$ (Moslen, 1994) y $HClO$ formado por la enzima mieloperoxidasa (Babior, 1978); este proceso es realizado por los leucocitos granulocitos y el sistema monocito-macrófago e implica la acción de la NADPH oxidasa. Los radicales libres producidos en el denominado “estallido respiratorio” se utilizan como arma de ataque de las células fagocíticas contra la bacteria fagocitada; no obstante, éstos pueden atacar y dañar los tejidos sanos circundantes, un hecho que se ha implicado en la etiopatogenia de algunas enfermedades, como la artritis reumatoide (Babior, 1984; Moslen, 1994).

Finalmente, otras enzimas implicadas en la producción de radicales libres son la aminooxidasa y la xantina oxidasa, que participan en la oxidación de monoaminas y xantinas respectivamente. Los mecanismos de formación de radicales libres en estas vías metabólicas se han implicado en la etiopatogenia de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson (Fahn y Cohen, 1992; Chiueh y cols., 1993).

Efecto nocivo de los radicales libres en las membranas biológicas

Daño oxidativo a los lípidos

Los ácidos grasos poliinsaturados son componentes esenciales de las membranas celulares. Sin embargo, son muy vulnerables al ataque oxidativo de los radicales libres (Reilly y Bulkley, 1990; Gutteridge, 1995; Cadenas, 1997; Jerlick y cols., 2000; Venero Gutiérrez, 2002). El estrés oxidativo produce un gran daño en la membrana que sufre modificaciones que perturban o anulan su función a través de un proceso biológico denominado peroxidación lipídica, en el que se genera una reacción en cadena (Tappel, 1973; Svingen y cols., 1979; Kanner y cols., 1987).

La peroxidación lipídica o enranciamiento oxidativo de las grasas representa una forma de daño celular que puede ser desencadenado por: $^1\text{O}_2$, $\text{ROO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$ y $\cdot\text{OH}$ (Kanner y cols., 1987; Halliwell y Gutteridge, 1990). Se inicia cuando un radical libre extrae un átomo de hidrógeno de la cola de ácido graso de un fosfolípido de la membrana, produciéndose a continuación un reordenamiento de los dobles enlaces del resto acilo, formando conjugados dienos, seguido de su combinación con una molécula de oxígeno, y de la formación de un $\text{ROO}\cdot$ y de otras moléculas como endoperóxidos y cicloperóxidos. El nuevo $\text{ROO}\cdot$ formado puede extraer un átomo de hidrógeno de un fosfolípido adyacente, iniciando así una reacción en cadena que se propaga por toda la membrana (Kanner y cols., 1987; Hunt y cols., 1988). Una vez formados, estos radicales libres son los responsables de los efectos citotóxicos (Rangan y Bulkley, 1993).

Los factores que influyen en la magnitud de la peroxidación lipídica son: la naturaleza cualitativa y cuantitativa del agente iniciador, los contenidos de la membrana en ácidos grasos poliinsaturados y su accesibilidad, la tensión de oxígeno, la presencia de hierro, el contenido celular de antioxidantes.

La peroxidación lipídica se ha sistematizado en cuatro pasos: iniciación, propagación, ramificación y terminación (Tabla IV); sólo termina cuando los radicales libres interaccionan con moléculas antioxidantes o cuando se agota el sustrato, lo que implica la muerte celular. La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados en estas circunstancias produce su agotamiento y la formación de uniones cruzadas entre

fosfolípidos o entre fosfolípidos y proteínas (Bruch y Thayer, 1983; Curtis y cols., 1984). Esas alteraciones estructurales contribuyen a la pérdida de la fluidez, rigidez, en las membranas biológicas cuando son expuestas a los radicales libres (Dobretsov y cols., 1977; Schroeder, 1984).

Tabla IV. Reacción de la peroxidación lipídica en membranas biológicas. Un radical libre inicia una reacción en cadena que se extiende por toda la membrana saltando de un fosfolípido al vecino.

Paso	Mecanismo
1) Iniciación	$RH + RL \longrightarrow R\cdot$
2) Propagación	$R\cdot + O_2 \longrightarrow ROO\cdot$ $ROO\cdot + RH \longrightarrow ROOH + R\cdot$
3) Ramificación	$ROOH \longrightarrow RO\cdot + \cdot OH$ $2 ROOH \longrightarrow ROO\cdot + RO\cdot + H_2O$
4) Terminación	$RO\cdot + RO\cdot \longrightarrow$ no polímeros $ROO\cdot + ROO\cdot \longrightarrow$ no polímeros

Entre los productos generados durante el proceso oxidativo de los lípidos destacan el malonildialdehído (MDA) y los 4-hidroxiálquenos (4-HDA), moléculas cuantificadas en este trabajo como indicadores del grado de la peroxidación lipídica. Las moléculas generadas pueden ser muy tóxicas y capaces a su vez de provocar graves alteraciones en la membrana, como modificaciones en su fluidez (Bruch y Thayer, 1983; Garzetti y cols., 1993; Chen y Yu, 1994), 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).

Daño oxidativo a las proteínas

Las proteínas también son blanco del ataque de los radicales libres (Davies, 2003). La oxidación proteica, ocasiona cambios en la estructura química con disminución de su actividad e incluso la pérdida total de su función.

Las alteraciones bioquímicas que producen los radicales libres en las proteínas incluyen oxidaciones de un grupo de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina, oxidaciones de las cadenas laterales, ruptura de la secuencia de aminoácidos, formación de entrecruzamientos de las cadenas peptídicas, cambios de conformación, alteración de la hidrofobicidad, y adquisición de otros grupos reactivos como por ejemplo la 3,4-dihidroxifenilalanina y los hidroperóxidos; y formación de grupos carbonilo (Davies y cols., 1987; Davies y Goldberg, 1987; Dean y cols., 1997; Stadtman, 2001; Venero Gutiérrez, 2002; Davies, 2003) (Figura 13). En este trabajo, se ha cuantificado la carbonilación como indicador bioquímico de la oxidación proteica de la membrana.

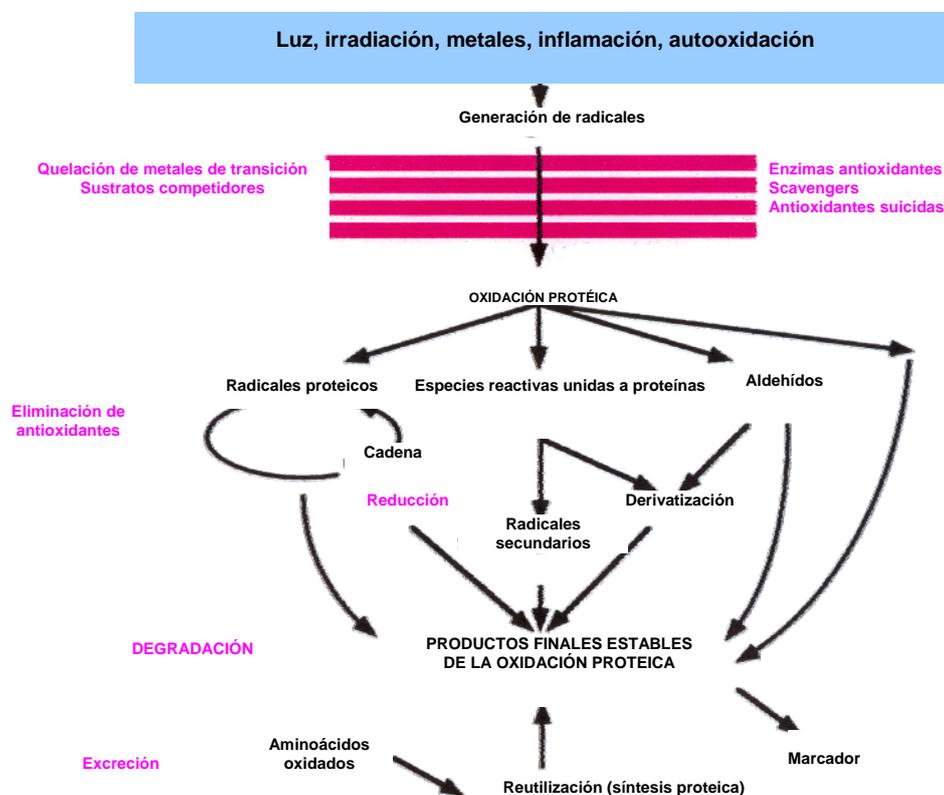
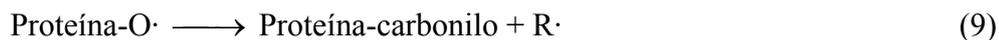
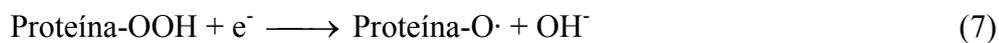


Figura 13. Mecanismos propuestos para la oxidación de proteínas in vivo mediada por radicales libres.

Al ser las proteínas estructuralmente muy grandes y complejas, compuestas por un gran número de aminoácidos, la variedad de reacciones que el ataque de los radicales libres pueden originar es muy elevada, ya que pueden actuar desde los enlaces peptídicos a las cadenas laterales, incluso pueden modificar los puentes disulfuro y los

En términos estrictos la reacción de las proteínas con los radicales libres no se puede considerar como una reacción en cadena, sin embargo se lleva a cabo una secuencia de reacciones (7-13) (Headlam y Davies, 2003):



Sistema de defensa antioxidante

La incapacidad de adaptación de los organismos anaerobios a la acumulación progresiva de O₂ en la atmósfera, provocó que sólo subsistieran aquéllos que se adaptaron a las nuevas condiciones ambientales. Esto se logró por el desarrollo de sistemas defensivos frente a la toxicidad del O₂. El sistema antioxidante está constituido por sustancias que al estar presente en bajas concentraciones respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente su oxidación.

Un antioxidante actúa a concentraciones menores que el sustrato oxidado por los radicales libres, interactúa más rápido con los radicales libres que con el resto de moléculas presentes, en un determinado microambiente –membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular (Tabla V). Las células contienen una amplia variedad de sustancias capaces de eliminar radicales libres, localizadas estratégicamente en los compartimientos celulares (Gutteridge, 1995; Lee y Lee, 1997).

En muchos casos los antioxidantes actúan sacrificando su propia estabilidad electrónica (Reiter, 1995). Su acción la realizan tanto en medios hidrofílicos como

hidrofóbicos (Jakoky y Ziegler, 1990) y actúan como eliminador o barredor “scavenger” para mantener el equilibrio redox (Tabla VI).

Tabla V. Clasificación de los antioxidantes según el lugar donde ejercen su acción.

Intracelular	Membrana	Extracelular
Superóxido dismutasa	Vitamina E	Ceruloplasmina
Catalasa	Betacarotenos	Transferinas
Peroxidasa	Ubiquinol-10	Lactoferrinas
Glutation	Melatonina	Albúminas
Proteínas que ligan metales		Haptoglobinas
Sistemas proteolíticos		Vitamina C
Vitamina C		Ácido úrico
Melatonina		Melatonina

La protección contra los radicales libres se puede realizar mediante un sistema enzimático de defensa que incluye a la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GP_X) o mediante un sistema paralelo que actúa especialmente cuando el anterior se satura, determinado por compuestos llamados depuradores de radicales libres (Crespo y cols., 1997). Este sistema se localiza en citosol (glutation, ácido ascórbico) y en las membranas (α -tocoferol y vitamina A) (Halliwell y Gutteridge, 1988). La neutralización de los radicales libres también involucra otros sistemas celulares como las membranas (peroxidación lipídica), ácidos nucleicos y proteínas, lo que en última instancia lleva a la muerte celular (Pierrefiche y Laborit, 1995).

Tabla VI. Clasificación de los antioxidantes según su origen.

Origen	Acción
1. Exógenos	
Vitamina E	Neutraliza oxígeno singlete Captura radicales hidroxilo Depura O ₂ Neutraliza peróxidos
Vitamina C	Elimina oxígeno singlete Captura radicales hidroxilo Depura O ₂ Regenera la forma oxidada de la vitamina E
Betacarotenos, Flavonoides, Licopenos	Neutraliza oxígeno singlete
2. Endógenos	
Superóxido dismutasa	Cofactor: Cobre, sodio, manganeso
Catalasa	Cofactor: Hierro
Glutación peroxidasa	Cofactor: Selenio
Melatonina	Actúa como “scavenger” y estimula la actividad de las enzimas antioxidantes
Glutación	Buen antioxidante intracelular que depura ·OH
Transportadores de metales (transferrina y ceruloplasmina)	Quelan metales evitando la reacción de Fenton

Glándula Pineal e indolaminas

Estructura funcional de la glándula pineal

Herófilo de Alejandría (335-280 a.C.) la describió anatómicamente por primera vez en el año 300 a.C., creyó que era una válvula que permitía el paso del espíritu desde el tercer al cuarto ventrículo cerebral, atribuyéndole la capacidad de regular la salida, el “flujo del pensamiento”, al exterior de los ventrículos laterales del cerebro. En el siglo II de nuestra era, Galeno de Pérgamo (129-199), introdujo el término *conarium* para la glándula pineal, debido a la semejanza de su forma con la del cono de una piña, y la conceptuó como una estructura necesaria para dar soporte a los vasos sanguíneos. El término actual pineal deriva del latín *pinealis*, y *pine*a significa “piña”. Galeno corrigió los conceptos de Herófilo, demostrando que la glándula pineal está localizada fuera del sistema ventricular y le atribuyó una función de paso entre cerebro y vasos cerebrales. Andrés Vesalio (1514-1564), describió su topografía, constitución y situación en su obra “*De Humanis Corporis Fabrica*”, sin embargo, fue el polifacético René Descartes (1596-1650), quien en su libro “*De Homine*” asignó a la glándula pineal el lugar donde reside el alma, siendo la conexión anatómica entre lo corporal y lo espiritual. Describió que los estímulos percibidos por los ojos son llevados al cerebro y desde allí alcanzan la glándula pineal, la cual posibilita el paso de los distintos *humores* que a través de unos “canales” o “poros” localizados en la pared de los ventrículos llegarían hasta los músculos ocasionando así la respuesta al estímulo original (Figura 15).

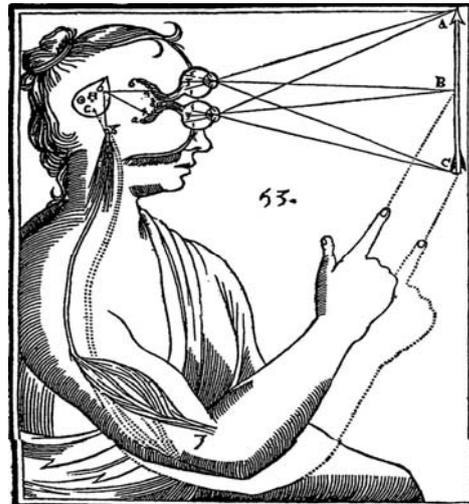


Figura 15. Esquema que ilustra como hipotéticamente la pineal recibe información visual y produce la contracción de grupos musculares.

El interés sobre la glándula pineal a partir de la segunda mitad del siglo XIX se dirigió hacia su anatomía comparada, histología y embriología, principalmente debido al desarrollo de métodos técnicos más refinados de corte y tinción tisular. Rudolph

Albert von Kolliker (1817-1905) en 1850, 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. A finales del siglo XIX, con el auge de la fisiología del sistema endocrino, se sospechó que la 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 destructores de la glándula pineal (Heubner, 1898). Así, se postuló que la pineal humana es un órgano endocrino que inhibe la función del hipotálamo, y en consecuencia, el desarrollo del sistema reproductor. Sin embargo, la ausencia de repercusiones claramente visibles en el animal pinealectomizado cuestionó su importancia funcional.

En los últimos 50 años se ha producido un desarrollo exponencial en la investigación sobre la fisiología de la glándula pineal. En 1958 Lerner y cols. aislaron y caracterizaron, a partir de 250.000 pineales bovinas, una molécula potencialmente hormonal (Lerner y cols., 1958). En 1968 (Fiske y Huppert, 1968), se demostró la importancia de la luz-oscuridad en el control de la función pineal y los efectos de la glándula pineal en la reproducción de los mamíferos (Wurtman y cols., 1963; Hoffman y Reiter, 1965).

El origen embriológico de la glándula pineal está en el techo del diencéfalo, hacia la 8ª semana de vida fetal, donde aparece un pequeño divertículo en la línea media de la parte posterior o caudal que en su desarrollo adquiere la forma de una piña. Aunque comienza como una estructura sacular, rápidamente la proliferación de las células de sus paredes la convierten en una glándula sólida. Una vez completado el desarrollo embrionario, se puede localizar la glándula pineal inmediatamente por encima de los tubérculos cuadrigéminos del mesencéfalo, en la región de la comisura posterior. En el hombre adulto es un órgano de unos 100-200 mg de peso, con forma cónica y unido al diencéfalo por el tallo pineal. La base de este tallo presenta un fondo de saco que se continúa con la cavidad del tercer ventrículo (Figura 16).

La glándula pineal está constituida por una red de tejido conectivo ricamente vascularizada, siendo uno de los tejidos corporales con mayor flujo sanguíneo en relación a su tamaño (Reiter y cols., 1981). En su interior hay una red de fibras

conjuntivas donde se encuentran los pinealocitos, células nobles de la glándula pineal productoras de melatonina, así como algunas células gliales.

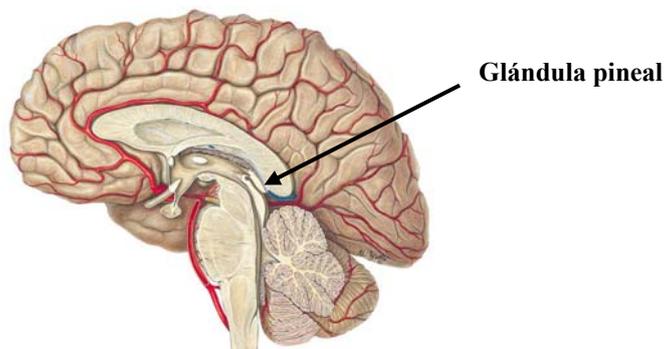


Figura 16. Localización de la glándula pineal en el cerebro del ser humano.

Síntesis de indolaminas en la glándula pineal

El triptófano, aminoácido esencial, es decir, que no se sintetiza en el organismo humano, pertenece al grupo de los aromáticos, ya que tiene un anillo indólico como grupo R unido al carbono a través de un resto metileno (Figura 17). Este compuesto por 64,69% de carbono, 5,92% de hidrógeno, 13,72% de nitrógeno y 15,67% de oxígeno, y su peso molecular es 204,23 D. Es soluble en agua, alcohol caliente e hidróxidos alcalinos, e insoluble en cloroformo.

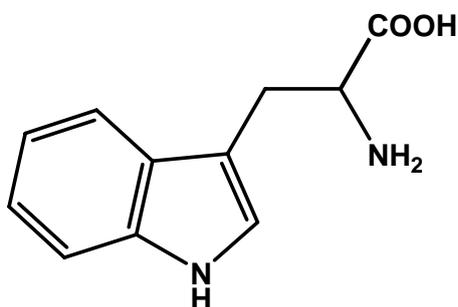


Figura 17. Estructura química del triptófano.

Internacionalmente se representa como Trp o simplemente W. Ingresa en el organismo como constituyente de las proteínas ingeridas en la dieta. Tras actuar las proteasas en la luz intestinal, es absorbido en el intestino y transportado en la sangre unido a la albúmina en un 80-90%. La mayor parte del triptófano es utilizado para sintetizar proteínas, pero una pequeña parte puede ser metabolizada sobre todo en intestino, hígado y

cerebro, produciendo una gran variedad de derivados.

Se han descrito cuatro vías de metabolización del triptófano:

Vía de los indoles bacterianos

La realizan las eubacterias presentes en la luz intestinal. Estas bacterias poseen la enzima triptofanasa, que rompe la molécula de triptófano produciendo indol, metilindol, escatol, ácido pirúvico y amoníaco. Además se forman otros metabolitos como los ácidos indolacético, indoláctico y la indolacetilglutamina.

Vía de las kinureninas

En términos cuantitativos es la principal vía de degradación del triptófano. Se realiza fundamentalmente en el cerebro y en el hígado. Sus metabolitos intermedios tienen actividad sobre el sistema nervioso central (SNC) (Stone, 2001). La vía se inicia por la apertura del anillo indólico del triptófano, formándose formilkinurenina. Esta reacción puede ser catalizada por dos isoenzimas diferentes, la triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO), una hemoproteína presente en el hígado que actúa específicamente sobre el L-triptófano y cuya expresión está inducida por L-triptófano y esteroides (Schutz y cols., 1972), y la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) presente en muchos órganos de mamíferos, incluyendo SNC, intestino, placenta, pulmón, células mononucleares fagocíticas, testículo y otras glándulas endocrinas (Watanabe y cols., 1981). La IDO no es específica para L-triptófano como la TDO, sino que puede abrir el anillo indol de indolaminas como el D-triptófano, L/D-5-hidroxitriptófano, serotonina y melatonina (Hirata y Hayaishi, 1972; Iwasaki y cols., 1978; Narbona y cols., 1994). Además de la función catabólica del triptófano, la IDO puede actuar como enzima antioxidante puesto que depura $\cdot\text{O}_2^-$ (Malina y Martin, 1996).

Por acción de las dos enzimas, la TDO y la IDO, se produce formilkinurenina, que se metaboliza rápidamente a L-kinurenina por la formamidasa, una enzima muy abundante en la mayoría de los órganos de los mamíferos. La L-kinurenina es el compuesto clave de esta vía de degradación de las kinureninas, estando presente en concentraciones micromolares en sangre, cerebro y órganos periféricos. Puede llegar al SNC porque atraviesa la barrera hematoencefálica utilizando transportadores de aminoácidos neutros (Speciale y cols., 1989). Hay algunas evidencias que demuestran

que este metabolito es una molécula con actividad proconvulsivante (Lapin, 1978; Stone y cols., 1996).

La L-kinurenina puede metabolizarse por tres enzimas, la kinurenina 3-hidroxilasa, la kinurenina aminotransferasa y la kinureninasa (Erickson y cols., 1992; Toma y cols., 1997). En esta vía, el ácido quinolínico se convierte en ácido nicotínico por la acción de la ácido quinolínico fosforribosiltransferasa, que termina con la formación de nicotinamida y dinucleótido de nicotinamida (Figura 18).

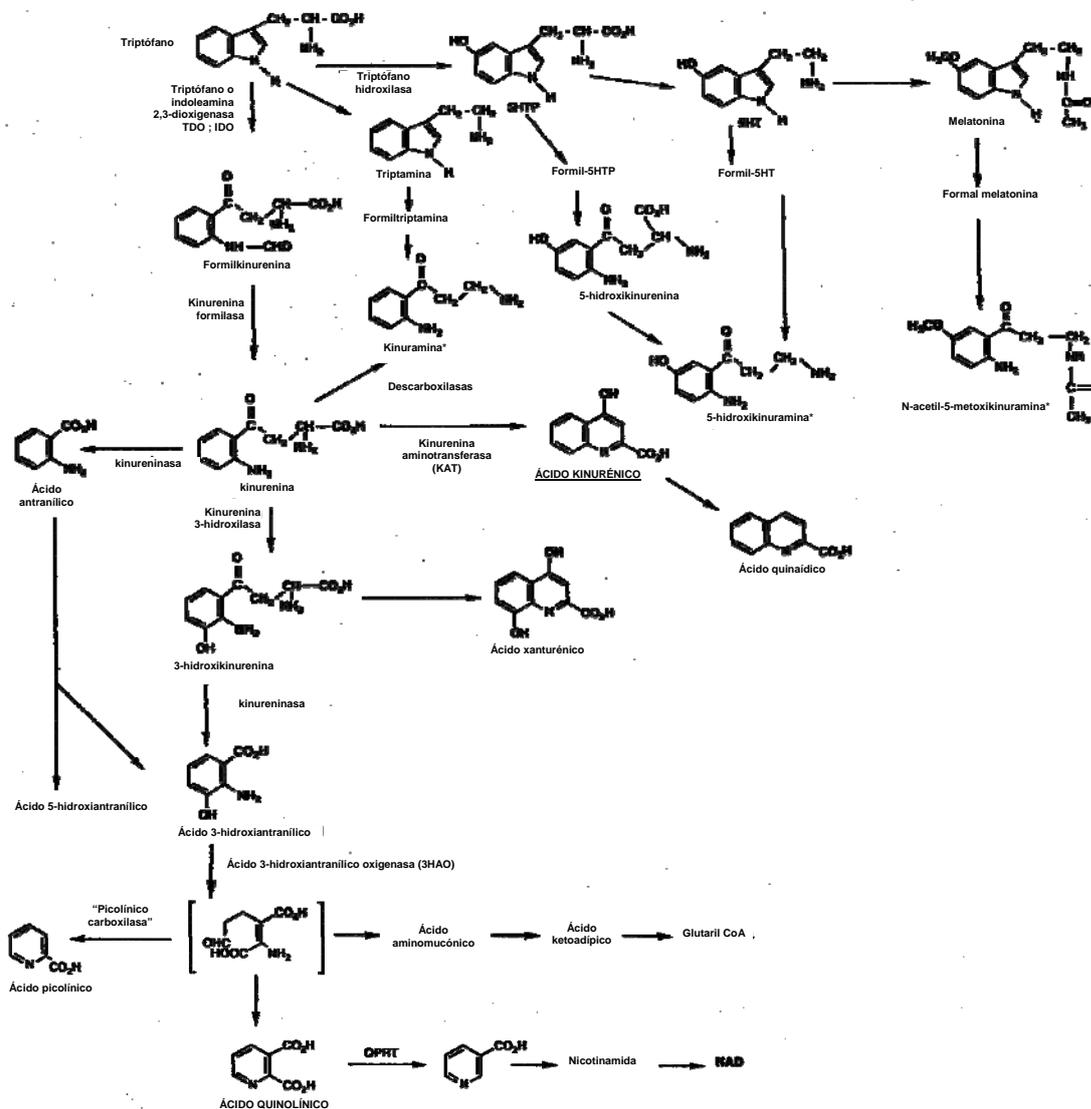


Figura 18. Ruta de degradación del triptófano: vía de las kinureninas (Stone, 2001). OPRT: ácido quinolínico fosforribosiltransferasa; NAD: nicotin adenin dinucleótido.

Vía de los hidroxindoles

Aproximadamente sólo el 1% del triptófano ingerido en la dieta se metaboliza por esta vía. Se realiza en los sistemas nervioso y endocrino. El triptófano sufre una hidroxilación por la triptófano-5-hidroxilasa, convirtiéndose en 5-hidroxitriptófano. A continuación éste se descarboxila para formar la 5-hidroxitriptamina o serotonina y posteriormente el 5-hidroxiindolacetaldehído por acción de la monoaminoxidasa (MAO) (Touitou y cols., 1996) (Figura 19).

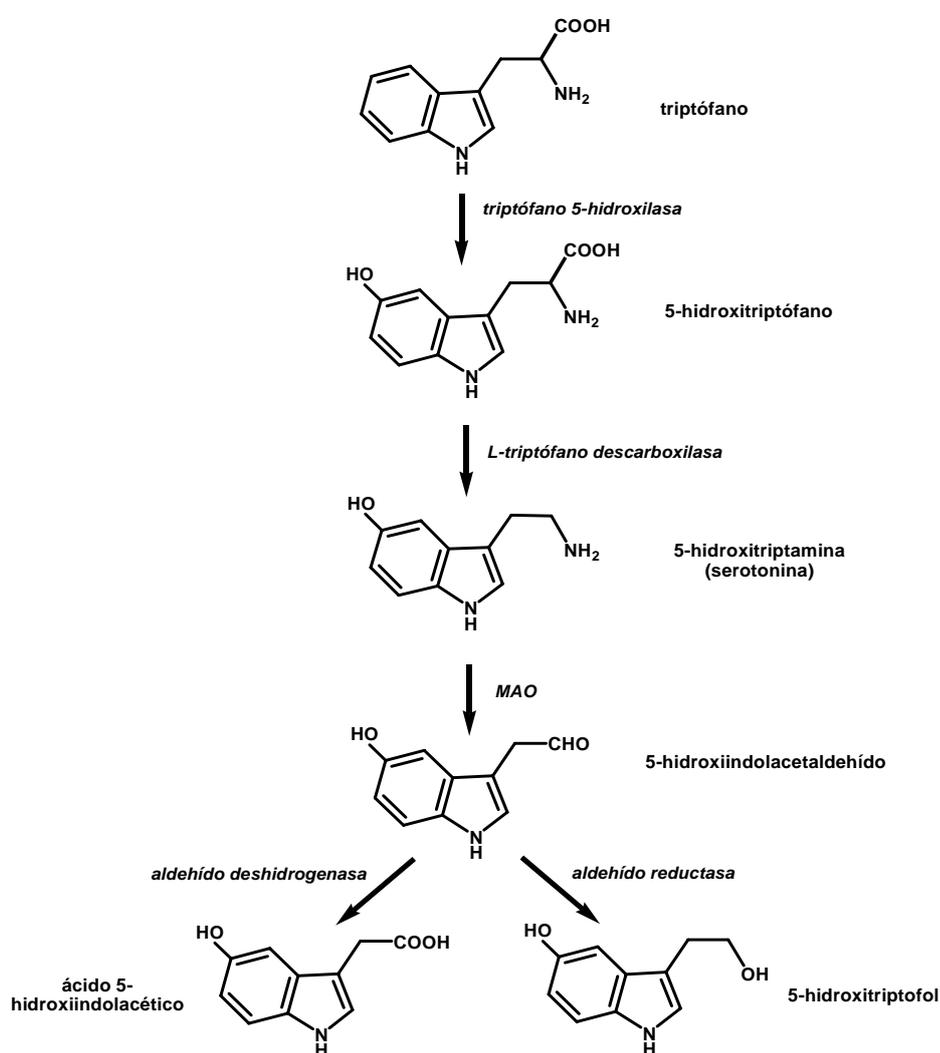


Figura 19. Vía metabólica de los hidroxindoles.

La enzima triptófano-5-hidroxilasa cataliza el paso limitante en la síntesis de serotonina. La reacción 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, 1984). Se ha descrito una pequeña variación circadiana de su actividad siendo 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.

La descarboxilación del 5-hidroxitriptófano para formar serotonina ocurre catalizada por la enzima L-triptófano descarboxilasa, que está localizada en el citosol del pinealocito y de otras estirpes celulares. Su actividad está aumentada por la iluminación ambiental a través de fibras simpáticas. Requiere el piridoxal fosfato como cofactor (Snyder y cols., 1964).

La MAO de los pinealocitos, del tipo B, se localiza en la mitocondria. Esta forma de MAO es relativamente insensible a la clorgilina y se inhibe por el deprenilo (Masson-Pevet y Pevet, 1989). El 5-hidroxiindolacetaldehído formado es una molécula muy inestable que pasa rápidamente a ácido o alcohol por la acción de las enzimas aldehído deshidrogenasa y aldehído reductasa, respectivamente. La primera de estas reacciones requiere un cofactor reducido de piridina y la segunda un cofactor de piridina oxidado.

Vía de los metoxiindoles o de la melatonina

Se realiza en la glándula pineal y en otros tejidos productores de melatonina como retina (Grace y cols., 1991), iris (Aimoto y cols., 1985), glándula lacrimal (Mhatre y cols., 1988), médula ósea (Tan y cols., 1999b), aparato digestivo (Bubenik, 1980; Vakkuri y cols., 1985b; Huether y cols., 1992; Tan y cols., 1999a), ovario (Itoh y cols., 1997) y sistema inmune (Guerrero y Reiter, 2002).

La melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina es una indolamina descrita por primera vez en 1917 por McCord y aislada a partir de extractos de glándula pineal por Lerner en 1958. Está constituida por 67,22% de carbono, 6,94% de hidrógeno, 12,06%

de nitrógeno y 13,78% de oxígeno. Su peso molecular es de 232,38 D. Es un sólido orgánico poco soluble en agua y muy soluble en etanol, con punto de fusión entre 116 y 118 °C.

Cuando la serotonina es metabolizada en la glándula pineal, puede desaminarse por acción de la MAO o puede convertirse en melatonina en dos reacciones sucesivas, en primer lugar la N-acetilación catalizada por la enzima N-acetil-transferasa (NAT) y a continuación la O-metilación catalizada por la enzima hidroxindol-O-metil transferasa (HIOMT) (Figura 20).

En prácticamente todos los tejidos explorados se ha demostrado la N-acetilación de aminas; en la glándula pineal se produce en el citosol, transfiriéndose un grupo

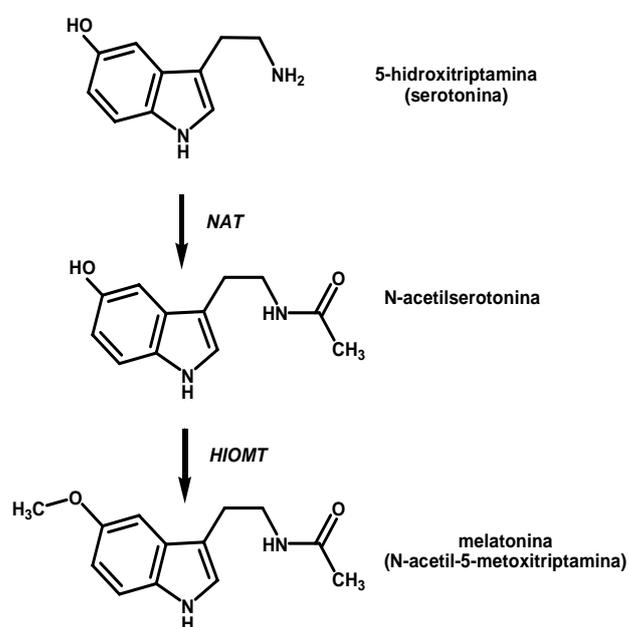


Figura 20. Biosíntesis de melatonina a partir de serotonina. NAT: N-acetil-transferasa; HIOMT: hidroxindol-O-metil transferasa.

acetilo del cofactor acetil CoA principalmente a la serotonina (Weissbach y cols., 1960), aunque la 5-metoxitriptamina también puede acetilarse (Yang y Neff, 1976). Los principales factores que regulan la actividad de la NAT son la luz, el estrés y algunos fármacos. Aumentan su actividad la oscuridad, el estrés y fármacos como el isoproterenol, la desmetilimipramina y la pargilina, y por el contrario, los β -bloqueantes, la ciclohexamida y la ouabaína la inhiben (Romero y Axelrod, 1974; Quay, 1980).

La HIOMT es una enzima que está limitada a los mamíferos. Se encuentra en concentraciones elevadas sólo en la glándula pineal y en mucha menor concentración en otros tejidos como la retina, la glándula de Harder y el intestino (Acuña-Castroviejo y cols., 1993a). Transfiere un grupo metilo de un cofactor de S-adenosil-metionina a un hidroxindol aceptor. En la glándula pineal la HIOMT cataliza la conversión de N-acetilserotonina a melatonina y en menor grado, de ácido 5-hidroxiindolacético a 5-

metoxiindolacético, de 5-hidroxitriptófano a 5-metoxitriptófano y de 5-hidroxitriptofol a 5-metoxitriptofol (Morton, 1987). Estas reacciones suceden en el citosol del pinealocito.

Regulación de la síntesis de melatonina

El fotoperíodo regula la síntesis de melatonina y otros metoxiindoles en la glándula pineal. La oscuridad se asocia con niveles plasmáticos elevados de melatonina en todos los animales y sucede lo contrario con las concentraciones de serotonina si bien, no todas las variaciones de serotonina son debidas a su transformación en melatonina (Reiter, 1981; 1991b). Las diferencias plasmáticas diurnas y nocturnas de melatonina se explican por el ritmo circadiano de la NAT (Reiter, 1980). También se han descrito pequeños aumentos nocturnos en los niveles de actividad de la HIOMT, que por sí solos no explican el ritmo circadiano de melatonina (Sugden y Klein, 1983; Sugden y cols., 1987).

En ausencia de luz, se generan potenciales de acción en la retina, que son conducidos hasta el núcleo supraquiasmático del hipotálamo. Desde aquí, la vía nerviosa sale de la cavidad craneal, alcanza la médula espinal donde hace sinapsis y el axón de la siguiente neurona, postsináptica, conduce el impulso eléctrico hasta el ganglio cervical superior, desde donde partirán fibras adrenérgicas postganglionares que regresarán a la cavidad craneal, y alcanzarán la membrana del pinealocito. Allí se liberará la norepinefrina que se unirá a receptores adrenérgicos α_1 y β_1 del pinealocito, lo que aumentará la concentración intracelular de adenosin monofosfato cíclico (AMPC), segundo mensajero, que provocará una serie de fosforilaciones intracelulares y aumentará la expresión y actividad de la NAT, con la consecuente elevación de la síntesis de N-acetilserotonina y melatonina (Reiter, 1991c) (Figura 21).

La alta liposolubilidad de la melatonina, debido a su estructura indólica, le permite atravesar fácilmente por difusión simple la bicapa de la membrana del pinealocito, lo que determina que el estímulo de la síntesis de melatonina en la glándula pineal eleve rápidamente sus niveles en sangre y en todos los compartimientos del organismo (Reiter, 1991a).

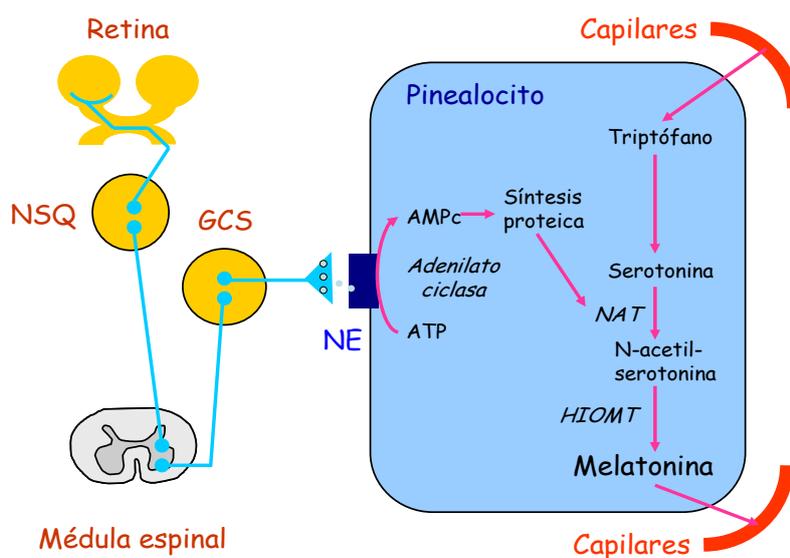


Figura 21. Regulación de la síntesis de melatonina.

En plasma, su vida media oscila entre los 20 y 40 minutos (Illnerova y cols., 1978; Vakkuri y cols., 1985a). Cuando alcanza el hígado, se transforma en 6-hidroximelatonina que es eliminada fácilmente por la orina al hacerse más hidrosoluble tras la conjugación hepática con el anión sulfato o el ácido glucurónico (Figura 2).

La melatonina también puede seguir otras vías catabólicas, como la desacetilación y desaminación para convertirse en ácido 5-metoxiindolacético y 5-metoxitriptofol (Galzin y cols., 1988; Grace y cols., 1991). En la glándula pineal y cerebro también es posible su transformación en kinureninas, en presencia de la IDO (Figura 23) (Hirata y cols., 1974; Kennaway y cols., 1988), o de forma no enzimática mediante la reacción con $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2^-$ o con H_2O_2 (Hardeland y cols., 1993; Tan y cols., 1998a; 2000b). Entre las kinureninas derivadas destacan la

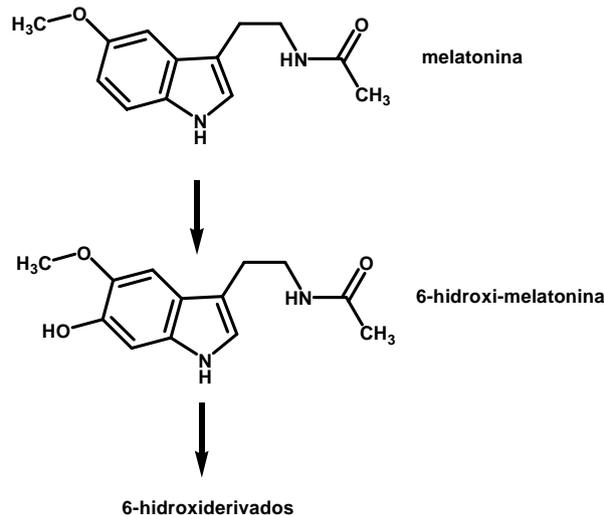


Figura 22. Ruta de degradación hepática de la melatonina.

N^1 -acetil- N^2 -formil-5-metoxikinurenamina (AFMK) y la N^1 -acetil-5-metoxikinurenamina (AMK), molécula estable que se elimina por la orina.

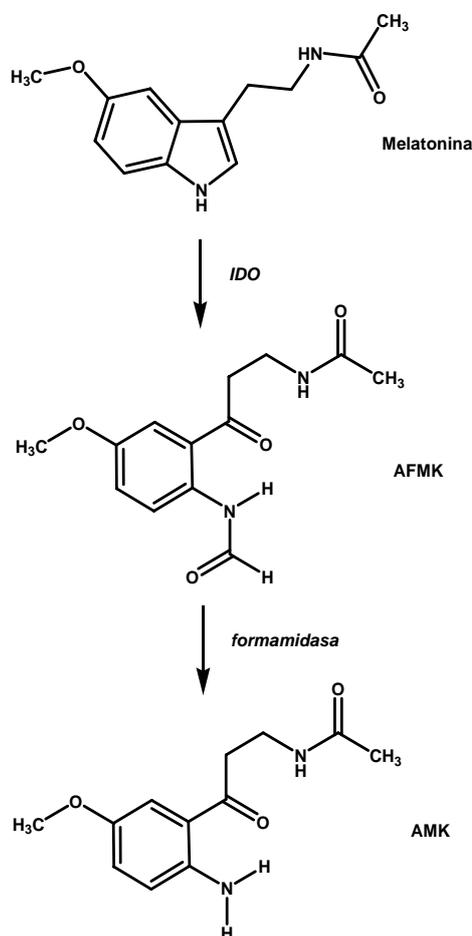


Figura 23. Ruta enzimática de degradación de melatonina en cerebro. IDO: indolamina 2,3-dioxigenasa; AFMK: N^1 -acetil- N^2 -formil-5-metoxikinurenamina; AMK: N^1 -acetil-5-metoxikinurenamina.

Se ha propuesto otra vía metabólica que consiste en la condensación de una indolamina y un aldehído, denominada ruta de Pictet-Spengler, que conduce a la formación de compuestos tricíclicos de la familia de las β -carbólinas (McIsaac y cols., 1972; Bosin y cols., 1983; Hardeland y cols., 1993; Callaway y cols., 1994; Pähkla y cols., 1996) (Figura 24). 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, 1984; Leino, 1984).

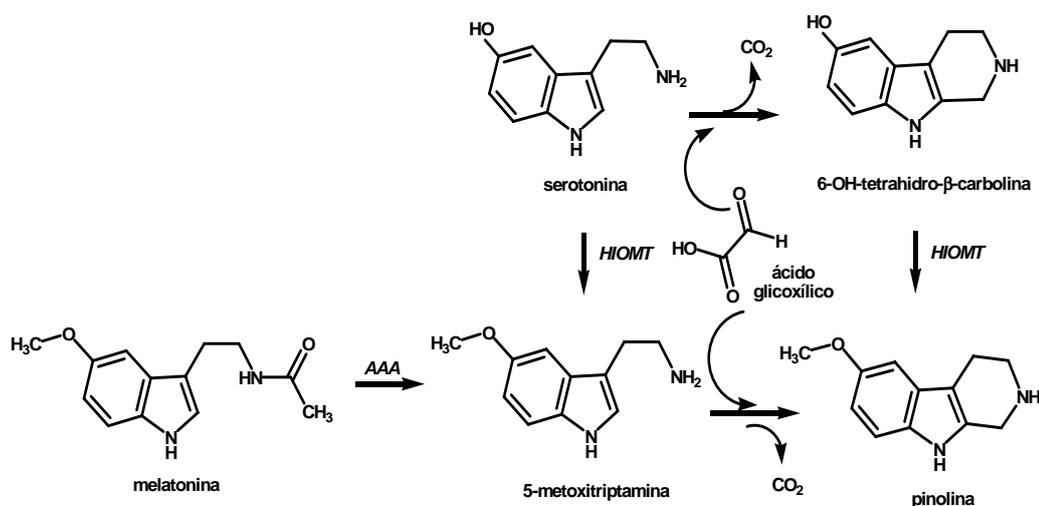


Figura 24. Vía de Pictet-Spengler para la síntesis de la β-carbolina pinolina a partir de melatonina. AAA: aril acil amidasa; HIOMT: hidroxindol-O-metil transferasa.

Actividad biológica de la melatonina

La actividad biológica de la melatonina se relaciona con el control de los ritmos circadianos, la regulación de la reproducción, la neuroinmunomodulación y la función antioxidante. Las fluctuaciones rítmicas de las concentraciones plasmáticas de melatonina regulan los biorritmos. En 1960 Lerner y Case atribuyeron a la melatonina algunos efectos relajantes (Lerner y Case, 1960) y en 1984 Lieberman y cols., propusieron un efecto hipnótico, debido a que reduce el tiempo de conciliación del sueño y mejora su calidad, estableciendo una relación entre melatonina y los ciclos sueño-vigilia (Lieberman y cols., 1984).

La glándula pineal es el principal órgano mediador de la respuesta fisiológica ante los ritmos circadianos y circanuales. La melatonina actúa como nexo de unión entre el medio ambiente y los sistemas reguladores nervioso y endocrino. Un ejemplo evidente del papel de la glándula pineal en la transmisión de información luminosa al sistema neuroendocrino lo da la reproducción estacional de muchas especies animales. Sincronizando la reproducción con la época del año más adecuada para la supervivencia de las crías, los individuos optimizan su capacidad adaptativa. Además, numerosas funciones endocrinas y del SNC tienen también un ritmo circanual, por ejemplo, el cambio de pelaje, la conducta y la función tiroidea (Tresguerres y cols., 1999). En estas

especies animales de reproducción estacional, también se ha descubierto una variación en el patrón de la secreción de dichas indolaminas con el estímulo lumínico (Grady y cols., 1984).

Se han descrito importantes alteraciones en el ritmo de secreción de melatonina durante los ciclos sueño-vigilia en personas que realizan viajes transatlánticos (Petrie y cols., 1989; Takahashi y cols., 2002), en las 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); además, se ha descrito un déficit de la concentración plasmática de melatonina en personas con desórdenes del estado anímico que cursan con alteraciones de los ritmos circadianos, como por ejemplo en la depresión endógena o en el síndrome depresivo estacional (Brown y cols., 1987; Blehar y Rosenthal, 1989). Cuando la melatonina es administrada a dosis elevadas produce hipotermia (Deacon y Arendt, 1995). Se cree que 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, 1991b).

La relación de la glándula pineal con el desarrollo sexual y los cambios gonadotróficos se estableció hace más de un siglo. En 1898, Heubner describió el caso clínico de un niño con pubertad precoz tras desarrollar un tumor en la glándula pineal (Heubner, 1898). En años posteriores, la relacionaron con la reproducción en mamíferos (Reiter y Fraschini, 1969; Reiter, 1973). 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 investigadores sostienen que la correlación inversa entre los niveles de melatonina circulante y la edad durante la infancia y adolescencia no está relacionada con el desarrollo sexual sino con la maduración corporal, lo que coincidiría con las observaciones que asocian 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 las estaciones (Reiter, 1991c), y en humanos que viven en latitudes altas están asociados a la duración del día (Martikainen y cols., 1985; Kivela y cols., 1988). Se ha sugerido que la disminución de los niveles de melatonina con la edad, pudiera relacionarse con el aumento de la secreción de la hormona folículo estimulante que se observa en la mujer durante la menopausia (Vakkuri y cols., 1996; Reiter, 1998a). La administración de melatonina modula la actividad del eje gonadal a diferentes niveles, incluyendo la secreción hipotalámica del 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 (Díaz y cols., 1999; Ianas y cols., 1999; Tresguerres y cols., 1999).

El sistema inmune y su relación con la melatonina es una línea de investigación en auge, en los últimos años. Tras someter varias generaciones de ratas a un estímulo luminoso continuo, se observó que después de la tercera ó cuarta generación aparecían problemas de crecimiento, déficit en la producción de anticuerpos y atrofia en tejido linfoide de timo y bazo (Maestroni y Pierpaoli, 1981). La melatonina estimuló la respuesta inmune mediante el aumento de producción de interleucina IL-4 en linfocitos T cooperadores de la médula ósea y las células madre de la línea granulocítica-macrofágica (Maestroni y cols., 1994a).

La melatonina protegió a las células de la médula ósea de la apoptosis inducida por sustancias citotóxicas (Maestroni y cols., 1994b) y a los timocitos de la apoptosis inducida por glucocorticoides (Sáinz y cols., 1999). Esta protección se confirmó con el descubrimiento de receptores de melatonina de alta afinidad en linfocitos T_{CD4} (González-Haba y cols., 1995). También se ha descrito que estimula la secreción de interleucina (IL)-1, IL-6, interferón (INF) γ (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 el INF α por los linfocitos (García-Maurino y cols., 1998).

En 1998, Conti y Maestroni concluyeron que la melatonina, por su capacidad de promover la formación de IL-2, reduce el crecimiento tumoral, de forma que en pacientes sometidos a inmunoterapia tumoral con IL-2, la administración conjunta de ésta con melatonina, disminuye la cantidad de IL-2 necesaria y reduce los efectos secundarios que esta citocina produce en el organismo (Conti y Maestroni, 1998).

En los últimos años se ha descrito ampliamente la función antioxidante de la melatonina, función que será tratada más adelante.

Mecanismos de acción de la melatonina

Al haber sido considerada como una hormona, las funciones de la melatonina, principalmente las relacionadas con el control de los biorritmos y con la reproducción, se intentaron explicar a través de su interacción con receptores de membrana. Sin embargo, en estudios posteriores se describieron funciones independientes de receptores de membrana. Así por ejemplo, se demostró que la melatonina es un potente depurador de radicales libres (Tan y cols., 1993; Reiter y cols., 1994), se han caracterizado receptores nucleares en órganos periféricos (Acuña-Castroviejo y cols., 1993b; Becker-André y cols., 1994; Hirose y cols., 1994) y en SNC (Acuña-Castroviejo y cols., 1993b; Giguere y cols., 1994; Carlberg y Wiesenber, 1995), y se ha demostrado su capacidad 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). Por tanto, los mecanismos de acción de la melatonina se pueden dividir en dos grupos: aquéllos que están mediados por su unión a un receptor, de membrana o nuclear, y aquéllos que se realizan independientemente de un receptor, como la interacción con proteínas intracelulares y la actividad antioxidante.

Mecanismos mediados por receptor de membrana

Mediante técnicas de autorradiografía y de unión de ligando utilizando 2-¹²⁵I-melatonina, se han identificado receptores de membrana (Dubocovich y Takahashi, 1987; Vanecek y cols., 1987; Weaver y cols., 1988; Williams y Morgan, 1988). El receptor de la melatonina es una proteína constituida por 420 aminoácidos, de peso

molecular 47.424 D y cuenta con 7 dominios transmembrana hidrofóbicos, receptor “serpentina” o 7DTM (Ebisawa y cols., 1994) (Figura 25). Está glicado en el extremo amino terminal, con una secuencia consenso para N-glicación, característica común a todos los receptores acoplados a proteínas G (Probst y cols., 1992). En su extremo carboxilo terminal posee varios sitios de fosforilación, implicados en su regulación (Sibley y cols., 1987). Es un receptor acoplado a proteínas G_i inhibitoras de la producción de AMPc (Abe y cols., 1969; Daniolos y cols., 1990).

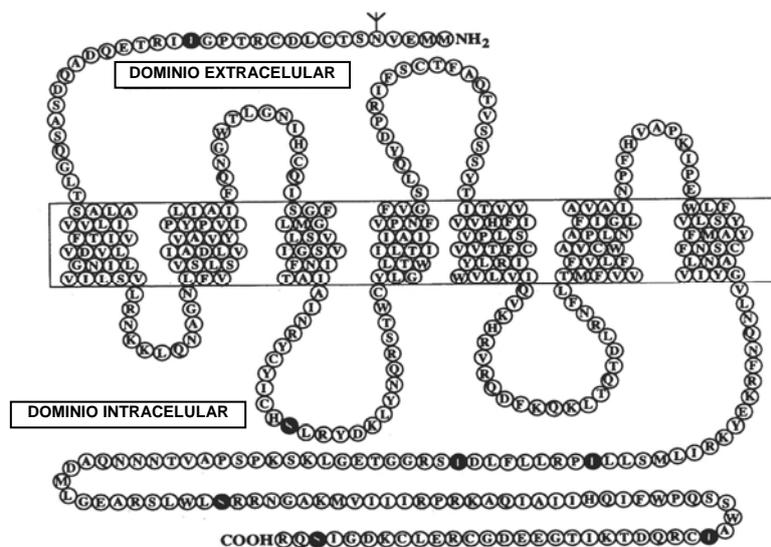


Figura 25. Estructura del receptor de melatonina clonado por Ebisawa y cols. en *Xenopus Laevis*. El receptor está glicado en el extremo amino terminal (Y). El extremo carboxilo terminal tiene varios sitios de fosforilación por proteína quinasa C (●).

En la unión de alta afinidad de la melatonina al receptor son esenciales sus grupos 5-metoxi y N-acetilo. Si se pierde el grupo 5-metoxi, la afinidad del receptor por el ligando disminuye, especialmente en el subtipo MT₂, lo que ha contribuido a encontrar antagonistas selectivos para él (Sugden y cols., 1997).

Aunque se han observado efectos sobre otros segundos mensajeros, en la mayoría de las células estudiadas, la melatonina inhibe la acumulación de AMPc. Son receptores acoplados a proteínas G, y se han descrito cinco tipos de proteínas de la familia G_i/G_o acopladas a seis efectores diferentes, adenilato ciclasa, fosfolipasa C, canales de potasio, canales de calcio, canales catiónicos sensibles a amiloride y canales de potasio sensibles a ATP y a toxina pertúsica (Reppert y cols., 1996). El receptor también puede estar acoplado a un efector, por ejemplo adenilato ciclasa, a través de la

subunidad α de la proteína G_i y con otro diferente, por ejemplo fosfolipasa C a través de la subunidad $\beta\gamma$ (Godson y Reppert, 1997). También es posible que esté acoplado a un único efector, que medie todos los efectos de la melatonina, inhibición de la acumulación de AMPc y GMPc, disminución de la concentración de Ca^{2+} intracelular e inhibición de la formación de diacilglicerol (Vanecek, 1998).

Entre las funciones de la melatonina en las que interviene el receptor de membrana destacan tanto la adaptación de los organismos a los ritmos circadianos, como la regulación de la liberación de dopamina en la retina (Redman y cols., 1983; Dubocovich y Takahashi, 1987). Utilizando ratones *knockout* respecto a mt_1 y antagonistas selectivos de MT_2 , se ha encontrado que el subtipo mt_1 media la inhibición neuronal aguda del núcleo supraquiasmático, por lo que es posible su intervención en algunos efectos circadianos y algunas acciones de la melatonina sobre la reproducción, mientras que MT_2 está implicado en cambios de fase en los ritmos circadianos (Liu y cols., 1997; Dubocovich y cols., 1998). En concordancia los compuestos que activan los receptores de membrana de melatonina pueden tener interés terapéutico en desórdenes del sueño y en la regulación de ritmos circadianos (Steinhilber y Carlberg, 1999).

Unión a receptores nucleares

La melatonina tiene funciones en el corazón y el tiroides, sin embargo no se han descrito receptores de membrana en estos tejidos (Buzzell y cols., 1989; Reiter, 1991a; Chen y cols., 1993). La existencia de receptores nucleares de melatonina fue sugerida, antes de su descubrimiento, tras inyectar melatonina marcada radioactivamente a ratas y observar la acumulación de radioactividad en la fracción nuclear de diferentes tejidos, planteándose que la melatonina podría actuar modificando la expresión génica en las células diana (Withyachumnarkul y cols., 1986). También se describió la presencia de melatonina en el núcleo de células de la retina y glándula pineal de palomas y ratas, lo que apoyaba la posibilidad de que actúe en la transcripción génica (Mennenga y cols., 1990; 1991).

En otra experiencia se observó que la melatonina inhibió la expresión de la 5-aminolevulinato sintasa en la glándula harderiana del hámster sirio (Menéndez-Peláez y cols., 1991). Posteriormente, con estudios de fraccionamiento subcelular, se aisló en la glándula harderiana, el hipotálamo y el hígado de rata, una proteína nuclear que podría

actuar como receptor nuclear para la melatonina (Menéndez-Peláez y cols., 1993); también detectaron melatonina en el núcleo celular de numerosos tejidos, incluyendo cerebro, glándula pineal, glándula harderiana, intestino, hígado, riñón y bazo de roedores y primates, comprobando que la melatonina aparecía asociada a la cromatina nuclear y no al nucleolo. Además se describió la unión específica de alta afinidad de melatonina en un purificado de núcleos de hepatocitos de rata, con un $K_d = 148-190$ pM, utilizando estudios de unión de ligando con ^{125}I -melatonina, sugiriendo que la unión específica se producía con la fracción proteica del núcleo, y no con el ADN (Acuña-Castroviejo y cols., 1993b; 1994). Estos resultados, sumados a los de Menéndez-Peláez y cols. pueden explicar efectos de melatonina, tales como la estimulación de enzimas antioxidantes, que pudieran estar mediados por la acción sobre un receptor nuclear modificando la expresión de dichas enzimas.

Los receptores nucleares son proteínas localizadas en el interior del núcleo, capaces de unirse a la región reguladora de algunos genes. Activados por unión a su ligando participarían en la regulación de la ácido ribonucleico (ARN) polimerasa II, necesaria para la expresión génica. Se conocen varias familias de receptores nucleares para hormonas esteroideas, tiroidea, vitamina D_3 y retinoides. Se denominan receptores huérfanos, porque cuando se descubrieron no se les pudo atribuir ninguna función (Laudet y cols., 1992). Se han clonado seis receptores nucleares de melatonina, RZR/ROR, denominados $\text{ROR}\alpha_1$, $\text{ROR}\alpha_2$, $\text{ROR}\alpha_3$, $\text{RZR}\alpha$, $\text{RZR}\beta$, $\text{RZR}\gamma$ (Becker-André y cols., 1993; Carlberg y cols., 1994; Giguere y cols., 1994; Hirose y cols., 1994). $\text{RZR}\alpha$ y $\text{ROR}\alpha$ son nombres diferentes para el mismo receptor nuclear, que presenta al menos cuatro isoformas distintas generadas por el procesamiento diferencial de un ARN mensajero precursor común (Giguere y cols., 1994) (Figura 26).

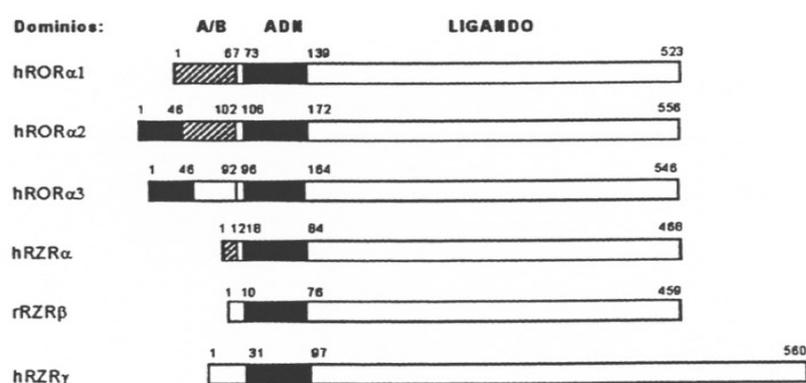


Figura 26. Familia de los receptores huérfanos RZR/ROR.

Interacción con proteínas intracelulares

Se ha descrito la interacción de la melatonina con proteínas citosólicas (Niles y cols., 1979), como calmodulina, calreticulina y PKC. La calmodulina es una proteína ubicua y multifuncional que posee cuatro sitios de unión para el Ca^{2+} , lo que le permite modular la actividad de muchas enzimas (Teo y Wang, 1973), como la fosfodiesterasa de los nucleótidos cíclicos y la adenilato ciclasa necesaria para la formación del AMPc intracelular (Cheung, 1970; Cheung y cols., 1975); además, interactúa con una gran cantidad de proteínas y péptidos citosólicos (Manalan y Klee, 1984), también puede interactuar con la Ca^{2+} -ATPasa de eritrocitos y sinaptosomas, la quinasa de la cadena ligera de miosina, la nicotin adenin dinucleótido oxidado quinasa, la fosforilasa quinasa, la $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPasa y la óxido nítrico sintasa; y por último, la calmodulina, se une a otras proteínas del citoesqueleto, como la proteína 2 asociada al microtúbulo, tubulina, miosina y troponina. En su interacción con la calmodulina, la melatonina inhibe la actividad fosfodiesterasa de forma concentración-dependiente, lo que permite modular directamente las señales intracelulares de calcio (Benítez-King y cols., 1991; 1993).

La calreticulina, proteína del retículo endoplasmático, también une calcio. Entre sus funciones se incluyen la actividad de los chaperones, la homeostasis intracelular del Ca^{2+} y la regulación de la adhesión intercelular por interacción con las integrinas de la membrana (Macías y cols., 2003). Se ha sugerido su localización citosólica (Jethmalani y cols., 1997; Yoon y cols., 2000; Holaska y cols., 2001) y nuclear (Roderick y cols., 1997), describiéndose 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 melatonina-calreticulina es altamente específica, con afinidad en el rango nanomolar (Macías y cols., 2003).

Finalmente, la PKC, es una quinasa de serina y treonina activada por el Ca^{2+} , fosforila diversos sustratos y modifica la estructura del citoesqueleto (Aderem, 1992); es activada por la melatonina de forma dependiente de Ca^{2+} (Benítez-King y Antón-Tay, 1996); otros derivados y precursores de melatonina, como serotonina, 6-hidroxi-melatonina y N-acetilserotonina, no tuvieron efecto sobre su actividad (Anton-Tay y cols., 1998).

Mecanismos antioxidantes de la melatonina

Esta acción ocurre en todos los compartimientos del organismo. En 1991 se realizó la primera observación sobre las propiedades antioxidantes de la melatonina (Ianas y cols., 1991), hecho confirmado en 1993, cuando demostraron que la melatonina neutraliza $\cdot\text{OH}$ (Tan y cols., 1993). Desde entonces, numerosos trabajos han demostrado su capacidad como molécula antioxidante al interactuar con especies reactivas dependientes del oxígeno. La melatonina es uno de los depuradores “scavenger” de radicales libres más potentes que se conocen (Reiter, 1998a; Reiter y cols., 1998). Actúa interaccionando directamente con H_2O_2 (Tan y cols., 2000a,b), $\cdot\text{OH}$ (Tan y cols., 2000b; 2003), $\text{NO}\cdot$ (Crespo y cols., 1999), ONOO^- (Zhang y cols., 1999), HClO (Marshall y cols., 1996; Dellegar y cols., 1999), $^1\text{O}_2$ (Cagnoli y cols., 1995) y posiblemente $\text{ROO}\cdot$ (Pieri y cols., 1994). Además de esta acción directa también ejerce una actividad antioxidante indirecta, estimulando enzimas antioxidantes como la GPx (Barlow-Walden y cols., 1995; Pablos y cols., 1995), la SOD (Antolin y cols., 1996) y la catalasa (Coto-Montes y Hardeland, 1999) e inhibiendo enzimas que generan radicales libres, como la 5-aminolevulinato sintasa (Antolin y cols., 1996) y la óxido nítrico sintasa (Pozo y cols., 1994, 1997).

La melatonina podría ser un protector celular conservado evolutivamente (Hardeland y cols., 1995; Reiter y cols., 1997b), hecho probable por su presencia en organismos unicelulares como *Gonyaulax Polyedra* (Poeggeler y Hardeland, 1994), o bacterias (Manchester y cols., 1995; Tilden y cols., 1997). También se han descrito sus funciones antioxidantes a nivel mitocondrial. Esto tiene especial interés porque esta organela es la primera fuente de radicales libres en las células eucariotas (Yu, 1994) y porque en ella se han detectado las mayores concentraciones intracelulares de melatonina, muy por encima de los niveles plasmáticos durante el pico nocturno (Acuña-Castroviejo y cols., 2002). Las acciones de la melatonina sobre la fisiología mitocondrial incluyen: 1) Su administración crónica incrementa el número de mitocondrias (Decker y Quay, 1982); 2) activa los complejos I y IV de la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias hepáticas y cerebrales (Martín y cols., 2000b); 3) aumenta la producción de ATP mitocondrial (Martín y cols., 2002) y 4) estabiliza la membrana mitocondrial frente a los EROS (Karbownik y cols., 2000).

Los efectos protectores de la melatonina en la mitocondria se evidencian en la inhibición de la peroxidación lipídica dependiente de NADPH en mitocondrias de placenta humana (Milczarek y cols., 2000), la reducción del daño mitocondrial inducido por lesión oxidativa en cerebro de rata (Wakatsuki y cols., 2001) y la prevención de las toxicidades del 1-metil-4-fenilpiridinio (Absi y cols., 2000), hidroperóxido de t-butilo (Martín y cols., 2000a) y cianuro (Yamamoto y Tang, 1996). Por último se puede destacar que la administración crónica de melatonina estimula la respiración mitocondrial en hígado y cerebro de ratones con envejecimiento acelerado (Okatani y cols., 2002a,b; 2003a,b).

Reacción con radical hidroxilo

La melatonina cede uno de sus electrones al $\cdot\text{OH}$, formándose el radical indolil, que es un metabolito menos reactivo electrónicamente; éste a su vez puede reaccionar con un $\cdot\text{O}_2^-$ formando el producto final, AFMK (Hardeland y cols., 1993). También es posible que el indolil formado reaccione con otro $\cdot\text{OH}$ y se forme una molécula más estable, la 3-hidroximelatonina cíclica (Figura 27), que se elimina por orina. En este proceso, una molécula de melatonina es capaz de depurar dos $\cdot\text{OH}$. Se ha propuesto utilizar la 3-hidroximelatonina como indicador de lesión oxidativa mediada por $\cdot\text{OH}$ (Roberts y cols., 1997; Tan y cols., 1998a; Stasica y cols., 2000).

Reacción con peróxido de hidrógeno

Cuando la melatonina actúa directamente sobre el H_2O_2 también produce AFMK (Tan y cols., 2000a), (Figura 28). El mecanismo de reacción es diferente si durante la reacción está presente un $^1\text{O}_2$, aunque el resultado final es el mismo. La AMFK por acción de la catalasa, puede ser metabolizada a AMK, la cual es excretada por orina.

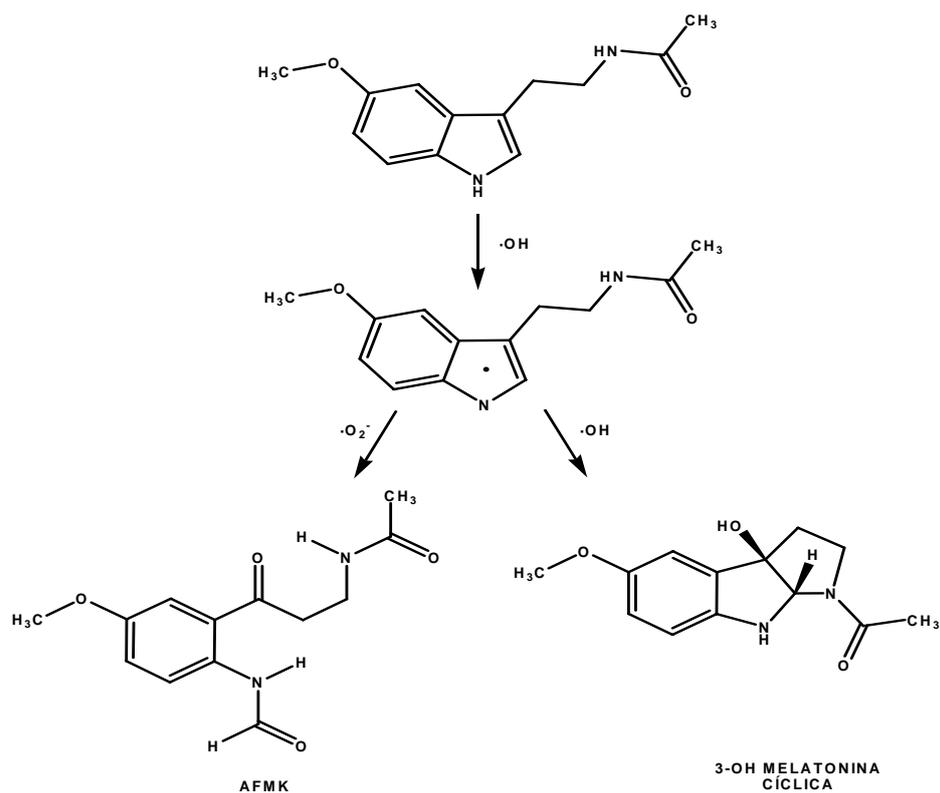


Figura 27. Interacción de la melatonina con los $\cdot\text{OH}$. AFMK: N^1 -acetil- N^2 -formil-5-metoxikinurenamina.

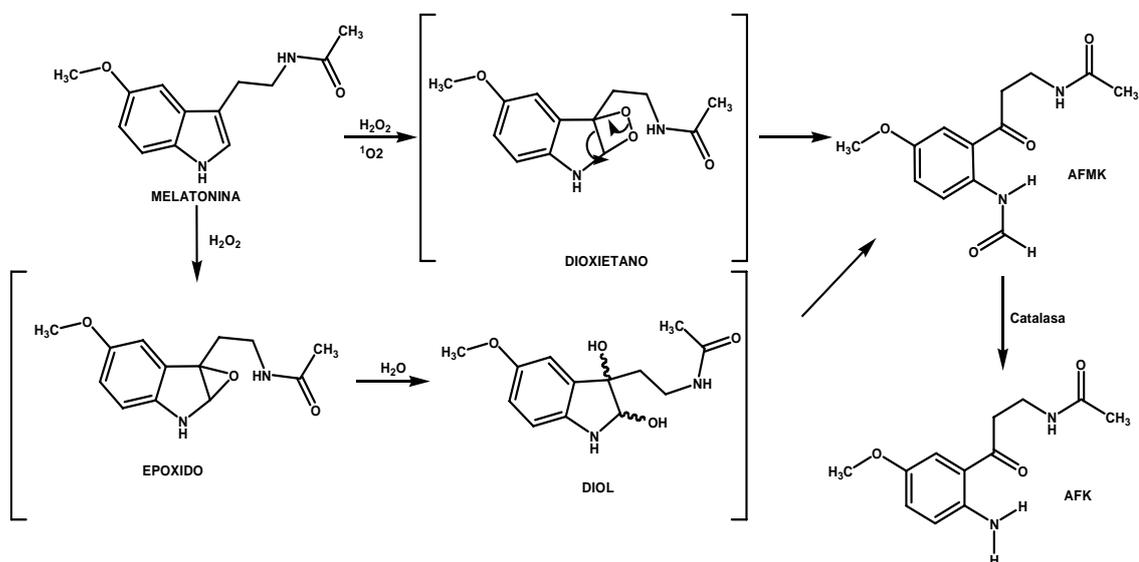


Figura 28. Reacción de una molécula de H_2O_2 con otra de melatonina. AFMK: N^1 -acetil- N^2 -formil-5-metoxikinurenamina; AMK: N^1 -acetil-5-metoxikinurenamina.

Reacción con peroxinitrito

La reacción directa de la melatonina con el ONOO^- , forma 6-hidroximelatonina, que también tiene propiedades antioxidantes (Qi y cols., 2000; Maharaj y cols., 2003a,b). Se sabe que el ONOO^- se descompone en presencia de CO_2 o proteínas que contengan el grupo hemo, como la hemoglobina. En cambio con iones bicarbonato, los productos son la 2-hidroximelatonina cíclica y la 3-hidroximelatonina cíclica; ésta última también es el producto de reacción de melatonina con $\cdot\text{OH}$, y se piensa que lo que sucede en realidad es que el ONOO^- se descompone para dar $\cdot\text{OH}$, y éste es el que reacciona con melatonina (Zhang y cols., 1998; 1999) (Figura 29).

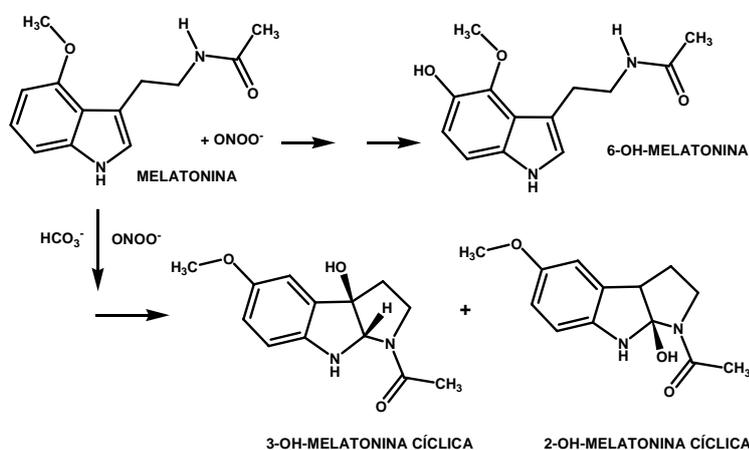


Figura 29. Formación de 6-hidroximelatonina por la interacción de melatonina con peroxinitrito (ONOO^-).

Reacción con ácido hipocloroso

La reacción del HClO con la melatonina produce 2-hidroximelatonina, a través de una reacción de adición nucleófila, en la que participan activamente las moléculas de agua, por lo que ocurre mucho más fácilmente en el citosol que en la membrana. Tras una serie de pasos intermedios se produce la 2-hidroximelatonina que se excreta por orina (Dellegar y cols., 1999) (Figura 30).

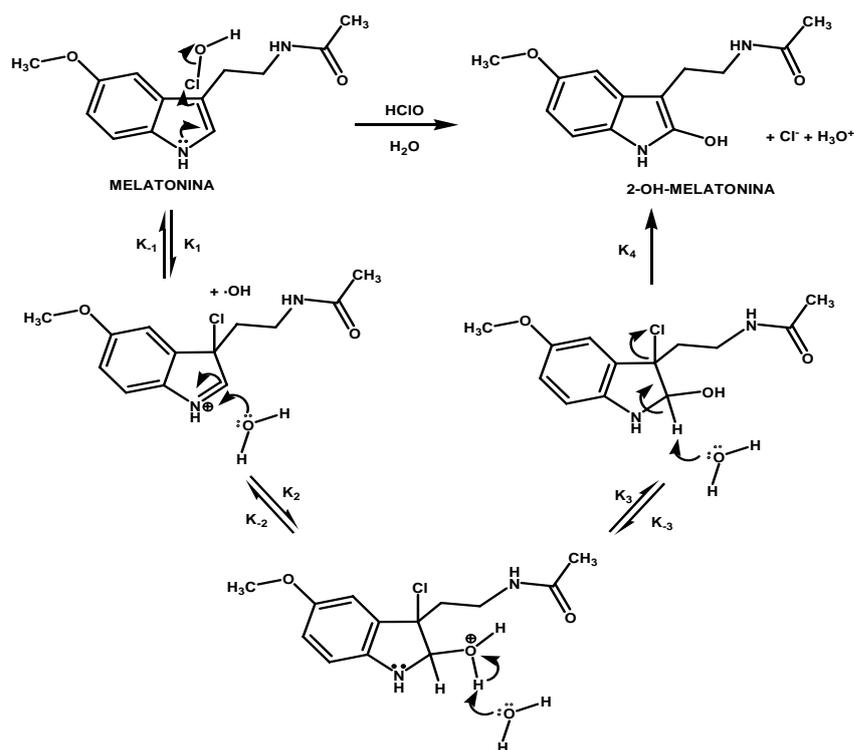


Figura 30. Reacción de la melatonina con el ácido hipocloroso.

Actividad antioxidante de otras indolaminas y β -carbolinas

Nuestro grupo de investigación, ha estudiado la actividad antioxidante de melatonina y de algunas otras indolaminas. Este trabajo de investigación es una expresión de nuestro interés en este tema. Aunque se ha descrito al triptófano como una molécula que promueve el estrés oxidativo en el córtex cerebral de rata (Feksa y cols., 2006), y que anomalías de su metabolismo en la vía de las kinureninas se relacionan con la enfermedad de Huntington (Stoy y cols., 2005), muchos de sus derivados pineales poseen actividad depuradora frente a los radicales libres.

De todos los metabolitos del triptófano en la glándula pineal, la melatonina ha sido la más estudiada en cuanto a su función antioxidante. En 1993 cuando se descubrió que depuraba los $\cdot\text{OH}$ (Tan y cols., 1993), se inició una carrera para definir su capacidad antioxidante, como lo evidencian los numerosos trabajos publicados en los últimos años por diferentes grupos de investigación en muchos países, utilizando modelos experimentales de generación de radicales libres muy variados.

En la actualidad se sabe que otros indoles poseen propiedades antioxidantes. El comportamiento antioxidante de la *5-metoxitriptamina* se conoce desde el citado trabajo de Tan y cols., donde demostraron una actividad del 40% respecto a la melatonina; estos resultados se confirmaron posteriormente cuando se atribuyó a la *5-metoxitriptamina* una potente actividad donadora de electrones (Poeggeler y cols., 1996) y se reforzó cuando se evaluó su actividad antioxidante frente a la hemólisis y la peroxidación lipídica de sinaptosomas y hepatocitos inducidas por radicales libres (Ng y cols., 2000).

Otra indolamina capaz de aumentar la supervivencia de cultivos neuronales expuestos a radicales libres es la *N-acetilserotonina*, precursor inmediato de melatonina en la vía metabólica del triptófano en la glándula pineal (Moosmann y cols., 1997; Lezoualc'h y cols., 1998), aunque también se ha aislado en otros tejidos como retina, tracto digestivo y ovarios (Itoh y cols., 1997). Tiene un efecto protector contra el daño inducido por toxinas en varios órganos, incluyendo la peroxidación lipídica en homogeneizados de retina (Longoni y cols., 1997; Bachurin y cols., 1999; Siu y cols., 1999; Wolfler y cols., 1999; Calvo y cols., 2001). Además, en el tejido hepático reduce la peroxidación lipídica y la rigidez de membrana causadas por FeCl_3 /adenosin difosfato (ADP)/NADPH (García y cols., 2001) y el α -naftilisotiocianato (Calvo y cols., 2001); y presenta un efecto protector de la carcinogénesis inducida por cromo (III) (Qi y cols., 2000).

Otro metabolito con propiedades antioxidantes es el *5-metoxitriptofol*. Su biosíntesis está catalizada por la MAO, alcohol deshidrogenasa e HIOMT (McIsaac y cols., 1965; Hardeland y cols., 1993). La actividad del *5-metoxitriptofol* se demostró al reducir la oxidación del 2,2'-azino-bis(ácido-3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfónico) (ABTS) por $\cdot\text{OH}$ (Poeggeler y cols., 1996), inhibir la peroxidación lipídica en sinaptosomas expuestos a hierro y ácido ascórbico o H_2O_2 (Ng y cols., 2000; Ortega-Gutiérrez y cols., 2002) y reducir la rigidez de membranas microsomaes hepáticas causada por los radicales libres (García y cols., 2000b).

Aunque no son indolaminas, algunas β -carbolinas, incluyendo la 6-metoxi-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina o *pinolina*, pueden formarse por condensación de indolaminas y aldehídos vía la reacción de Pictet-Spengler (Callaway y cols., 1994). Se

ha descrito que pinolina incrementa los niveles de serotonina en el cerebro, porque inhibe la MAO y reduce el consumo de serotonina en el SNC (Airaksinen y cols., 1978; Langer y cols., 1984). Además, se ha destacado su capacidad como antioxidante al reducir el estrés oxidativo por radicales libres en las membranas biológicas (Kawashima y cols., 1995; Pähkla y cols., 1998; Pless y cols., 1999). Aunque algunas β -carbolinas sean neurotoxinas, responsables de degeneración neuronal, hasta ahora todas las publicaciones coinciden en su potente actividad antioxidante, pudiendo actuar como un buen agente neuroprotector. Así, se ha demostrado que tienen mayor potencia antioxidante que la melatonina al estudiar la peroxidación lipídica tanto en homogeneizados de cerebro (Frederiksen y cols., 1998; Piñol-Ripoll y cols., 2006) y sinaptosomas (Pless y cols., 1999; Siu y cols., 1999; García y cols., 2000a; Ortega-Gutiérrez y cols., 2002; Millán-Plano y cols., 2003), como en membranas microsómicas hepáticas, inducida por óxido nítrico, H_2O_2 , y $FeCl_3/ADP/NADPH$ (García y cols., 1999). Además disminuyen los niveles de oxidación del ADN por el cromo (III) al reducir la concentración de 8-hidroxideoxiguanosina, una base mutada en presencia de radicales libres (Qi y cols., 2000).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Justificación y planteamiento

Entre los productos sintetizados en la glándula pineal a partir del triptófano se incluyen muchas indolaminas y β -carbolinas derivadas. Son numerosos los trabajos científicos que demuestran la potente actividad antioxidante de la melatonina tanto *in vitro* como *in vivo* y en diversos modelos experimentales, pero en la actualidad hay muy pocas investigaciones que evalúen la capacidad antioxidante de otras moléculas pineales. Estos trabajos además analizan sólo uno o muy pocos derivados pineales y utilizan muestras biológicas diversas y distintos modelos generadores de estrés oxidativo.

El diseño experimental de este trabajo de investigación, permite profundizar de manera sistemática en el conocimiento de las propiedades antioxidantes de diez derivados del triptófano presentes en la glándula pineal de mamífero. Se estudia en primer lugar el *triptófano* y a continuación se valora el efecto sobre su actividad antioxidante de la inclusión de un resto hidroxilo en su estructura, el *5-hidroxitriptófano*. En segundo lugar estudiamos tres moléculas, la *triptamina*, cuya estructura química es la base común para otras dos indolaminas, la *N-acetilserotonina* y la *5-metoxitriptamina*, ambas precursores inmediatos de la melatonina. En tercer lugar, se investigó la actividad antioxidante de la *melatonina*, principal producto de secreción de la glándula pineal. En cuarto lugar se estudiaron el *ácido 5-metoxiindolacético* y el *5-metoxitriptofol*, indoles finales de la vía de la MAO. Finalmente, se evaluaron las actividades antioxidantes de dos de las β -carbolinas aisladas en la glándula pineal, la *triptolina* y la *6-metoxitriptolina* o *pinolina*.

Con la finalidad de establecer los parámetros de comparación de los resultados de las diferentes indolaminas, se utilizó un único modelo productor de radicales libres que se basó en la generación de $\cdot\text{OH}$. Para ello se emplearon cloruro férrico y ácido ascórbico, siendo este último un agente reductor que convierte el Fe (III) en Fe (II), potenciando la reacción de Fenton. Todos los experimentos se realizaron con el mismo tipo de tejido, membranas celulares aisladas de hepatocitos de rata, elección determinada por su elevada tasa metabólica y por tanto su sobreexposición al ataque mediado por radicales libres, así como por la facilidad de extracción del tejido y el volumen de muestra obtenida de cada animal. Se utilizaron membranas celulares

aisladas, para reducir las interferencias en el modelo oxidativo ocasionadas por la presencia de oxidantes y/o antioxidantes endógenos, que pudieran estar presentes de haberse trabajado con homogeneizados.

Para evaluar la actividad antioxidante de todas las indolaminas arriba mencionadas, decidimos valorar un parámetro dinámico como es la fluidez de membrana. Éste refleja el grado de movilidad de los fosfolípidos de la bicapa y sus niveles óptimos se asocian con la homeostasis de numerosas funciones celulares. Está bien establecido que el daño oxidativo mediado por radicales libres conlleva la pérdida de la fluidez, rigidez, en las membranas biológicas. Dado que éstas están constituidas casi exclusivamente por lípidos y proteínas, elegimos dos indicadores muy específicos de lesión oxidativa. Para los primeros constituyentes, los lípidos, determinamos las concentraciones de MDA+4-HDA. Para las proteínas estudiamos la incorporación de restos carbonilo en su estructura. De esta manera podíamos establecer relaciones entre la rigidez provocada por el modelo oxidativo, con el grado de lesión en los lípidos y proteínas, así como los efectos antioxidantes más o menos eficientes que ofrecieron las indolaminas estudiadas.

Por último estudiamos bajo las mismas condiciones experimentales, los efectos antioxidantes de todas las indolaminas y β -carbolinas en ausencia del modelo generador de radicales libres. El objetivo último fue el conocer si alguna de la respuesta pro o antioxidante detectada para estos derivados del triptófano, pudo deberse a la interacción directa de la indolamina sobre los lípidos de la bicapa, influenciando de esa forma la dinámica de los fosfolípidos en condiciones basales de nivel oxidativo.

Objetivos específicos

Primero: Establecer las condiciones adecuadas para el modelo oxidativo constituido por cloruro férrico (FeCl_3) y ácido ascórbico, utilizado en membranas de hepatocitos de rata, determinando el tiempo óptimo de incubación para inducir significativamente la oxidación de lípidos y proteínas.

Segundo: Cuantificar el daño a lípidos y proteínas en presencia y ausencia del modelo oxidativo, determinando los valores de fluidez en las membranas aisladas de

hígado de rata, así como los aumentos de MDA+4-HDA y de restos carbonilo.

Tercero: Determinar los posibles efectos protectores del triptófano sobre la fluidez y la oxidación de lípidos y proteínas de membranas de hepatocitos inducida por cloruro férrico y ácido ascórbico, y compararlos con su derivado 5-hidroxilado.

Cuarto: Valorar la actividad antioxidante de dos precursores de la melatonina, 5-metoxitriptamina y N-acetilserotonina, y de su estructura base común la triptamina, comparando sus potencias antioxidantes frente al estrés oxidativo de lípidos y proteínas de membrana de hepatocito.

Quinto: Estudiar los efectos antioxidantes de la melatonina, sobre la fluidez y la oxidación de lípidos y proteínas de membranas celulares hepáticas inducida por FeCl₃ y ácido ascórbico.

Sexto: Comparar las potencias antioxidantes del ácido 5-metoxiindolacético y del 5-metoxitriptofol, metoxiindolaminas sintetizadas por la glándula pineal en la vía de la MAO.

Séptimo: Analizar los efectos de dos β-carbolinas pineales, triptolina y pinolina, sobre el estrés oxidativo inducido por hierro reducido en membranas de hepatocitos.

Octavo: Obtener, comparar y evaluar las potencias antioxidantes de todas las moléculas estudiadas, calculando sus respectivas IC₅₀ y valorando su función protectora frente a la oxidación de lípidos y proteínas de membrana.

Noveno: Estudiar los efectos de todas las indolaminas y las β-carbolinas sobre la fluidez de la membrana y los indicadores de lesión oxidativa de sus constituyentes en condiciones basales de inducción de estrés oxidativo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron un total de 200 animales: ratas macho de la raza Sprague-Dawley, con pesos de 220 ± 20 gr; adquiridos en Harlan-Ibérica®. Tras su recepción, se estabularon durante dos semanas en el animalario del Área de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza, a razón de tres animales en cada jaula de plexiglás. Recibieron agua y comida *ad libitum*, con dieta de mantenimiento para roedores adquirida en Harlan-Ibérica® tipo RMM. La temperatura ambiente del animalario fue de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ y se mantuvo un ciclo de luz/oscuridad de 14/10 horas. Las condiciones de estabulación cumplieron las directrices relativas al alojamiento y cuidados de los animales de experimentación, anexo II al artículo 5 de la Directiva del Consejo de la Comunidad Económica Europea de 24 de Noviembre de 1986 (86/609/CEE), Real Decreto 1201/2005 y Ley 11/2003 del Gobierno de Aragón, respecto a la protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Los animales fueron perfundidos intravascularmente con suero fisiológico (0,9% NaCl) a 4°C , se sacrificaron anestesiados con tiopental (50 mg/kg), procediéndose lo más rápidamente posible a la extracción del hígado que de inmediato fue lavado con solución salina fisiológica, conservándose a -80°C para proceder posteriormente a la obtención de membranas, que también se preservaron a -80°C hasta el día del experimento.

Reactivos

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

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

- Ácido ascórbico (Sigma-Aldrich®, A-7506)
- Ácido clorhídrico (HCl) 37 % (Panreac®, 131020)
- Ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazina-1-etanosulfónico (HEPES) (Sigma-Aldrich®, H-3375)
- Ácido metanilsulfónico (Sigma-Aldrich®, 47135-6)
- Ácido 5-metoxiindol-3-acético (Sigma-Aldrich®, M-225)
- Albúmina bovina (Sigma-Aldrich®, A-7848)
- Cloruro potásico (KCl) (Sigma-Aldrich®, P-9333)
- 2,4-Dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Sigma-Aldrich®, D-2630)
- Etanol absoluto (Panreac®, 131086)
- Etilendiaminotetraacético disódico (EDTA-Na₂) (Panreac®, 131669)
- FeCl₃ (Sigma-Aldrich®, F-2877)
- Guanidina (Sigma-Aldrich®, 17725-3)
- 5-Hidroxitriptófano (Sigma-Aldrich®, H-9772)
- Melatonina (Sigma-Aldrich®, M-5250)
- Metanol (Panreac®, 131091)
- 1-Metil-2-fenilindol (Sigma-Aldrich®, M-1164)
- 5-Metoxitriptamina (Sigma-Aldrich®, M-6628)
- 5-Metoxitriptofol (Sigma-Aldrich®, M-4126)
- N-acetil-5-hidroxitriptamina (Sigma-Aldrich®, A-1824)
- NaOH (Merck®, 6498)
- Noreleagnina o triptolina (Sigma-Aldrich®, 30,076-4)
- Pinolina (Sigma-Aldrich®, 29,155-2)
- Reactivo de Bradford (Bio-rad®, 500-0006)
- Tetrahidrofurano (THF) (Sigma-Aldrich, 27038-5)

- 1,1,3,3-Tetrametoxipropano (Sigma-Aldrich®, T-1642)
- 1-(4-trimetilamoniofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno-*p*-tolueno-sulfonato (TMA-DPH) (Molecular Probes®, T-204)
- Triptamina (Sigma-Aldrich®, T-2891)
- Triptófano (Sigma-Aldrich®, T-0254)
- Tris[hidrometil]aminometano (TRIS) (Sigma-Aldrich®, T-1503)

El ácido ascórbico, el FeCl₃, el triptófano, el 5-hidroxitriptófano, el 5-metoxitriptofol, la N-acetil-5-hidroxitriptamina y el 1,1,3,3-tetrametoxipropano, se disolvieron en una disolución de tampón TRIS 50 mM (pH=7,40). El ácido 5-metoxiindol-3-acético, la 5-metoxitriptamina, la triptamina, la triptolina y la pinolina, se disolvieron en metanol al 2% en TRIS. La melatonina se disolvió en TRIS 50 mM con etanol al 2%. Todas estas disoluciones se prepararon el mismo día del experimento, justo antes de ser utilizadas.

La albúmina, el EDTA-Na₂, la guanidina, la dinitrofenilhidrazina y el 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 oscuridad en una nevera a 4°C. La DNPH se disolvió en agua ultrapura, y se almacenó en una botella de vidrio color ámbar en oscuridad a temperatura ambiente. El 1-metil-2-fenilindol se disolvió en acetonitrilo y se conservó en nevera a 4°C. El TMA-DPH se disolvió en una disolución de THF y agua ultrapura 1/1, v/v. Esta disolución se preparó el mismo día de la determinación, justo antes de ser utilizada.

Material de laboratorio

El estudio presentado se ejecutó íntegramente en los laboratorios del Área de Fisiología del Departamento de Farmacología y Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza. Se utilizaron cuatro laboratorios, equipados con el siguiente utillaje:

- Agitadores Vórtex Velp Scientifica® zx³
- Agitadores Vórtex Heidolph® REAX 2000
- Balanza de precisión Cobos® CBH-300J
- Balanza de precisión Cobos® A-220 CB
- Baño termostatzado con agitación Bunsen® BTG-1
- Baño recirculador Selecta-Frigoterm
- 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
- Dos juegos de pipetas de precisión Gilson®: P-20, P-200, P-1000 y P-5000 y un juego de pipetas Eppendorf®: 0,1-2,5; 2-20; 10-100; 50-250 y 200-1000
- Espectrofotómetro Beckman-Coulter® DU800 con cubetas de plástico desechables para medir en el rango visible y de cuarzo para medir en el rango ultravioleta
- Espectroscopio de fluorescencia Perkin-Elmer LS-55 equipado con un accesorio de polarización con cubetas de cuarzo, y un accesorio de microagitación de la muestra presente en la cubeta
- Homogeneizador de teflón acoplado a un rotor Heidolph® RZR 2020
- Homogeneizador Ultra-turrax Janke & Kunkel® T25
- pHmetro Crison® micro pH 2001 con sonda de temperatura
- Material quirúrgico diverso: pinzas, tijeras, separadores, bisturí, etc
- Nevera (-20 °C). Liebherr Premium
- Sistema de agua destilada de Millipore® MilliRX
- Sistema de agua ultrapura de Millipore® MilliQ
- Máquina preparadora de escamas de hielo
- Ultracongelador (-80 °C). Ing. Climas. CVF 350/80

Diseño experimental

El daño oxidativo a las membranas hepáticas se indujo utilizando un sistema generador de $\cdot\text{OH}$, para lo cual se consideró como punto inicial los procedimientos propuestos por Wong (Wong y cols., 1981) y Sahu (Sahu y Washington, 1992). El modelo combinó el ácido ascórbico y el hierro en forma de FeCl_3 . Ambos se diluyeron en buffer TRIS 50 mM pH=7,40 con una concentración final de 0,1 mM. El ácido ascórbico reduce el hierro férrico a ferroso, lo que acelera la producción de $\cdot\text{OH}$ mediante la reacción de Fenton.

Se utilizaron membranas purificadas, aisladas a partir de los homogeneizados del tejido hepático de rata. Estas membranas se suspendieron en buffer TRIS 50 mM ajustado a un pH de 7,40. En todos los experimentos se utilizó una cantidad de membranas equivalente a 0,5 mg/mL de proteína total de membrana. La duración de la incubación con el ácido ascórbico y el FeCl_3 fue determinada mediante cinéticas de tiempo en las que se valoró la formación de MDA+4-HDA, restos carbonilo y el efecto sobre la fluidez de membrana, a los 0, 10, 20, 30, 60 y 120 minutos de iniciada la exposición al sistema oxidativo.

Las reacciones de oxidación de las membranas se detuvieron mediante la adición de EDTA 2 mM, un quelante de metales. Éste se une al hierro que fue añadido al medio de incubación para inducir el daño oxidativo. Para determinar la inhibición de la melatonina y sus metabolitos precursores o derivados sobre la formación de MDA+4-HDA, restos carbonilo y rigidez de membrana inducidas por el hierro, se incluyeron en cada experimento muestras de membranas en presencia o ausencia de ácido ascórbico y FeCl_3 , y distintas concentraciones de la indolamina estudiada. Todos los experimentos se repitieron al menos 5 veces.

Métodos analíticos

Aislamiento de membranas de hepatocitos

Previo a los ensayos para determinar las concentraciones de los parámetros que indican daño oxidativo a las membranas de hepatocito, fue necesario proceder a su aislamiento. Para ello, el tejido hepático se homogeneizó en HEPES 20 mM / KCl 140 mM (pH=7,4) en una proporción de 1:7 (p/v). El homogeneizado resultante fue centrifugado a 1.000 xg durante 10 minutos a 4°C, con la finalidad de eliminar los restos tisulares sin homogeneizar y los núcleos celulares. El sobrenadante se centrifugó a 50.000 xg durante 20 minutos a 4°C. El precipitado obtenido, integrado por membranas y mitocondrias, se resuspendió 1/10 (v/v) en el mismo tampón y fue centrifugado a 10.000 xg durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante, que contenía sólo las membranas celulares, se recentrifugó a 50.000 xg durante 20 minutos a 4°C. El sedimento final, se suspendió 1/2 v/v en una solución tampón de TRIS 50 mM (pH = 7,40) y se conservó por congelación a -80°C hasta ser utilizado el día del experimento (Escames y cols., 2001; Millán-Plano y cols., 2003). De la suspensión final de las membranas se tomaron varias alícuotas para determinar la concentración de proteínas totales. La Figura 31 ilustra el proceso de aislamiento.

Cuantificación de proteínas totales

La concentración de proteínas en las membranas se determinó tras el aislamiento con objeto de partir de cantidades de muestras idénticas durante el tratamiento experimental. Las proteínas se determinaron por el método de Bradford (Bradford, 1976). El fundamento se basa en la adición de un colorante ácido, el reactivo de Bradford, a la suspensión de proteína problema y la medición espectrofotométrica del producto formado que tiene máxima absorbancia a 595 nm. El reactivo de Bradford es una disolución de un colorante para proteínas en ácido fosfórico y metanol. Las absorbancias de las muestras se compararon con una curva de albúmina bovina sérica, y a continuación se realizó el cálculo de las concentraciones de proteínas mediante el programa Assay 4.0 (Biosoft®). Los resultados se expresaron en mg/mL. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

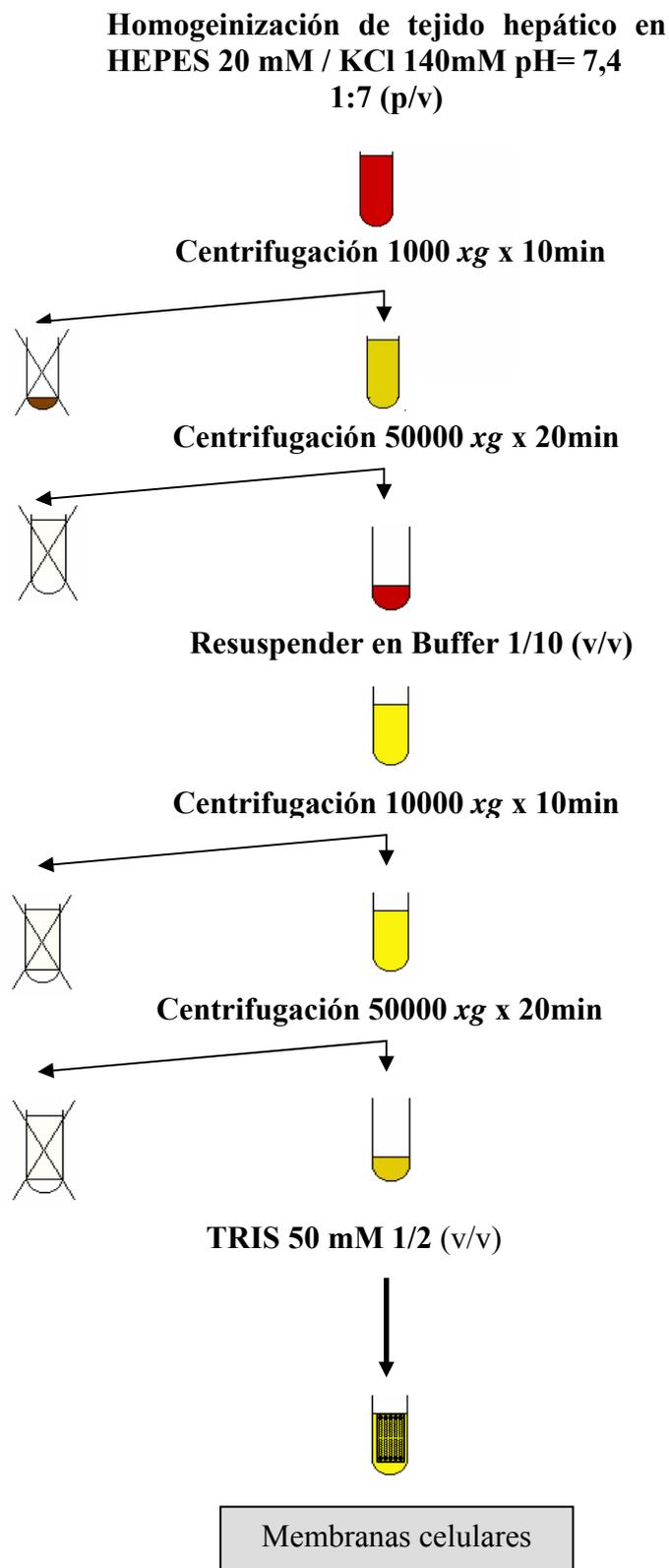


Figura 31. Aislamiento de membranas de hepatocitos. Método basado en la centrifugación a diferentes velocidades, lo que permite separar unas organelas de otras.

Protocolo:

1. Dispensar 4 μL de suspensión de membranas celulares
2. Añadir 796 μL de buffer TRIS 50 mM
3. Añadir 200 μL de reactivo de Bradford. Agitar
4. Incubación 10 minutos a temperatura ambiente
5. Lectura en espectrofotómetro a 595 nm

Valoración de la concentración de MDA+4-HDA

Para determinar el grado de peroxidación de los lípidos de membrana de hepatocitos, se cuantificaron las concentraciones de MDA+4-HDA (Valenzuela, 1991). Se determinó mediante una técnica analítica basada en la colorimetría (Esterbauer y Cheeseman, 1990; Escames y cols., 1997; Gawel y cols., 2004). Éste método consiste en la reacción del 1-metil-2-fenilindol disuelto en acetonitrilo y metanol en una proporción 3/1 (v/v), con el MDA y 4-HDA a 45°C. Una molécula de MDA o 4-HDA se une a dos moléculas de 1-metil-2-fenilindol, formándose un complejo coloreado estable que presenta una absorbancia máxima a 586 nm (Figura 32).

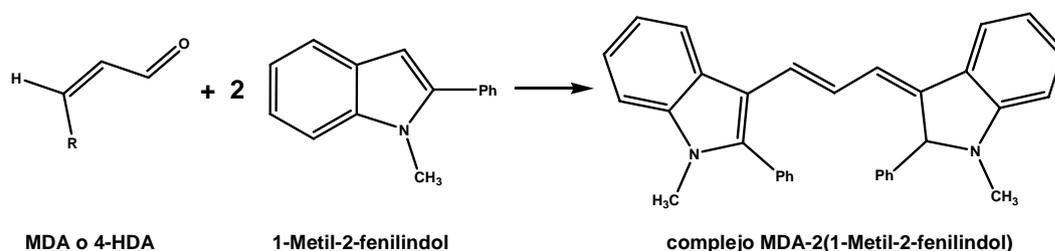


Figura 32. Fundamento de la técnica de cuantificación de MDA+4-HDA.

R: OH en caso del MDA e hidroxialquilo en caso de 4-HDA.

Los niveles de MDA+4-HDA se cuantificaron utilizando como estándar una curva patrón de 1,1,3,3-tetrametoxipropano. Los resultados se expresaron en nmoles/mg de proteína de membrana de hepatocito. Para calcular las concentraciones de MDA+4-HDA se utilizó el programa Assay 4.0 (Biosoft®). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Protocolo analítico:

1. Centrifugar la suspensión de membranas a 3.000 *xg* durante 10 minutos a 4°C
2. Dispensar 200 µL del sobrenadante y añadir 650 µL de una disolución 3:1 (v/v) de 1-metil-2-fenilindol 10,3 mM en acetonitrilo y metanol. Agitar
3. Añadir 150 µL de ácido metanilsulfónico 15,4 M. Agitar
4. Incubar a 45°C durante 40 minutos
5. Centrifugar a 3.000 *xg* durante 10 minutos a 4°C
6. Medir la absorbancia en un espectrofotómetro a 586 nm a temperatura ambiente

Valoración de la concentración de restos carbonilo

Para cuantificar el daño oxidativo a las proteínas de membrana, se determinó la concentración de restos carbonilo proteicos, siguiendo el protocolo descrito por Levine y cols. con ligeras variaciones (Davies y Goldberg, 1987; Levine y cols., 1990; 1994; Dean y cols., 1997). El fundamento de esta técnica es la reacción de los restos carbonilo de las proteínas con la DNPH obteniéndose un producto de condensación que se valora midiendo su máxima absorción en el rango 360 - 390 nm (14).

Protocolo analítico:

1. Dispensar 100 µL de TRIS 50 mM en 1 mL de suspensión de membranas que contienen 0,5 mg de proteínas
2. Añadir 200 µL de DNPH 10 mM. Agitar
3. Incubar con agitación, a 37°C durante 60 minutos
4. Añadir 325 µL de ácido tricloroacético al 50%. Agitar
5. Incubar durante 10 minutos a 4°C
6. Centrifugar a 3.000 *xg* durante 10 minutos a 4°C
7. Añadir 1 mL de una disolución de etanol y acetato de etilo 1/1, v/v. Agitar
8. Centrifugar a 11.000 *xg* durante 3 minutos a 4°C

9. Resuspender el *pellet* con 1 mL de etanol:acetato de etilo 1:1, v:v
10. Recentrifugar a 11.000 xg durante 3 minutos a 4°C
11. Repetir los pasos 9-10
12. Disolver el *pellet* en 700 µL de guanidina-HCl 6 M. Agitar
13. Incubar con agitación, a 37°C durante 15 minutos
14. Centrifugar a 12.000 xg durante 10 minutos a 4°C
15. Leer la absorbancia del sobrenadante a 375 nm a temperatura ambiente

Para la lectura en el espectrofotómetro se utilizó como blanco de reactivos una disolución de guanidina-HCl 6 M. Los valores de carbonilo se obtuvieron utilizando el coeficiente de absorción molar de la DNPH ($\epsilon = 22.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), mediante la ley de Beer-Lambert (15), siendo “l” la longitud de paso de luz por la cubeta de medida, que es 1 cm, y “c” la concentración que se desea calcular.

$$\text{Absorbancia} = \epsilon \cdot l \cdot c \quad (15)$$

Los resultados se expresaron en nmoles/mg de proteínas totales de membranas. Todos los valores obtenidos se calcularon a partir del promedio de dos determinaciones independientes.

Determinación de la fluidez de membrana

La fluidez de las membranas de hepatocitos se monitorizó utilizando espectroscopía de fluorescencia (Yu y cols., 1992), basada en la inclusión de una molécula marcadora en las membranas, que se intercala entre los fosfolípidos reflejando de forma indirecta sus movimientos (Figura 33), cuando ésta es iluminada por luz polarizada emite una señal fluorescente (Zimmer y cols., 1993). Las membranas se incubaron a 37°C durante 30 minutos con TMA-DPH 66,7 nM, manteniendo una agitación constante.

Protocolo analítico:

1. Dispensar 1992 µL de TRIS 50 mM en 1 mL de suspensión de membranas que contienen 0,5 mg de proteínas totales/mL
2. Añadir 8 µL de TMA-DPH 66,7 nM. Agitar vigorosamente

3. Incubar a 37°C durante 30 minutos
4. Colocar en baño de agua a temperatura ambiente
5. Agitar para resuspender las membranas
6. Leer la polarización en el espectrofotómetro de fluorescencia a 360 nm de excitación y 430 de emisión

Existe una relación inversa entre la polarización (P) (16) y la fluidez de membrana, por lo que esta última se expresó como el inverso de P (Yu y cols., 1992; Lee y cols., 1999), calculada según la siguiente expresión:

$$P = \frac{I_{Vv} - GI_{Vh}}{I_{Vv} + GI_{Vh}} \quad (16)$$

Donde I es la intensidad de la luz polarizada emitida en vertical y registrada por un detector orientado en paralelo (Vv) o perpendicular (Vh) al plano de excitación, y G es un factor de corrección del sistema óptico. El resultado se calculó por la media aritmética de 30 mediciones independientes.

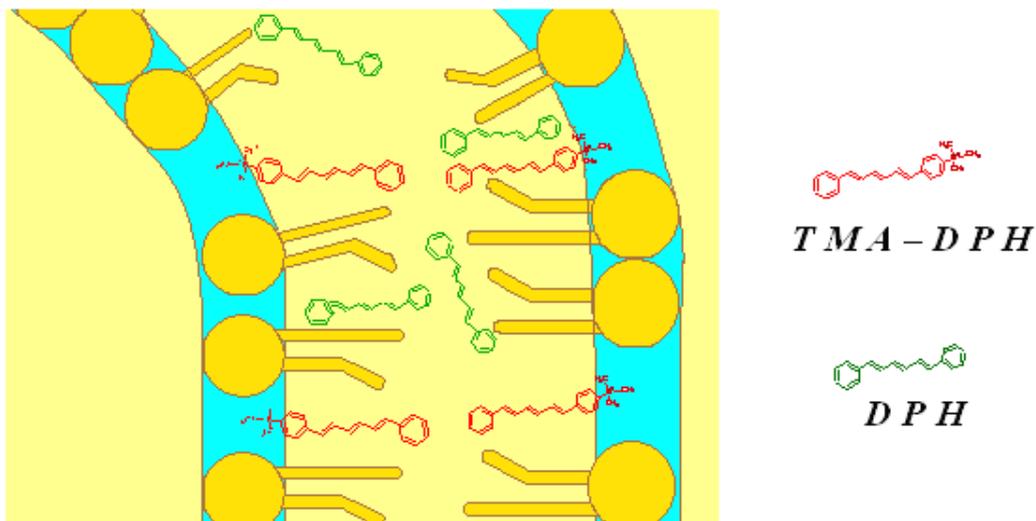


Figura 33. Localización de DPH y TMA-DPH utilizados en la valoración de la fluidez de una membrana. En esta investigación utilizamos el TMA-DPH. Esta molécula tiene como ventaja su carácter anfipático, lo que permite que se oriente en la membrana paralela a los fosfolípidos con el resto TMA en las regiones hidrofílicas de la membrana.

Métodos estadísticos

Para poder establecer un grado de comparación entre las potencias antioxidantes de cada uno de los derivados del triptófano ensayados en este trabajo, se calculó la concentración de cada molécula necesaria para inhibir al 50% los efectos (IC₅₀) sobre la rigidez de la membrana de hepatocitos y la formación, inducida por hierro ferroso, de MDA+4-HDA y de restos carbonilo. Esta concentración fue calculada gráficamente, tras la representación de los porcentajes de inhibición del incremento de estos indicadores de lesión oxidativa en la membrana, para cada concentración de indolamina. Éstos porcentajes de inhibición se obtuvieron de acuerdo a la siguiente ecuación (17):

$$\% \text{ inhibición} = \frac{X_1 - X_2}{X_1 - X_0} \cdot 100 \quad (17)$$

Donde X₀ o control, es la concentración de MDA+4-HDA, restos carbonilo o valor de la fluidez en las muestras, sin daño oxidativo inducido; X₁ es el valor de MDA+4-HDA, restos carbonilo o fluidez, en las muestras incubadas con ácido ascórbico y FeCl₃; X₂ es el valor de MDA+4-HDA, restos carbonilo o fluidez, en las muestras incubadas con ácido ascórbico, FeCl₃ y el indol correspondiente a distintas concentraciones.

Los resultados obtenidos expresados tanto en concentraciones absolutas, como en porcentajes de inhibición de la oxidación inducida por FeCl₃ y ácido ascórbico, fueron tratados estadísticamente con el programa SPSS 12.0.1.

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

Posteriormente y una vez comprobado por el test de Kolmogorov-Smirnov que los valores de las variables seguían una distribución normal, se realizó un estudio

inferencial para comprobar si las diferencias entre las medias de los grupos eran estadísticamente significativas, lo que se logró aplicando el test de la t de Student para datos pareados, con un nivel de significación aceptado en $p \leq 0,05$.

Todas las gráficas se elaboraron mediante el uso del programa informático Sigma Plot, versión 9.0.

RESULTADOS

Estudios cinéticos del modelo oxidativo

Antes de evaluar la actividad antioxidante de las indolaminas estudiadas en este trabajo y para establecer las condiciones óptimas del modelo generador de radicales libres se realizaron en primer lugar dos estudios cinéticos. En ellos se determinaron las modificaciones en la fluidez de membrana y las concentraciones de MDA+4-HDA y de restos carbonilo proteicos en la suspensión de membranas aisladas de hepatocitos de rata, manteniendo una temperatura de incubación constante de 37°C y modificando el tiempo de incubación. En una primera serie de estudios se valoraron los cambios en la fluidez y la formación de MDA+4-HDA y restos carbonilo en membranas incubadas en ausencia de cloruro férrico y ácido ascórbico, muestras controles. En la segunda serie se valoraron los efectos del tiempo de incubación cuando se añadieron al medio FeCl₃ 0,1 mM y ácido ascórbico 0,1 mM.

En la Tabla VII se detallan los resultados obtenidos en las dos cinéticas. En la incubación de las membranas controles en ausencia FeCl₃ y ácido ascórbico no se modificó ni la fluidez en las membranas celulares, ni los niveles de MDA+4-HDA y de restos carbonilo. Sin embargo, la adición de FeCl₃ y ácido ascórbico disminuyó la fluidez y aumentó los otros dos indicadores bioquímicos de lesión oxidativa. En los tres casos las modificaciones fueron tiempo-dependientes de forma significativa. En la Figura 34 se ilustran estos resultados incluyendo el estudio estadístico inferencial. De acuerdo a los resultados obtenidos en los estudios cinéticos, se decidió utilizar un tiempo de incubación de 120 minutos para los siguientes experimentos. Este tiempo fue elegido debido a que hubo diferencias significativas, en los tres parámetros evaluados, entre los controles y los 30, 60 y 120 minutos. Además, también fue significativa la diferencia entre 30, 60 y 120 minutos, y entre 60 y 120 minutos.

Tabla VII. El FeCl₃ y el ácido ascórbico 0,1 mM disminuyeron la fluidez y aumentaron las concentraciones de MDA+4-HDA y restos carbonilo de forma tiempo dependiente en membranas de hepatocitos de rata. N=5.

Tiempo (min)	Fluidez de membrana (1 / Polarización)		MDA+4-HDA (nmol / mg proteína)		Restos carbonilo (nmol / mg proteína)	
	Control	+ FeCl ₃ + ácido ascórbico	Control	+ FeCl ₃ + ácido ascórbico	Control	+ FeCl ₃ + ácido ascórbico
0	3,72 ± 0,04	3,69 ± 0,01	2,77 ± 0,38	2,61 ± 0,41	5,62 ± 0,25	6,68 ± 0,65
10	3,71 ± 0,02	3,65 ± 0,04	2,38 ± 0,20	14,58 ± 3,01	5,67 ± 0,23	11,36 ± 1,64
20	3,74 ± 0,02	3,58 ± 0,04	2,78 ± 0,22	27,73 ± 4,93	5,64 ± 0,28	16,06 ± 1,82
30	3,74 ± 0,03	3,51 ± 0,05	2,57 ± 0,22	38,03 ± 6,13	5,85 ± 0,23	21,09 ± 2,83
60	3,73 ± 0,03	3,42 ± 0,05	2,50 ± 0,22	49,73 ± 5,96	5,57 ± 0,21	24,66 ± 4,06
120	3,73 ± 0,02	3,31 ± 0,05	2,11 ± 0,35	59,82 ± 5,87	5,04 ± 0,47	27,50 ± 4,40

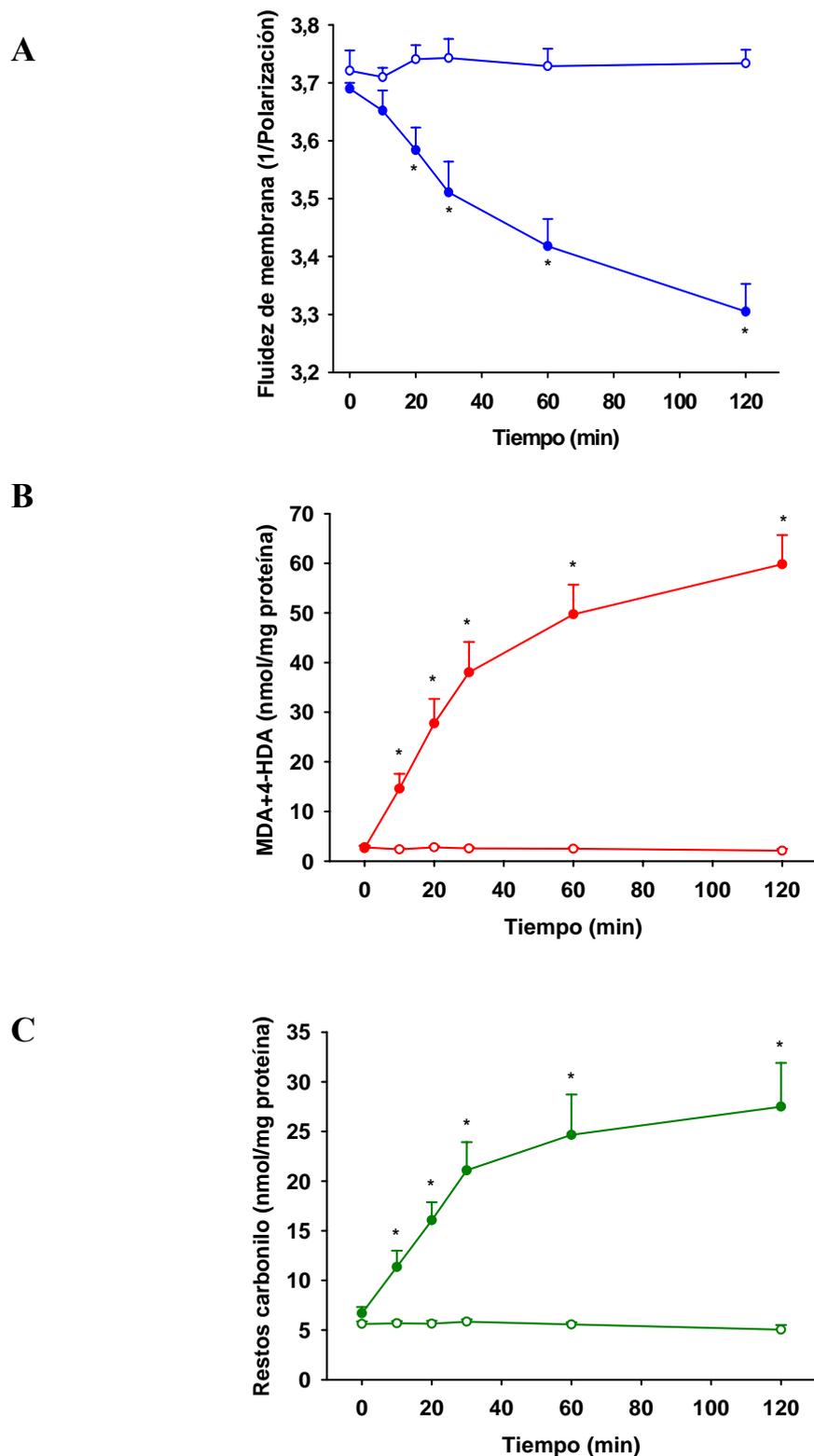


Figura 34. Influencia del tiempo de incubación a 37°C sobre la fluidez de la membrana (A), la peroxidación lipídica (B) y la formación de restos carbonilo (C) en membranas de hepatocitos, en ausencia (○) o presencia (●) de FeCl₃ 0,1 mM y ácido ascórbico 0,1 mM. N=5. * $p \leq 0,05$ vs. tiempo 0.

Efecto antioxidante de las indolaminas

Triptófano y 5-hidroxitriptófano

Inicialmente se estudiaron los efectos del **triptófano** en las membranas plasmáticas de hepatocitos expuestas al estrés oxidativo. Las concentraciones del triptófano utilizadas fueron 0,01; 0,1; 0,3; 1 y 3 mM. En la Tabla VIII se muestran los valores obtenidos de fluidez de membrana, MDA+4-HDA y restos carbonilo. El triptófano no modificó la rigidez en la membrana inducida por el hierro, ni la peroxidación lipídica, ni la formación de restos carbonilo proteicos, incluso cuando utilizamos las concentraciones más elevadas en el medio de incubación (Figura 35 A-C). De acuerdo a estos resultados fue imposible obtener la concentración necesaria para inhibir el 50% del efecto oxidativo, IC₅₀, en ninguno de los tres parámetros analizados.

Tabla VIII. Efectos del triptófano (Trp) sobre la oxidación causada por FeCl₃ y ácido ascórbico (AA) (0,1 mM) en lípidos, proteínas y fluidez de membranas de hepatocitos. Los resultados son la media ± error estándar de 5 experimentos independientes. * $p \leq 0,05$ vs. control.

	Fluidez de membrana (1/Polarización)	MDA+4-HDA (nmol / mg proteína)	Restos carbonilo (nmol / mg proteína)
Control	3,70 ± 0,04	1,73 ± 0,37	5,30 ± 0,42
FeCl ₃ + AA (0,1 mM)	3,37 ± 0,04	37,99 ± 5,60	22,56 ± 0,92
+ Trp 0,01 mM	3,35 ± 0,03	39,70 ± 5,12	17,47 ± 1,84
+ Trp 0,1 mM	3,35 ± 0,03	40,32 ± 4,76	21,18 ± 1,89
+ Trp 0,3 mM	3,36 ± 0,03	40,21 ± 5,24	22,08 ± 1,19
+ Trp 1 mM	3,37 ± 0,04	42,14 ± 4,98	23,89 ± 2,78
+ Trp 3 mM	3,37 ± 0,03	40,61 ± 4,74	23,97 ± 0,73

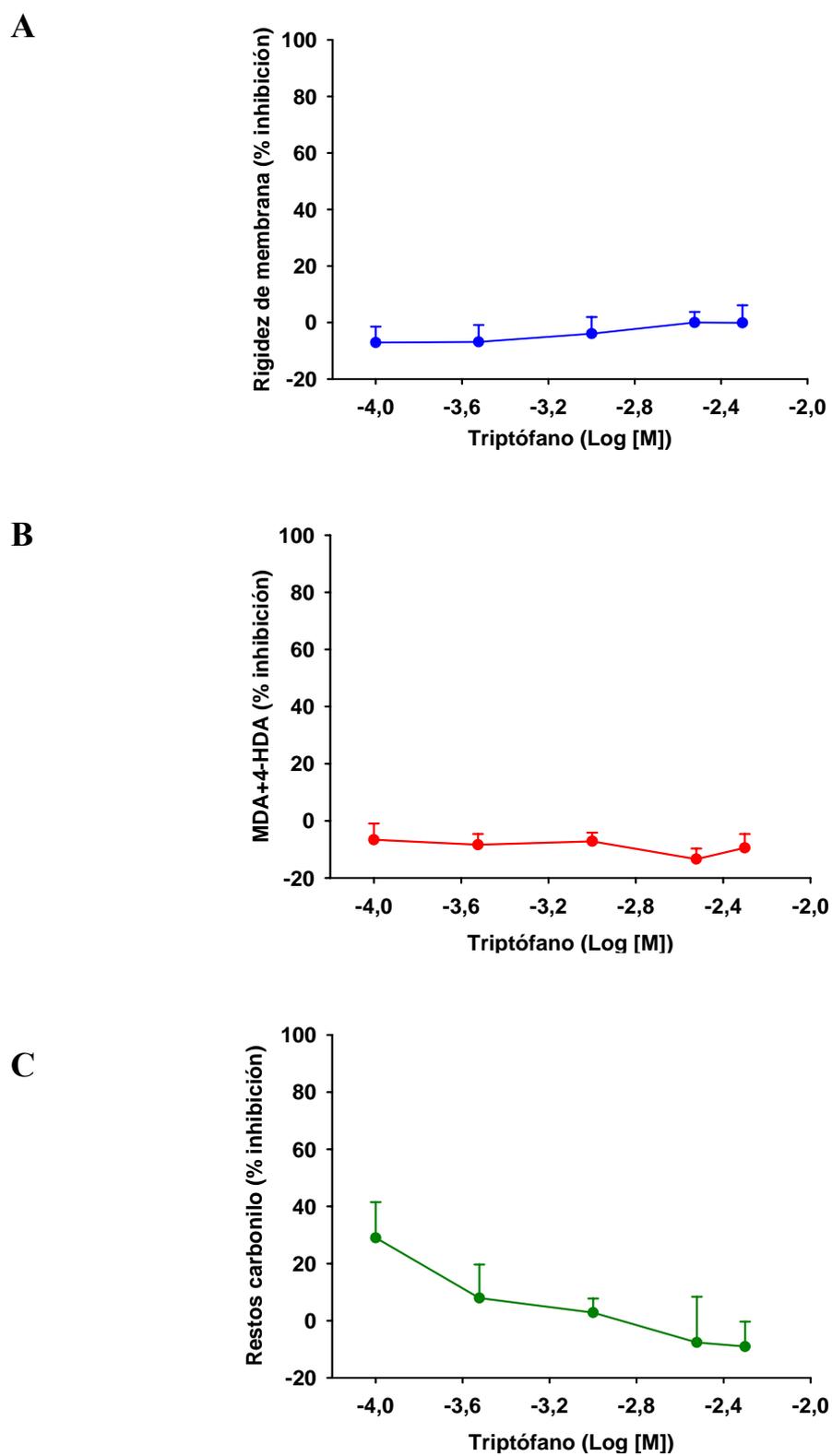


Figura 35. Efecto del triptófano sobre la rigidez de membrana (A), formación de MDA+4-HDA (B) y carbonilación proteica (C) inducida por FeCl_3 y ácido ascórbico 0,1 mM. Las concentraciones de triptófano se expresan como logaritmo decimal de su concentración molar. $N=5$.

En la Tabla IX se detallan los resultados de fluidez de membrana, MDA+4-HDA y restos carbonilo obtenidos en presencia de **5-hidroxitriptófano**. Todas las concentraciones valoradas en este estudio redujeron la rigidez de membrana hepática causada por el modelo oxidativo de forma concentración dependiente. Los resultados fueron estadísticamente significativos a concentraciones mayores o iguales a 0,3 mM (Figura 37 A). De forma análoga, disminuyó la peroxidación lipídica con significación a las mismas concentraciones (Figura 37 B). En la oxidación de proteínas también se previno el daño de modo concentración-dependiente evidenciado por la menor formación de restos carbonilo, con resultados estadísticamente significativos a concentraciones de 5-hidroxitriptófano ≥ 1 mM (Figura 36 C).

Las IC₅₀ del 5-hidroxitriptófano para la inhibición de la rigidez en las membranas, la peroxidación lipídica y la oxidación de las proteínas fueron 2,40; 1,38 y 2,62 mM respectivamente.

Tabla IX. Efecto del 5-OH-Triptófano (5-OH-Trp) sobre la oxidación causada por FeCl₃ y ácido ascórbico (AA) 0,1 mM en lípidos, proteínas y fluidez de membrana de hepatocitos. Los resultados se expresan como media \pm error estándar de al menos 5 experimentos independientes.

	Fluidez de membrana (1/Polarización)	MDA+4-HDA (nmol / mg proteína)	Restos carbonilo (nmol / mg proteína)
Control	3,62 \pm 0,03	0,95 \pm 0,22	6,17 \pm 1,47
FeCl ₃ + AA (0,1 mM)	3,24 \pm 0,02	35,21 \pm 2,63	29,19 \pm 1,49
+ 5-OH-Trp 0,1 mM	3,24 \pm 0,03	32,72 \pm 2,97	29,14 \pm 2,50
+ 5-OH-Trp 0,3 mM	3,27 \pm 0,02	29,52 \pm 2,78	29,09 \pm 1,90
+ 5-OH-Trp 1 mM	3,29 \pm 0,03	23,32 \pm 1,98	24,44 \pm 2,28
+ 5-OH-Trp 3 mM	3,42 \pm 0,06	5,043 \pm 1,69	17,27 \pm 1,86
+ 5-OH-Trp 5 mM	3,67 \pm 0,09	2,26 \pm 0,36	14,77 \pm 0,96

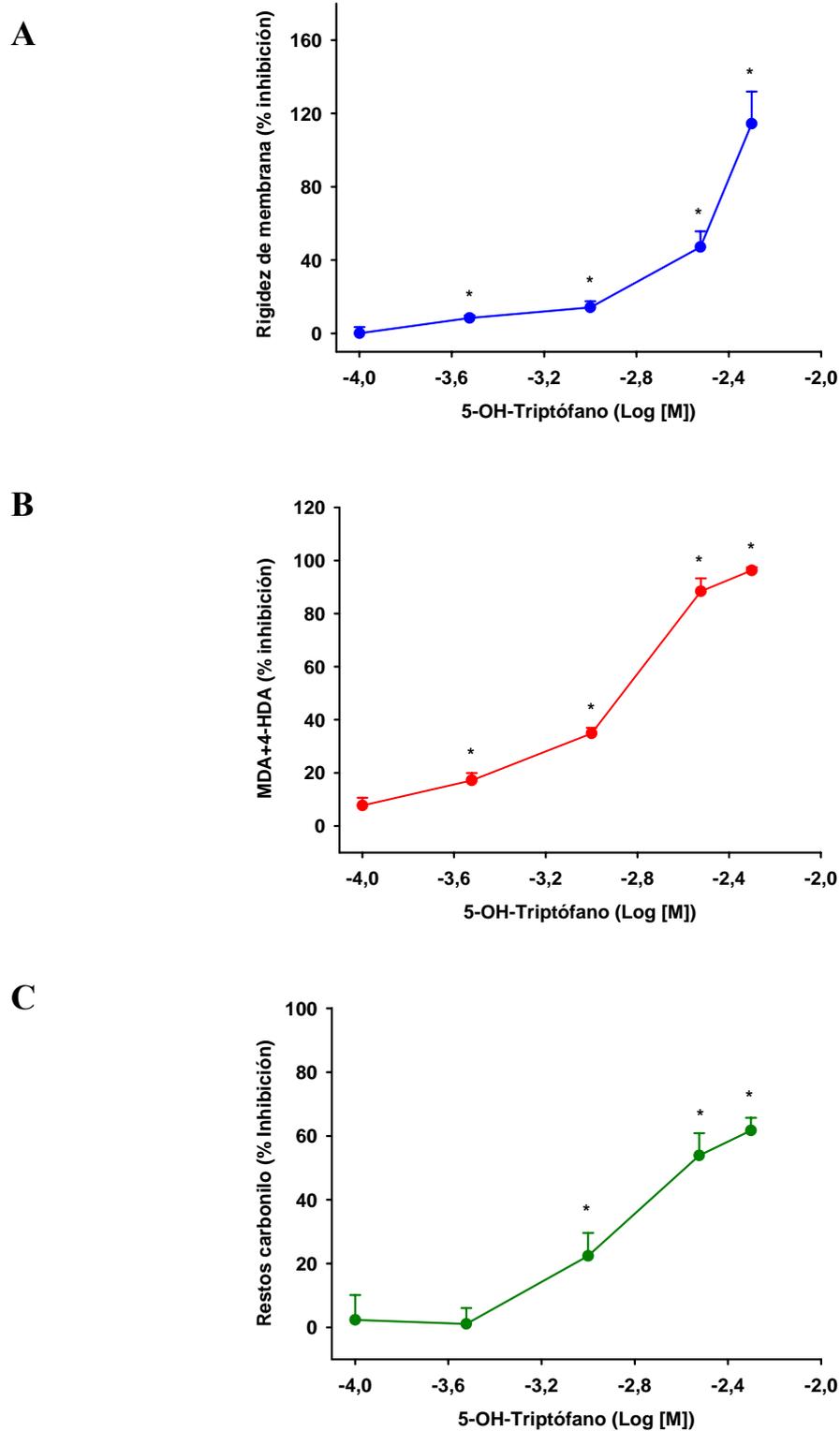


Figura 36. El 5-OH-triptófano inhibió la rigidez de las membranas de los hepatocitos (A), así como la peroxidación lipídica (B) y la formación de restos carbonilo (C) causada por $FeCl_3$ y ácido ascórbico (AA) (0,1 mM). $N=5$. * $p \leq 0,05$ vs. membranas tratadas con hierro.

Triptamina, 5-metoxitriptamina y N-acetilserotonina

La **triptamina** se analizó en concentraciones 0,1; 0,3; 1; 3 y 5 mM. Los resultados de fluidez de membrana, MDA+4-HDA y de restos carbonilo se presentan en la Tabla X. La triptamina aumentó eficientemente la fluidez de membrana de los hepatocitos reducida por el hierro a concentraciones de 1 y 3 mM, sin embargo a 5 mM parece tener menor efecto protector (Figura 37 A). Respecto a los lípidos, tuvo una acción protectora significativa en todas las concentraciones evaluadas (Figura 37 B). En la oxidación de proteínas, también se apreció un comportamiento antioxidante reduciendo la carbonilación, aunque con menor actividad que para lípidos, ya que el efecto sólo fue significativo a concentraciones de 3 y 5 mM (Figura 37 C).

La IC₅₀ de la triptamina para la inhibición de la rigidez de membrana no fue posible calcularla por su comportamiento dual, antioxidante y prooxidante. Para la peroxidación lipídica fue 0,41 mM, y la correspondiente a la inhibición de la oxidación de proteínas tampoco fue calculada por su baja actividad, porcentaje de inhibición 49% a la mayor concentración de triptamina.

Tabla X. Efectos de la triptamina (Trm) sobre el estrés oxidativo causado por FeCl₃ y ácido ascórbico (AA) en lípidos, proteínas y fluidez de membranas de hepatocitos. Los resultados se expresan como media ± error estándar de 5 experimentos o más.

	Fluidez de membrana (1/Polarización)	MDA+4-HDA (nmol / mg proteína)	Restos carbonilo (nmol / mg proteína)
Control	3,65 ± 0,02	0,76 ± 0,30	5,39 ± 0,56
FeCl ₃ + AA (0,1 mM)	3,18 ± 0,03	74,35 ± 2,95	29,70 ± 1,39
+ Trm 0,1 mM	3,20 ± 0,04	55,44 ± 2,33	31,94 ± 1,68
+ Trm 0,3 mM	3,19 ± 0,04	43,63 ± 2,45	29,52 ± 1,61
+ Trm 1 mM	3,45 ± 0,09	20,67 ± 1,84	27,37 ± 0,93
+ Trm 3 mM	3,85 ± 0,11	1,26 ± 0,28	23,05 ± 0,85
+ Trm 5 mM	3,56 ± 0,05	1,00 ± 0,18	17,61 ± 0,18

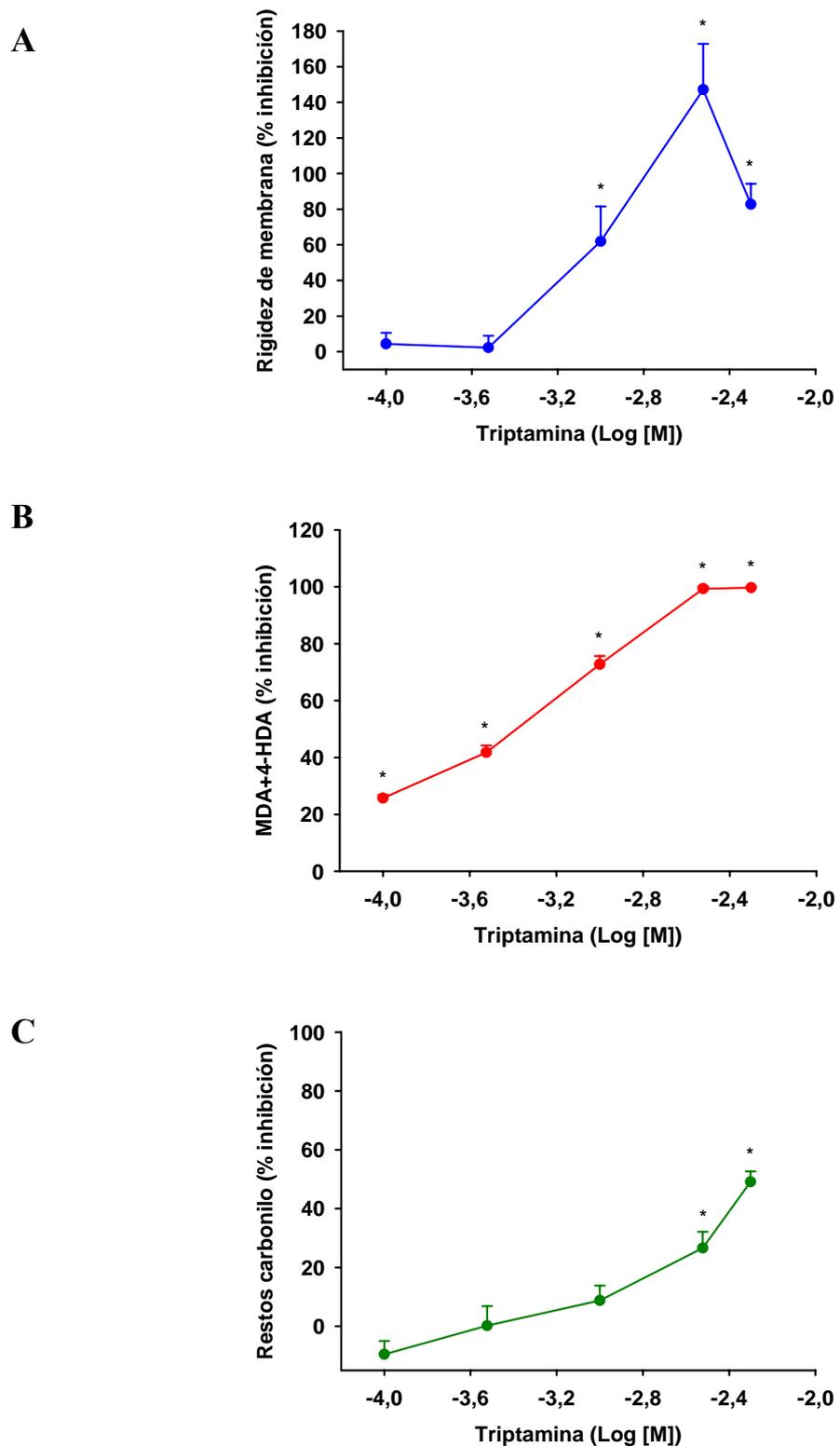


Figura 37. Efecto protector de la triptamina sobre la fluidez (A), la peroxidación lipídica (B) y la carbonilación de proteínas (C) en membranas de hepatocitos expuestos a radicales libres. N=5. * $p \leq 0,05$ vs. control oxidado por $FeCl_3$ y ácido ascórbico.

Posteriormente se estudiaron los efectos de la **5-metoxitriptamina** en la fluidez de membrana, formación de MDA+4-HDA y carbonilación proteica. Los resultados se presentan en la Tabla XI.

Desde la menor concentración evaluada, 0,1 mM, la 5-metoxitriptamina elevó los niveles de fluidez en las membranas, muy por encima de los resultados obtenidos para los controles (Figura 38 A). En la prevención de la oxidación de lípidos se obtuvieron resultados protectores con todas las concentraciones (0,1-5 mM) (Figura 38 B) y preservando a las proteínas su efecto fue menor y sólo a concentraciones iguales o superiores a 3 mM previno los cambios (Figura 38 C).

No se pudo obtener la IC₅₀ de la 5-metoxitriptamina para la inhibición de la rigidez de membrana. Tampoco fue posible calcular la IC₅₀ para la oxidación proteica porque el mayor porcentaje de inhibición fue inferior al 20%. La IC₅₀ para la prevención de la peroxidación lipídica fue 0,16 mM.

Tabla XI. Efectos de la adición de 5-metoxitriptamina (MTrm) sobre el estrés oxidativo inducido por FeCl₃ y ácido ascórbico 0,1 mM en lípidos, proteínas y fluidez de membranas de hepatocitos. Los resultados se expresan como media ± error estándar de 5 experimentos.

	Fluidez de membrana (1/Polarización)	MDA+4-HDA (nmol / mg proteína)	Restos carbonilo (nmol / mg proteína)
Control	3,57 ± 0,09	0,34 ± 0,11	5,77 ± 0,94
FeCl ₃ + AA (0,1 mM)	3,19 ± 0,01	78,97 ± 3,25	27,24 ± 2,97
+ MTrm 0,1 mM	3,60 ± 0,04	49,21 ± 2,26	28,76 ± 2,30
+ MTrm 0,3 mM	3,96 ± 0,06	25,72 ± 1,46	26,77 ± 3,34
+ MTrm 1 mM	4,58 ± 0,02	3,90 ± 1,00	28,43 ± 3,40
+ MTrm 3 mM	4,35 ± 0,05	1,21 ± 0,28	25,56 ± 3,81
+ MTrm 5 mM	5,77 ± 0,94	1,12 ± 0,20	22,83 ± 2,58

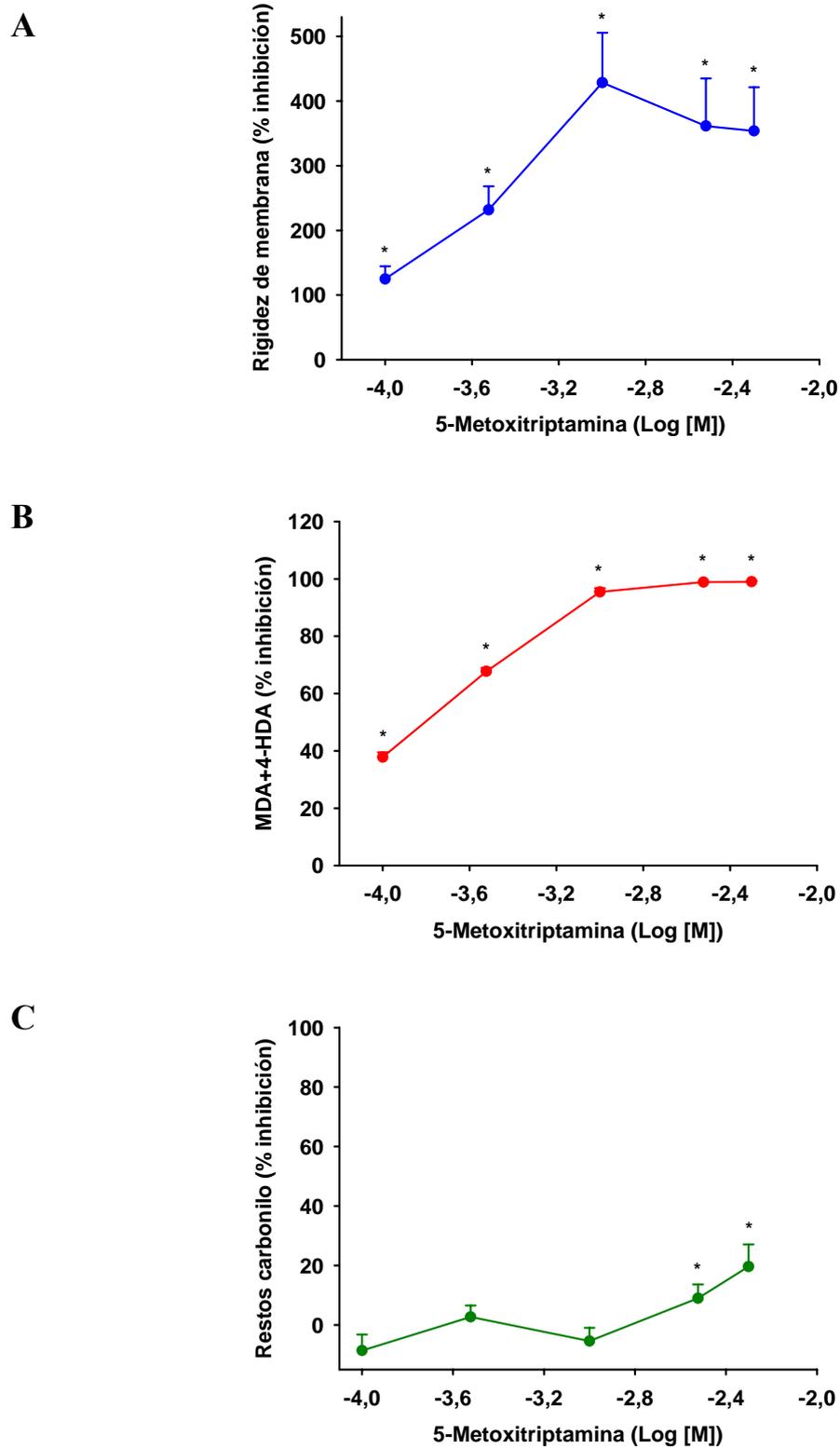


Figura 38. Efecto de la 5-metoxitriptamina sobre la rigidez (A), la peroxidación lipídica (B) y la formación de restos carbonilo en proteínas (C) de membranas de hepatocitos, inducida por FeCl_3 y ácido ascórbico (AA). $N=5$. * $p \leq 0,05$ vs. control + FeCl_3 + AA.

Finalmente, se estudió la N-acetilserotonina. Los resultados se resumen en la Tabla XII.

La N-acetilserotonina redujo significativamente y de manera concentración dependiente la rigidez de la membrana causada por el hierro y el ácido ascórbico a las concentraciones de 0,3 y 1 mM (Figura 39 A). También disminuyó significativamente la formación de MDA+4-HDA (Figura 39 B) y evitó la oxidación de las proteínas en las membranas celulares (Figura 39 C) a concentraciones mayores o iguales a 0,05 mM.

La IC₅₀ de la N-acetilserotonina para prevenir la disminución de la fluidez de membrana inducida por el hierro fue de 0,12 mM, para la inhibición de la peroxidación lipídica 0,15 mM, y la calculada para la reducción de la oxidación de las proteínas 0,16 mM.

Tabla XII. Efecto de la adición de N-acetilserotonina (NAS) sobre la oxidación inducida por FeCl₃ y ácido ascórbico (AA) 0,1 mM en lípidos, proteínas y fluidez de membranas de hepatocitos. Los resultados se expresan como media ± error estándar de 5 experimentos.

	Fluidez de membrana (1/Polarización)	MDA+4-HDA (nmol / mg proteína)	Restos carbonilo (nmol / mg proteína)
Control	3,65 ± 0,02	2,17 ± 0,32	3,83 ± 0,43
FeCl ₃ + AA (0,1 mM)	3,22 ± 0,01	30,78 ± 3,34	15,55 ± 0,75
+ NAS 0,01 mM	3,28 ± 0,04	28,80 ± 2,42	13,58 ± 0,51
+ NAS 0,05 mM	3,34 ± 0,07	24,63 ± 1,91	13,25 ± 0,45
+ NAS 0,1 mM	3,42 ± 0,09	21,78 ± 2,10	11,75 ± 0,54
+ NAS 0,3 mM	3,53 ± 0,05	6,44 ± 0,87	6,61 ± 0,17
+ NAS 1 mM	3,62 ± 0,05	2,76 ± 0,22	6,44 ± 0,88

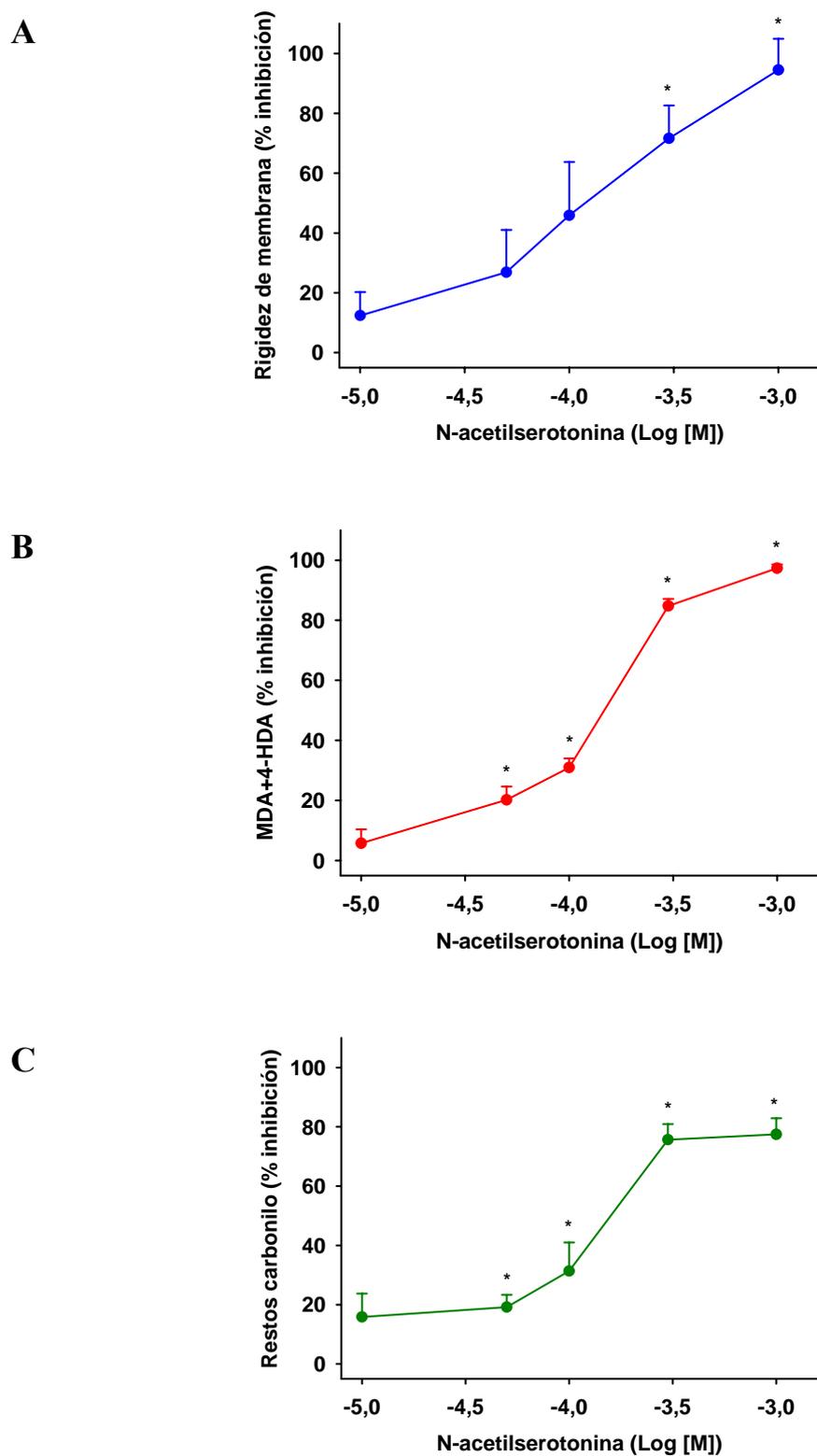


Figura 39. La *N*-acetilserotonina inhibió la rigidez (A), la peroxidación lipídica (B) y la formación de restos carbonilo (C) inducida por FeCl_3 y ácido ascórbico en membranas aisladas de hepatocitos. $N=5$. * $p \leq 0,05$ vs. control oxidado.

Melatonina

La **melatonina**, fue evaluada como molécula activa frente a los radicales libres en un rango de concentraciones de 0,1 a 5 mM. Los valores de fluidez de membrana, MDA+4-HDA y restos carbonilo obtenidos en las membranas de los hepatocitos se compendian en la Tabla XIII.

La melatonina redujo la rigidez de la membrana de los hepatocitos, causada por el FeCl₃ y el ácido ascórbico, de manera concentración-dependiente y de forma significativa a las concentraciones de 1, 3 y 5 mM (Figura 40 A). Análogamente se evidenció una acción antioxidante de los lípidos de las membranas a las mismas concentraciones, demostrada por la reducción en la formación de MDA+4-HDA (Figura 41 B). También presentó un efecto protector en la carbonilación de las proteínas, con significación estadística a partir de 0,3 mM (Figura 41 C).

Las IC₅₀ fueron 3,80 mM, 3,51 mM y 3,31 mM para inhibir la rigidez de la membrana, la formación de MDA+4-HDA y la aparición de restos carbonilo en las proteínas respectivamente.

Tabla XIII. Efecto protector de la melatonina (aMT) sobre el estrés oxidativo inducido por FeCl₃ y ácido ascórbico 0,1 mM en lípidos, proteínas y fluidez de membranas de hepatocitos. Los resultados se expresan como media ± error estándar de 5 experimentos.

	Fluidez de membrana (1/Polarización)	MDA+4-HDA (nmol / mg proteína)	Restos carbonilo (nmol / mg proteína)
Control	3,68 ± 0,02	1,93 ± 0,60	4,46 ± 0,07
FeCl ₃ + AA (0,1 mM)	3,24 ± 0,03	44,17 ± 0,78	22,35 ± 1,00
+ aMT 0,1 mM	3,24 ± 0,03	46,15 ± 1,77	20,38 ± 0,68
+ aMT 0,3 mM	3,27 ± 0,03	42,25 ± 0,93	19,46 ± 0,62
+ aMT 1 mM	3,30 ± 0,03	39,68 ± 0,84	17,69 ± 0,55
+ aMT 3 mM	3,39 ± 0,02	30,58 ± 1,90	14,17 ± 0,42
+ aMT 5 mM	3,54 ± 0,03	5,22 ± 1,30	9,79 ± 0,93

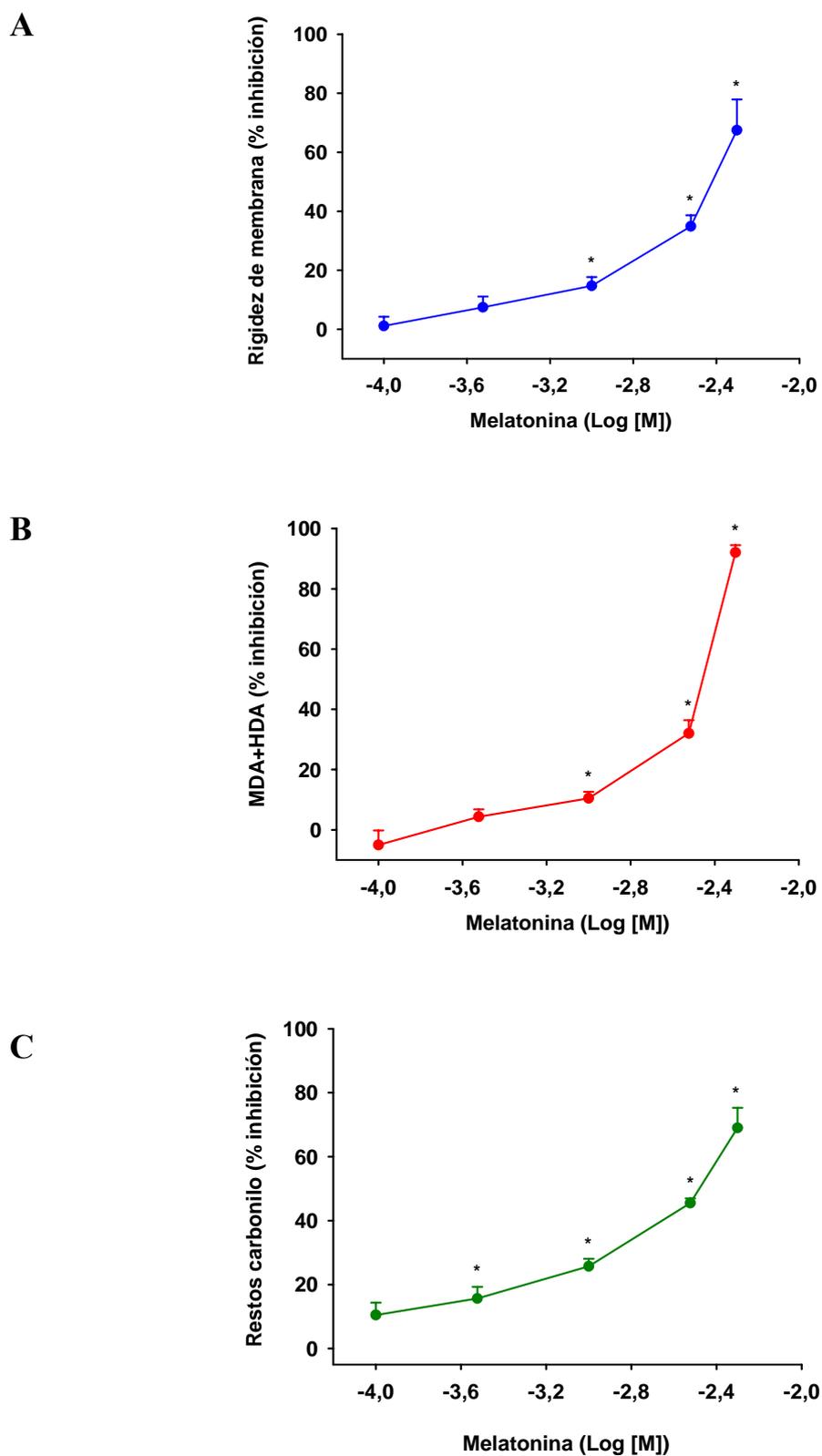


Figura 40. La melatonina reduce la rigidez (A), la formación de MDA+4-HDA (B) y la carbonilación de proteínas (C) de membrana de hepatocitos producida por daño oxidativos. $N=5$. * $p \leq 0,05$ vs. membranas control con oxidación inducida.

Metoxiindoles de la vía de la monoaminooxidasa

Bajo esta denominación se estudiaron las dos indolaminas finales de la ruta de la MAO-B en la glándula pineal: el ácido 5-metoxiindol-3-acético y el 5-metoxitriptofol.

En primer lugar se presentan los resultados del **ácido 5-metoxiindol-3-acético**. Los valores obtenidos de la fluidez, MDA+4-HDA y restos carbonilo en las membranas aisladas de los hepatocitos se muestran en la Tabla XIV. El ácido 5-metoxiindol-3-acético recuperó discretamente la fluidez de la membrana de los hepatocitos a las concentraciones más altas, 3 y 5 mM (Figura 41 A), sin embargo, no previno ni la peroxidación de los lípidos inducida por hierro en ninguna de las concentraciones estudiadas (Figura 41 B) ni la oxidación de proteínas (Figura 41 C). Por ello no pudieron calcularse sus IC₅₀ para ninguno de los tres parámetros estudiados.

Tabla XIV. Efecto protector de la adición del ácido 5-metoxiindol-3-acético (Mia) sobre la oxidación inducida por FeCl₃ y ácido ascórbico (AA) 0,1 mM en lípidos, proteínas y fluidez de membranas de hepatocitos. Los resultados se expresan como media ± error estándar de 5 experimentos independientes.

	Fluidez de membrana (1/Polarización)	MDA+4-HDA (nmol / mg proteína)	Restos carbonilo (nmol / mg proteína)
Control	3,70 ± 0,06	2,13 ± 0,22	5,41 ± 1,03
FeCl ₃ + AA (0,1 mM)	3,39 ± 0,03	23,61 ± 3,13	16,89 ± 1,84
+ Mia 0,1 mM	3,41 ± 0,05	24,87 ± 3,60	16,99 ± 0,71
+ Mia 0,3 mM	3,43 ± 0,05	25,81 ± 3,31	16,21 ± 1,32
+ Mia 1 mM	3,40 ± 0,03	26,38 ± 3,61	16,85 ± 0,60
+ Mia 3 mM	3,49 ± 0,03	26,17 ± 3,84	14,46 ± 0,78
+ Mia 5 mM	3,52 ± 0,03	25,49 ± 4,43	14,03 ± 1,26

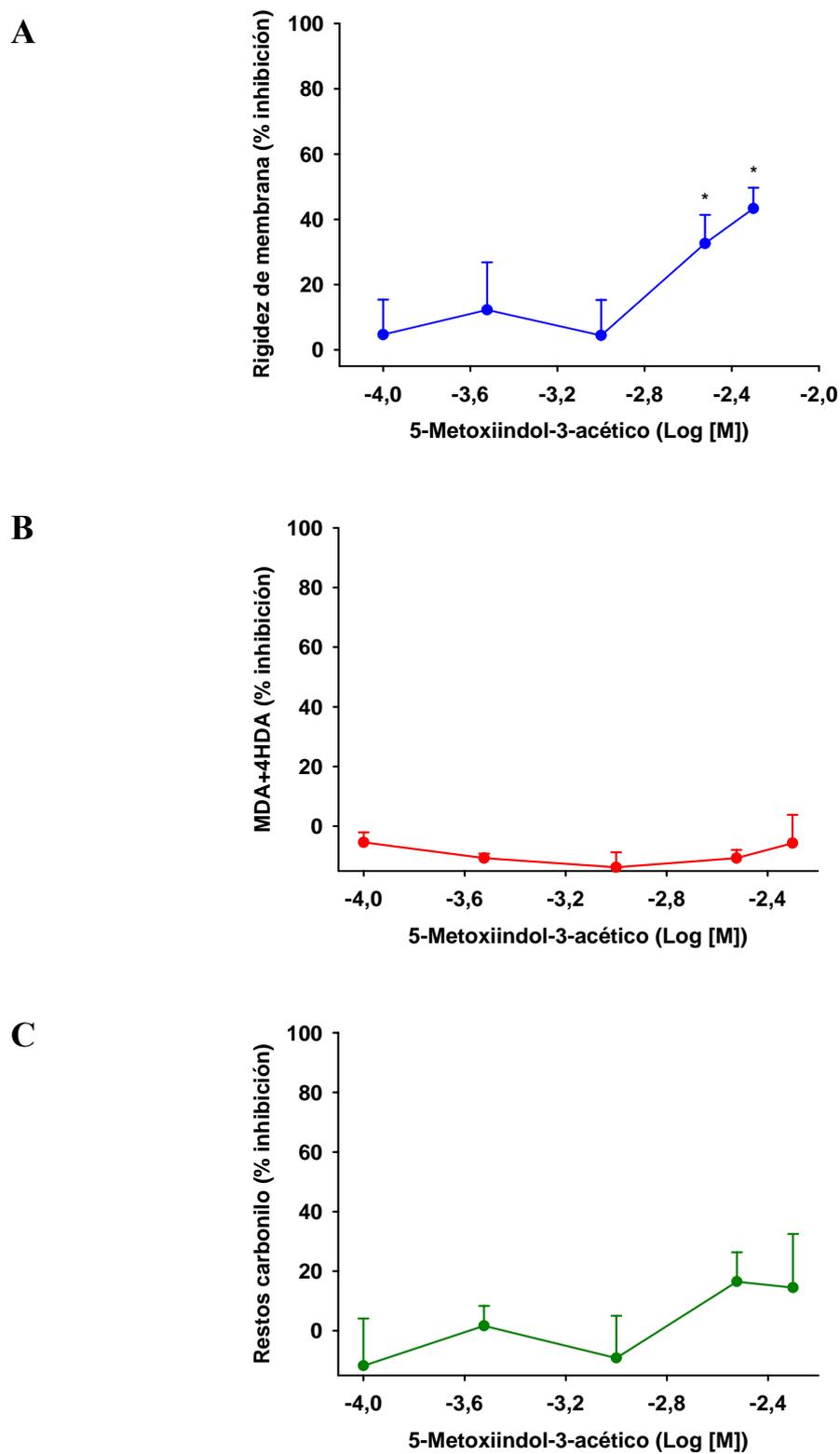


Figura 41. Efecto del ácido 5-metoxiindol-3-acético sobre la rigidez (A), la formación de MDA+4-HDA (B) y la carbonilación de proteínas (C) de las membranas de hepatocitos inducida por $FeCl_3$ y ácido ascórbico (AA). $N=5$. * $p \leq 0,05$ vs. control + $FeCl_3$ y AA.

En la Tabla XV se resumen los resultados obtenidos para el **5-metoxitriptofol**. Éste frenó la rigidez de la membrana inducida por FeCl₃ y ácido ascórbico a todas las concentraciones, con máxima eficacia a 1 mM (Figura 42 A). En el modelo de la peroxidación lipídica (Figura 42 B) y oxidación proteica (Figura 42 C), tuvo un efecto antioxidante significativo en todas las concentraciones estudiadas. Debido a su comportamiento dual en la estabilización de la fluidez de la membrana frente al daño oxidativo fue imposible calcular su IC₅₀. Los valores de IC₅₀ en la prevención del daño oxidativo a lípidos y proteínas fueron 0,62 mM y 0,63 mM respectivamente.

Tabla XV. Efecto protector del 5-metoxitriptofol (Mtf) sobre el estrés oxidativo inducido por FeCl₃ y ácido ascórbico (AA) 0,1 mM en lípidos, proteínas y fluidez de membranas de hepatocitos. Los resultados se expresan como media ± error estándar de 5 experimentos o más.

	Fluidez de membrana (1/Polarización)	MDA+4-HDA (nmol / mg proteína)	Restos carbonilo (nmol / mg proteína)
Control	3,65 ± 0,02	2,43 ± 0,98	5,51 ± 0,24
FeCl ₃ + AA (0,1 mM)	3,41 ± 0,01	53,66 ± 5,30	25,47 ± 1,43
+ Mtf 0,1 mM	3,50 ± 0,02	45,71 ± 4,44	21,46 ± 1,74
+ Mtf 0,3 mM	3,51 ± 0,04	37,29 ± 3,49	18,51 ± 1,09
+ Mtf 1 mM	3,66 ± 0,03	22,14 ± 2,86	13,73 ± 1,00
+ Mtf 3 mM	3,48 ± 0,04	1,41 ± 0,36	5,19 ± 0,31
+ Mtf 5 mM	3,50 ± 0,04	1,04 ± 0,29	4,82 ± 1,02

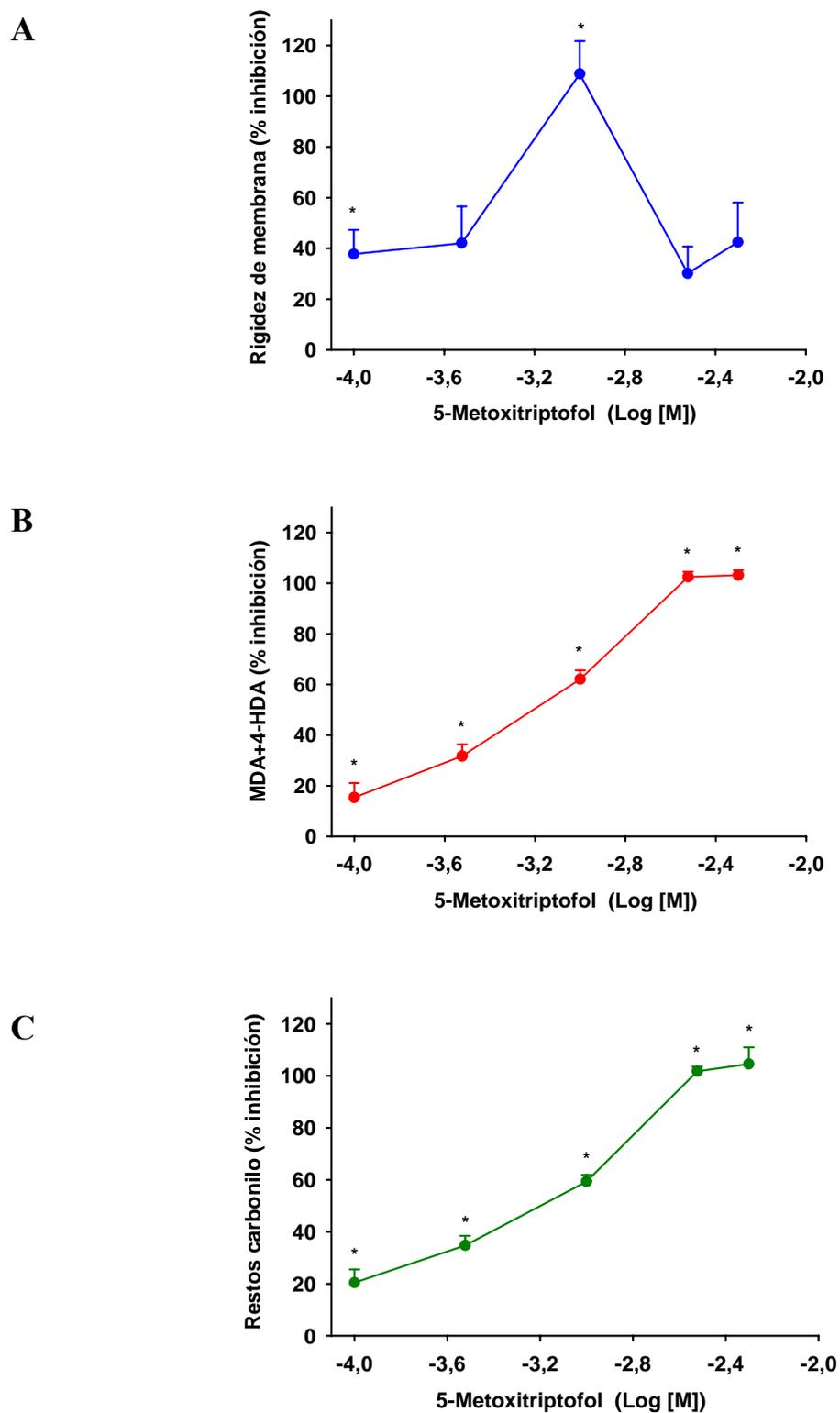


Figura 42. Efecto del ácido 5-metoxitriptofol sobre la rigidez (A), la formación de MDA+4-HDA (B) y la oxidación de proteínas (C) de las membranas de hepatocitos expuestas a la acción de los radicales libres. N=5. * $p \leq 0,05$ vs. control oxidado.

β-carbolinas

La **triptolina**, se valoró en concentraciones de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 y 1 mM. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla XVI. En ella se evidencia una potente acción protectora de la fluidez de membrana, reduciendo significativamente la rigidez a medida que aumentaron las concentraciones estudiadas (Figura 43 A). Además fue muy eficaz su acción antioxidante en los lípidos, disminuyendo significativamente la formación de MDA+4-HDA, inducida por FeCl₃ y ácido ascórbico, a concentraciones mayores o iguales a 0,2 mM (Figura 43 B). En la oxidación de proteínas, también fue protectora a partir de la concentración 0,4 mM (Figura 43 C). Sus IC₅₀ en la inhibición de la rigidez de membrana, formación de MDA+4-HDA y carbonilación proteica fueron 0,33; 0,63 y 0,52 mM respectivamente.

Tabla XVI. Efectos de la triptolina sobre la oxidación inducida por FeCl₃ y ácido ascórbico (AA) 0,1 mM en lípidos, proteínas y fluidez de membranas de hepatocitos. Los resultados se expresan como media ± error estándar de 5 experimentos.

	Fluidez de membrana (1/Polarización)	MDA+4-HDA (nmol / mg proteína)	Restos carbonilo (nmol / mg proteína)
Control	3,64 ± 0,03	1,44 ± 0,33	6,97 ± 1,07
FeCl ₃ + AA (0,1 mM)	3,20 ± 0,02	42,25 ± 2,02	27,06 ± 1,94
+ Triptolina 0,1 mM	3,26 ± 0,02	42,89 ± 2,69	28,18 ± 1,31
+ Triptolina 0,2 mM	3,32 ± 0,04	40,97 ± 2,62	24,35 ± 1,28
+ Triptolina 0,4 mM	3,46 ± 0,05	34,05 ± 4,24	19,44 ± 1,96
+ Triptolina 0,6 mM	3,52 ± 0,05	26,91 ± 4,54	15,50 ± 1,21
+ Triptolina 1 mM	3,60 ± 0,04	7,26 ± 1,55	9,08 ± 0,73

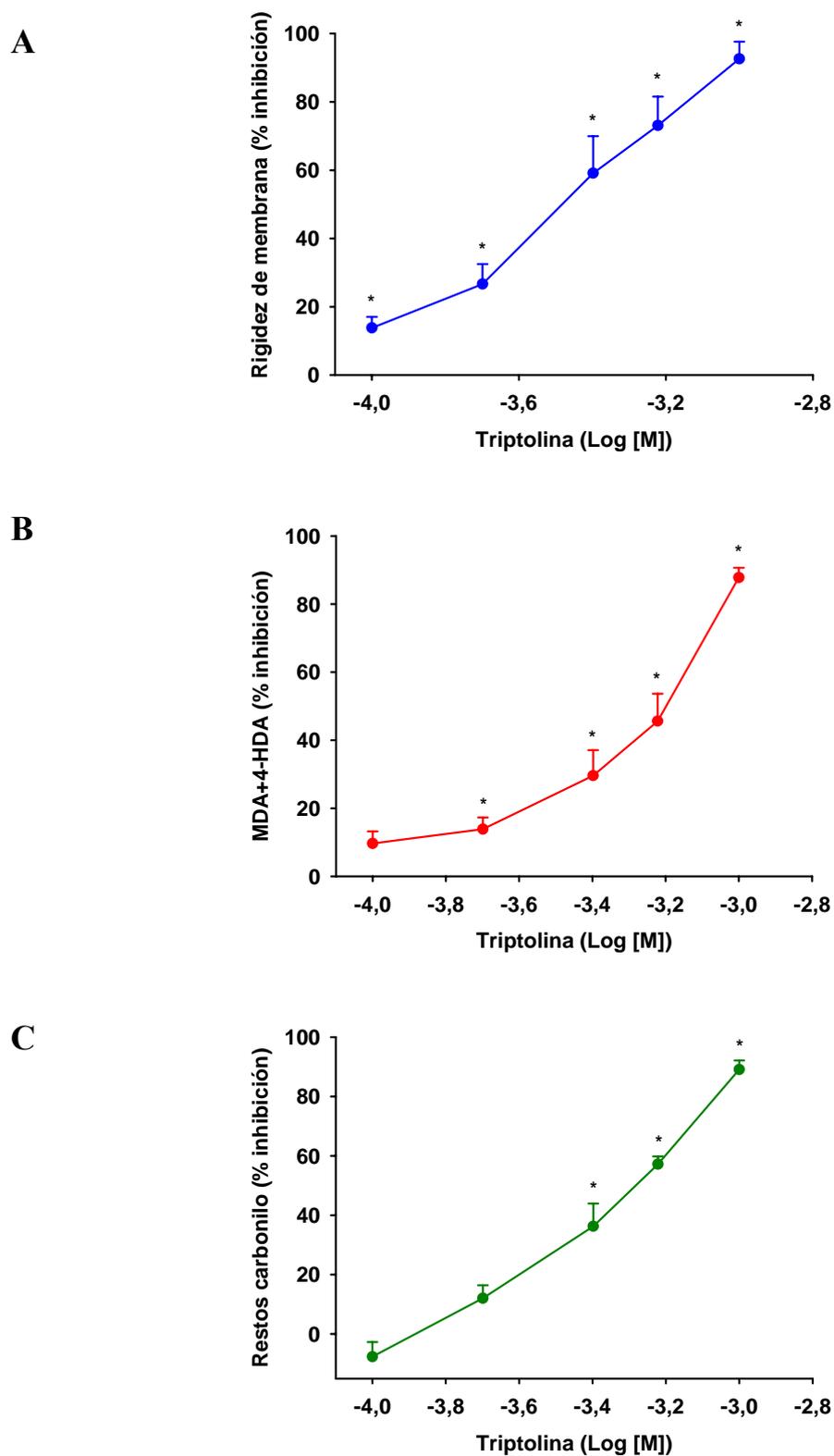


Figura 43. La triptolina reduce la rigidez (A), la formación de MDA+4-HDA (B) y los niveles de restos carbonilo (C) de las membranas de hepatocitos inducida por el estrés oxidativo ocasionado por radicales libres. $N=5$. * $p \leq 0,05$ vs. control + $FeCl_3$ y ácido ascórbico.

Finalmente, se estudiaron los efectos de la **pinolina**. La Tabla XVII resume los resultados. De todos los metabolitos derivados del triptófano evaluados en este estudio, la pinolina fue el que presentó mayor actividad antioxidante. Desde la menor concentración, 0,01 mM, se observó un efecto protector muy potente en la prevención de la rigidez de la membrana (Figura 44 A). También, se obtuvo un efecto protector de la toxicidad oxidativa causada por hierro en la prevención del daño oxidativo a lípidos (Figura 44 B) y proteínas (Figura 44 C).

Los valores de IC₅₀ de pinolina para la inhibición de la prevención de la rigidez en la membrana y de los daños oxidativos a los lípidos y proteínas fueron 0,03; 0,17 y 0,15 mM respectivamente.

Tabla XVII. Efectos de la pinolina sobre el estrés oxidativo inducido por FeCl₃ y ácido ascórbico (AA) 0,1 mM en lípidos, proteínas y fluidez de membranas de hepatocitos. Los resultados se expresan como media ± error estándar de 5 experimentos.

	Fluidez de membrana (1/Polarización)	MDA+4-HDA (nmol / mg proteína)	Restos carbonilo (nmol / mg proteína)
Control	3,57 ± 0,03	0,90 ± 0,25	5,94 ± 1,04
FeCl ₃ + AA (0,1 mM)	3,28 ± 0,03	22,66 ± 0,59	24,74 ± 2,00
+ Pinolina 0,01 mM	3,37 ± 0,03	19,10 ± 0,57	19,78 ± 0,75
+ Pinolina 0,05 mM	3,46 ± 0,04	19,57 ± 1,28	19,73 ± 1,61
+ Pinolina 0,1 mM	3,55 ± 0,03	19,05 ± 0,75	18,90 ± 1,45
+ Pinolina 0,2 mM	3,91 ± 0,02	9,70 ± 1,84	13,43 ± 2,21
+ Pinolina 0,4 mM	4,48 ± 0,03	2,26 ± 0,45	8,70 ± 1,35

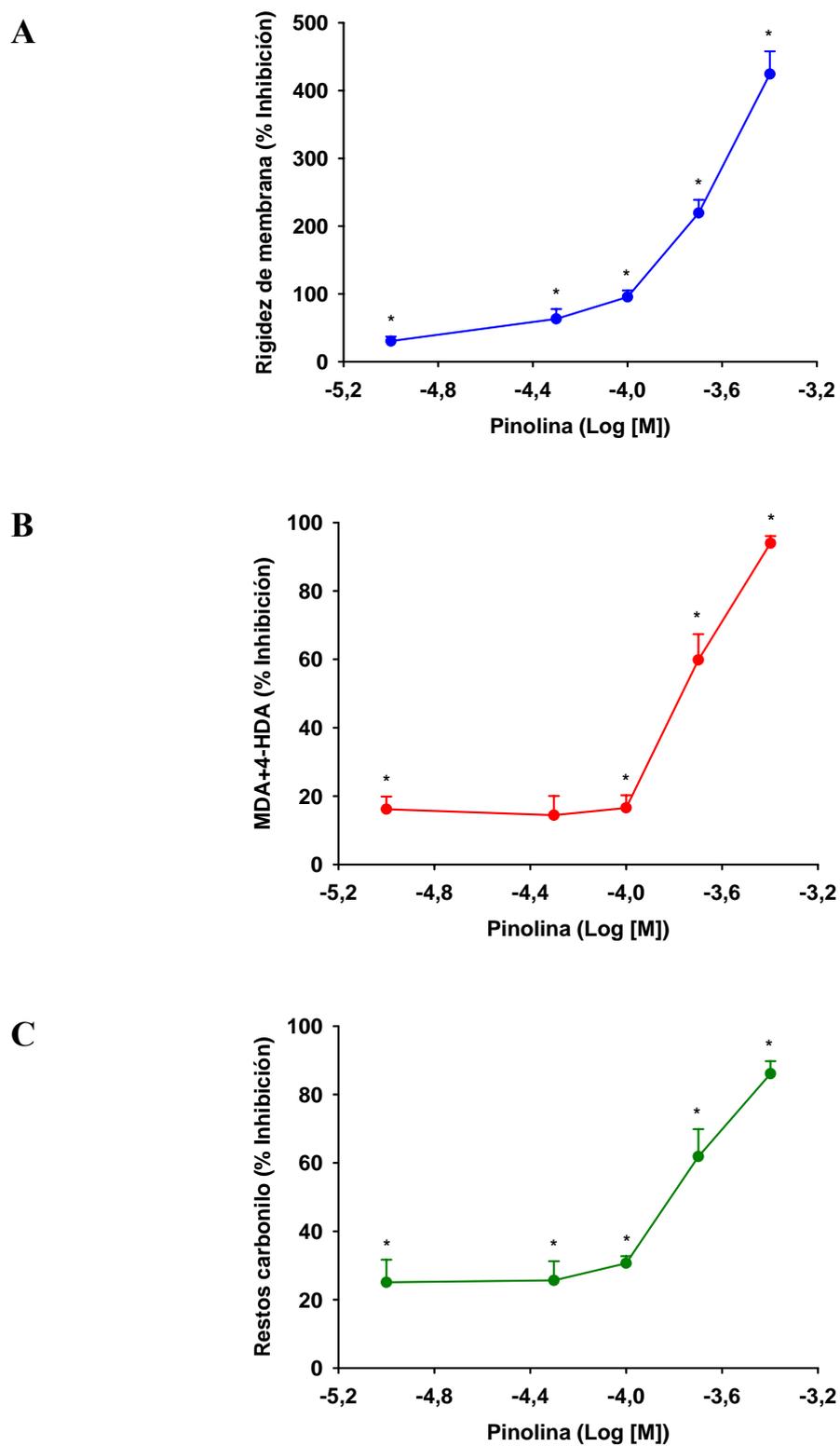


Figura 44. Actividad antioxidante de la pinolina sobre la rigidez (A), la peroxidación lipídica (B) y la formación de restos carbonilo (C) en las membranas de hepatocitos expuestas a estrés oxidativo. $N=5$. * $p \leq 0,05$ vs. control oxidado.

Con la finalidad de facilitar la comparación de las potencias antioxidantes de todos los derivados del triptófano estudiados en la presente investigación, se ha compendiado en la Tabla XVIII los valores de IC₅₀ en la reducción de la rigidez, formación de MDA+4-HDA e inhibición de la carbonilación en las proteínas de membrana de hepatocitos. Cuanto menor el valor de IC₅₀, mayor efecto antioxidante de la molécula, por ello se destaca en dicha tabla N-acetilserotonina y pinolina como las más eficaces.

Tabla XVIII. Valores de IC₅₀ en la prevención de la rigidez de membrana, formación de MDA+4-HDA y de restos carbonilo, en membranas de hepatocitos para cada uno de los metabolitos del triptófano estudiados, utilizando el modelo oxidativo FeCl₃ y ácido ascórbico .

	IC ₅₀ (mM) Rigidez de membrana	IC ₅₀ (mM) MDA+4-HDA	IC ₅₀ (mM) Restos carbonilo
Triptófano	---	---	---
5-Hidroxitriptófano	2,40	1,38	2,62
Triptamina	---	0,41	---
5-Metoxitriptamina	---	0,16	---
N-acetilserotonina	0,12	0,15	0,16
Melatonina	3,80	3,51	3,31
5-metoxiindol-3-acético	---	---	---
5-Metoxitriptofol	---	0,62	0,63
Triptolina	0,33	0,63	0,52
Pinolina	0,03	0,17	0,15

Efectos en ausencia de daño oxidativo

Triptófano y 5-hidroxitriptófano

Se estudiaron los efectos del **triptófano** sobre las membranas plasmáticas de hepatocitos sin la presencia de FeCl₃ y ácido ascórbico, con la finalidad de determinar la influencia de éste aminoácido sobre la dinámica de los fosfolípidos. Se utilizaron las mismas concentraciones de triptófano que las empleadas en los experimentos con el modelo oxidativo 0,01; 0,1; 0,3; 1 y 3 mM. Los resultados se resumen en la Tabla XIX. Ninguna concentración de triptófano produjo modificaciones significativas sobre la fluidez, ni sobre la aparición de metabolitos derivados de la oxidación de lípidos y

Tabla XIX. Efectos del triptófano sobre la fluidez, la formación de MDA+4-HDA y la carbonilación proteica de membranas de hepatocitos. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de 5 experimentos independientes.
proteínas de la membrana.

	Fluidez de membrana (1/Polarización)	MDA+4-HDA (nmol / mg proteína)	Restos carbonilo (nmol / mg proteína)
Control	3,71 \pm 0,05	1,01 \pm 0,11	4,73 \pm 0,75
+ Triptófano 0,01 mM	3,74 \pm 0,05	1,08 \pm 0,10	6,50 \pm 1,14
+ Triptófano 0,1 mM	3,71 \pm 0,05	1,41 \pm 0,29	6,31 \pm 0,94
+ Triptófano 0,3 mM	3,76 \pm 0,06	1,30 \pm 0,15	7,66 \pm 1,19
+ Triptófano 1 mM	3,73 \pm 0,07	1,17 \pm 0,11	6,75 \pm 1,37
+ Triptófano 3 mM	3,75 \pm 0,05	1,72 \pm 0,57	6,31 \pm 0,87

A continuación se evaluó el efecto del **5-hidroxitriptófano**. En la Tabla XX se detallan los resultados obtenidos. Ninguna de sus concentraciones modificaron la fluidez, ni la concentración de MDA+4-HDA, ni la formación de restos carbonilo.

Tabla XX. Efecto del 5-hidroxitriptófano (5-OH-Trp) sobre las membranas de hepatocitos en ausencia de FeCl₃ y ácido ascórbico 0,1 mM. Los resultados se expresan como media ± error estándar de 5 experimentos independientes. N=5. * $p \leq 0,05$ vs. membranas control

	Fluidez de membrana (1/Polarización)	MDA+4-HDA (nmol / mg proteína)	Restos carbonilo (nmol / mg proteína)
Control	3,62 ± 0,05	1,03 ± 0,15	4,82 ± 0,57
+ 5-OH-Trp 0,1 mM	3,56 ± 0,02	0,84 ± 0,10	6,09 ± 0,47
+ 5-OH-Trp 0,3 mM	3,57 ± 0,04	0,96 ± 0,12	6,74 ± 0,62*
+ 5-OH-Trp 1 mM	3,55 ± 0,04	1,07 ± 0,13	6,18 ± 0,12
+ 5-OH-Trp 3 mM	3,61 ± 0,04	1,16 ± 0,17	5,76 ± 0,33
+ 5-OH-Trp 5 mM	3,62 ± 0,03	1,10 ± 0,22	5,28 ± 0,30

Triptamina, 5-metoxitriptamina y N-acetilserotonina

Los resultados de fluidez de membrana, MDA+4-HDA y de restos carbonilo para la **triptamina** se detallan en la Tabla XXI. La triptamina en ausencia de estrés oxidativo modificó la membrana de hepatocitos incrementando significativamente su fluidez. También los valores de MDA+4-HDA en concentraciones de 0,1 a 3 mM aumentaron aunque muy ligeramente respecto al control. Los niveles de restos carbonilo de las proteínas aumentaron de forma marcada en todas las concentraciones evaluadas.

Tabla XXI. Efecto de la triptamina en la fluidez, formación de MDA+4-HDA y carbonilación proteica de membranas de hepatocitos. Resultados expresados como media \pm error estándar. N=5. * $p \leq 0,05$ vs. control.

	Fluidez de membrana (1/Polarización)	MDA+4-HDA (nmol / mg proteína)	Restos carbonilo (nmol / mg proteína)
Control	3,65 \pm 0,04	0,70 \pm 0,27	4,41 \pm 0,41
+ Triptamina 0,1 mM	3,79 \pm 0,04*	1,82 \pm 0,33*	16,57 \pm 1,20*
+ Triptamina 0,3 mM	4,06 \pm 0,06*	2,05 \pm 0,35*	27,49 \pm 2,01*
+ Triptamina 1 mM	4,03 \pm 0,07*	1,66 \pm 0,42*	25,63 \pm 1,53*
+ Triptamina 3 mM	3,84 \pm 0,07*	1,60 \pm 0,43*	22,57 \pm 1,41*
+ Triptamina 5 mM	3,73 \pm 0,14	1,31 \pm 0,41	18,09 \pm 1,42*

Similares fueron los resultados de la forma 5-metoxi de la triptamina (Tabla XXII). Se observa que desde la menor concentración estudiada, 0,1 mM, la **5-metoxitriptamina** elevó los niveles de fluidez en las membranas y de restos carbonilo, mucho más que los valores obtenidos para los controles. Respecto a los lípidos, su efecto fue bastante menor y únicamente a 0,3 mM se apreció un discreto pero significativo incremento de la concentración de MDA+4-HDA.

Tabla XXII. La 5-metoxitriptamina aumentó la fluidez y la carbonilación proteica en membranas aisladas de tejido hepático. Resultados expresados como media \pm error estándar de 5 experimentos.

$N=5$. * $p \leq 0,05$ vs. control.

	Fluidez de membrana (1/Polarización)	MDA+4-HDA (nmol / mg proteína)	Restos carbonilo (nmol / mg proteína)
Control	3,58 \pm 0,08	1,18 \pm 0,36	5,13 \pm 0,76
+ Metoxitriptamina 0,1 mM	3,88 \pm 0,03*	1,05 \pm 0,32	13,88 \pm 0,89*
+ Metoxitriptamina 0,3 mM	4,22 \pm 0,04*	1,51 \pm 0,39*	19,05 \pm 1,37*
+ Metoxitriptamina 1 mM	4,29 \pm 0,03*	1,49 \pm 0,43	19,37 \pm 0,96*
+ Metoxitriptamina 3 mM	4,30 \pm 0,03*	1,30 \pm 0,41	15,34 \pm 1,01*
+ Metoxitriptamina 5 mM	4,28 \pm 0,44*	1,14 \pm 0,41	13,61 \pm 0,61*

En cuanto a la **N-acetilserotonina**, (Tabla XXIII), se evidenció claramente que en todas las concentraciones evaluadas, la N-acetilserotonina, no modificó ni la fluidez de la membrana, ni la concentración de MDA+4-HDA. Tan sólo a la mayor concentración, 1 mM, se observó una discreta, pero significativa disminución del nivel basal de los restos carbonilo.

Tabla XXIII. Efecto de la N-acetilserotonina (NAS) en la fluidez de membranas de hepatocito y en la formación de MDA+4-HDA y restos carbonilo proteicos. Resultados expresados como media \pm error estándar. $N=5$. * $p \leq 0,05$ vs. membranas control.

	Fluidez de membrana (1/Polarización)	MDA+4-HDA (nmol / mg proteína)	Restos carbonilo (nmol / mg proteína)
Control	3,70 \pm 0,04	1,40 \pm 0,17	3,75 \pm 0,27
+ NAS 0,01 mM	3,71 \pm 0,04	1,44 \pm 0,48	3,95 \pm 0,31
+ NAS 0,05 mM	3,71 \pm 0,03	1,81 \pm 0,68	4,13 \pm 0,31
+ NAS 0,1 mM	3,70 \pm 0,05	1,86 \pm 0,83	3,66 \pm 0,22
+ NAS 0,3 mM	3,72 \pm 0,04	2,04 \pm 0,71	3,48 \pm 0,25
+ NAS 1 mM	3,75 \pm 0,02	1,92 \pm 0,71	3,04 \pm 0,37*

Melatonina

La actividad de la melatonina sobre la dinámica de los fosfolípidos, la formación de MDA+4-HDA y la carbonilación proteica en ausencia del modelo oxidativo, se compendian en la tabla XXIV. La melatonina no modificó la fluidez de la membrana ni produjo carbonilación en las proteínas. A nivel de la oxidación lipídica detectada por la formación de MDA+4-HDA, el antioxidante incluso bajó significativamente, respecto a los controles, los valores de MDA+4-HDA en el rango de concentración 3-5 mM.

Tabla XXIV. La melatonina no modifica la fluidez de la membrana hepática en ausencia de estrés oxidativo. Se incluyen resultados sobre la formación de MDA+4-HDA y la carbonización proteica. N=5. * $p \leq 0,05$ vs. control.

	Fluidez de membrana (1/Polarización)	MDA+4-HDA (nmol / mg proteína)	Restos carbonilo (nmol / mg proteína)
Control	3,77 ± 0,03	2,09 ± 0,40	6,70 ± 0,75
+ Melatonina 0,1 mM	3,82 ± 0,03	2,18 ± 0,41	7,00 ± 0,41
+ Melatonina 0,3 mM	3,78 ± 0,06	2,13 ± 0,44	6,48 ± 0,46
+ Melatonina 1 mM	3,83 ± 0,04	1,93 ± 0,40	6,55 ± 0,24
+ Melatonina 3 mM	3,80 ± 0,03	1,32 ± 0,28*	5,74 ± 0,47
+ Melatonina 5 mM	3,77 ± 0,03	1,47 ± 0,22*	5,24 ± 0,30

Metoxiindoles de la vía de la monoaminoxidasa

Los resultados del **ácido 5-metoxiindol-3-acético** se exponen en la Tabla XXV. No modificó ni la formación de MDA+4-HDA ni la carbonilación proteica en ninguna de las concentraciones evaluadas y sólo incrementó significativamente la fluidez de la membrana a la concentración más alta.

Tabla XXV. Efecto del ácido 5-metoxiindol-3-acético (Mia) en la fluidez y las concentraciones de MDA+4-HDA y restos carbonilo en membranas de hepatocitos. N=5. * $p \leq 0,05$ vs. control.

	Fluidez de membrana (1/Polarización)	MDA+4-HDA (nmol / mg proteína)	Restos carbonilo (nmol / mg proteína)
Control	3,56 ± 0,01	1,96 ± 0,26	5,08 ± 0,83
+ Mia 0,1 mM	3,57 ± 0,02	1,90 ± 0,26	5,43 ± 1,34
+ Mia 0,3 mM	3,57 ± 0,02	1,85 ± 0,35	5,57 ± 1,55
+ Mia 1 mM	3,58 ± 0,02	1,78 ± 0,29	4,86 ± 1,09
+ Mia 3 mM	3,65 ± 0,04	1,87 ± 0,37	4,97 ± 0,79
+ Mia 5 mM	3,72 ± 0,02*	1,71 ± 0,40	4,07 ± 1,31

Respecto al **5-metoxitriptofol** (tabla XXVI) no se observan cambios significativos ni en la fluidez de membrana, ni en la formación de MDA+4-HDA, ni en los valores de restos carbonilo en ausencia del modelo generador de radicales libres.

Tabla XXVI. Efecto del 5-metoxitriptofol sobre la fluidez, MDA+4-HDA y las proteínas de membrana de hepatocitos. Resultados expresados como media ± error estándar. N=5.

	Fluidez de membrana (1/Polarización)	MDA+4-HDA (nmol / mg proteína)	Restos carbonilo (nmol / mg proteína)
Control	3,65 ± 0,09	1,52 ± 0,38	5,15 ± 0,49
+ Metoxitriptofol 0,1 mM	3,64 ± 0,05	1,81 ± 0,42	5,84 ± 0,38
+ Metoxitriptofol 0,3 mM	3,66 ± 0,03	1,67 ± 0,35	5,44 ± 0,35
+ Metoxitriptofol 1 mM	3,65 ± 0,03	1,52 ± 0,37	5,08 ± 0,35
+ Metoxitriptofol 3 mM	3,63 ± 0,06	1,26 ± 0,35	4,76 ± 0,49
+ Metoxitriptofol 5 mM	3,64 ± 0,10	1,39 ± 0,40	5,30 ± 0,53

β -carbolicinas

Los resultados obtenidos para la **triptolina** se detallan en la Tabla XXVII. No existen cambios significativos ni en MDA+4-HDA, ni en la carbonilación proteica, sin embargo hay una disminución de la fluidez de membrana a la concentración más alta.

Tabla XXVII. Efectos de la triptolina sobre MDA+4-HDA, restos carbonilo y fluidez de membranas de hepatocitos. Los resultados son media \pm error estándar. N=5. * $p \leq 0,05$ vs. control.

	Fluidez de membrana (1/Polarización)	MDA+4-HDA (nmol / mg proteína)	Restos carbonilo (nmol / mg proteína)
Control	3,65 \pm 0,03	1,52 \pm 0,35	5,14 \pm 0,68
+ Triptolina 0,1 mM	3,66 \pm 0,02	1,55 \pm 0,25	6,38 \pm 0,79
+ Triptolina 0,2 mM	3,65 \pm 0,03	1,49 \pm 0,25	5,85 \pm 0,97
+ Triptolina 0,4 mM	3,59 \pm 0,03	1,47 \pm 0,28	5,61 \pm 1,22
+ Triptolina 0,6 mM	3,63 \pm 0,03	1,46 \pm 0,19	5,43 \pm 0,81
+ Triptolina 1 mM	3,58 \pm 0,03*	1,59 \pm 0,18	6,72 \pm 0,96

Finalmente se valoró la **pinolina** (Tabla XXVIII). Desde 0,05 mM se observó que incrementó la fluidez de la membrana, sin embargo no modificó MDA+4-HDA y hubo mínimas variaciones en los restos carbonilo a 0,05 y 1 mM.

Tabla XXVIII. Efectos de la pinolina en la fluidez, MDA+4-HDA y carbonilación proteica. Resultados media \pm error estándar. N=5. * $p \leq 0,05$ vs. control.

	Fluidez de membrana (1/Polarización)	MDA+4-HDA (nmol / mg proteína)	Restos carbonilo (nmol / mg proteína)
Control	3,62 \pm 0,02	1,51 \pm 0,11	6,34 \pm 0,35
+ Pinolina 0,01 mM	3,66 \pm 0,03	1,61 \pm 0,09	5,75 \pm 0,24
+ Pinolina 0,05 mM	3,73 \pm 0,04*	1,51 \pm 0,10	5,35 \pm 0,30*
+ Pinolina 0,1 mM	3,84 \pm 0,04*	1,49 \pm 0,15	5,46 \pm 0,37*
+ Pinolina 0,2 mM	4,05 \pm 0,03*	1,73 \pm 0,27	6,01 \pm 0,57
+ Pinolina 0,4 mM	4,51 \pm 0,07*	1,55 \pm 0,13	5,40 \pm 0,32

DISCUSIÓN

La elevada tasa metabólica del hígado, su propensión al ataque mediado por los radicales libres, la facilidad para el aislamiento de las membranas y el considerable volumen de muestra disponible para la realización de los ensayos, nos motivaron a seleccionar el tejido hepático como adecuado para el estudio del efecto protector de la melatonina y otras indolaminas derivadas del triptófano frente al daño oxidativo causado por radicales libres.

En esta investigación comparamos, por primera vez, los efectos de una batería de indolaminas y de sus principales derivados tricíclicos sobre la fluidez de la membrana celular en presencia y ausencia de un sistema generador de radicales libres. Como las membranas de las células eucariotas se componen principalmente de lípidos y proteínas incluimos los dos indicadores de daño oxidativo en las membranas celulares más utilizados en la literatura científica, la cuantificación del MDA + 4-HDA como un índice de la oxidación de los fosfolípidos y la incorporación de restos carbonilo como indicador de daño a las proteínas.

Aunque en los estudios de cinética de tiempo del modelo, se obtuvieron resultados significativos de lesión oxidativa a los lípidos y proteínas a partir de los 10 minutos, y de los 20 minutos para la fluidez de la membrana, seleccionamos el tiempo de 120 minutos con objeto de incrementar la diferencia entre los controles con y sin FeCl₃ y ácido ascórbico, y de esa manera posibilitar la obtención de unos resultados intermedios al incluir en el diseño experimental diversas concentraciones de las indolaminas, lo que nos permitiría a su vez calcular los valores de IC₅₀ para cada molécula evaluada.

La elección del modelo generador de radicales libres, en el que se reduce el hierro (III) a hierro (II) por acción del ácido ascórbico, se fundamentó en que el hierro reducido causa la generación de ·OH mediante la bien conocida reacción de Fenton (Fenton, 1894; Kanner y cols., 1987). Nuestro grupo de investigación ya tiene experiencia con este modelo, en diferentes trabajos y publicaciones científicas (Millán-Plano y cols., 2003; Albendea y cols., 2007). Además, las concentraciones de hierro y ácido ascórbico utilizadas fueron 0,1 mM, lo que coincide con otros autores (Sahu y Washington, 1991; Wiseman y Halliwell, 1994).

El aminoácido **triptófano** es un componente habitual de las membranas biológicas y desempeña un papel importante en la solubilidad de las proteínas que la integran (Schiffer y cols., 1992). Sin embargo, se conoce muy poco de sus efectos sobre la oxidación de las membranas celulares. De los resultados de nuestro estudio (Tabla VIII) podemos deducir que el triptófano en presencia de hierro (II) tuvo un comportamiento neutro en todas las concentraciones utilizadas, debido a que no modificó significativamente los cambios en la fluidez de membrana, ni la formación de MDA+4-HDA, ni la carbonilación proteica. En ausencia de estrés oxidativo el triptófano tampoco alteró la fluidez de la membrana celular ni los indicadores bioquímicos de estrés oxidativo. Estos resultados nos sugieren que éste aminoácido carece de actividades prooxidantes o antioxidantes.

En la literatura científica no existe un resultado unánime respecto a sus efectos pro o antioxidantes. Al igual que nosotros, Chan y Tang utilizando liposomas y membranas de eritrocitos de rata expuestos a Fe^{+2} y H_2O_2 , concluyeron que el triptófano careció de actividad antioxidante (Chan y Tang, 1996). Sin embargo, otros trabajos realizados con ratas que recibieron una dieta rica en triptófano, describieron aumentos del MDA y otras sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, en el plasma y en varios tejidos, lo que sugería que éste aminoácido tenía actividad prooxidante (Mathur y Sahai, 1990; Aviram y cols., 1991; Ronen y cols., 1999). Contrariamente se describió su comportamiento antioxidante, así en 1996, utilizando un modelo en el que la interacción de $\cdot OH$ y $ROO\cdot$ con ABTS, produjo $ABTS^{\bullet+}$, se demostró que el triptófano redujo la aparición de este radical catiónico, mediada por su capacidad para depurar $\cdot OH$ y $ROO\cdot$. En ese mismo año, también se comparó su actividad antioxidante con la de la melatonina, observándose que la diferencia del aminoácido triptófano era unos 5 órdenes de magnitud menor y que solamente se manifestaba a concentraciones muy elevadas, 5 mM (Poeggeler y cols., 1996). También es reseñable otra experiencia con triptófano y melatonina protegiendo *in vivo* la aparición de lesiones en la mucosa gástrica causadas por isquemia-reperfusión de la arteria gástrica; su efecto protector se explicó por la depuración directa de radicales libres y el aumento de la síntesis de la prostaglandina E_2 (Brzozowski y cols., 1997). Recientemente, el mismo grupo de investigación, ha demostrado que la melatonina y el triptófano aceleran la cicatrización de las úlceras gástricas provocadas por el ácido acético (Brzozowska y cols., 2002). En

está misma línea cabe destacar que la administración de triptófano redujo la severidad de la pancreatitis inducida por ceruleína y por un modelo de isquemia-reperfusión (Jaworek y cols., 2003).

En diversas experiencias *in vitro*, el triptófano, disminuyó la oxidación de liposomas expuestos a ROO \cdot utilizando un modelo con FeCl $_3$ y ácido ascórbico, y otro basado en el NO \cdot (Christen y cols., 1990; Chan y Tang, 1996; Noda y cols., 1999). Más recientemente se ha descrito la capacidad del triptófano para proteger al aminoácido tirosina, de la nitración inducida por ONOO $^-$, su IC $_{50}$ fue de 2,0 mM (Nakagawa y cols., 2004). En líneas generales, en este grupo de experimentos *in vitro*, la acción pro o antioxidante del triptófano no se produjo o se observaron pequeñas modificaciones a sus concentraciones más altas, resultados similares a los nuestros, ya que tampoco obtuvimos cambios protectores o agravantes de lesión oxidativa causada por FeCl $_3$ y ácido ascórbico en las membranas celulares de tejido hepático.

Sin embargo, observamos que el triptófano presentó un leve efecto, no significativo, en la carbonilación de las proteínas de membranas de hepatocitos inducida por el hierro lo que sugiere una discreta tendencia prooxidante. Este hecho que difiere con los reportados sobre la peroxidación lipídica, podría explicarse al menos parcialmente por dos circunstancias: la primera, su buena hidrosolubilidad, lo que facilita su difusión en la región hidrofílica próxima a las proteínas y su escasa interacción con el *core* hidrofóbico de la bicapa (Davies y cols., 1987); y segundo porque el triptófano podría generar nuevas especies reactivas que lo utilizan como base y ocasionan alteraciones en la estructura y función de algunas proteínas (Eiserich y cols., 1995). En este sentido cabe reseñar que el triptófano es un aminoácido esencial constitutivo de numerosas proteínas y que junto a la tirosina tiene una mayor susceptibilidad a la lesión oxidativa (Davies y cols., 1987; Reyftmann y cols., 1990; Uchida y cols., 1990; Pietraforte y Minetti, 1997; Metodiewa, 1998; Irwin y cols., 1999). De su interacción con radicales libres derivarían nuevas especies reactivas que tienen suficiente inestabilidad electrónica como para atacar a otros aminoácidos vecinos propagando la oxidación lipídica por toda la proteína (Eiserich y cols., 1995).

El primer metabolito obtenido a partir del triptófano en la glándula pineal es el **5-hidroxitriptófano**. Los resultados evidenciaron claramente un comportamiento

antioxidante en la protección de lípidos, proteínas y estabilizando las membranas frente a la lesión oxidativa causada por hierro. Las IC_{50} fueron 1,38, 2,62 y 2,40 mM para la prevención del daño oxidativo a lípidos, proteínas y fluidez respectivamente. Hay muy poco publicado sobre el efecto del 5-hidroxitriptófano en la peroxidación lipídica y nuestros resultados son los primeros que evalúan su acción en la oxidación de proteínas y en la fluidez de membrana. Existe unanimidad en indicar que el 5-hidroxitriptófano reduce la peroxidación lipídica causada por radicales libres. En 1989 se demostró que el 5-hidroxitriptófano redujo los valores de MDA+4-HDA derivados de la peroxidación lipídica inducida por hierro en microsomas hepáticos de rata (Cadenas y cols., 1989), lo que fue confirmado posteriormente al demostrarse que también protegió a los liposomas del ataque del $ROO\cdot$ (Christen y cols., 1990). Además se ha descrito su capacidad para depurar el $NO\cdot$ (Noda y cols., 1999) y para suprimir la apoptosis inducida por la radiación ultravioleta en monocitos humanos (Lysek y cols., 2003). Su actividad antioxidante se ha vinculado a su núcleo indólico (Uchida y cols., 1990), sin embargo, aún se desconoce el mecanismo molecular de la función antioxidante de este indol. Aunque este núcleo es común para el triptófano y el 5-hidroxitriptófano, únicamente esta última molécula tiene una clara función antioxidante, por lo que se puede inferir que la presencia del grupo hidroxilo en el C_5 del triptófano debe estar relacionada con el mecanismo antioxidante, probablemente porque facilita los procesos de transferencia electrónica (Christen y cols., 1990).

Los resultados obtenidos en la literatura científica protegiendo la peroxidación lipídica, se amplían con los efectos protectores de la oxidación proteica y reducción de la rigidez, causados ambos por el $FeCl_3$ y el ácido ascórbico. Estos resultados confirman su amplio espectro como molécula antioxidante. Los valores de IC_{50} para los tres son bastante similares, aunque ligeramente mayores en el caso de la oxidación proteica, lo que podría explicarse por la complejidad estructural de las proteínas que integran la membrana de los hepatocitos en relación a los lípidos, lo que dificultaría la protección en aquellas regiones de las proteínas a las que por su estructura tridimensional resulta muy difícil el acceso del antioxidante. Otro hecho destacado es que ninguna de las concentraciones de 5-hidroxitriptófano estudiadas, modificó los niveles basales de fluidez y de los indicadores de estrés oxidativo. Esto tiene especial interés ya que los niveles de fluidez deben mantenerse en unos márgenes estrechos para preservar una

función adecuada. En este sentido, los tocoferoles pueden alterar la dinámica de los fosfolípidos en condiciones de ausencia de estrés oxidativo. Ohyashiki y cols. demostraron que la adición de α -tocoferol a membranas aisladas del borde en cepillo de enterocitos de origen porcino, redujo la movilidad de las moléculas de pireno porque el α -tocoferol interaccionó con los fosfolípidos de la membrana (Ohyashiki y cols., 1986). La misma acción se ha demostrado para otros derivados de la vitamina E (Massey y cols., 1982; Ohki y cols., 1984). También el tamoxifeno y su metabolito más activo, el 4-hidroxitamoxifeno, alteran la fluidez en ausencia de estrés oxidativo por un efecto mimético al del colesterol (Wiseman y cols., 1993).

Otro grupo de moléculas estudiadas fue el integrado por la triptamina y sus metabolitos, la 5-metoxitriptamina y la N-acetilserotonina. La prevención de la rigidez causada por el daño oxidativo así como la reducción de los niveles de MDA+4-HDA y de restos carbonilo en las membranas de hepatocitos (Figuras 37 a 39), evidenció claramente que las tres indolaminas tuvieron un comportamiento antioxidante.

Aunque la **triptamina** es un indol que no aparece en la ruta metabólica del triptófano en la glándula pineal, presenta un núcleo químico común con la 5-metoxitriptamina y la N-acetilserotonina. Se diferencia de la primera por la ausencia de un grupo metoxi en la posición C₅, y de la segunda por la falta del resto hidroxilo y el N-acetilo. Esta indolamina fue muy eficiente en la prevención de la peroxidación lipídica, IC₅₀= 0,41 mM, sin embargo, tuvo menor actividad en la prevención de la carbonilación de proteínas. Respecto a la fluidez de membrana presentó un comportamiento ambiguo, reduciendo la rigidez a las concentraciones de 1 y 3 mM, pero falló en la concentración más alta ensayada, 5 mM. Pocos son los estudios en los que se evaluó la actividad antioxidante de la triptamina. Se ha descrito que ésta indolamina disminuye la formación de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico, inducidas por el t-butilhidroperóxido, así como la hiperglucemia generada por la administración del aloxano, una toxina pancreática que necrosa las células β de los islotes de Langerhans por un mecanismo en el que está implicado el estrés oxidativo (Stetinova y cols., 2002). También se describió que redujo la nitración de la tirosina inducida por el ONOO⁻ con una IC₅₀ de 1,8 mM (Nakagawa y cols., 2004). Todos estos trabajos y nuestros resultados están en la misma línea y evidencian que la triptamina es una indolamina con capacidad antioxidante, con efecto protector sobre las membranas

celulares, y sugieren que actúa protegiendo más a los lípidos que a las proteínas que las conforman. De hecho, sólo pudimos calcular su IC_{50} en la prevención de la peroxidación lipídica. Debido a que la triptamina es una molécula fuertemente apolar, es poco soluble en agua por lo que en la suspensión de membranas de hepatocitos la triptamina se pudo concentrar en la región hidrofóbica de la bicapa, posibilitando su mayor protección antioxidante en los restos de ácidos grasos de los fosfolípidos que en las proteínas de la membrana celular.

Nuestras observaciones también son concordantes con los resultados obtenidos por el grupo de investigación de Poeggeler (Poeggeler y cols., 1996), quienes calcularon que la tasa de reacción de la triptamina con el $\cdot OH$ es menor que la observada para $ROO\cdot$: $0,80 \cdot 10^6$ y $0,95 \cdot 10^6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ respectivamente. Los $ROO\cdot$ se forman a partir de las colas de ácido graso de los fosfolípidos de la región hidrofóbica en la bicapa de las membranas celulares, donde se localizará preferentemente la triptamina. Contrariamente, los $\cdot OH$ se distribuyen mejor en los entornos hidrofílicos, como los que rodean a las proteínas. La apolaridad de la triptamina y su mayor reactividad con $ROO\cdot$, podrían explicar su comportamiento antioxidante preferente en la formación de MDA+4-HDA, respecto a la carbonilación de las proteínas. De especial interés son los resultados obtenidos en ausencia del modelo generador de radicales libres. El tratamiento de las membranas con triptamina provocó una marcada elevación de la carbonilación proteica, un discreto efecto fluidificante, ya que disminuye la polarización en la luz emitida por el marcador TMA-DPH, y una tendencia a aumentar el MDA+4-HDA, especialmente a bajas concentraciones, datos diferentes a los que obtuvieron para el 5-hidroxitriptófano, y que pudieran desaconsejar su utilización como molécula antioxidante.

Cuando se introdujo un grupo metoxi en la posición C_5 de la triptamina, **5-metoxitriptamina**, se observó un potente efecto protector en las membranas de los hepatocitos. La capacidad protectora de los lípidos mejoró sustancialmente, observándose una disminución, respecto de la triptamina, en un 61,9% de la IC_{50} en la formación de MDA+4-HDA, en las membranas expuestas a hierro y ácido ascórbico. Sin embargo en el caso de los carbonilos no se evidenció una clara mejoría. La 5-metoxitriptamina fue una indolamina más potente al valorar la prevención del daño oxidativo en los lípidos de la membrana con una IC_{50} de 0,16 mM, resultado inferior al

de la triptamina y ligeramente superior al calculado para N-acetilserotonina: 0,15 mM. Existe un claro consenso, en que la 5-metoxitriptamina posee propiedades antioxidantes, lo que es coincidente con nuestras observaciones en membranas de hepatocitos. La 5-metoxitriptamina fue descrita por primera vez como antioxidante por Tan y cols. 1993, quienes demostraron que depuró $\cdot\text{OH}$ usando un modelo que los produjo por ruptura fotolítica del H_2O_2 cuando se expuso a la radiación ultravioleta. Su actividad antioxidante fue del 40% respecto a la de la melatonina. En el mismo modelo se valoró la N-acetilserotonina comprobándose que ésta no tuvo capacidad para eliminar los $\cdot\text{OH}$, sugiriendo la necesidad del grupo metoxi en la actividad antioxidante de la melatonina (Tan y cols., 1993). Resultados antioxidantes semejantes fueron descritos en 1996 (Matuszak y cols., 1997) y 1997 (Chan y Tang, 1996) quienes demostraron como la 5-metoxitriptamina, redujo la peroxidación lipídica inducida por el FeSO_4 en liposomas de fosfolípidos y en membranas eritrocitarias; una actividad que también fue confirmada en homogeneizados de cerebro, hígado y riñón de rata (Ng y cols., 2000). La administración de la 5-metoxitriptamina, en ratas Sprague-Dawley, previa al estrés oxidativo producido por el ejercicio físico, redujo los descensos en los niveles de glutatión, la tasa glutatión oxidado/reducido y los aumentos de la peroxidación lipídica en el tejido muscular consecutivos al esfuerzo tras una hora de natación (Hara y cols., 1997). Finalmente, la 5-metoxitriptamina disminuyó la peroxidación lipídica en el riñón de ratones inducida por la administración intraperitoneal de CCl_4 (Wang y cols., 2001). Al igual que sucedió con la triptamina, cuando las membranas se expusieron a la forma 5-metoxilada en ausencia de estrés oxidativo, se produjo un incremento de la carbonilación proteica y de la fluidez, y una ligera tendencia a la oxidación lipídica en las membranas. Resultados explicables por su similitud estructural con la triptamina.

La actividad estabilizadora de la fluidez en la membrana y antioxidante de sus lípidos y proteínas, mejoró sustancialmente con la inclusión del grupo hidroxilo en posición C_5 y del resto N-acetilo en la molécula de triptamina, como se demostró con nuestros resultados obtenidos con la **N-acetilserotonina**, indolamina de mayor eficiencia que las otras dos estudiadas en este apartado. Así, se obtuvieron valores de IC_{50} de 0,12, 0,15 y 0,16 para prevenir la rigidez de membrana, la peroxidación lipídica y la oxidación de proteínas, respectivamente, lo que refleja un aumento de la eficacia en la protección frente a la formación de restos carbonilo y en la fluidez de membrana.

Estos resultados sugieren que la hidroxilación y N-acetilación de la triptamina, posibilitan que aumente la capacidad de transferencia de electrones con los radicales libres, lo que unido a una mejora de su hidrosolubilidad favorece su acción en el medio hidrofílico que rodea a las proteínas y por ello les brinda una mayor protección.

Aunque inicialmente se describió la incapacidad de la N-acetilserotonina para depurar $\cdot\text{OH}$ generados en el sistema de H_2O_2 y luz ultravioleta (Tan y cols., 1993) y posteriormente se propuso que ésta acelera la actividad prooxidante del ascorbato (Siraki y O'Brien, 2002), varios trabajos apoyan su función antioxidante. Destacan los que demuestran la prevención de la peroxidación lipídica de liposomas en modelos para generar especies reactivas como el $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 y HClO (Chan y Tang, 1996), en homogeneizados de retina incubados con hierro ferroso (Longoni y cols., 1997; Siu y cols., 1999; Guajardo y cols., 2003), en homogeneizados de testículo expuestos a H_2O_2 y sulfato ferroso (Karbownik y cols., 2001), en microsomas hepáticos tratados con $\text{FeCl}_3/\text{ADP}/\text{NADPH}$ (García y cols., 2001), y en la oxidación inducida por Cu^{2+} a las lipoproteínas séricas de baja densidad (Seegar y cols., 1997). También se han descrito propiedades neuroprotectoras de la N-acetilserotonina por aumentar la supervivencia celular en cultivos neuronales expuestos a radicales libres (Moosmann y cols., 1997; Lezoualc'h y cols., 1998; Post y cols., 1998) y por la protección de la neurotoxicidad causada por el péptido $\text{A}\beta$ (Bachurin y cols., 1999), una acción que puede favorecerse por la prevención del daño oxidativo al ADN (Qi y cols., 2000).

En algunos trabajos *in vivo* también se demostró la eficacia de la N-acetilserotonina. Destacan el de Calvo y cols. (2001), donde la indolamina estabilizó membranas microsómicas hepáticas frente a la toxicidad del α -naftilisotiocianato, una toxina que produce necrosis hepática (Calvo y cols., 2001); la reducción de la incidencia de cataratas y de la formación de MDA+4-HDA en plasma y retina de ratas Sprague-Dawley expuestas a radiación ultravioleta (Yildirim y cols., 2003); y finalmente, la prevención de la lesión oxidativa causada por el lipopolisacárido, un componente de la pared bacteriana que causa un cuadro clínico similar al shock séptico (Requintina y Oxenkrug, 2003). A diferencia de la triptamina y 5-metoxitriptamina, ninguna de las concentraciones de N-acetilserotonina estudiadas por nosotros, modificó los niveles de fluidez en la membrana celular en ausencia de estrés oxidativo. A nivel de los indicadores de lesión oxidativa tampoco modificó la peroxidación lipídica basal e

incluso a la mayor concentración, 1 mM, redujo la carbonilación proteica basal. La importancia de preservar los niveles óptimos de la fluidez en ausencia de estrés oxidativo radica en la estrecha relación entre la función y la fluidez de una membrana, ya que pequeñas alteraciones de la fluidez pueden causar disminución, pérdida o incluso la aparición de funciones celulares aberrantes (Van Blitterswijk, 1985).

De todas las moléculas sintetizadas en la glándula pineal, la **melatonina** o N-acetil-5-metoxitriptamina, es el derivado del triptófano cuya función antioxidante está mejor estudiada en la literatura científica. Desde el descubrimiento de su acción antioxidante, más de un millar de trabajos publicados por diversos grupos de investigación, con multitud de modelos oxidativos experimentales lo sustentan. Véase las revisiones de Reiter y cols. sobre este tema (Reiter y cols., 1997a,b; Reiter, 1998b,c; Reiter y cols., 1999b; 2001; 2003; 2004; 2007). Bajo nuestras condiciones experimentales se confirmó su actividad antioxidante en la prevención de la oxidación lipídica y proteica, así como su efecto protector sobre la fluidez de la membrana plasmática en los hepatocitos de la rata.

La melatonina actúa sobre varias especies reactivas dependientes del oxígeno: $\cdot\text{OH}$, $\text{ROO}\cdot$, H_2O_2 , $^1\text{O}_2$, ONOO^- y HClO (Tan y cols., 2000b); de ellas, en el modelo experimental de FeCl_3 y ácido ascórbico utilizado en este trabajo, están implicadas las dos primeras. Se conoce que las tasas de reacción de la melatonina con los $\cdot\text{OH}$ y $\text{ROO}\cdot$ son elevadas, $0,60 \cdot 10^{11}$ y $0,75 \cdot 10^{11} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ respectivamente (Poeggeler y cols., 1996). La melatonina redujo la peroxidación lipídica en microsomas hepáticos expuestos a $\text{FeCl}_3/\text{ADP}/\text{NADPH}$ y potenció la función antioxidante de moléculas como el tamoxifeno y la pinolina (García y cols., 1997; 1998; 1999); previno la peroxidación lipídica causada por FeCl_3 y ácido ascórbico, en membranas del SNC, incluso cuando esta lesión fue potenciada por aluminio (Millán-Plano y cols., 2003; Albendea y cols., 2007); disminuyó la peroxidación de los lípidos producida por el aminoácido excitador glutamato (Herrera y cols., 2001) y por especies reactivas como el H_2O_2 , ONOO^- y $\text{NO}\cdot$ (Escames y cols., 1997; Frederiksen y cols., 1998; Pless y cols., 1999; Ortega-Gutiérrez y cols., 2002; Teixeira y cols., 2003; Piñol-Ripoll y cols., 2006).

En numerosos estudios *in vivo* también se demostró la acción protectora de la melatonina frente al daño oxidativo. Así, previno, incluso con mayor eficiencia que las

vitaminas C y E, los incrementos de las concentraciones de MDA+4-HDA cerebrales y cerebelosas producidos en la fenilcetonuria, un desorden autosómico recesivo causado por una deficiencia en la conversión de fenilalanina en tirosina (Martínez-Cruz y cols., 2002); atenuó el estrés oxidativo y las alteraciones del citoesqueleto causadas por el ácido okadaico (Benítez-King y cols., 2003; Túnez y cols., 2003), protegió a las neuronas de la excitotoxicidad causada por los ácidos quinolénico y kaínico (Tan y cols., 1998b; Cabrera y cols., 2000; Mohanan y Yamamoto, 2002; Chung y Han, 2003); previno la peroxidación lipídica causada por el péptido β -amiloide (Pappolla y cols., 1997a,b), el MPTP (Acuña-Castroviejo y cols., 1997; Ortiz y cols., 2001); el lipopolisacárido bacteriano (Sewerynek y cols., 1995; Escames y cols., 2003; 2006 Requentina y Oxenkrug, 2003;) y el vapor de tolueno (Baydas y cols., 2003). Además la administración de melatonina disminuyó la severidad del síndrome de isquemia-reperusión en el tejido cerebral (Wakatsuki y cols., 1999; Sinha y cols., 2001; Sener y cols., 2003b), y previno la aparición de cataratas por el tóxico butionin sulfoximina (Abe y cols., 1994).

Más recientemente en el año 2000, se demostró que la melatonina redujo la carbonilación de la albúmina sérica bovina causada por el hierro y el ácido ascórbico, con una IC_{50} aproximada de 1,4 mM (Kim y cols., 2000), también evitó la fragmentación y carbonilación de la albúmina bovina debida a Cu^{2+} y H_2O_2 (Mayo y cols., 2003), una acción que se extendió a otras proteínas como la lisozima, la albúmina sérica humana y la β -lactoglobulina A (Salvi y cols., 2001). En modelos *in vivo*, la melatonina previno la carbonilación proteica en el riñón e hígado de animales tratados con gentamicina y paracetamol (Sener y cols., 2002a; 2003a); amortiguó el daño oxidativo en la isquemia-reperusión hepática y renal y en las quemaduras (Sener y cols., 2002b,c,d; 2003b) y redujo la pérdida de bandas de espectrina y la disminución de restos sulfidrilo ocasionado por el $ONOO^-$ en las membranas de eritrocitos (Di Mascio y cols., 2000).

El incremento progresivo de restos carbonilo en las proteínas es uno de los indicadores de daño oxidativo celular, que se manifiesta a lo largo del envejecimiento (Levine y Stadtman, 2001). Cuando a ratas Sprague-Dawley se les extirpó la glándula pineal en el primer mes de vida, se observó un incremento en la carbonilación proteica en el tejido hepático a los 25 meses vida, respecto a ratas de edad semejante con la

función pineal conservada. Otros indicadores de daño oxidativo como el MDA+4-HDA, la 8-hidroxideoxiguanosina y la rigidez de membrana, también demostraron cambios en el mismo sentido. A la vista de los resultados, la ausencia de moléculas sintetizadas en la glándula pineal durante la mayor parte de la vida estuvo directamente implicada en la aceleración del envejecimiento fisiológico (Reiter y cols., 1999a). En el mismo sentido, en ratones con envejecimiento acelerado, SAM, se demostró que la melatonina administrada diariamente durante los últimos meses de vida, frenó la carbonilación proteica en la corteza cerebral hasta los valores propios de ratones SAM de tres meses de edad (Okatani y cols., 2002c).

Al igual que la N-acetilserotonina, su inmediato precursor en la vía de las indolaminas, ninguna concentración de melatonina modificó la fluidez de las membranas hepáticas en ausencia de estrés oxidativo. Estos resultados coinciden con las observaciones previas, utilizando espectroscopía de fluorescencia (García y cols., 1997; 1998; 1999) y las de Costa y cols. (1997) quienes mediante métodos basados en la resonancia del spin electrónico, demostraron que la melatonina no modificó la señal de marcadores colocados en posiciones del quinto y duodécimo carbono de los restos acilo de fosfolípidos de sinaptosomas, lo que indicó que la melatonina no modificó el grado de organización de la membrana, por lo menos a ese nivel. Respecto a los otros indicadores, en condiciones basales, la carbonilación proteica fue igual a los controles y las concentraciones de MDA+4-HDA incluso se redujeron, lo que refuerza la marcada actividad antioxidante de la melatonina.

La adición de un grupo metoxi en posición C₅ y de un grupo N-acetilo, en la triptamina, aumenta considerablemente la hidrosolubilidad de la indolamina, lo que sugiere una mayor presencia de melatonina en el ambiente acuoso que rodea a las proteínas. Esto posibilita el incremento de la protección antioxidante de melatonina sobre las proteínas, así como una pérdida de dicha protección a los lípidos y fluidez de membrana de hepatocitos, respecto a la triptamina. Por otro lado, la sustitución del grupo metoxi de la melatonina por el hidroxilo, como sucede en la N-acetilserotonina, redujo las IC₅₀ tanto para los lípidos y proteínas como para la fluidez de las membranas hepáticas. Debido a que ambas moléculas se distribuyen adecuadamente en los medios lipofílicos e hidrofílicos, cabe pensar que la inclusión del hidroxilo modificó significativamente la transferencia electrónica de las dos indolaminas, y de manera

favorable la capacidad antioxidante de la N-acetilserotonina. Finalmente, cuando se incluyó el grupo N-acetilo en la 5-metoxitriptamina, es decir con la melatonina, se apreció un aumento en la prevención del daño oxidativo inducido a las proteínas por el hierro (II) y una disminución de la protección a los lípidos y fluidez de membrana, lo que podría estar influenciado por el cambio en la solubilidad acuosa de la molécula.

Además de todos estos hechos que avalan la actividad antioxidante de la melatonina, ésta presenta algunas ventajas importantes sobre los antioxidantes clásicos. En primer lugar, la melatonina actúa en todos los compartimientos celulares, membrana, núcleo, citosol y mitocondria donde además de concentrarse (Menéndez-Peláez y cols., 1993; Menéndez-Peláez y Reiter, 1993), incrementa el transporte electrónico y la síntesis de ATP (Acuña-Castroviejo y cols., 2003). Además, su estructura química le otorga una gran facilidad para atravesar las membranas biológicas (Shida y cols., 1994; Costa y cols., 1995). Frente a radicales libres utiliza mecanismos de acción directos, interactuando con ellos, o indirectos, potenciando otros antioxidantes. En la actualidad no se conocen efectos adversos de importancia derivados de su uso en la clínica (Reiter y cols., 1997a). Por último, es muy destacable que algunos productos de su interacción con radicales libres como la 6-hidroximelatonina (Seegar y cols., 1997; Maharaj y cols., 2003a,b), la N¹-acetil-N²-formil-5-metoxikinuramina (Burkhardt y cols., 2001) y la N¹-acetil-5-metoxikinuramina (Ressmeyer y cols., 2003) también posean propiedades antioxidantes (Tan y cols., 2000b; 2001; 2003).

En el estudio de los metoxiindoles de la vía de la MAO se incluyen el ácido 5-metoxiindol-3-acético y el 5-metoxitriptofol, dos indoles sintetizados preferentemente en la fase diurna, a diferencia de melatonina y N-acetilserotonina, ya que su precursor serotonina es una indolamina que alcanza mayor concentración durante el día en la glándula pineal. En nuestro trabajo experimental se observó que ninguna de las concentraciones evaluadas del **ácido 5-metoxiindol-3-acético** modificó la formación de MDA+4-HDA, ni la oxidación de proteínas y tan sólo a las mayores concentraciones, 3 y 5 mM, el ácido protegió levemente la fluidez de las membranas de hepatocitos expuestas a hierro y ácido ascórbico, unos resultados que sugieren una escasa o nula actividad antioxidante en membranas celulares. Nuestras observaciones coinciden y amplían las obtenidas por Wang y cols. donde el 5-metoxiindol-3-acético tampoco previno la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad séricas (Wang y cols., 2001),

aunque la indolamina sí se comportó como un antifúngico frente a *Mycosphaerella arachidicola*, *Botrytis cinerea* y *Physalospora piricola*, posiblemente por mecanismos independientes de la lesión oxidativa. También son concordantes con las observaciones de Ng y cols. que utilizaron un modelo de hemólisis y otro peroxidación en sinaptosomas (Ng y cols., 2000). Sin embargo, se ha descrito una tasa de reacción de este indol con $\cdot\text{OH}$ y $\text{ROO}\cdot$, aunque sólo se logró cuando el pH del medio de incubación fue marcadamente ácido (Poeggeler y cols., 1996), lo que podría explicar la ausencia de actividad antioxidante significativa del trabajo de Wang y cols., con el de Ng y cols. y el nuestro, ya que los dos se realizaron manteniendo un pH fisiológico.

En ausencia de FeCl_3 y ácido ascórbico, tan sólo a su mayor concentración, 5 mM, aumentó ligeramente la fluidez en las membranas hepáticas. Este hecho junto con la ausencia de cambios en la formación de MDA+4-HDA y la carbonilación proteica, y sobretodo, la incapacidad para reducir la oxidación lipídica y proteica inducida por los reactivos fentonianos sugieren que el incremento en la fluidez de la membrana en presencia y ausencia de hierro, se debe a una interacción directa del ácido 5-metoxiindol-3-acético en la dinámica de los fosfolípidos de la bicapa lipídica.

El **5-metoxitriptofol**, tiene un marcado efecto antioxidante de los lípidos y proteínas en todas las concentraciones evaluadas, y una evidente protección de las membranas de hepatocitos, ya que a concentraciones de 0,1-1 mM, disminuyó la rigidez causada por el hierro. Las escasas publicaciones que estudian el 5-metoxitriptofol lo describen como un antioxidante, así, las tasas de reacción de esta metoxiindolamina con $\cdot\text{OH}$ y $\text{ROO}\cdot$ en el modelo del ABTS fueron $0,20\cdot 10^9$ y $0,45\cdot 10^9$ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ respectivamente (Poeggeler y cols., 1996); además evitó la peroxidación lipídica en sinaptosomas expuestos a hierro y ácido ascórbico (Ng y cols., 2000), y a H_2O_2 (Ortega-Gutiérrez y cols., 2002). Finalmente, García y cols. describieron que protegió a las membranas microsómicas hepáticas del daño causado por radicales libres (García y cols., 2000b). La exposición de las membranas al 5-metoxitriptofol en ausencia de hierro no provocó cambios significativos ni de la fluidez en la membrana hepática ni de sus indicadores de lesión oxidativa a lípidos o proteínas. Estos resultados son muy similares a los publicados por nuestro grupo de investigación en microsomas hepáticos en lo referente a las concentraciones de MDA+4-HDA y difieren ligeramente en la valoración de la fluidez en la membrana, ya que en microsomas, ésta disminuyó por la

exposición a concentraciones de 5-metoxitriptofol mayores a 0,3 mM (García y cols., 2000b).

Las β -carbolinas, son moléculas tricíclicas que pueden obtenerse por condensación de una indolamina con un aldehído (McIsaac y cols., 1972; Bosin y cols., 1983; Callaway y cols., 1994; Pähkla y cols., 1996). De ellas destaca la **triptolina**, de la que existe muy poca información respecto a sus propiedades antioxidantes. En nuestro estudio, la concentración de esta β -carbolina requerida para inhibir el 50% de la rigidez de membrana, formación de MDA+4-HDA y oxidación de proteínas fue 0,33 mM, 0,63 mM y 0,52 mM, respectivamente. En un trabajo previo nuestro grupo de investigación demostró que la triptolina protegió homogeneizados de cerebro de rata contra el daño oxidativo inducido por H₂O₂ (García y cols., 2000a). Además se ha descrito que su efecto neuroprotector podría potenciarse al ser capaz de competir por el receptor de glutamato de tipo NMDA, con el fármaco MK-801 (Berger, 2000). En ausencia de estrés oxidativo, la triptolina no cambió las concentraciones de MDA+4-HDA, ni la carbonilación proteica respecto a los controles, aunque a nivel de la fluidez de la membrana la mayor concentración, 1 mM, provocó un descenso significativo de la fluidez, lo que sugiere una interacción directa de ésta β -carbolina en la dinámica de los fosfolípidos de las membranas.

La otra β -carbolina evaluada en nuestro estudio fue la **pinolina**, que demostró una gran actividad estabilizando la membrana desde muy bajas concentraciones (0,01 mM) y una gran potencia antioxidante en lípidos y proteínas. Así, las IC₅₀ para inhibir la formación de MDA+4-HDA y la carbonilación proteica fueron 0,17mM y 0,15 mM. Existe coincidencia en la bibliografía respecto a la potente actividad antioxidante de la pinolina. Así, su acción se comparó con la de la melatonina utilizando tres modelos diferentes, en uno se expuso ácido linoléico al FeSO₄, el otro fue un tratamiento con ABTS y el último consistió en usar ácido tereftálico para formar aductos con ·OH. En todos, la melatonina fue mejor antioxidante que la pinolina (Pahkla y cols., 1998); no obstante, posteriores estudios han demostrado que la actividad antioxidante de pinolina fue entre dos y ocho veces superior a la de melatonina: en homogeneizados de cerebro la pinolina redujo el daño oxidativo a lípidos producido por H₂O₂ (Pless y cols., 1999; García y cols., 2000a; Ortega-Gutiérrez y cols., 2002; Millán-Plano y cols., 2003), por glutamato (Herrera y cols., 2001) y por nitroprusiato sódico (Piñol-Ripoll y cols., 2006);

también evitó la formación de $\text{NO}\cdot$ en homogeneizados de retina (Siu y cols., 1999), protegió al ADN del daño por Cr^{3+} (Qi y cols., 2000) y estabilizó las membranas microsomales hepáticas frente a la rigidez inducida por estrés oxidativo (García y cols., 1999). En ausencia de estrés oxidativo, la pinolina aumentó la fluidez en las membranas aisladas del tejido hepático sin modificación de los indicadores de lesión oxidativa. Estos resultados son algo diferentes a los que se demostraron en el microsoma hepático, en el que la pinolina provocó rigidez, aunque a un rango de concentraciones muy superiores, 1-1,5 mM (García y cols., 1999).

La diferencia estructural entre pinolina y triptolina radica únicamente en la presencia de un grupo metoxi en posición C_6 . Al igual que melatonina, su acción puede favorecerse por su distribución en los diferentes compartimentos y se ha sugerido que atraviesa con facilidad las membranas celulares, al detectarse en concentraciones elevadas a nivel nuclear después de administrar pinolina tritiada, por lo que podría ofrecer mayor protección a este nivel (Pähkla y cols., 1996). También se ha observado que la pinolina atraviesa las barreras hematoencefálica y placentaria, aunque en menor proporción que la triptolina (Leino y cols., 1984; Pähkla y cols., 1996). Sin embargo no debe olvidarse el aspecto tóxico de las β -carbolinas al valorar un posible uso en terapéutica, aunque la dosis letal de pinolina administrada por vía intravenosa en el ratón es muy elevada, 112 mg/kg (Airaksinen y cols., 1978).

CONCLUSIONES

Primera: La exposición de membranas celulares de tejido hepático a cloruro férrico y ácido ascórbico provocó, de forma proporcional al tiempo de incubación, lesión oxidativa en lípidos y proteínas de la membrana con disminución de su fluidez.

Segunda: Aunque el aminoácido triptófano, precursor metabólico de indolaminas en la glándula pineal, no pudo evitar la pérdida de la fluidez en las membranas inducida por el hierro, todos los demás indoles que siguen la ruta directa hasta la melatonina redujeron eficientemente la rigidez. Este efecto también se observó en las β -carbolinas y en menor medida en la triptamina y 5-metoxitriptamina e indolaminas que se catabolizan por la vía de la MAO.

Tercera: Las moléculas con capacidad para prevenir la rigidez de membrana, fueron eficaces antioxidantes tanto de lípidos como de proteínas de membrana, salvo triptamina y 5-metoxitriptamina que sólo inhibieron la formación de MDA + 4-HDA.

Cuarta: Se infiere la importancia de los grupos hidroxilo, metoxi y N-acetilo, para dotar o potenciar la eficacia antioxidante de la molécula al aumentar su capacidad de transferencia electrónica y solubilidad en medios lipídico y acuoso; en concreto, disminuyó la rigidez de membrana con casi todas las variantes químicas, la lipidoperoxidación al incorporar un grupo metoxi, y la carbonilación proteica al incluir en el anillo indólico restos hidroxilo o N-acetilo.

Quinta: Modificaciones del nivel basal de fluidez de membrana en ausencia de estrés oxidativo, provocados por triptamina, 5-metoxitriptamina y derivados tricíclicos, y resultados dispares sobre fluidez y daño oxidativo a lípidos y proteínas, pueden explicarse por interacciones de la molécula en la dinámica de los fosfolípidos de membrana.

Sexta: El presente estudio sobre un amplio grupo de metabolitos del triptófano de la glándula pineal, contribuye al mejor conocimiento de sus propiedades moleculares antioxidantes *in vitro*, y anuncia la investigación de estos efectos *in vivo* para plantear posibles usos terapéuticos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe K, Robison GA, Liddle GW, Butcher RW, Nicholson WE y Baird CE (1969). "Role of cyclic AMP in mediating the effects of MSH, norepinephrine, and melatonin on frog skin color." *Endocrinology* **85**(4): 674-682.
- 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**(2): 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**(1): 40-47.
- Acuña-Castroviejo D, Fernández B, Castillo JL, Gomar MD y Del Águila CM (1993a). *Bioquímica de la glándula pineal. En: Aspectos morfofuncionales y fisiopatológicos de la glándula pineal. Consideraciones de interés pediátrico.*, Eds: Muñoz-Hoyos A, Fernández García JM y Acuña-Castroviejo D. Madrid: Nuevas creaciones médicas, S.L.
- Acuña-Castroviejo D, Pablos MI, Menéndez-Peláez A y Reiter RJ (1993b). "Melatonin receptors in purified cell nuclei of liver." *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **82**(2): 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**(2): 100-112.
- Acuña-Castroviejo D, Coto-Montes A, Gaia Monti M, Ortiz GG y Reiter RJ (1997). "Melatonin is protective against MPTP-induced striatal and hippocampal lesions." *Life Sci* **60**(2): PL23-29.
- 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**(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.
- Aderem A (1992). "Signal transduction and the actin cytoskeleton: the roles of MARCKS and profilin." *Trends Biochem Sci* **17**(10): 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**(2): 149-160.
- Airaksinen MM, Ho BT, An R y Taylor D (1978). "Major pharmacological effects of 6-methoxytetrahydro-beta-carboline, a drug elevating the tissue 5-hydroxytryptamine level." *Arzneimittelforschung* **28**(1): 42-46.
- Albendea CD, Gómez-Trullén EM, Fuentes-Broto L, Miana-Mena FJ, Millán-Plano S, Reyes-Gonzales MC, Martínez-Ballarín E y García JJ (2007). "Melatonin reduces lipid and protein oxidative damage in synaptosomes due to aluminium." *J Trace Elem Med Biol* **21**(4): 261-268.
- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K y Walter P (2006). *Introducción a la biología celular*. Madrid, Editorial Médica Panamericana.
- Ames BN, Shigenaga MK y Hagen TM (1993). "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(17): 7915-7922.
- Antolin I, Rodriguez C, Sainz RM, Mayo JC, Uria H, Kotler ML, Rodriguez-Colunga MJ, Tolivia D y Menendez-Pelaez A (1996). "Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes." *FASEB J* **10**(8): 882-890.
- Anton-Tay F, Ramirez G, Martinez I y Benitez-King G (1998). "In vitro stimulation of protein kinase C by melatonin." *Neurochem Res* **23**(5): 601-606.
- Apostolov K y Barker W (1981). "The effects of interferon on the fatty acids in uninfected cells." *FEBS Lett* **126**(2): 261-264.
- Aviram M, Cogan U y Mokady S (1991). "Excessive dietary tryptophan enhances plasma lipid peroxidation in rats." *Atherosclerosis* **88**(1): 29-34.
- Babior BM (1978). "Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts)." *N Engl J Med* **298**(12): 659-668.
- Babior BM (1984). "Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction." *Blood* **64**(5): 959-966.
- Bachurin S, Oxenkrug G, Lermontova N, Afanasiev A, Beznosko B, Vankin G, Shevtzova E, Mukhina T y Serkova T (1999). "N-

acetylserotonin, melatonin and their derivatives improve cognition and protect against beta-amyloid-induced neurotoxicity." *Ann N Y Acad Sci* **890**: 155-166.

Barber AA y Bernheim F (1967). "Lipid peroxidation: its measurement, occurrence, and significance in animal tissues." *Adv Gerontol Res* **2**: 355-403.

Barjavel MJ, Mamdouh Z, Raghbate N y Bakouche O (1998). "Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes." *J Immunol* **160**(3): 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**(5): 497-502.

Basaga HS (1989). "Biomedical aspects of free radicals." *Biochem. Cell. Biol.* **68**: 989-998.

Baydas G, Reiter RJ, Nedzvetskii VS, Yasar A, Tuzcu M, Ozveren F y Canatan H (2003). "Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis." *Toxicol Lett* **137**(3): 169-174.

Becker-André M, André 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**(3): 1371-1379.

Becker-André M, Wiesenberg 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**(46): 28531-28534.

Beckman JS y Koppenol WH (1996). "Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly." *Am J Physiol* **271**(5 Pt 1): C1424-1437.

Beckman Kb y Ames BN (1998). "Mitochondrial aging: open questions." *Ann N Y Acad Sci* **854**: 118-127.

Benítez-King G, Huerto-Delgadillo L y Anton-Tay F (1991). "Melatonin modifies calmodulin cell levels in MDCK and N1E-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity in vitro." *Brain Res* **557**(1-2): 289-292.

Benítez-King G, Huerto-Delgadillo L y Anton-Tay F (1993). "Binding of 3H-melatonin to calmodulin." *Life Sci* **53**(3): 201-207.

Benítez-King G y Antón-Tay F (1996). *Role of melatonin in cytoskeletal remodelling is mediated by calmodulin and protein kinase C. En: Melatonin: A universal photoperiodic signal with diverse actions.*, Eds: Tang PL, Pang SF y Reiter RJ. Basel: Karger Publishers.

Benítez-King G, Túnez I, Bellón A, Ortiz GG y Anton-Tay F (2003). "Melatonin prevents cytoskeletal alterations and oxidative stress induced by okadaic acid in N1E-115 cells." *Exp Neurol* **182**(1): 151-159.

Berger ML (2000). "Tryptamine derivatives as non-competitive N-methyl-D-aspartate receptor blockers: studies using [³H]MK-801 binding in rat hippocampal membranes." *Neurosci Lett* **296**(1): 29-32.

Bindoli A (1988). "Lipid peroxidation in mitochondria." *Free Radic Biol Med* **5**(4): 247-261.

Blehar MC y Rosenthal NE (1989). "Seasonal affective disorders and phototherapy. Report of a National Institute of Mental Health-sponsored workshop." *Arch Gen Psychiatry* **46**(5): 469-474.

Blenkharn JI y Apostolov K (1980). "The effect of iodination on the haemolytic property and the fatty acids of Newcastle disease virus." *Biochim Biophys Acta* **597**(2): 358-363.

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**(2): 287-293.

Bradford MM (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254.

Brown RP, Kocsis JH, Caroff S, Amsterdam J, Winokur A, Stokes P y Frazer A (1987). "Depressed mood and reality disturbance correlate with decreased nocturnal melatonin in depressed patients." *Acta Psychiatr Scand* **76**(3): 272-275.

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**(2): 216-222.
- Brzozowska I, Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ, Kwiecien S, Pajdo R, Drozdowicz D, Pawlik M, Ptak A y Hahn EG (2002). "Role of prostaglandins, nitric oxide, sensory nerves and gastrin in acceleration of ulcer healing by melatonin and its precursor, L-tryptophan." *J Pineal Res* **32**(3): 149-162.
- 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**(2): 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**(6): 313-323.
- Budowski P (1981). "Review: nutritional effects of omega 3-polyunsaturated fatty acids." *Isr J Med Sci* **17**(4): 223-231.
- Burkhardt S, Reiter RJ, Tan DX, Hardeland R, Cabrera J y Karbownik M (2001). "DNA oxidatively damaged by chromium(III) and H₂O₂ is protected by the antioxidants melatonin, N¹-acetyl-N²-formyl-5-methoxykynuramine, resveratrol and uric acid." *Int J Biochem Cell Biol* **33**(8): 775-783.
- Butterfield DA y Leung PK (1978). "Erythrocyte membrane fluidity in chicken muscular dystrophy." *Life Sci* **22**(20): 1783-1788.
- 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**(3): 427-429.
- Cabrera J, Reiter RJ, Tan DX, Qi W, Sáinz RM, Mayo JC, García JJ, Kim SJ y El-Sokkary G (2000). "Melatonin reduces oxidative neurotoxicity due to quinolinic acid: in vitro and in vivo findings." *Neuropharmacology* **39**(3): 507-514.
- 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**(1): 11-17.
- Cadenas E (1997). "Biochemistry of oxygen toxicity." *Annu Rev Biochem* **58**: 79-110.
- Cagnoli CM, Atabay C, Kharlamova E y Manev H (1995). "Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis." *J Pineal Res* **18**(4): 222-226.
- Calvo JR, Reiter RJ, Garcia 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." *J Cell Biochem* **80**(4): 461-470.
- Callaway JC, Gynther J, Poso A, Vepsäläinen J y Airaksinen MM (1994). "The Pictet-Spengler reaction and biogenic tryptamines: Formation of tetrahydro-β-carbolines at physiological pH." *J Heterocyclic Chem* **31**: 431-435.
- Carlberg C, Hoof van Huijsdijnen 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**(6): 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**(4): 171-178.
- Conti A y Maestroni GJ (1998). "Melatonin rhythms in mice: role in autoimmune and lymphoproliferative diseases." *Ann N Y Acad Sci* **840**: 395-410.
- Costa EJ, Lopes RH y Lamy-Freund MT (1995). "Permeability of pure lipid bilayers to melatonin." *J Pineal Res* **19**(3): 123-126.
- Costa EJ, Shida CS, Biaggi MH, Ito AS y Lamy-Freund MT (1997). "How melatonin interacts with lipid bilayers: a study by fluorescence and ESR spectroscopies." *FEBS Lett* **416**(1): 103-106.
- 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**(3): 154-158.
- Crespo E, Macías M, García JJ, Martín M, Arauzo M, León J, Escames G y Acuña-Castroviejo D (1997). "Mecanismos de neuroprotección de la melatonina durante el

- envejecimiento." *Arch Neurocién (Mex)* **2**(4): 247-257.
- 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**(12): 1537-1546.
- Cross AR y Jones OT (1991). "Enzymic mechanisms of superoxide production." *Biochim Biophys Acta* **1057**(3): 281-298.
- Curtis MT, Gilfor D y Farber JL (1984). "Lipid peroxidation increases the molecular order of microsomal membranes." *Arch Biochem Biophys* **235**(2): 644-649.
- Chan Ty y Tang PL (1996). "Characterization of the antioxidant effects of melatonin and related indoleamines in vitro." *J Pineal Res* **20**(4): 187-191.
- Cheeseman KH y Slater TF (1998a). "Free Radicals in Medicine." *Br Med Bull* **49**: 118-121.
- Cheeseman KH y Slater TF (1998b). "An introduction to free radical biochemistry." *Br Med Bull* **49**: 481-493.
- Chen JJ y Yu BP (1994). "Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products." *Free Radic Biol Med* **17**(5): 411-418.
- Chen L, Yang X, Jiao H y Zhao B (2002). "Tea catechins protect against lead-induced cytotoxicity, lipid peroxidation, and membrane fluidity in HepG2 cells." *Toxicol Sci* **69**(1): 149-156.
- 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**(4): 178-183.
- Cheung WY (1970). "Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Demonstration of an activator." *Biochem Biophys Res Commun* **38**(3): 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**(3): 1055-1062.
- Chiueh CC, Miyake H y Peng MT (1993). "Role of dopamine autoxidation, hydroxyl radical generation, and calcium overload in underlying mechanisms involved in MPTP-induced parkinsonism." *Adv Neurol* **60**: 251-258.
- Christen S, Peterhans E y Stocker R (1990). "Antioxidant activities of some tryptophan metabolites: possible implication for inflammatory diseases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(7): 2506-2510.
- Chung SY y Han SH (2003). "Melatonin attenuates kainic acid-induced hippocampal neurodegeneration and oxidative stress through microglial inhibition." *J Pineal Res* **34**(2): 95-102.
- Daniolos A, Lerner AB y Lerner MR (1990). "Action of light on frog pigment cells in culture." *Pigment Cell Res* **3**(1): 38-43.
- Davies KJ, Delsignore ME y Lin SW (1987). "Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids." *J Biol Chem* **262**(20): 9902-9907.
- Davies KJA y Goldberg AL (1987). "Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells." *J Biol Chem* **262**(17): 8227-8234.
- Davies MJ (2003). "Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences." *Biochem Biophys Res Commun* **305**(3): 761-770.
- 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**(1-2): 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.
- Decker JF y Quay WB (1982). "Stimulatory effects of melatonin on ependymal epithelium of choroid plexuses in golden hamsters." *J Neural Transm* **55**(1): 53-67.
- 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**(2): 431-439.

- 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**(1): 11-17.
- Díaz E, Fernández C, Castrillón PO, Esquifino Ai, Marín B y Díaz López B (1999). "Effect of exogenous melatonin on neuroendocrine-reproductive function of middle-aged female rats." *J Reprod Fertil* **117**(2): 331-337.
- Diplock AT (1991). "Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview." *Am J Clin Nutr* **53**(1 Suppl): 189S-193S.
- Dobretsov GE, Borschevskaya TA, Petrov VA y Vladimirov YA (1977). "The increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxidation." *FEBS Lett* **84**(1): 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**(11): 3916-3920.
- Dubocovich ML, Yun K, Al-Ghoul WM, Benloucif S y Masana MI (1998). "Selective MT₂ melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms." *FASEB J* **12**(12): 1211-1220.
- Ebadi M (1984). "Regulation of the synthesis of melatonin and its significance to neuroendocrinology. En: Comprehensive Endocrinology. The pineal gland." Ed: Reiter RJ. Nueva York: Raven Press.
- 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 USA* **91**(13): 6133-6137.
- Eiserich JP, Butler J, Van Der Vliet A, Cross CE y Halliwell B (1995). "Nitric oxide rapidly scavenges tyrosine and tryptophan radicals." *Biochem J* **310**: 745-749.
- Erickson JB, Flanagan Em, Russo S y Reinhard JF, JR. (1992). "A radiometric assay for kynurenine 3-hydroxylase based on the release of ³H₂O during hydroxylation of L-[3,5-³H]kynurenine." *Anal Biochem* **205**(2): 257-262.
- Escames G, Guerrero JM, Reiter RJ, García JJ, Muñoz-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**(3): 147-150.
- Escames G, Macías M, León J, García JJ, 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**(8): 932-934.
- Escames G, López LC, Ortiz F, Ros E y Acuña-Castroviejo D (2006). "Age-dependent lipopolysaccharide-induced iNOS expression and multiorgan failure in rats: effects of melatonin treatment." *Exp Gerontol* **41**(11): 1165-1173.
- Esterbauer H y Cheeseman KH (1990). "Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal." *Methods Enzymol* **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**(1): 81-128.
- Fahn S y Cohen G (1992). "The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it." *Ann Neurol* **32**(6): 804-812.
- Fang YZ, Yang S y Wu G (2002). "Free radicals, antioxidants, and nutrition." *Nutrition* **18**(10): 872-879.
- Feksa LR, Latini A, Rech VC, Wajner M, Dutra-Filho CS, De Souza Wyse AT y Wannmacher CM (2006). "Promotion of oxidative stress by L-tryptophan in cerebral cortex of rats." *Neurochem Int* **49**(1): 87-93.
- Fenton HJH (1894). "Oxidation of tartaric acid in presence of iron. ." *J. Chem. Soc.* **65**: 899-910.
- Fiske VM y Huppert LC (1968). "Melatonin action on pineal varies with photoperiod." *Science* **162**(850): 279.
- Frederiksen TJP, Pless G, García JJ y Reiter RJ (1998). "Pinoline and melatonin protect against H₂O₂ -induced lipid peroxidation in rat brain homogenates." *Neuroendocr Lett* **19**(3): 117-123.

- 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**(3): 389-397.
- 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**(1-2): 76-84.
- 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**(3): 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**(1): 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**(6): 609-616.
- García JJ, Martínez-Ballarín E, Robinson M, Allué JL, Reiter RJ, Osuna C y Acuña-Castroviejo D (2000a). "Protective effect of beta-carbolines and other antioxidants on lipid peroxidation due to hydrogen peroxide in rat brain homogenates." *Neurosci Lett* **294**(1): 1-4.
- García JJ, Reiter RJ, Cabrera JJ, Pié J, Mayo JC, Sáinz RM, Tan DX, Qi W y Acuña-Castroviejo D (2000b). "5-methoxytryptophol preserves hepatic microsomal membrane fluidity during oxidative stress." *J Cell Biochem* **76**(4): 651-657.
- García JJ, Reiter RJ, Karbownik M, Calvo JR, Ortiz GG, Tan DX, Martínez-Ballarín E y Acuña-Castroviejo D (2001). "N-acetylserotonin suppresses hepatic microsomal membrane rigidity associated with lipid peroxidation." *Eur J Pharmacol* **428**(2): 169-175.
- 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**(3): 337-340.
- Gawel S, Wardas M, Niedworok E y Wardas P (2004). "Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker." *Wiad Lek* **57**(9-10): 453-455.
- Gazulla J y Cavero-Nagore M (2006). "Glutamate and Alzheimer's disease." *Rev Neurol* **42**(7): 427-432.
- 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**(5): 538-553.
- Godson C y Reppert SM (1997). "The Mel_{1a} melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways." *Endocrinology* **138**(1): 397-404.
- Goeptar AR, Scheerens H y Vermeulen NP (1995). "Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450." *Crit Rev Toxicol* **25**(1): 25-65.
- 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**(13): 1331-1335.
- Grace MS, Cahill GM y Besharse JC (1991). "Melatonin deacetylation: retinal vertebrate class distribution and *Xenopus laevis* tissue distribution." *Brain Res* **559**(1): 56-63.
- Grady RK, JR., Caliguri A y Mefford IN (1984). "Day/night differences in pineal indoles in the adult pigeon (*Columba livia*)." *Comp Biochem Physiol C* **78**(1): 141-143.
- Guajardo MH, Terrasa AM y Catala A (2003). "Protective effect of indoleamines on in vitro ascorbate-Fe²⁺ dependent lipid peroxidation of rod outer segment membranes of bovine retina." *J Pineal Res* **35**(4): 276-282.
- Guan Z, Wang Y, Cairns NJ, Lantos PL, Dallner G y Sindelar PJ (1999). "Decrease and structural modifications of phosphatidylethanolamine plasmalogen in the brain with Alzheimer disease." *J Neuropathol Exp Neurol* **58**(7): 740-747.
- Guerrero JM y Reiter RJ (2002). "Melatonin-immune system relationships." *Curr Top Med Chem* **2**(2): 167-179.

- Gutteridge JM (1995). "Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage." *Clin Chem* **41**(12 Pt 2): 1819-1828.
- Hajimohammadreza I y Brammer M (1990). "Brain membrane fluidity and lipid peroxidation in Alzheimer's disease." *Neurosci Lett* **112**(2-3): 333-337.
- Halliwell B y Gutteridge JM (1984). "Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy." *Lancet* **1**(8391): 1396-1397.
- Halliwell B y Gutteridge JMC (1985). "Oxygen radicals and the nervous system." *Trends in Neurosciences* **8**: 22-26.
- Halliwell B y Gutteridge JM (1988). "Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease." *Hum Toxicol* **7**(1): 7-13.
- 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 (1992). "Reactive oxygen species and the central nervous system." *J Neurochem* **59**(5): 1609-1623.
- Halliwell B, Gutteridge JM y Cross CE (1992). "Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?" *J Lab Clin Med* **119**(6): 598-620.
- Halliwell B y Gutteridge JMC (1999). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford, Oxford University Press.
- Hara M, Iigo M, Ohtani-Kaneko R, Nakamura N, Suzuki T, Reiter RJ y Hirata K (1997). "Administration of melatonin and related indoles prevents exercise-induced cellular oxidative changes in rats." *Biol Signals* **6**(2): 90-100.
- 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**(3): 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**(2): 104-111.
- Harman D (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." *J Gerontol* **11**(3): 298-300.
- Harman D (1984). "Free radical theory of aging: The "free radical" diseases." *Age* **7**: 111-131.
- Headlam HA y Davies MJ (2003). "Cell-mediated reduction of protein and peptide hydroperoxides to reactive free radicals." *Free Rad Biolo Med* **34**(1): 44-55.
- Herrera F, Sáinz RM, Mayo JC, Martín V, Antolin I y Rodríguez C (2001). "Glutamate induces oxidative stress not mediated by glutamate receptors or cystine transporters: protective effect of melatonin and other antioxidants." *J Pineal Res* **31**(4): 356-362.
- Heubner O (1898). "Tumor der glandula pinealis." *Dtsch. Med. Wochenschr.* **24**: 214.
- Hill JS, Sawyer WH, Howlett GJ y Wiley JS (1982). "Hereditary spherocytosis of man. Altered binding of cytoskeletal components to the erythrocyte membrane." *Biochem J* **201**(2): 259-266.
- Hirata F y Hayaishi O (1972). "New degradative routes of 5-hydroxytryptophan and serotonin by intestinal tryptophan 2,3-dioxygenase." *Biochem Biophys Res Commun* **47**(5): 1112-1119.
- 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**(4): 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**(3): 1976-1983.
- Hoffman RA y Reiter RJ (1965). "Rapid pinealectomy in hamsters and other small rodents." *Anat Rec* **153**(1): 19-21.
- 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**(1): 127-140.
- Hori S (1975). "Effects of sulfhydryl agents on the activation of tryptophan-5-monoxygenase from bovine pineal glands." *Biochim Biophys Acta* **384**(1): 58-68.

- Hubbard RE y Garratt CJ (1980). "The composition and fluidity of adipocyte membranes prepared from young and adult rats." *Biochim Biophys Acta* **600**(3): 701-704.
- Huerto-Delgado L, Antón-Tay F y Benítez-King G (1994). "Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: role of melatonin as a calmodulin antagonist." *J Pineal Res* **17**(2): 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**(12): 945-953.
- Hunt JV, Simpson JA y Dean RT (1988). "Hydroperoxide-mediated fragmentation of proteins." *Biochem J* **250**(1): 87-93.
- Ianas O, Olinescu R y Badescu I (1991). "Melatonin involvement in oxidative processes." *Endocrinologie* **29**(3-4): 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.
- Illnerova H, Backström M, Sääf J, Wetterberg L y Vangbo B (1978). "Melatonin in rat pineal gland and serum; rapid parallel decline after light exposure at night." *Neurosci. Lett.* **9**: 189-193.
- Irwin JA, Ostvald H y Davies MJ (1999). "Myoglobin-induced oxidative damage: Evidence for radical transfer from oxidized myoglobin to other proteins and antioxidants." *Arch Biochem Biophys* **362**(1): 94-104.
- 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**(1): 7-13.
- Iwasaki Y, Kato Y, Ohgo S, Abe H, Imura H, Hirata F, Senoh S, Tokuyama T y Hayaishi O (1978). "Effects of indoleamines and their newly identified metabolites on prolactin release in rats." *Endocrinology* **103**(1): 254-258.
- Jakoby WB y Ziegler DM (1990). "The enzymes of detoxication." *J Biol Chem* **265**: 20715-20718.
- Jaworek J, Leja-Szpak A, Bonior J, Nawrot K, Tomaszewska R, Stachura J, Sendur R, Pawlik W, Brzozowski T y Konturek SJ (2003). "Protective effect of melatonin and its precursor L-tryptophan on acute pancreatitis induced by caerulein overstimulation or ischemia/reperfusion." *J Pineal Res* **34**(1): 40-52.
- Jerlick A, Pitt AR, Schaur RJ y Spickett CM (2000). "Pathway of phospholipid oxidation by HOCl in human LDL, detected by LC-MS." *Free Rad Biol Med* **28**(5): 673-682.
- Jethmalani SM, Henle KJ, Gazitt Y, Walker PD y Wang SY (1997). "Intracellular distribution of heat-induced stress glycoproteins." *J Cell Biochem* **66**(1): 98-111.
- Jetten AM, Meeks RG y De Luca LM (1981). "Specific and nonspecific alterations in membrane microviscosity induced by retinoids in embryonal carcinoma and fibroblast cells." *Ann N Y Acad Sci* **359**: 398-400.
- Jiménez-Jiménez FJ, De Bustos F, Gasalla T y Ortí-Pareja M (1996). "Estrés oxidativo y sistema nervioso central." *Rev Neurol* **11**(supl. 3): 13-22.
- Jiménez-Jiménez FJ, Alonso-Navarro H, Ayuso-Peralta L y Jabbour-Wadiah T (2006). "Oxidative stress and Alzheimer's disease." *Rev Neurol* **42**(7): 419-427.
- Kanner J, German JB y Kinsella JE (1987). "Initiation of lipid peroxidation in biological systems." *Crit Rev Food Sci Nutr* **25**(4): 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**(2-3): 140-146.
- Karbownik M, Gitto E, Lewinski A y Reiter RJ (2001). "Relative efficacies of indole antioxidants in reducing autoxidation and iron-induced lipid peroxidation in hamster testes." *J Cell Biochem* **81**(4): 693-699.
- Kari I (1981). "6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline in pineal gland of chicken and cock." *FEBS Lett* **127**(2): 277-280.
- Karp G (1987). *Biología celular*. México, McGraw-Hill de México S.A. de C. V.
- Kawashima Y, Horiguchi A, Taguchi M, Tuyuki Y, Karasawa Y, Araki H y Hatayama K (1995). "Synthesis and pharmacological

- evaluation of 1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline derivatives." *Chem Pharm Bull* **43**: 783-787.
- 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**(5): 455-467.
- Kim SJ, Reiter RJ, Qi W, Tan DX D y Cabrera J (2000). "Melatonin prevents oxidative damage to protein and lipid induced by ascorbate-Fe(3+)-EDTA: Comparison with glutathione and alpha-tocopherol." *Neuro Endocrinol Lett* **21**(4): 269-276.
- Kivela A, Kauppila A, Ylostalo P, Vakkuri O y Leppaluoto J (1988). "Seasonal, menstrual and circadian secretions of melatonin, gonadotropins and prolactin in women." *Acta Physiol Scand* **132**(3): 321-327.
- Koop DR (1992). "Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1." *FASEB J* **6**(2): 724-730.
- Koster-Van Hoffen GC, Mirmiran M, Bos NP, Witting W, Delagrèe 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**(6): 565-569.
- Lai CS, Hopwood LE y Swartz HM (1980). "Electron spin resonance studies of changes in membrane fluidity of Chinese hamster ovary cells during the cell cycle." *Biochim Biophys Acta* **602**(1): 117-126.
- Langer SZ, Lee CR, Segonzac A, Tateishi T, Esnaud H, Schoemaker H y Winblad B (1984). "Possible endocrine role of the pineal gland for 6-methoxytetrahydro-beta-carboline, a putative endogenous neuromodulator of the [3 H]imipramine recognition site." *Eur J Pharmacol* **102**(2): 379-380.
- Lapin IP (1978). "Convulsions and tremor in immature rats after intraperitoneal injection of kynurenine and its metabolites." *Pharmacol Res Commun* **10**(1): 81-84.
- Laudet V, Hanni C, Coll J, Catzeflis F y Stehelin D (1992). "Evolution of the nuclear receptor gene superfamily." *EMBO J* **11**(3): 1003-1013.
- Lee J, Yu BP y Herlihy JT (1999). "Modulation of cardiac mitochondrial membrane fluidity by age and calorie intake." *Free Radic Biol Med* **26**(3-4): 260-265.
- Lee Sk y Lee BM (1997). "Oxidation of erythrocyte protein and lipid, and hemolysis in rabbit red blood cells treated with benzo[a]pyrene or adriamycin." *J Toxicol Environ Health* **51**(6): 557-569.
- Lehninger AL, Nelson DL y Cox MM (2001). "Principios de bioquímica." 3ª edición. Barcelona: Editorial Omega.
- 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**(1): 135-138.
- Leino M (1984). "6-Methoxy-tetrahydro-beta-carboline and melatonin in the human retina." *Exp Eye Res* **38**(3): 325-330.
- 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**(5): 361-371.
- 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.
- Lerner AB y Case JD (1960). "Melatonin." *Fed Proc.* **19**: 590-592.
- 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." *Meth Enzymol* **186**: 464-478.
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER y Shacter E (1994). "Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins." *Meth Enzymol* **233**: 346-357.
- Levine RL y Stadtman ER (2001). "Oxidative modification of proteins during aging." *Exp Gerontol* **36**(9): 1495-1502.
- Lewy AJ y Newsome DA (1983). "Different types of melatonin circadian secretory rhythms in some blind subjects." *J Clin Endocrinol Metab* **56**(6): 1103-1107.
- Lezoualc'h F, Sparapani M y Behl C (1998). "N-acetyl-serotonin (normelatonin) and melatonin protect neurons against oxidative challenges and suppress the activity of the transcription factor NF-kappaB." *J Pineal Res* **24**(3): 168-178.
- Lieberman HR, Waldhauser F, Garfield G, Lynch HJ y Wurtman RJ (1984). "Effects of

- melatonin on human mood and performance." *Brain Res* **323**(2): 201-207.
- Liu C, Weaver DR, Jin X, Shearman LP, Pieschl RL, Gribkoff VK y Reppert SM (1997). "Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock." *Neuron* **19**(1): 91-102.
- Longoni B, Pryor WA y Marchiafava P (1997). "Inhibition of lipid peroxidation by N-acetylserotonin and its role in retinal physiology." *Biochem Biophys Res Commun* **233**(3): 778-780.
- Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM y Markesbery WR (1995). "Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease." *Neurology* **45**(8): 1594-1601.
- Lysek N, Kinscherf R, Claus R y Lindel T (2003). "L-5-Hydroxytryptophan: antioxidant and anti-apoptotic principle of the intertidal sponge *Hymeniacidon heliophila*." *Z Naturforsch [C]* **58**(7-8): 568-572.
- 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**(5): 832-840.
- Maestroni GJ y Pierpaoli W (1981). *Pharmacologic control of the hormonally mediated immune response. En: Psyconeuroimmunology.*, Ed: Ader R. Nueva York: NY Academic Press.
- Maestroni GJ, Conti A y Lissoni P (1994a). "Colony-stimulating activity and hematopoietic rescue from cancer chemotherapy compounds are induced by melatonin via endogenous interleukin 4." *Cancer Res* **54**(17): 4740-4743.
- Maestroni GJ, Covacci V y Conti A (1994b). "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**(9): 2429-2432.
- Maharaj DS, Limson JL y Daya S (2003a). "6-Hydroxymelatonin converts Fe (III) to Fe (II) and reduces iron-induced lipid peroxidation." *Life Sci* **72**(12): 1367-1375.
- Maharaj DS, Walker RB, Glass BD y Daya S (2003b). "6-Hydroxymelatonin protects against cyanide induced oxidative stress in rat brain homogenates." *J Chem Neuroanat* **26**(2): 103-107.
- Malina HZ y Martin XD (1996). "Indoleamine 2,3-dioxygenase: antioxidant enzyme in the human eye." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **234**(7): 457-462.
- 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**(5): 391-395.
- Marcus DL, Thomas C, Rodríguez C, Simberkoff K, Tsai JS, Strafaci JA y Freedman ML (1998). "Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease." *Exp Neurol* **150**(1): 40-44.
- Markesbery WR y Lovell MA (1998). "Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* **19**(1): 33-36.
- 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**(3): 307-315.
- Martikainen H, Tapanainen J, Vakkuri O, Leppaluoto J y Huhtaniemi I (1985). "Circannual concentrations of melatonin, gonadotrophins, prolactin and gonadal steroids in males in a geographical area with a large annual variation in daylight." *Acta Endocrinol (Copenh)* **109**(4): 446-450.
- 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**(12): 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**(4): 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**(4): 348-357.
- Martínez-Cruz F, Pozo D, Osuna C, Espinar A, Marchante C y Guerrero JM (2002). "Oxidative stress induced by phenylketonuria in the rat: Prevention by melatonin, vitamin E, and vitamin C." *J Neurosci Res* **69**(4): 550-558.
- Massey JB, She HS y Pownall HJ (1982). "Interaction of vitamin E with saturated phospholipid bilayers." *Biochem Biophys Res Commun* **106**(3): 842-847.
- Masson-Pevet M y Pevet P (1989). "Cytochemical localization of type-A and -B monoamine oxidase in the rat pineal gland." *Cell Tissue Res* **255**(2): 299-305.
- Mathur RL y Sahai P (1990). "Effects of a tryptophan supplemented diet and U.V. radiation on the rat lens." *Lens Eye Toxic Res* **7**(2): 143-160.
- Matuszak Z, Reszka K y Chignell Cf (1997). "Reaction of melatonin and related indoles with hydroxyl radicals: EPR and spin trapping investigations." *Free Rad Biol Med* **23**(3): 367-372.
- 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**(1-3): 139-150.
- McDonnel AC, Van Kirk EA, Isaak DD y Murdoch WJ (2003). "Inhibitory effects of progesterone on plasma membrane fluidity and tumorigenic potential of ovarian epithelial cancer cells." *Exp Biol Med (Maywood)* **228**(3): 308-314.
- McIsaac WM, Farrell G, Taborsky RG y Taylor AN (1965). "Indole Compounds: Isolation from Pineal Tissue." *Science* **148**: 102-103.
- McIsaac WM, Taylor D, Walker KE y Ho BT (1972). "6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-a serotonin elevator." *J Neurochem* **19**(4): 1203-1206.
- Mckee T y Mckee JR (2003). *Bioquímica: La base molecular de la vida.*, McGraw-Hill. Interamericana.
- Mecocci P, Cherubini A, Beal MF, Cecchetti R, Chionne F, Polidori MC, Romano G y Senin U (1996). "Altered mitochondrial membrane fluidity in AD brain." *Neurosci Lett* **207**(2): 129-132.
- Mecocci P, Beal MF, Cecchetti R, Polidori MC, Cherubini A, Chionne F, Avellini L, Romano G y Senin U (1997). "Mitochondrial membrane fluidity and oxidative damage to mitochondrial DNA in aged and AD human brain." *Mol Chem Neuropathol* **31**(1): 53-64.
- Menéndez-Peláez A, Rodríguez C y Domínguez P (1991). "5-aminolevulinatase synthase mRNA levels in the Harderian gland of Syrian hamsters: correlation with porphyrin concentrations and regulation by androgens and melatonin." *Mol Cell Endocrinol* **80**(1-3): 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**(4): 373-382.
- Menéndez-Peláez A y Reiter RJ (1993). "Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization." *J Pineal Res* **15**(2): 59-69.
- Mennenga K, Ueck M y Reiter RJ (1990). "Immunocytochemical results with melatonin antiserum in the pineal gland and retina of the pigeon." *Adv Pineal Res* **4**: 69-74.
- 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**(3): 159-164.
- Metodiewa D (1998). "Molecular mechanisms of cellular injury produced by neurotoxic amino acids that generate reactive oxygen species." *Amino Acids* **14**: 181-187.
- Mhatre MC, Van Jaarsveld AS y Reiter RJ (1988). "Melatonin in the lacrimal gland: first demonstration and experimental manipulation." *Biochem Biophys Res Commun* **153**(3): 1186-1192.
- Milczarek R, Klimek J y Zelewski L (2000). "Melatonin inhibits NADPH-dependent lipid peroxidation in human placental mitochondria." *Horm Metab Res* **32**(2): 84-85.

- 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**(1): 39-44.
- Mohanan PV y Yamamoto HA (2002). "Preventive effect of melatonin against brain mitochondria DNA damage, lipid peroxidation and seizures induced by kainic acid." *Toxicol Lett* **129**(1-2): 99-105.
- Moosmann B, Uhr M y Behl C (1997). "Neuroprotective potential of aromatic alcohols against oxidative cell death." *FEBS Lett* **413**(3): 467-472.
- Morrey KM, McLachlan JA, Serkin CD y Bakouche O (1994). "Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin." *J Immunol* **153**(6): 2671-2680.
- Morton DJ (1987). "Production of methoxyindoles in vitro from methoxytryptophan by rat pineal gland." *J Pineal Res* **4**(1): 7-11.
- Moslen MT (1994). "Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis." *Adv Exp Med Biol* **366**: 17-27.
- Mulder C, Wahlund LO, Teerlink T, Blomberg M, Veerhuis R, Van Kamp GJ, Scheltens P y Scheffer PG (2003). "Decreased lysophosphatidylcholine/phosphatidylcholine ratio in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease." *J Neural Transm* **110**(8): 949-955.
- Nakagawa H, Takusagawa M, Arima H, Furukawa K, Kinoshita T, Ozawa T y Ikota N (2004). "Selective scavenging property of the indole moiety for the nitrating species of peroxynitrite." *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **52**(1): 146-149.
- Naqui A, Britton C y Cadenas E (1996). "Reactive oxygen intermediates in biochemistry." *Annu Rev Biochem* **55**: 137-166.
- Narbona E, RTM y Uberos J (1994). "Metabolismo del triptófano. Su importancia en patología infantil. En: Aspectos morfofuncionales y fisiopatológicos de la glándula pineal. Consideraciones de interés pediátrico. Eds: Muñoz-Hoyos A, Fernández García JM y Acuña-Castroviejo D." *Madrid: Nuevas creaciones médicas, S.L.*
- Ng TB, Liu F y Zhao L (2000). "Antioxidative and free radical scavenging activities of pineal indoles." *J Neural Transm* **107**(11): 1243-1251.
- Niles LP, Wong YW, Mishra RK y Brown GM (1979). "Melatonin receptors in brain." *Eur J Pharmacol* **55**(2): 219-220.
- Noda Y, Mori A, Liburdy R y Packer L (1999). "Melatonin and its precursors scavenge nitric oxide." *J Pineal Res* **27**(3): 159-163.
- Nohl H y Hegner D (1978). "Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo?" *Eur J Biochem* **82**(2): 563-567.
- 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-deficient rat." *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **30**(3): 221-234.
- Ohyashiki T, Ushiro H y Mohri T (1986). "Effects of alpha-tocopherol on the lipid peroxidation and fluidity of porcine intestinal brush-border membranes." *Biochim Biophys Acta* **858**(2): 294-300.
- Okatani Y, Wakatsuki A y Reiter RJ (2002a). "Melatonin protects hepatic mitochondrial respiratory chain activity in senescence-accelerated mice." *J Pineal Res* **32**(3): 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**(3): 127-133.
- Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ y Miyahara Y (2002c). "Melatonin reduces oxidative damage of neural lipids and proteins in senescence-accelerated mouse." *Neurobiol Aging* **23**(4): 639-644.
- 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**(1-3): 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**(3): 367-375.
- Ortega-Gutiérrez S, García JJ, Martínez-Ballarín E, Reiter RJ, Millán-Plano S, Robinson M y Acuña-Castroviejo D (2002). "Melatonin improves deferoxamine antioxidant activity in

- protecting against lipid peroxidation caused by hydrogen peroxide in rat brain homogenates." *Neurosci Lett* **323**(1): 55-59.
- Ortiz GG, Crespo-López ME, Morán-Moguel C, García JJ, Reiter RJ y Acuña-Castroviejo D (2001). "Protective role of melatonin against MPTP-induced mouse brain cell DNA fragmentation and apoptosis in vivo." *Neuro Endocrinol Lett* **22**(2): 101-108.
- 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**(6): 325-330.
- Pähkla R, Zilmer M, Kullisaar T y Rago L (1998). "Comparison of the antioxidant activity of melatonin and pinoline in vitro." *J Pineal Res* **24**(2): 96-101.
- Pähkla R, Masso R, Zilmer M, Rago L y Airaksinen MM (1996). "Autoradiographic localization of [³H]-pinoline binding sites in mouse tissues." *Methods Find Exp Clin Pharmacol* **18**(6): 359-366.
- Palmer AM y Burns MA (1994). "Selective increase in lipid peroxidation in the inferior temporal cortex in Alzheimer's disease." *Brain Res* **645**(1-2): 338-342.
- Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Álvarez-Uría M, Fraile B, Anadón R y Sáez F (2003). *Biología celular*. Madrid, McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U.
- Pappolla MA, Sos M, Bick RJ, Omar RA, Hickson-Bick DIm, Reiter RJ, Efthimiopoulos S, Sambamurti K y Robakis NK (1997a). "Oxidative damage and cell death induced by an amyloid peptide fragment is completely prevented by melatonin." *En: Alzheimer's disease: Biology, diagnosis and therapeutics*. Eds: Iqbal K, Winblad B, Nishimura T, Takeda M, Wisniewski HM. John Wiley & Sons Ltd.
- Pappolla MA, Sos M, Omar RA, Bick RJ, Hickson-Bick DL, Reiter RJ, Efthimiopoulos S y Robakis NK (1997b). "Melatonin prevents death of neuroblastoma cells exposed to the Alzheimer amyloid peptide." *J Neurosci* **17**(5): 1683-1690.
- Petrie K, Conaglen JV, Thompson L y Chamberlain K (1989). "Effect of melatonin on jet lag after long haul flights." *BMJ* **298**(6675): 705-707.
- 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**(15): PL271-276.
- Pierrefiche G y Laborit H (1995). "Oxygen free radicals, melatonin, and aging." *Exp Gerontol* **30**(3-4): 213-227.
- Pietraforte D y Minetti M (1997). "One-electron oxidation pathway of peroxy nitrite decomposition in human blood plasma: evidence for the formation of protein tryptophan-centred radicals." *Biochem J* **321**(Pt 3): 743-750.
- Piñol-Ripoll G, Fuentes-Broto L, Millán-Plano S, Reyes-González M, Mauri JA, Martínez-Ballarín E, Reiter RJ y García JJ (2006). "Protective effect of melatonin and pinoline on nitric oxide-induced lipid and protein peroxidation in rat brain homogenates." *Neurosci Lett* **405**(1-2): 89-93.
- 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**(7): 999-1009.
- Pless G, Frederiksen TJ, García JJ y Reiter RJ (1999). "Pharmacological aspects of N-acetyl-5-methoxytryptamine (melatonin) and 6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline (pinoline) as antioxidants: reduction of oxidative damage in brain region homogenates." *J Pineal Res* **26**(4): 236-246.
- 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): 1-10.
- Poeggeler B, Reiter RJ, Hardeland R, Tan DX y Barlow-Walden LR (1996). "Melatonin and structurally-related, endogenous indoles act as potent electron donors and radical scavengers in vitro." *Red Rep* **2**: 179-184.
- Post A, Holsboer F y Behl C (1998). "Induction of NF-kappaB activity during haloperidol-induced oxidative toxicity in clonal hippocampal cells: suppression of NF-kappaB and neuroprotection by antioxidants." *J Neurosci* **18**(20): 8236-8246.
- Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR y Guerrero JM (1994). "Physiological concentrations of

- melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum." *Life Sci* **55**(24): 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**(3): 430-442.
- Prasad MR, Lovell MA, Yatin M, Dhillon H y Markesbery WR (1998). "Regional membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease." *Neurochem Res* **23**(1): 81-88.
- Pratico D, MY Lee V, Trojanowski JQ, Rokach J y Fitzgerald GA (1998). "Increased F₂-isoprostanes in Alzheimer's disease: evidence for enhanced lipid peroxidation in vivo." *FASEB J* **12**(15): 1777-1783.
- Probst WC, Snyder La, Schuster DI, Brosius J y Sealfon SC (1992). "Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily." *DNA Cell Biol* **11**(1): 1-20.
- 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 H₂O₂: protection by melatonin and related molecules." *J Pineal Res* **29**(1): 54-61.
- Quay WB (1980). *General biochemistry of the pineal gland of mammals. En: The Pineal Gland. Vol I: Anatomy and Biochemistry.*, Ed: Reiter RJ. Boca Ratón: CRC Press Inc.
- Rangan U y Bulkley GB (1993). "Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury." *Br Med Bull* **49**(3): 700-718.
- Redman J, Armstrong S y Ng KT (1983). "Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin." *Science* **219**(4588): 1089-1091.
- Refsgaard HH, Tsai L y Stadtman ER (2000). "Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products." *Proc Natl Acad Sci USA* **97**(2): 611-616.
- Reilly PM y Bulkley GB (1990). "Tissue injury by free radicals and other toxic oxygen metabolites." *Br J Surg* **77**(12): 1323-1324.
- Reiter RJ y Fraschini F (1969). "Endocrine aspects of the mammalian pineal gland: a review." *Neuroendocrinology* **5**(3): 219-255.
- Reiter RJ (1973). "Comparative physiology: pineal gland." *Annu Rev Physiol* **35**: 305-328.
- Reiter RJ (1980). "The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals." *Endocr Rev* **1**(2): 109-131.
- Reiter RJ (1981). "The mammalian pineal gland: structure and function." *Am J Anat* **162**(4): 287-313.
- Reiter RJ, Craft CM, Johnson JE, JR., King TS, Richardson BA, Vaughan GM y Vaughan MK (1981). "Age-associated reduction in nocturnal pineal melatonin levels in female rats." *Endocrinology* **109**(4): 1295-1297.
- Reiter RJ (1991a). "Melatonin: That ubiquitously acting pineal hormone." *News Physiol Sci* **6**: 223-227.
- Reiter RJ (1991b). "Pineal gland: Interface between the photoperiodic environment and the endocrine system." *Endocr. Rev.* **12**: 151-180.
- Reiter RJ (1991c). "Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions." *Endocr Rev* **12**(2): 151-180.
- 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 (1995). "Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain." *FASEB J* **9**(7): 526-533.
- Reiter RJ, Carneiro RC y Oh CS (1997a). "Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms." *Horm Metab Res* **29**(8): 363-372.
- Reiter RJ, Tang L, García JJ y Muñoz-Hoyos A (1997b). "Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology." *Life Sci* **60**(25): 2255-2271.
- Reiter RJ (1998a). "Melatonin and human reproduction." *Ann Med* **30**(1): 103-108.
- Reiter RJ (1998b). "Melatonin, active oxygen species and neurological damage." *Drug News Perspect* **11**(5): 291-296.
- Reiter RJ (1998c). "Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin." *Prog Neurobiol* **56**(3): 359-384.
- Reiter RJ, Guerrero JM, García JJ y Acuña-Castroviejo D (1998). "Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging. Relation to melatonin." *Ann N Y Acad Sci* **854**: 410-424.

- Reiter RJ, Tan D, Kim SJ, Manchester LC, Qi W, Garcia JJ, Cabrera JC, El-Sokkary G y Rouvier-Garay V (1999a). "Augmentation of indices of oxidative damage in life-long melatonin-deficient rats." *Mech Ageing Dev* **110**(3): 157-173.
- Reiter RJ, Tan DX, Cabrera J y D'arpa D (1999b). "Melatonin and tryptophan derivatives as free radical scavengers and antioxidants." *Adv Exp Med Biol* **467**: 379-387.
- Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D, Tan DX y Burkhardt S (2001). "Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system." *Ann N Y Acad Sci* **939**: 200-215.
- Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sáinz RM, León J y Czarnocki Z (2003). "Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans." *Acta Biochim Pol* **50**(4): 1129-1146.
- Reiter RJ, Tan DX, Gitto E, Sáinz RM, Mayo JC, Leon J, Manchester LC, Vijayalaxmi, Kilic E y Kilic U (2004). "Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage." *Pol J Pharmacol* **56**(2): 159-170.
- Reiter RJ, Tan DX, Terron MP, Flores LJ y Czarnocki Z (2007). "Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions." *Acta Biochim Pol* **54**(1): 1-9.
- Reppert SM, Weaver DR y Godson C (1996). "Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes." *Trends Pharmacol Sci* **17**(3): 100-102.
- Requintina PJ y Oxenkrug GF (2003). "Differential effects of lipopolysaccharide on lipid peroxidation in F344N, SHR rats and BALB/c mice, and protection of melatonin and NAS against its toxicity." *Ann N Y Acad Sci* **993**: 325-333; discussion 345-329.
- Ressmeyer AR, Mayo JC, Zelosko V, Sáinz RM, Tan DX, Poeggeler B, Antolin 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." *Red Rep* **8**(4): 205-213.
- Reyftmann JP, Santus R, Maziere JC, Morliere P, Salmon S, Candide C, Maziere C y Haigle J (1990). "Sensitivity of tryptophan and related compounds to oxidation induced by lipid autooxidation. Application to human serum low- and high-density lipoproteins." *Biochim Biophys Acta* **1042**(2): 159-167.
- Rivers JP y Frankel TL (1981). "Essential fatty acid deficiency." *Br Med Bull* **37**(1): 59-64.
- Roberts JE, Hu DN y Wishart JF (1997). "Pulse radiolysis studies of melatonin and chloromelatonin." *J Photochem Photobiol B* **42**: 125-132.
- 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.
- Romero JA y Axelrod J (1974). "Pineal beta-adrenergic receptor: diurnal variation in sensitivity." *Science* **184**(4141): 1091-1092.
- Ronen N, Livne E y Gross B (1999). "Oxidative damage in rat tissue following excessive L-tryptophan and atherogenic diets." *Adv Exp Med Biol* **467**: 497-505.
- Sack RL y Lewy AJ (1997). "Melatonin as a chronobiotic: treatment of circadian desynchrony in night workers and the blind." *J Biol Rhythms* **12**(6): 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**(3): 237-241.
- Sáinz RM, Mayo JC, Reiter RJ, Antolin I, Esteban MM y Rodríguez C (1999). "Melatonin regulates glucocorticoid receptor: an answer to its antiapoptotic action in thymus." *FASEB J* **13**(12): 1547-1556.
- 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**(10): 1237-1242.
- Sawyer WH, Hill JS, Howlett GJ y Wiley JS (1983). "Hereditary spherocytosis of man. Defective cytoskeletal interactions in the

- erythrocyte membrane." *Biochem J* **211**(2): 349-356.
- Sayre LM, Zelasko DA, Harris PL, Perry G, Salomon RG y Smith MA (1997). "4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease." *J Neurochem* **68**(5): 2092-2097.
- Scott JA (1982). "Membrane fluidity as an index of pathology." *Med Hypotheses* **9**(2): 223-228.
- Schiffer M, Chang CH y Stevens FJ (1992). "The functions of tryptophan residues in membrane proteins." *Protein Eng* **5**(3): 213-214.
- Schroeder F, Perlmutter JF, Glaser M y Vagelos Pr (1976). "Isolation and characterization of subcellular membranes with altered phospholipid composition from cultured fibroblasts." *J Biol Chem* **251**(16): 5015-5026.
- Schroeder F (1984). "Role of membrane lipid asymmetry in aging." *Neurobiol Aging* **5**(4): 323-333.
- Schutz G, Chow E y Feigelson P (1972). "Regulatory properties of hepatic tryptophan oxygenase." *J Biol Chem* **247**(17): 5333-5337.
- Seegar H, Mueck AO y Lippert TH (1997). "Effect of melatonin and metabolites on copper-mediated oxidation of low density lipoprotein." *Br J Clin Pharmacol* **44**(3): 283-284.
- Sener G, Sehirli AO, Altunbas HZ, Ersoy Y, Paskaloglu K, Arbak S y Ayanoglu-Dulger G (2002a). "Melatonin protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats." *J Pineal Res* **32**(4): 231-236.
- Sener G, Sehirli AO, Keyer-Uysal M, Arbak S, Ersoy Y y Yegen BC (2002b). "The protective effect of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in the rat." *J Pineal Res* **32**(2): 120-126.
- Sener G, Sehirli AO, Satiroglu H, Keyer-Uysal M y Yegen BC (2002c). "Melatonin improves oxidative organ damage in a rat model of thermal injury." *Burns* **28**(5): 419-425.
- Sener G, Sehirli AO, Satiroglu H, Keyer-Uysal M y Yegen BC (2002d). "Melatonin prevents oxidative kidney damage in a rat model of thermal injury." *Life Sci* **70**(25): 2977-2985.
- Sener G, Sehirli AO y Ayanoglu-Dulger G (2003a). "Protective effects of melatonin, vitamin E and N-acetylcysteine against acetaminophen toxicity in mice: a comparative study." *J Pineal Res* **35**(1): 61-68.
- 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**(24): 2707-2718.
- 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**(4): 327-334.
- Seyama Y (2003). "Cholesterol metabolism, molecular pathology, and nutritional implications." *J Med Food* **6**(3): 217-224.
- Sherbet GV (1989). "Membrane fluidity and cancer metastasis." *Exp Cell Biol* **57**(4): 198-205.
- Shida CS, Castrucci AM y Lamy-Freund MT (1994). "High melatonin solubility in aqueous medium." *J Pineal Res* **16**(4): 198-201.
- Sibley DR, Benovic JL, Caron MG y Lefkowitz RJ (1987). "Regulation of transmembrane signaling by receptor phosphorylation." *Cell* **48**(6): 913-922.
- Singer SJ y Nicolson GL (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." *Science* **175**(23): 720-731.
- Singer SJ (2004). "Some early history of membrane molecular biology." *Annu Rev Physiol* **66**: 1-27.
- Sinha K, Degaonkar MN, Jagannathan NR y Gupta YK (2001). "Effect of melatonin on ischemia reperfusion injury induced by middle cerebral artery occlusion in rats." *Eur J Pharmacol* **428**(2): 185-192.
- Siraki AG y O'Brien PJ (2002). "Prooxidant activity of free radicals derived from phenol-containing neurotransmitters." *Toxicology* **177**(1): 81-90.
- Sitaram BR y Lees GJ (1978). "Diurnal rhythm and turnover of tryptophan hydroxylase in the pineal gland of the rat." *J Neurochem* **31**(4): 1021-1026.
- 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**(2): 122-128.

- Slater TF (1982). "Lipid peroxidation." *Biochem Soc Trans* **10**(2): 70-71.
- 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.
- Sohal RS y Weindruch R (1996). "Oxidative stress, caloric restriction, and aging." *Science* **273**(5271): 59-63.
- Sok M, Sentjurs M, Schara M, Stare J y Rott T (2002). "Cell membrane fluidity and prognosis of lung cancer." *Ann Thorac Surg* **73**(5): 1567-1571.
- Speciale C, Hares K, Schwarcz R y Brookes N (1989). "High-affinity uptake of L-kynurenine by a Na⁺-independent transporter of neutral amino acids in astrocytes." *J Neurosci* **9**(6): 2066-2072.
- Stadtman ER (2001). "Protein oxidation in aging and age-related diseases." *Ann N Y Acad Sci* **928**: 22-38.
- Stasica P, Paneth P y Rosiak JM (2000). "Hydroxyl radical reaction with melatonin molecule: a computational study." *J Pineal Res* **29**(2): 125-127.
- Steinhilber D y Carlberg C (1999). "Melatonin receptor ligands." *Exp. Opin. Ther. Patents* **9**: 281-290.
- Stetinova V, Smetanova L, Grossmann V y Anzenbacher P (2002). "In vitro and in vivo assessment of the antioxidant activity of melatonin and related indole derivatives." *Gen Physiol Biophys* **21**(2): 153-162.
- Stone TW, Macgregor DG, Smith RA, Jones P, Behan WM y Graham DI (1996). "Basic mechanisms of kynurenine actions in the central nervous system." *Adv Exp Med Biol* **398**: 195-201.
- Stone TW (2001). "Endogenous neurotoxins from tryptophan." *Toxicol* **39**(1): 61-73.
- Stoy N, Mackay GM, Forrest CM, Christofides J, Egerton M, Stone TW y Darlington Lg (2005). "Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with Huntington's disease." *J Neurochem* **93**(3): 611-623.
- Subbarao KV, Richardson JS y Ang LC (1990). "Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro." *J Neurochem* **55**(1): 342-345.
- 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**(3): 1161-1169.
- Sugden D y Klein DC (1983). "Regulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase in neonatal and adult rats." *J Neurochem* **40**(6): 1647-1653.
- Sugden D, Cena V y Klein DC (1987). "Hydroxyindole O-methyltransferase." *Meth Enzymol* **142**: 590-596.
- Sugden D, Pickering H, Teh MT y Garratt PJ (1997). "Melatonin receptor pharmacology: toward subtype specificity." *Biol Cell* **89**(8): 531-537.
- Svingen BA, Buege JA, O'neal FO y Aust Sd (1979). "The mechanism of NADPH-dependent lipid peroxidation. The propagation of lipid peroxidation." *J Biol Chem* **254**(13): 5892-5899.
- 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." *Psychi Clin Neurosci* **56**(3): 301-302.
- Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC y Reiter RJ (1993). "Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger." *Endocr* **1**: 57-60.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Hardies LJ, Weintraub ST, Vijayalaxmi y Shepherd AM (1998a). "A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation." *Biochem Biophys Res Commun* **253**(3): 614-620.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Kim SJ y El-Sokkary GH (1998b). "Melatonin protects hippocampal neurons in vivo against kainic acid-induced damage in mice." *J Neurosci Res* **54**(3): 382-389.
- Tan DX, 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**(23): 2523-2529.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Zhang M, Weintraub ST, Cabrera J, Sáinz RM y Mayo JC (1999b). "Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its

- origin and significance." *Biochim Biophys Acta* **1472**(1-2): 206-214.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Limson J, Weintraub ST y Qi W (2000a). "Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation." *Free Radic Biol Med* **29**(11): 1177-1185.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Karbownik M y Calvo JR (2000b). "Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products." *Biol Signals Recept* **9**(3-4): 137-159.
- Tan DX, Manchester LC, Burkhardt S, Sáinz RM, Mayo JC, Kohen R, Shohami E, Huo YS, Hardeland R y Reiter RJ (2001). "N¹-acetyl-N²-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant." *FASEB J* **15**(12): 2294-2296.
- Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Poeggeler B, Lopez-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**(4): 249-259.
- Tappel AL (1973). "Lipid peroxidation damage to cell components." *Fed Proc* **32**(8): 1870-1874.
- Teixeira A, Morfim MP, De Cordova CA, Charao CC, De Lima VR y Creczynski-Pasa TB (2003). "Melatonin protects against pro-oxidant enzymes and reduces lipid peroxidation in distinct membranes induced by the hydroxyl and ascorbyl radicals and by peroxynitrite." *J Pineal Res* **35**(4): 262-268.
- 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 Ca²⁺ binding protein." *J Biol Chem* **248**(17): 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**(2): 102-106.
- Toma S, Nakamura M, Tone S, Okuno E, Kido R, Breton J, Avanzi N, Cozzi L, Speciale C, Mostardini M, Gatti S y Benatti L (1997). "Cloning and recombinant expression of rat and human kynureninase." *FEBS Lett* **408**(1): 5-10.
- Touitou Y, Selmaoui B, Zhao ZY, San Martin M y Bogdan A (1996). "Melatonin and biological rhythms: various aspects in human physiopathology." *Ann Pharm Fr* **54**(6): 241-250.
- Tresguerres JAF, Aguilar Benítez De Lugo E, Cachafeiro MV, Cardinali D, Gil Loызaga P, Lahera Juliá V, Martínez Verano F, Mora Teruel F, Rodríguez Roisin R, Romano Pardo M, Tamargo Menéndez J y Zarco Gutiérrez P (1999). *Fisiología humana*. Madrid, 2ª Edición. Aravaca: McGraw-Hill Interamericana.
- Túnez I, Muñoz Mdel C, Feijoo M, Muñoz-Castañeda JR, Bujalance I, Valdelvira ME y Montilla Lopez P (2003). "Protective melatonin effect on oxidative stress induced by okadaic acid into rat brain." *J Pineal Res* **34**(4): 265-268.
- Uchida K, Enomoto N, Itakura K y Kawakishi S (1990). "Formation of diastereoisomeric 3a-hydroxypyrrroloindoles from a tryptophan residue analog mediated by iron (II)-EDTA and L-ascorbate." *Arch Biochem Biophys* **279**(1): 14-20.
- Vakkuri O, Rintamaki H y Leppaluoto J (1985a). "Plasma and tissue concentrations of melatonin after midnight light exposure and pinealectomy in the pigeon." *J Endocrinol* **105**(2): 263-268.
- Vakkuri O, Rintamaki H y Leppaluoto J (1985b). "Presence of immunoreactive melatonin in different tissues of the pigeon (*Columba livia*)." *Gen Comp Endocrinol* **58**(1): 69-75.
- Vakkuri O, Kivela A, Leppaluoto J, Valtonen M y Kauppila A (1996). "Decrease in melatonin precedes follicle-stimulating hormone increase during perimenopause." *Eur J Endocrinol* **135**(2): 188-192.
- 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**(2): 193-199.
- Valenzuela A (1991). "The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress." *Life Sci* **48**(4): 301-309.

- Van Blitterswijk WJ, Van Hoeven RP y Emmelot P (1981). "On the lipid fluidity of malignant lymphoid cell membranes." *Cancer Res* **41**(9 Pt 1): 3670-3671.
- Van Blitterswijk WJ (1985). "in: Membrane Fluidity in Biology." *Disease Processes (Aloia R.C. and Boggs, J. M., Eds.). Academic Press, Orlando, FL.* **3**: 85-159.
- Vanecek J, Pavlik A y Illnerova H (1987). "Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography." *Brain Res* **435**(1-2): 359-362.
- Vanecek J (1998). "Cellular mechanisms of melatonin action." *Physiol Rev* **78**(3): 687-721.
- Venero Gutiérrez JR (2002). "Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes." *Rev Cubana Med Milit* **31**(2): 126-133.
- Vladimirov YA, Olenev VI, Suslova TB y Cheremisina ZP (1980). "Lipid peroxidation in mitochondrial membrane." *Adv Lipid Res* **17**: 173-249.
- Wakatsuki A, Okatani Y, Izumiya C y Ikenoue N (1999). "Melatonin protects against ischemia and reperfusion-induced oxidative lipid and DNA damage in fetal rat brain." *J Pineal Res* **26**(3): 147-152.
- 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**(2): 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**(8): 671-681.
- Wang HX, Liu F y Ng TB (2001). "Examination of pineal indoles and 6-methoxy-2-benzoxazolinone for antioxidant and antimicrobial effects." *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **130**(3): 379-388.
- Watanabe Y, Yoshida R, Sono M y Hayaishi O (1981). "Immunohistochemical localization of indoleamine 2,3-dioxygenase in the argyrophilic cells of rabbit duodenum and thyroid gland." *J Histochem Cytochem* **29**(5): 623-632.
- Weaver DR, Namboodiri MA y Reppert SM (1988). "Iodinated melatonin mimics melatonin action and reveals discrete binding sites in fetal brain." *FEBS Lett* **228**(1): 123-127.
- Weissbach H, Redfield BG y Axelrod J (1960). "Biosynthesis of melatonin: enzymic conversion of serotonin to N-acetylserotonin." *Biochim Biophys Acta* **43**: 352-353.
- Williams LM y Morgan PJ (1988). "Demonstration of melatonin-binding sites on the pars tuberalis of the rat." *J Endocrinol* **119**(1): R1-3.
- Wiseman H, Quinn P y Halliwell B (1993). "Tamoxifen and related compounds decrease membrane fluidity in liposomes. Mechanism for the antioxidant action of tamoxifen and relevance to its anticancer and cardioprotective actions?" *FEBS Letters* **330**: 53-56.
- 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**(5): 485-488.
- Withyachumnarnkul B, Limpanawattanakul 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**(19): 1757-1765.
- Wolfler A, Abuja PM, Schauenstein K y Liebmann PM (1999). "N-acetylserotonin is a better extra- and intracellular antioxidant than melatonin." *FEBS Lett* **449**(2-3): 206-210.
- Wong SF, Halliwell B, Richmond R y Skowronek WR (1981). "The role of superoxide and hydroxyl radicals in the degradation of hyaluronic acid induced by metal ions and by ascorbic acid." *J Inorg Biochem* **14**(2): 127-134.
- 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 [¹⁴C]serotonin and [¹⁴C]melatonin." *J Neurochem* **18**(9): 1683-1687.
- Yamamoto H y Tang HW (1996). "Antagonistic effect of melatonin against cyanide-induced seizures and acute lethality in mice." *Toxicol Lett* **87**(1): 19-24.

- Yang HY y Neff NH (1976). "Brain N-acetyltransferase: substrate specificity, distribution and comparison with enzyme activity from other tissues." *Neuropharmacology* **15**(9): 561-564.
- Yildirim N, Ozer A, Inal M, Angin K y Yurdakul S (2003). "The effect of N-acetyl serotonin on ultraviolet-radiation-induced cataracts in rats." *Ophthalmologica* **217**(2): 148-153.
- 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**(4): 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**(5): 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**(1): 17-33.
- Yu BP (1994). "Cellular defenses against damage from reactive oxygen species." *Physiol Rev* **74**(1): 139-162.
- Zarkovic K (2003). "4-hydroxynonenal and neurodegenerative diseases." *Mol Aspects Med* **24**(4-5): 293-303.
- 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**(1): 83-87.
- Zhang H, Squadrito GL, Uppu R y Pryor WA (1999). "Reaction of peroxynitrite with melatonin: A mechanistic study." *Chem Res Toxicol* **12**(6): 526-534.
- Zimmer G (1984). *Fluidity of cell membranes in the presence of some drug and inhibitors*. Plenum, New York, M Kates and LA Manson.
- Zimmer G y Freisleben HJ (1988). *Membrane Fluidity determination form viscosity*. New York, CC Curtain and LM Gordon Alan R Liss.
- Zimmer G, Thürich T y Scheer B (1993). *Membrane Fluidity and vitamin E*. In: Packer, L. Fucks, J. (Eds.), *Vitamin E in Health and Disease*. Marcel Dekker, New York 207-213.