



**Universidad**  
Zaragoza



**Facultad de Ciencias**  
**Universidad Zaragoza**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

# **Estudio del mecanismo de protección celular de los derivados de melatonina**

---

**JORGE SANGÜESA GARCÍA**

**Director/a:** Dra. Desirée Pereboom Maicas

**Departamento de Farmacología y Fisiología, Facultad de  
Medicina**

**Zaragoza 2017**

# ÍNDICE

<b>Resumen/Abstract</b>	<b>1</b>
<b>Introducción</b>	<b>2</b>
1.0 Melatonina	2
1.1 Biosíntesis y metabolismo	2
1.2 Melatonina como antioxidante	3
1.3 Efectos terapéuticos	4
1.4 Acción las membranas celulares	5
2.0 Radiación ultravioleta	5
3.0 Estrés oxidativo	6
3.1 ROS	6
3.2 RNS	6
4.0 Tipos de muerte celular	6
4.1 Apoptosis extrínseca	6
4.2 Apoptosis intrínseca	7
4.3 Necrosis regulada	7
4.4 Necroptosis	8
<b>Objetivos</b>	<b>9</b>
<b>Material y métodos</b>	<b>10</b>
A. Material biológico	10
B. Cultivo y mantenimiento celular	10
C. Métodos de irradiación y tratamiento	11
D. Reactivos	12
E. Material fungible y equipos	14
<b>Resultados y discusión</b>	<b>15</b>
1. Estudio del efecto protector de la melatonina a una dosis de irradiación de 5 minutos	15
2. Evaluación de la protección de melatonina y pinolina durante 2.5 minutos de irradiación	17
3. Protección de la melatonina durante 24 horas de irradiación y efecto protector sinérgico de la melatonina y quercetina a 5 minutos de irradiación	18
4. Estudio de la viabilidad y las diferentes poblaciones de muerte celular por citometría de imagen	20
<b>Conclusiones/Conclusions</b>	<b>23</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>24</b>

## Resumen

En el presente trabajo se evalúa la capacidad de protección de la melatonina frente a la radiación UVC, así como la comparación de este efecto protector con otros antioxidantes como pinolina que es uno de sus derivados y quercetina. En las teorías propuestas, la radiación UVC causa daño en las células a través de la generación de diferentes especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), por lo que la melatonina tiene que tener cierto papel protector frente a este daño. La melatonina es el principal producto secretado por la glándula pineal y uno de los principales antioxidantes que se localizan en la zona de la dermis siendo un antioxidante de acción directa e indirecta que también será evaluado en el presente trabajo. Se trata de una pequeña molécula que debido a sus características físico químicas es capaz de difundir por la mayoría de membranas y barreras del organismo. La melatonina captura las diferentes ROS o RNS y además actúa induciendo la transcripción de varias enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa entre otras. Además de estos efectos antioxidantes la melatonina es más conocida por ser uno de los reguladores de los ciclos circadianos y por tener múltiples acciones pleiotrópicas.

**Palabras clave:** melatonina, pinolina, quercetina, radiación UVC, antioxidante, especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno.

## ABSTRACT

In the present report, It is checked the protection capacity of melatonin against UVC radiation, even the comparison of this protective effect with other antioxidants like pinoline which is melatonin's derivated and quercetin. Among other proposed theories, UVC radiation damages the cells through the differents reactive species of oxygen (ROS) and nitrogen (RNS), so melatonin should have some protective role. Melatonin is the chief secretory product of the pineal gland and one of the main antioxidant which is located in dermis being direct and indirect antioxidant, it's checked too. Melatonin is a small molecule and as consequences of its phisiochemical characteristics it's able to throw the majority of membranes and barriers in the organisms. This molecule catches the differents ROS and RNS and it induces many antioxidant enzymes transcription like superoxide dismutase. Moreover, melatonin it's best known for being a circadian rythm regulator and it has a lot of pleiotropic actions.

**Keywords:** melatonin, pinoline, quercetin, UVC radiation, antioxidant, reactive species of oxygen and reactive species of nitrogen

# INTRODUCCIÓN

## 1.0 Melatonina:

### 1.1 Biosíntesis y metabolismo:

Fue una de las primeras hormonas aisladas e identificada en 1958 por el profesor Lerner de la Facultad de Medicina en la Universidad de Yale. Es una hormona de tipo indolamina sintetizada de forma natural por la glándula pineal. Los dos grupos funcionales son los residuos O-metil y N-acetil necesarios para realizar su función, y son importantes para la unión específica con su receptor. Lo que le confieren propiedades liposolubles y oxidativas [1], que favorecen la solubilización en varios fluidos del organismo así como su movimiento a través de las membranas celulares. En la siguiente figura se muestran las características de la molécula:

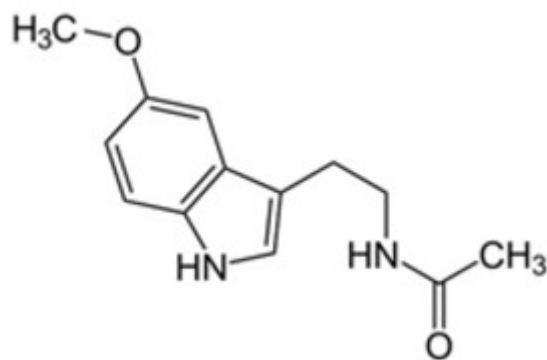


Figura 1. Estructura molecular de la melatonina

La síntesis de melatonina empieza con el aminoácido esencial triptófano que gracias a la enzima TDC, tras una cascada de reacciones da lugar a melatonina. La ruta clásica de síntesis de melatonina en mamíferos se muestra en la siguiente figura [2] :

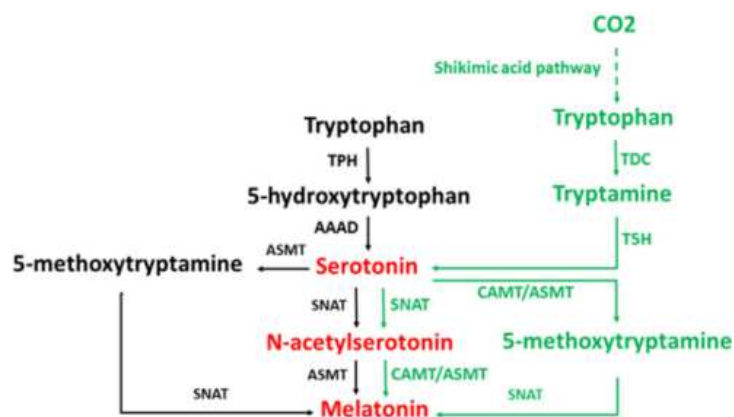


Figura 2. Ruta biosintética de la melatonina en mamíferos a partir de triptófano.

La enzima limitante es la que controla el paso de serotonina a N-acetilserotonina y es la enzima SNAT. Se ha llegado a dicha observación porque la actividad de SNAT está regulada por el ritmo circadiano y controla los niveles de melatonina. La enzima está fuertemente regulada por la glándula pineal, lo que probablemente deriva en la gran producción de melatonina durante la fase nocturna [2].

Además de esta ruta general de síntesis, las células epiteliales humanas tienen la capacidad de sintetizar melatonina porque expresan todas las enzimas necesarias, como demuestran Slominski A. y colaboradores en sus estudios de la ruta epitelial serotoninérgica [3].

La melatonina circulante es metabolizada mayoritariamente por el hígado donde se hidroxila gracias a la acción del sistema enzimático del citocromo P-450 conjugándose con sulfato para formar 6-sulfoximelatonina. Sin embargo, según Goswami en 2015, esta vía solo es válida para la melatonina en circulación y no para la melatonina tisular [4].

Durante décadas se creyó que el metabolito 6-hidroximelatonina era la pieza clave de su metabolismo y las investigaciones se centraron en él. Con el paso de los años se ha visto que el metabolismo de melatonina es un proceso complejo, donde es sintetizada por procesos enzimáticos, pseudoenzimáticos y por interacciones vía ROS y NOS [5].

En organismos vertebrados esta hormona posee múltiples acciones pleiotrópicas, a través de interacciones de gran afinidad con sus receptores, además actúa sobre los ritmos circadianos, como neurotransmisor, hormona, citoquina, en general regula una gran cantidad de acciones biológicas. También actúa como un antioxidante directo de amplio espectro y muestra acciones indirectas regulando los mecanismos celulares antioxidantes y protectores [6].

La glándula pineal es la principal productora de melatonina y se regula a través del sistema adrenérgico. La síntesis se activa en situación de oscuridad secretándose noradrenalina que interactúa con los receptores  $\beta 1$  de los pinealocitos promoviendo la síntesis de la enzima N-acetiltransferasa que es clave para su síntesis [7].

### 1.2 Melatonina como antioxidante:

En el artículo de Kratz y colaboradores de 2016, es el antioxidante lipofílico natural más efectivo y que puede cruzar fácilmente todas las membranas celulares, incluyendo la barrera hematoencefálica [8]. Esto estaba corroborado por Ding en 2014 que afirma que su propiedad antioxidante es muy significativa en su papel neuroprotector en sus experimentos con ratones ICR a los que se les realizaron cortes histológicos de tejido cerebral para medir los niveles de melatonina *in vivo*[9].

La interacción de melatonina con las diferentes especies reactivas de oxígeno y nitrógeno genera diversos metabolitos durante los procesos de estrés oxidativo siendo la mayoría de melatonina presente en la célula es metabolizada por las diferentes especies de ROS[2]. Sin embargo, la melatonina no se somete a un ciclo redox como lo hacen otros antioxidantes como la vitamina C, que actúan de forma intuitiva impidiendo la formación de radicales libres. La melatonina, una vez oxidada, no puede ser reducida a su estado inicial, se mantiene en forma de sus productos finales de forma estable[10].

La melatonina tiene diferentes radicales, algunos tienen función antioxidante y otros no. Como el radical acilo que no tiene ninguna función reduciendo los radicales hidroxilo. El radical con mayor potencia antioxidante es el metoxi cuya posición en el anillo indólico puede ser en 5 o 6. Sin embargo el radical metoxi, no tiene una función absoluta porque algunos derivados de melatonina no contienen este radical (como el compuesto N-acetil-5-hidroxitriptamina) y tienen una actividad antioxidante mayor [11]

Además, numerosas investigaciones han demostrado que la melatonina actúa eficazmente contra las alteraciones producidas por UVR (radiación ultravioleta) tanto en membrana plasmática como en citosol [12]. La melatonina detoxifica a una gran variedad de radicales libres: radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, radicales peroxilo, anión peroxinitrito, oxígeno singlete, anión superóxido y peroxidación lipídica [13].

En un artículo reciente de 2017, Goc y colaboradores inyectan SNP (nitroprusiato) en ratones suizos (Swiss mice) y corroboran que la melatonina induce la síntesis de las enzimas antioxidantes, incluyendo catalasas, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa. El nitroprusiato es un antihipertensivo que en exceso genera RNS. Este compuesto disminuye las actividades de las enzimas mencionadas, pero al administrar melatonina observaron un aumento en la transcripción de dichas enzimas antioxidantes. [14].

Otro gran efecto, lo ejerce mediante la inhibición en la producción mitocondrial de anión superóxido y peróxido de hidrógeno. La melatonina disminuye el consumo de oxígeno de la mitocondria que sumándolo a la reducción del potencial de membrana se obtiene una menor producción de las ROS mencionadas[15].

La mitocondria participa en la vía apoptótica desempeñando un papel clave porque contiene numerosas proteínas que participan en apoptosis: el citocromo c que activa la caspasa 9, iniciando así la apoptosis. La activación de estas proteínas se produce en situaciones de un aumento del flujo de calcio a la mitocondria. Este proceso se puede impedir con la acción de la melatonina como demuestran Espino y colaboradores evaluando la protección en leucocitos humanos[16]. Recientemente, se ha confirmado que el tratamiento con melatonina impide que el citocromo c pueda salir de la mitocondria al bloquear la apertura de los canales mPTP (aumentan su permeabilidad cuando se está produciendo la apoptosis), el bloqueo también produce que no se produzca un flujo de calcio desde la mitocondria hasta el citoplasma [17].

### 1.3 Efectos terapéuticos:

La melatonina tiene un importantísimo papel como protector epitelial. A parte de controlar la homeostasis tisular a través de sus respectivos receptores (MT), la mayor protección la ejerce de protector frente a la radiación UV que produce la síntesis de un gran número de radicales libres. La radiación UV está significativamente modulada por la melatonina y sus derivados [18].

Fischer T. W y colaboradores demuestran la capacidad de producción de melatonina por los queratinocitos después de su exposición a radiación UV. Los experimentos se basaron en los análisis de los niveles de 2-hidroxi-melatonina en los queratinocitos tras la exposición. La

melatonina producida por las diversas capas de la dermis contribuye a la homeostasis de la piel tras la exposición a radiación UV [19].

Recientemente se ha estudiado el papel de la melatonina para potenciar y modular la acción de los fármacos quimioterápicos, de tal forma que se potencia la acción en las células tumorales y se modula en las células sanas afectadas por estos fármacos reduciendo su daño[20].

La melatonina también ha sido descrita como un buen agente para reducir la respuesta inflamatoria. Inhibe la activación de NF- $\kappa$ B, así como la inhibición de la enzima COX2 que es una de las principales enzimas implicadas en el proceso inflamatorio. La melatonina se ha usado para reducir la inflamación intestinal como demuestran Dong y colaboradores [21].

### **1.4 Acción de la melatonina sobre las membranas celulares:**

De acuerdo a los experimentos de García J. J. y sus colaboradores, la melatonina tiene un gran potencial para impedir la peroxidación lipídica de los ácidos grasos de la membrana. La melatonina tiene gran capacidad de unirse a dipalmitoil fosfatidil-colina, dimiristoil fosfatidil colina y dipalmitoil fosfatidil glicerol. Aunque los modelos experimentales se basan en liposomas dotados de una bicapa lipídica son similares a las membranas que podemos encontrar en las células. Al unirse a dichos ácidos grasos, impide su peroxidación, y por tanto que aumente la rigidez de membrana favoreciendo su fluidez, porque la peroxidación lipídica impide el buen funcionamiento de la dinámica de las membranas celulares [22].

## **2.0 Radiación ultravioleta:**

La radiación ultravioleta es una de los componentes del espectro solar, junto con la luz visible y los rayos infrarrojos. El rango de RUV es 200-400 nm que está justo por debajo del espectro de la luz visible. La radiación ultravioleta se clasifica como: UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) y UVC (200-280 nm) [23]. La UVR produce daños debido a la interacción de los fotones directamente con el DNA celular causando mutaciones y oxidación de las bases nitrogenadas, generando altas cantidades de radicales libres que producen anomalías biológicas, además de generar moléculas pro-inflamatorias que inducen la formación de ROS [24].

El daño del DNA producido por la radiación UV impide que se incorporen correctamente bases nitrogenadas durante la replicación, daño hidrolítico como deaminación de las bases y daño oxidativo [25].

Según los experimentos de Begovic´ y sus colaboradores sobre los efectos de radiación UVC sobre fibroblastos de ratón, demostraron que se producía una apoptosis mediada por la activación de CD95/Fas sin la unión de Fas ligando. En los experimentos llevados a cabo usaron fibroblastos wild-type y deficientes en el adaptador FADD. Observaron que los fibroblastos wild-type sufrían más muertes por apoptosis que los deficientes en FADD [26].

### **3.0 Estrés oxidativo:**

Llamamos estrés oxidativo a las consecuencias de las especies reactivas de oxígeno o nitrógeno que interaccionan con numerosas biomoléculas: proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, etc. Tras la acción de estas especies reactivas sobre las respectivas biomoléculas en el contexto celular genera la acumulación de productos tóxicos para la propia célula [27].

#### **3.1 ROS (especies reactivas de oxígeno):**

El ión superóxido se sintetiza mediante la captación de un solo electrón por el oxígeno molecular. Es un anión muy reactivo e inestable que se metaboliza rápidamente por la superóxido dismutasa para dar peróxido de hidrógeno. En ausencia de enzimas antioxidantes este anión ataca de forma selectiva los grupos sulfidrilo de cisteínas para que formen puente disulfuro al oxidarlas [28].

El peróxido de hidrógeno es la segunda especie reactiva de oxígeno más importante después del anión superóxido. En la mayoría de los casos ambas especies reactivas de oxígeno son producidas por acción de NADPH oxidasas [29].

#### **3.2 RNS (especies reactivas de nitrógeno):**

La molécula principal es el NO, que es producido de forma controlada por las células del epitelio vascular para regular la vasodilatación. Pero forma parte de una familia de moléculas con capacidad oxidativa, incluso si hay NO en exceso genera estrés oxidativo. Es una de las moléculas que mayor poder oxidante tiene y puede reaccionar con el ADN, lípidos y proteínas en condiciones fisiológicas que puede conducir a una situación de citotoxicidad. Las demás moléculas principales componentes de esta familias son ONOO<sup>-</sup>, NO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [30].

### **4.0 Tipos de muerte celular:**

#### **4.1 Apoptosis extrínseca:**

La denominación de apoptosis extrínseca se utiliza cuando la muerte celular es inducida por señales extracelulares, normalmente viene determinada por la unión de los llamados ligandos mortales como Fas/FasL, TNF $\alpha$ /TNFR y TNFR1 con el receptor TRAIL. La unión de cualquiera de estos ligandos a sus respectivos receptores, desencadena la muerte celular programada. El modelo estudiado ha sido para Fas/FasL donde se ha identificado la ruta de apoptosis extrínseca donde participan el adaptador FADD, la caspasa 8 y la caspasa 3.



### 4.2 Apoptosis intrínseca:

Se desencadena normalmente por un aumento del estrés intracelular en diferentes condiciones como daño en ADN, estrés oxidativo, un gran aumento del calcio citosólico y acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico entre otros. La cascada que se desencadena empieza con la salida del citocromo c de la mitocondria, como consecuencia de un desbalance entre las proteínas anti-apoptóticas y pro-apoptóticas. Al final de la cascada se activa la caspasa 3 como en el caso anterior. Los efectos finales son similares en ambos tipos de apoptosis.

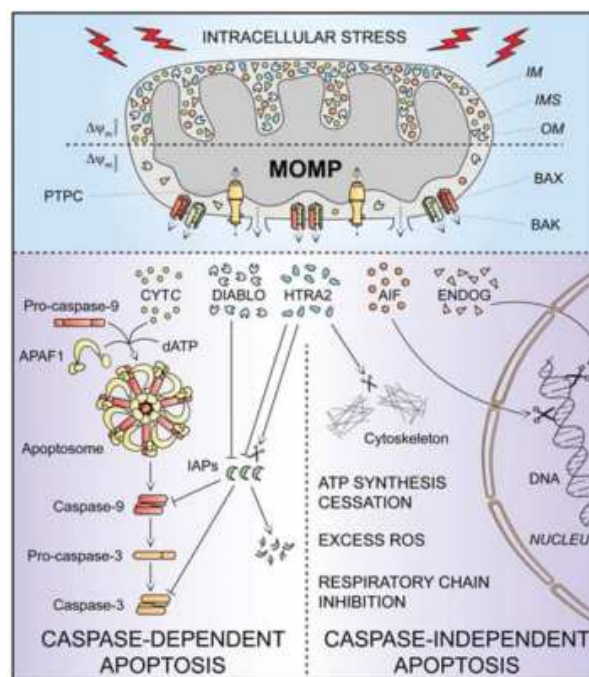


Figura 3. Diferencias entre ambas rutas de apoptosis

### 4.3 Necrosis regulada:

Este tipo de muerte celular se nombra de forma independiente porque conlleva unos módulos de activación y de señalización específicos. Normalmente se va a desencadenar cuando se expresen proteínas de la familia RIP, como RIP 1 y RIP 3 cuyas interacciones provocan como ultima consecuencia la muerte celular necrótica, incluso estas interacciones pueden estar generadas por la unión de diversos ligandos a receptores de membrana.

El proceso necrótico está asociado a múltiples causas, en la literatura se utiliza cuando se cumplen tres características: morfológicas, bioquímicas e interacción con los fagocitos. En el proceso se implican fundamentalmente los fenómenos que ocurren en el citosol, mitocondria y lisosoma. En la siguiente figura se muestra que fenómenos bioquímicos fundamentales desencadenan este tipo de muerte de forma natural [31]:

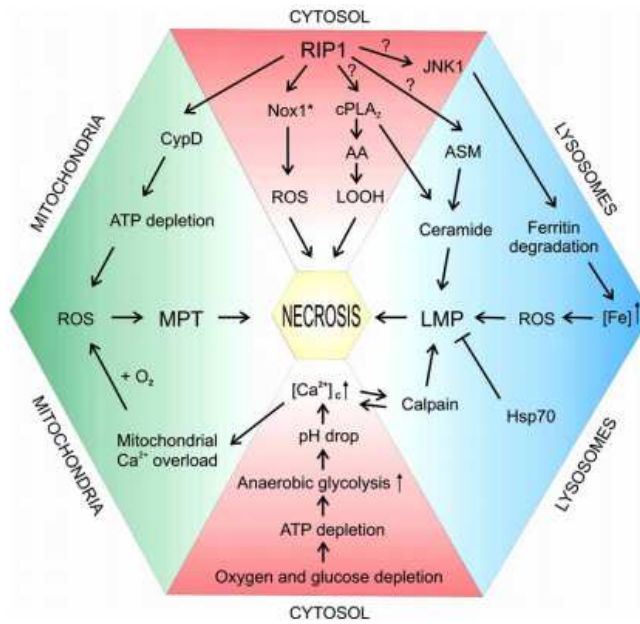


Figura 4. Fenómenos que desencadenan necrosis

### 4.3 Necroptosis:

El término se utiliza como sinónimo de necrosis regulada, pero solo aparece en un tipo especial de necrosis donde interacciona el factor RIP-1 con el receptor de TNF $\alpha$ . Este término también puede ser utilizado para referirse a necrosis reguladas por RIP-1 o RIP-3, cuya expresión debe aumentar antes que los demás factores necróticos. Es decir, cuando solo se sobreexpresa uno de los dos factores mencionados. Pero sobre todo se distingue el inicio de la vía, que solo es necroptosis cuando interaccionan RIP-1 o RIP-3 con TNFR, el mecanismo sería similar a una apoptosis extrínseca pero en este caso la muerte es independiente de la ruta de las caspasas. Además, en lugar de nucleosoma, se forma el necroptosoma que es un complejo multiproteico formado por los factores RIP mencionados que estimulan la necroptosis. Este tipo de muerte celular se desencadena por diversos factores, pero el principal es un gran daño en el ADN, en la siguiente figura se advierten las diferencias entre apoptosis y necroptosis [32]:

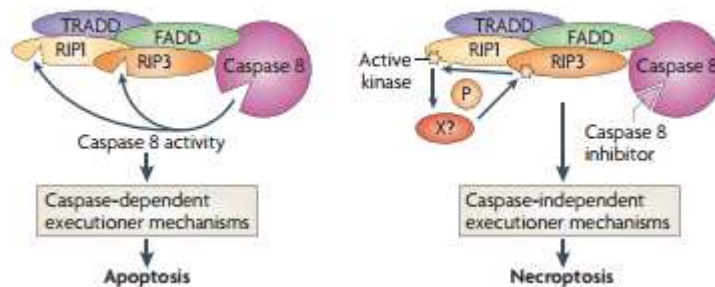


Figura 5. Esquema que recoge las diferencias entre apoptosis y necroptosis.

## **OBJETIVOS**

- Evaluar la capacidad de protección de la melatonina y pinolina frente a una dosis de radiación Ultravioleta.
- Estudiar el efecto de la aplicación mixta de la quercetina con melatonina sobre la mortalidad/vitalidad.
- Así mismo, distinguir por citometría de imagen que tipo de muertes celulares previene la melatonina.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## **A. Material biológico:**

El sustrato celular utilizado para el estudio de la protección son fibroblastos de cultivo primario de piel humana cultivado en medio *Eagle* modificado por *Dulbecco* (DMEM, GIBCO) con un 10% de suero fetal bovino, 5% de una mezcla antibiótica de estreptomycin-penicilina (Sigma, P-3539) y 1% de fungicida (Sigma, 9528).

El medio *Dulbecco* utilizado en el cultivo celular, se compone:

- Proteínas necesarias para la adherencia de las células a la matriz del soporte
- Enzimas
- Factores tróficos
- Lípidos esenciales para el desarrollo
- Minerales
- Inhibidores de proteasas
- Sustancias con capacidad tamponante (*Buffer*)
- Inactivantes de materiales tóxicos

La mezcla de antibióticos usados es de amplio espectro, es decir, que afecta a bacterias Gramm +/- . La estreptomycin sirve tanto para Gramm positivas como negativas y la penicilina para Gramm positivas.

## **B. Cultivo y mantenimiento celular:**

El cultivo celular de fibroblastos humanos se inocula en frascos de 75 cm<sup>2</sup> para que vayan multiplicándose y creciendo. Las condiciones de cultivo se realizan en una estufa con temperatura constante a 37 °C, oxígeno 95% y CO<sub>2</sub> al 5%. Para la posterior siembra en placas:

- Primero se elimina el medio de cultivo del frasco y se lava tres veces con PBS, para asegurarnos de que se ha eliminado todo el suero fetal bovino que pudiese quedar tras la retirada del medio.
- Después de haber atemperado a 37°C la tripsina se añade al frasco a una concentración de 1X. El frasco con tripsina se deposita en la estufa para mantener los 37°C necesarios para que actúe la tripsina. Se necesitan apenas 2-3 minutos para conseguir la separación de las células del soporte plástico.
- Necesitamos que la tripsina pare la reacción, para conseguirlo añadimos medio DMEM con suero fetal bovino o suero fetal bovino.
- Consecuentemente se recoge todo el contenido del frasco y se traspara tubos Falcon, donde se realizarán tres centrifugaciones a 800 rpm durante 5 minutos.
- Tras la primera centrifugación se recoge el sobrenadante y el pellet se resuspende en PBS. La siguiente centrifugación se realiza de la misma manera.

- Tras la segunda centrifugación, el pellet se resuspende en medio DMEM completo y se siembra en placas de 96 o de 6, dependiendo.
- Se dejan incubar en la estufa hasta que alcancen una confluencia del 90% aproximadamente para lo que se necesitan 48-72 horas.
- A continuación la placa correspondiente se someterá al tratamiento de radiación UVC y de melatonina.

### C. Métodos de irradiación y tratamiento:

La irradiación siempre se va a realizar sobre placas de 96 pocillos para determinar viabilidad por el método de AlamarBlue o de 6 pocillos para su posterior medida por citometría de imagen. En ambos casos las medidas se realizan a las 24 horas tras sufrir la irradiación.

Las diferentes etapas a seguir:

1. Retirar el medio de cultivo y lavar con PBS cada pocillo.
2. En los pocillos denominados como control se añade medio DMEM completo sin melatonina ni ningún reactivo. En las placas de 96 se añaden 100  $\mu$ L en cada pocillo y en las placas de 6 se añaden 2 mL.
3. En los pocillos restantes se añaden disoluciones preparadas con DMEM completo y las diversas concentraciones de melatonina para conseguir aquella que se requiere.
4. Después de haber completado la placa, se incuba durante 30 minutos en la estufa o durante 24 horas para las diversas mediciones.
5. Tras haber incubado se disponen para irradiar mediante UVC durante 5 minutos y 7.5 minutos, dependiendo del tiempo.
6. A las 24 horas de haberse cometido la irradiación se procede para su análisis en lector de placas o citometría.

#### i. Medida de la dosis de irradiación:

A través del instrumento *Gentec Solo 2* y su detector UP-K19 se puede acondicionar la potencia de la lámpara UVC de irradiación celular. El instrumento maneja los rangos de energía comprendidos entre 0,1 nW hasta 10 W, con varias escalas de medida. Aunque el tiempo de respuesta sea de apenas 1 segundo, el detector UP-K19 permite controlar un área lo suficientemente grande para percibir todo el haz fuera del foco y averiguar la desviación estándar, así como estabilidad y media de la energía detectada.

A través de su configuración se puede medir la longitud de onda generada en 254 nm de UVC. Al tratarse de un instrumento de medida, siempre se debe realizar una calibración del mismo antes y después de cada medida. Como la intensidad es inversamente proporcional a la distancia, y las muestras siempre se irradian a la misma distancia, en este caso, la intensidad va a ser dependiente de los tiempos.

### D. Reactivos:

#### i. **Melatonina:**

El reactivo de melatonina se encuentra en polvo a una pureza del 99% y un peso molecular de 232.28 g/mol. Para preparar una disolución stock 10 mM de melatonina, se disuelve en etanol al 96% porque tiene muy poca solubilidad en agua. Tras preparar esta primera disolución stock se realiza la segunda disolución 1 mM con la que se preparan las muestras para tratar los fibroblastos. La disolución 1 mM se diluye con agua destilada y las sucesivas disoluciones se preparan con medio DMEM completo, quedando al final una concentración de etanol <0,1%.

Las muestras de fibroblastos son tratados con dosis  $\mu\text{M}$  de melatonina que comprenden desde 1 hasta 100  $\mu\text{M}$ . Estas dosis de melatonina fueron preparadas a partir de la disolución 1 mM y medio *Eagle* modificado por *Dulbecco* completo porque se necesitan 24 horas para poder realizar las medidas correspondientes.

#### ii. **Pinolina:**

Las muestras se tratan con pinolina (Aldrich Chem. Co. – 355) con un peso molecular de 202.26 g/mol y una pureza del 97%. Para las disoluciones de pinolina se sigue un proceso similar, la única diferencia es la disolución stock de 10 mM que se realiza con etanol al 100% al tratarse de una molécula muy hidrófoba. Las sucesivas diluciones se preparan como en el caso anterior diluyendo con medio *Eagle*. En todos los casos donde se utiliza alcohol para solubilizar, la concentración final de etanol debe de ser <0,1% para evitar cualquier interferencia en los diferentes tratamientos.

#### iii. **Quercetina:**

Se utiliza quercetina (Sigma Q-0215) en polvo en forma dihidrato con una masa molecular de 338,3 g/mol. Se necesita disolverla en etanol o isopropanol al 100% generando la disolución stock de 25 mM. Las disoluciones de 1 mM y 200  $\mu\text{M}$  necesitan de agitación antes de añadir a las muestras para evitar que la quercetina forme un precipitado. Las disoluciones de 1 mM y 200  $\mu\text{M}$  se realizan haciendo una dilución de la disolución stock con agua destilada. Como la concentración de tratamiento es de 2  $\mu\text{M}$ , se consigue haciendo dilución de la disolución 200  $\mu\text{M}$  con medio DMEM completo.

#### iv. **Tripsina-EDTA:**

Es una proteasa obtenida del cerdo necesaria para disociar las células adheridas al romper las uniones extracelulares de las mismas. Se prepara junta a sal sódica del ácido etilendiaminotetracético (EDTA) que actúa quelando los iones calcio y magnesio que pudiesen interferir en la reacción catalizada por la tripsina. Para parar la reacción es necesario añadir suero fetal bovino porque las proteínas que contiene actúan inhibiendo la acción de la tripsina.

#### v. **Etanol:**

Se utiliza para solubilizar las muestras de melatonina, pinolina y quercetina.

vi. **Sal de bromuro de resazurina (AlamarBlue):**

Al entrar en las células, este líquido azulado es reducido por el ambiente reductor intracitoplásmico de las células. La reducción se produce por la aceptación de electrones de NADPH, NADH, FADH, FMNH y las enzimas que forman parte del citocromo (tanto citosólicas como mitocondriales). La acción de todas las moléculas sobre la resazurina provoca su reducción a un compuesto rojo llamado resorufina. Esta acción solo ocurre en células vivas. Las longitudes de onda que se miden son a 600 nm y 570 nm, la diferencia entre ambas da la verdadera medida [33].

vii. **Anexina V-FITC:**

Es un polipéptido capaz de difundir por la membrana plasmática y su función es la regulación de la actividad de un tipo de enzimas llamadas fosfolipasas  $A_2$ . Además inhibe la ruta enzimática que desencadena el proceso de coagulación porque es un competidor para los sitios de unión a fosfatidilserina. Lleva acoplado el fluorocromo FITC que tiene un pico de emisión de 492 nm.

Normalmente los lípidos de fosfatidilserina se encuentran en la semicapa de la membrana plasmática que da con el interior celular, pero cuando se desencadena la apoptosis se expone al exterior de la membrana plasmática por lo que se puede detectar añadiendo anexina V y detectar las células que se marquen por citometría.

viii. **Ioduro de propidio:**

Se trata de una molécula que emite fluorescencia en la longitud de onda del rojo, es impermeable e incapaz de atravesar la membrana plasmática en células viables. Cuando las células sufren alteración en la membrana, el ioduro de propidio puede atravesarlas porque al perder la integridad de membrana, éstas se vuelven más permeables al paso de sustancias. Esta molécula es capaz de establecer interacciones con los ácidos nucleicos cuando llega al núcleo, y excitando con un láser, podemos identificar que células han perdido integridad de membrana y cuáles son viables por citometría. Cuando el ioduro de propidio se une a los ácidos nucleicos, la excitación de fluorescencia máxima es de 535 nm y la emisión máxima es de 617 nm.

Además esta molécula unida a anexina V, se puede emplear en las determinaciones citométricas para establecer viabilidad celular y tipos de muerte celular, como apoptosis, necrosis o necroptosis.

## E. Material fungible y equipos:

Los elementos que se nombran a continuación se han utilizado como material fungible: frascos tipo Falcon de 25 cm<sup>2</sup>, Frascos Flask de 75 cm<sup>2</sup> para el mantenimiento de los cultivos, gradillas, micropipetas con capacidad de 1000, 200, 150, 50, 20 10 y 2 microlitros con sus puntas de plástico estériles correspondientes, tubos eppendorf de 1.5 mL, pipetas de vidrio de 10 mL, pipeteador automático, baño de agua caliente, congelador,

centrífuga, campana individual de flujo laminar para trabajar en condiciones de esterilidad, estufa a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5%, nevera, microscopio invertido, placas de 6 y 96 pocillos.

Como instrumentos y equipos para obtener diferentes medidas y datos:

### i. Sistema morfocitométrico ImageStream X AMNIS:

Es una vertiente de análisis citométrico que combina a la perfección imágenes a alta velocidad con la citometría de flujo, creando un soporte estadístico muy sólido y mostrando una gran gamma de herramientas nuevas para el análisis celular.

El equipo usado en los análisis está formado por 5 láseres, 12 canales de imagen, 3 objetivos de microscopía de 20, 40 y 60 aumentos, un campo claro que permite conseguir imágenes deseadas a través del espectro lumínico completo y un sistema de termostatación para mantener a las células a una temperatura adecuada.



Figura 7. AMNIS ISX

### ii. Espectrofotómetro de microplacas termostaticado Eon™:

El instrumento permite realizar las mediciones con un espectro óptico que puede medir longitudes de onda que comprenden desde 200 nm hasta 999 nm. Además, el lector de placas ofrece un control sobre la temperatura para mantenerla constante, las temperaturas se pueden mantener hasta 65°C, pero normalmente se mantendrán a 24-30 °C. Eon™ está controlado por un software llamado Gen5™2.0.



Figura 8. Lector Eon termostaticado de Biote



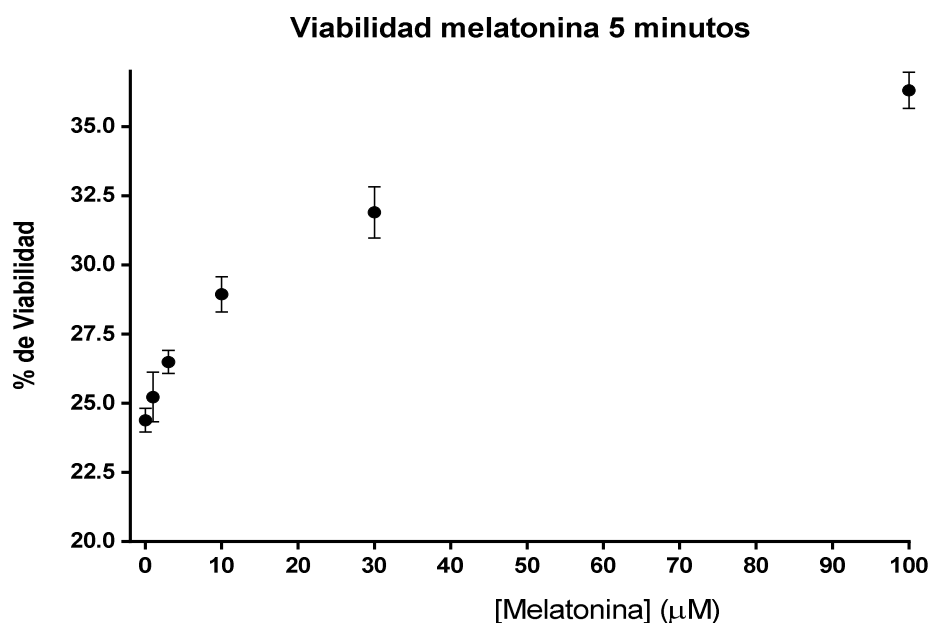
# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se ha estudiado mediante diversos experimentos en placas de 96 basados en la técnica de Alamar Blue que consistieron en exposición a radiación UVC a diferentes tiempos, con varias concentraciones de melatonina, pinolina y quercetina. Se compara la capacidad de protección frente a estrés oxidativo de melatonina, quercetina y pinolina. Se evaluaba la protección aplicando antes del tratamiento las diferentes concentraciones de los compuestos mencionados.

A través de la citometría de imagen-AMNIS se estudian las diferentes poblaciones de muerte celular que existen, se evalúa que tipo de muerte provoca la radiación UVC, así como, si la melatonina es capaz de evitar este tipos de muertes.

## **1. Estudio del efecto protector de la melatonina ante una dosis de radiación de UVC durante 5 minutos:**

En esta primera gráfica se evalúa el efecto de protección de la melatonina a diferentes concentraciones: 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ . Se aplica la melatonina 30 minutos antes de que las células reciban la dosis de irradiación para valorar el potencial de la melatonina libre como antioxidante. Se evalúa mediante la técnica de Alamar Blue, similar al MTT, en placas de 96 pocillos donde se incluyen los diferentes controles. Los controles que se usaron fueron 2: un control que nos fue irradiado y muestra la viabilidad de las células y un control que fue irradiado sin melatonina para ver la mortalidad total de la dosis de UVC.



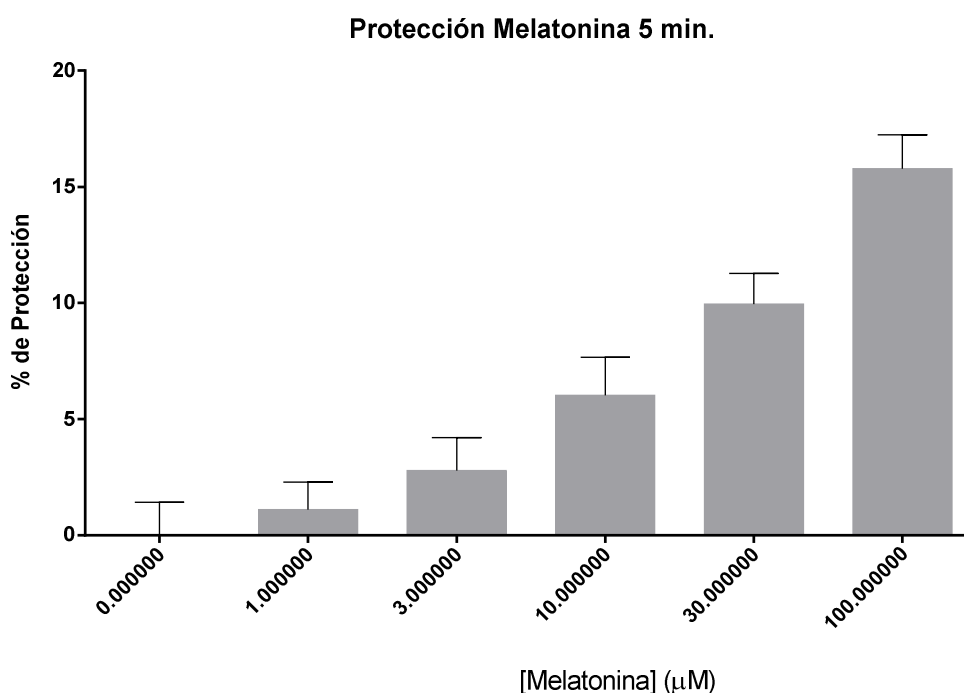
*Gráfica 1. Viabilidad de las células tratadas con melatonina tratadas con una dosis UVC de 5 minutos.*

Como podemos observar en la gráfica 1, la dosis de irradiación suministrada causó una gran mortalidad y solo se observan efectos protectores significativos a partir de una concentración de melatonina de 30  $\mu\text{M}$ . Como podemos observar a pequeñas dosis de

melatonina prácticamente no haya una gran mejora se mantienen cercanas a los controles que solo fueron irradiados marcando la mortalidad, este control correspondería con el primer punto de la gráfica donde la viabilidad es del 24.38 %. Con el tratamiento de 1  $\mu\text{M}$  y 3  $\mu\text{M}$  prácticamente aumenta la viabilidad porque la melatonina disponible es insuficiente, siendo las viabilidades 24.22% y 26.49% respectivamente.

A partir de 10  $\mu\text{M}$  la viabilidad empieza a aumentar hasta 28.93%, pero es a partir de 30  $\mu\text{M}$  donde nos encontramos una viabilidad de 31.89% cuando empieza a ser significativa, llegando hasta una concentración de 100  $\mu\text{M}$  donde la viabilidad es del 36%.

En la gráfica número 2 podremos observar la capacidad de protección de las diferentes concentraciones de melatonina respecto al control irradiado, con las mismas concentraciones que se encuentran en la gráfica 1 y con el mismo tiempo de irradiación.



*Gráfica 2. Capacidad de protección de las diferentes concentraciones de melatonina.*

En la segunda gráfica podemos confirmar como las concentraciones de 1  $\mu\text{M}$  y 3  $\mu\text{M}$  no alcanzan ni el 5% de protección. Y al igual que ocurre con la viabilidad la protección empieza a ser significativa a partir de 30  $\mu\text{M}$  llegando a un 10%. A la máxima concentración de 100  $\mu\text{M}$  la protección es de un 15%.

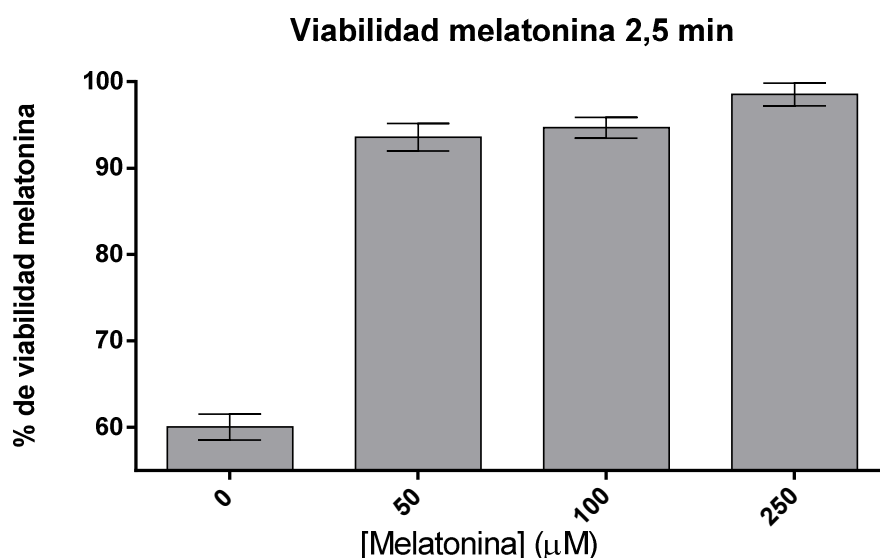
Se debe tener en cuenta que la dosis de radiación de 5 minutos es alta y que la mortalidad es del 75% por lo que a partir de un 10% de protección podemos decir que es significativa. Sin embargo, las protecciones significativas no se encuentran dentro de las concentraciones fisiológicas de melatonina.

Según García J. J. en la evaluación de la protección mediada por melatonina en las membranas celulares, la concentración a partir de la que se obtiene una gran protección frente a la peroxidación lipídica es a partir de 1mM de melatonina [34]. No hay que olvidar

que la primera zona en ser atacada por la radiación UVC es la membrana plasmática aumentando su permeabilidad.

### 2. Evaluación de la protección de la melatonina y pinolina a una dosis de irradiación de 2.5 minutos:

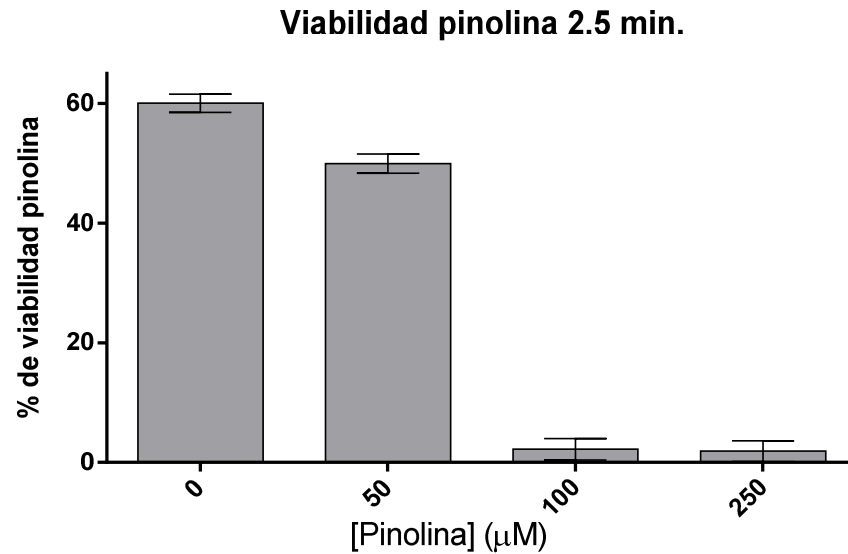
En la gráfica 3 se evalúa la viabilidad que otorga la melatonina a una dosis de irradiación de 2.5 minutos por la misma técnica que en el apartado 3, solo que en la misma placa se evalúa también la protección de la pinolina que es un derivado de melatonina. Tanto la melatonina como la pinolina se incubaron en los fibroblastos 30 minutos antes de la irradiación. Los controles utilizados también son dos como en el caso anterior.



Gráfica 3. Viabilidad de los fibroblastos tratados con melatonina ante la exposición a radiación UVC.

Los fibroblastos sin tratar con melatonina e irradiados corresponde al punto 0 en el eje X donde podemos ver que hay un 60% de viabilidad, cercano al IC50 de la radiación UVC. En la dosis de irradiación recibida durante 2.5 minutos, y las concentraciones de melatonina utilizadas, se puede ver una protección significativa. Se puede apreciar como apenas se encuentran diferencias entre la protección a las diferentes concentraciones. A una concentración de 50  $\mu\text{M}$  la viabilidad alcanzada es 93.55%, a 100  $\mu\text{M}$  la viabilidad es de 94.66% y a 250  $\mu\text{M}$  es de 98.51%. La concentración de 250  $\mu\text{M}$  otorga gran protección situándose cerca del 100% de viabilidad. Aunque todas las concentraciones utilizadas en este procedimiento experimental la viabilidad se encuentra por encima de un 90% debido a que se utiliza una menor dosis de irradiación que en el primer caso mencionado.

En la gráfica 4 se evalúa la capacidad de la pinolina para aumentar la protección frente a los daños causados por la radiación UVC a 2.5 minutos. La pinolina también fue añadida 30 minutos antes de irradiar.



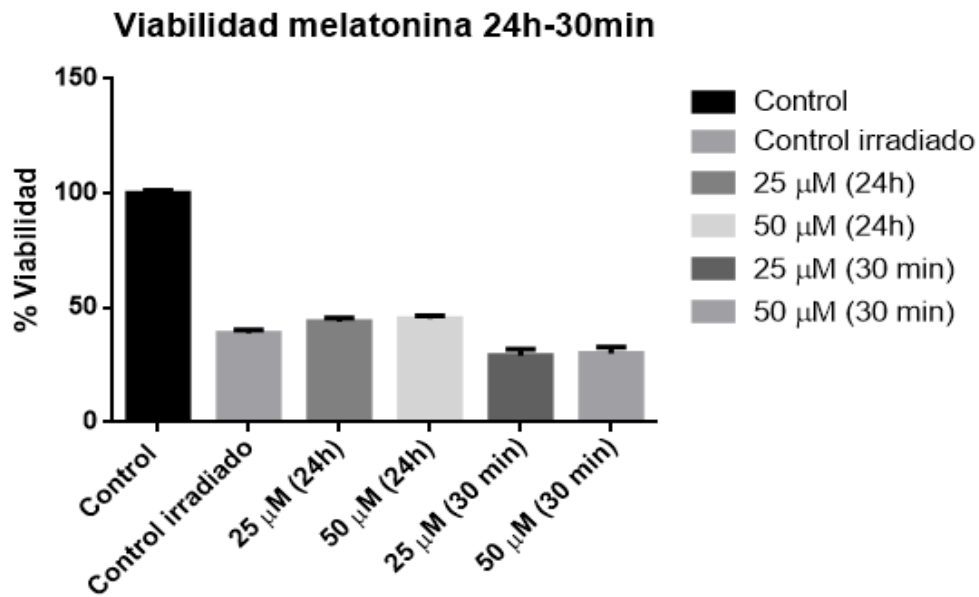
*Gráfica 4. Efecto protector de la pinolina sobre fibroblastos irradiados.*

A la vista de la gráfica podemos ver que la pinolina tiene un efecto tóxico a las concentraciones utilizadas, se encuentran por debajo del control que sería el punto 0 y determinaría la mortalidad. En las concentraciones más elevadas de pinolina usadas que corresponden a 100  $\mu\text{M}$  y 250  $\mu\text{M}$  la mortalidad es muy alta y la viabilidad desciende bruscamente. Al ser un derivado de la melatonina se esperaba que aumentará también la viabilidad pero no ha ocurrido así, siendo incluso tóxica a las dosis administradas.

Los experimentos llevados a cabo por Aranda M. sobre la protección mediada por la melatonina y pinolina frente a un agente generador de radicales libres como  $\text{CCl}_4$  demuestran que la melatonina presenta un mejor perfil de protección frente a la peroxidación lipídica de la membrana y no obtienen resultados de toxicidad sobre la pinolina [22]. El procedimiento experimental llevado a cabo por Aranda M. se realizó sobre hepatocitos, lo que puede explicar que no se encontrará toxicidad al ser un tipo celular más capaz que los fibroblastos.

### **3. Protección de la melatonina tras 24 horas de incubación y de quercetina a una dosis de irradiación de 5 minutos:**

En la gráfica 5 se compara la protección otorgada por melatonina después de 24 horas de incubación frente a la que se obtiene después de 30 minutos de incubación:

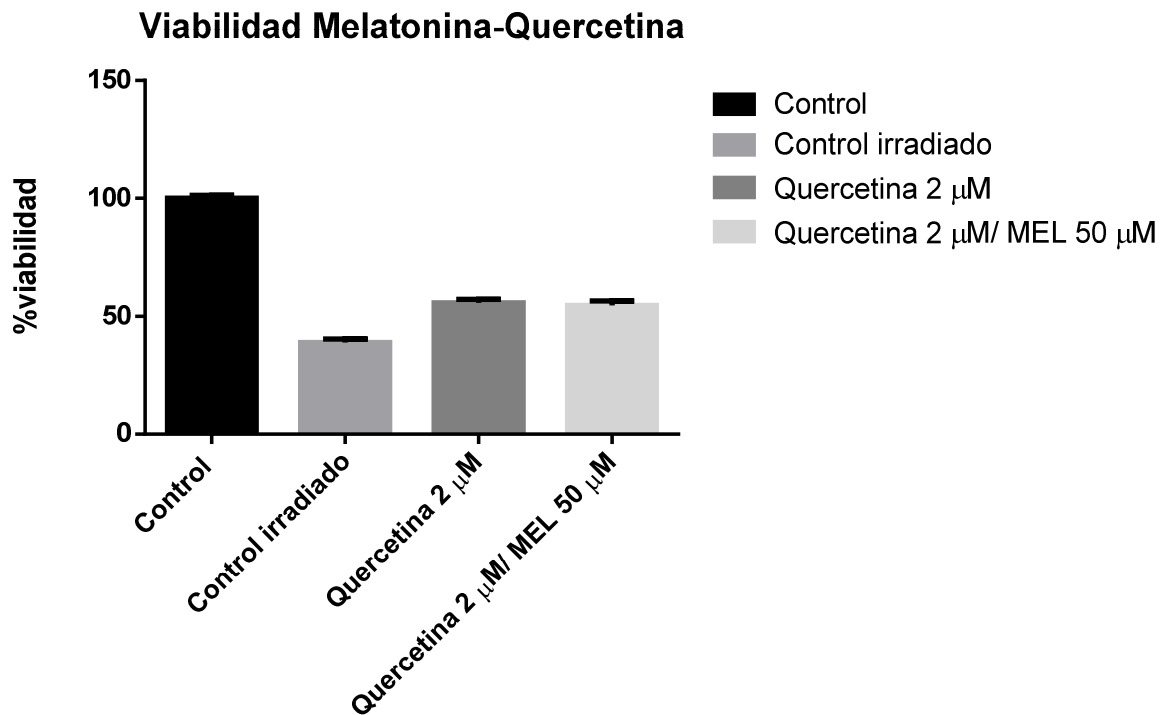


Gráfica 5. Viabilidad de la melatonina después de 24 horas de incubación frente los 30 minutos de incubación.

Los resultados obtenidos muestran como la acción de la melatonina es más potente después de las 24 horas de incubación donde favorece la transcripción de diversas enzimas, antioxidantes entre ellas. Llegando incluso a otorgar una protección similar entre las concentraciones de 25 µM y 50 µM después de las 24 horas de incubación siendo de 43.93% y 45.20% respectivamente. Sin embargo, la protección que otorgan ambas concentraciones después de 30 minutos de incubación es similar pero menor que después de las 24 horas de incubación.

La acción de la melatonina incubándola con fibroblastos durante 24 horas de incubación a través de sus enzimas antioxidantes es más potente que la incubación durante 30 minutos. Según Fischer (2013) [12] en el tejido epitelial, con el mismo periodo incubación de melatonina, observó el aumento de la transcripción de enzimas antioxidantes como SOD. La acción de la melatonina es más potente aumentando la transcripción, que incubando 30 minutos, correlacionando con los datos obtenidos en el experimento.

En la gráfica 6 se muestra se evalúa el efecto de la melatonina y quercetina de forma conjunta. Para ello se añade en una muestra 2 µM de quercetina y en la última se añade una mezcla de melatonina y quercetina a las concentraciones mencionadas, la melatonina se incuba 24 horas antes de la irradiación.



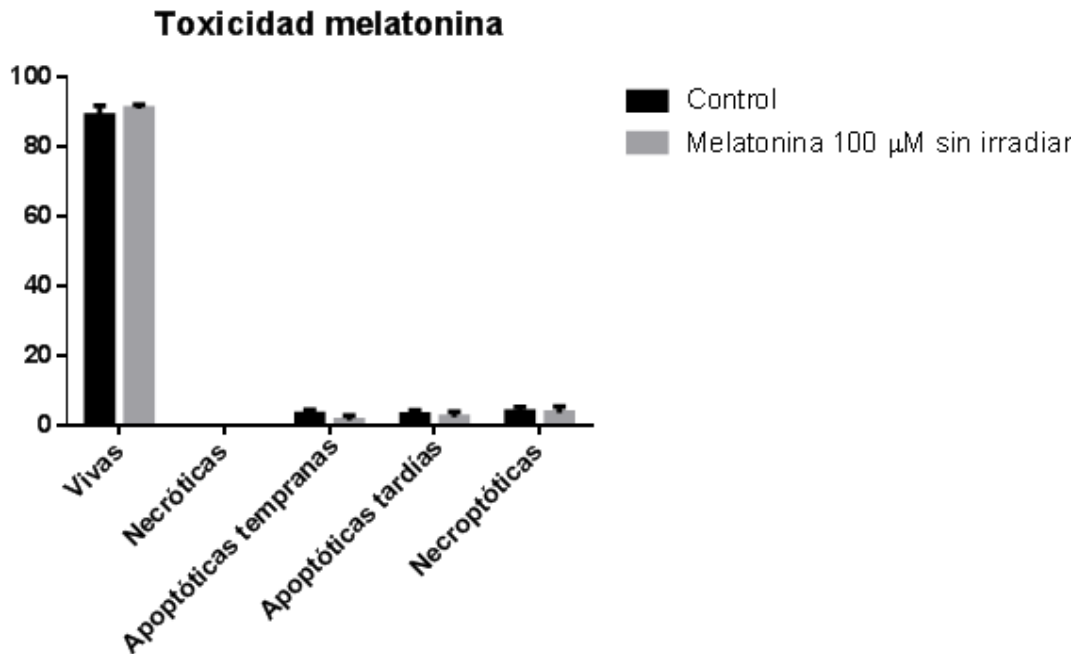
Gráfica 6. Evaluación del efecto sinérgico de la melatonina y quercetina.

La quercetina muestra un mayor potencial como antioxidante que la melatonina a la vista de los datos de la gráfica 5. No se aprecia un efecto sinérgico en la quercetina y melatonina porque la viabilidad es muy similar a la que otorga la quercetina a 2  $\mu$ M, siendo 54.5% y 55.68% respectivamente. Como no hay efecto sinérgico en la mezcla melatonina/quercetina podemos suponer actúan a diferentes niveles y que esas acciones no se suman.

Los experimentos llevados a cabo por Al-Rasheed evaluando la actividad sinérgica de la melatonina y quercetina sobre es estrés hipóxico inflamatorio pulmonar muestran que las actividades de melatonina y quercetina no se suman si no que actúan de diferente forma y que la quercetina tiene un mayor poder de protección que la melatonina [35].

#### 4. Estudio de la viabilidad por citometría de imagen y de las diferentes poblaciones de muerte celular:

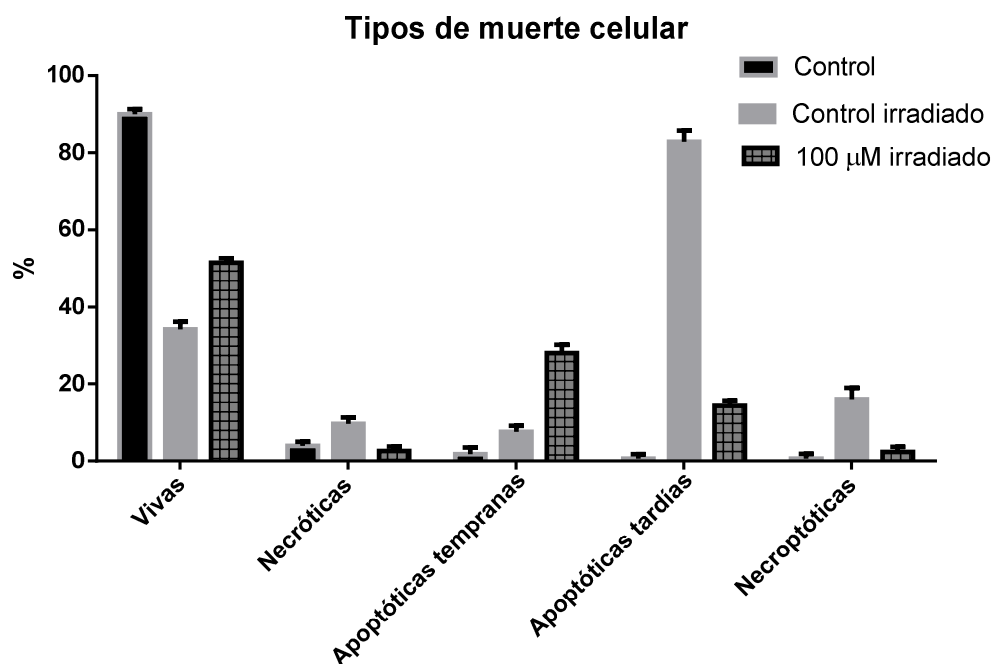
En la gráfica número 7 se muestran valores de viabilidad de poblaciones celulares de melatonina sin irradiar para evaluar si existiera algún efecto tóxico de la melatonina a una concentración de 100  $\mu$ M:



Gráfica 7. Evaluación de la toxicidad y tipos de muerte celular de la melatonina por citometría de imagen.

Los resultados muestran que la melatonina no es tóxica a la concentración de 100 µM, los resultados entre el control y las células tratadas con melatonina muestran valores similares en todos los aspectos evaluados, incluso en las diferentes poblaciones de muerte celular. Los resultados obtenidos son los esperados porque en los demás procedimientos experimentales la melatonina no mostraba ningún índice de toxicidad.

En la gráfica número 8 se evalúan los tipos de muerte celular producidas por la radiación UVC durante 5 minutos y en las muestras tratadas con melatonina después de 30 minutos de incubación, para ver si hay diferencias entre las mismas:



Gráfica 8. Evaluación de las diferentes poblaciones de muerte celular.

En los datos obtenidos en la gráfica los controles son dos correspondientes a un control que no fue irradiado y al segundo control que fue irradiado pero sin añadir melatonina. La citometría confirma los datos obtenidos por el test de Alamar Blue de la gráfica 1, aunque la diferencia es que la viabilidad de la melatonina a 100 µM en este caso es de un 51.47% mientras que en el caso de la gráfica 1 es de un 36%. Esta diferencia se puede deber fundamentalmente a que en este caso el control tiene una viabilidad del 89.96% mientras que en el caso mencionado el control es de un 100% porque el test de Alamar Blue muestra vitalidad. La mayor parte de la muerte celular provocada por la radiación UVC se produce por apoptosis tardía que es irreversible. Este dato se correlaciona con los experimentos llevados a cabo por Begovic' (2016) donde demuestra que la muerte celular inducida en fibroblastos por la radiación UVC es por apoptosis [26]. De la misma manera, las poblaciones tratadas con melatonina a 100 µM muestran un aumento de la viabilidad mencionado. Sin embargo, la mayoría de muerte celular que se produce en las poblaciones tratadas con melatonina e irradiadas es por apoptosis temprana que es reversible, a diferencia de lo que ocurre con la población de fibroblastos tratados solo con radiación UVC. El resultado del experimento muestra que la melatonina revierte de alguna forma la muerte celular inducida por UVC. Se puede suponer que revierte la apoptosis temprana impidiendo que termine en el proceso irreversible de apoptosis tardía que podría explicar porque en la población irradiada tratada con melatonina acumula apoptosis temprana y aumenta la viabilidad. Luccheti y sus colaboradores demostraron con sus experimentos que la melatonina previene la apoptosis en células U937 tratadas con radiación UVB al disminuir la acción de las especies reactivas de oxígeno que generaba dicha radiación en la línea celular [36]. Aunque este procedimiento experimental fue llevado a cabo con dosis de irradiación de UVB en lugar de UVC, puede servir de un indicio para constatar la hipótesis mencionada anteriormente relacionada con la capacidad de la melatonina de impedir el progreso de la apoptosis temprana a apoptosis tardía.



## **CONCLUSIONES**

1. La melatonina protege frente a la radiación UVC con valores significativos a concentraciones de 30  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ .
2. La pinolina no ofrece una buena protección frente a la radiación UVC como esperábamos al ser un propio derivado de la melatonina.
3. La quercetina tiene una actividad protectora más potente que la melatonina, incluso cuando la melatonina se ha incubado durante horas para favorecer el efecto de las enzimas antioxidantes.
4. Además, el efecto que ofrecen los dos no es sinérgico por lo que suponemos que el mecanismo de acción que utilizan quercetina y melatonina para combatir los radicales libres es diferente.
5. La protección de melatonina mejora significativamente la mortalidad apoptótica tardía pero aumenta la apoptosis temprana bloqueando de alguna forma el progreso de la apoptosis temprana a tardía.

## **CONCLUSIONS**

1. Melatonin provides protection against UVC radiation for 5 minutes but not at concentrations 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$  and 10  $\mu\text{M}$ . Significant values are started at concentrations 30  $\mu\text{M}$  and 100  $\mu\text{M}$ .
2. Pinoline doesn't protect against UVC radiation at the concentrations were used.
3. Quercetin has a mor potent protective activity than melatonin, even when melatonin has been incubate for 24 hours to favor the effect of antioxidant enzymes.
4. In addition, the effect by melatonin and quercetin isn't synergistic so we asume that the mechanism of action using quercetin and melatonin to protect fibroblasts is different.
5. The protection of melatonin significantly improves late apoptotic mortality but increases late apoptosis by blocking the porgression of early to late apoptosis in some way.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Poeggeler, B., et al., *Melatonin's unique radical scavenging properties - roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs*. J Pineal Res, 2002. **33**(1): p. 20-30.
2. Tan, D.X., et al., *Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and Metabolism*. Molecules, 2015. **20**(10): p. 18886-906.
3. Slominski, A., et al., *Serotonergic system in hamster skin*. J Invest Dermatol, 2002. **119**(4): p. 934-42.
4. Goswami, S. and C. Haldar, *Melatonin as a possible antidote to UV radiation induced cutaneous damages and immune-suppression: An overview*. J Photochem Photobiol B, 2015. **153**: p. 281-8.
5. Tan, D.X., et al., *One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species?* J Pineal Res, 2007. **42**(1): p. 28-42.
6. Kim, T.K., et al., *Metabolism of melatonin and biological activity of intermediates of melatonergic pathway in human skin cells*. FASEB J, 2013. **27**(7): p. 2742-55.
7. Johnston, J.D. and D.J. Skene, *60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: Regulation of mammalian neuroendocrine physiology and rhythms by melatonin*. J Endocrinol, 2015. **226**(2): p. T187-98.
8. Kratz, E.M., et al., *Decreased melatonin levels and increased levels of advanced oxidation protein products in the seminal plasma are related to male infertility*. Reprod Fertil Dev, 2016. **28**(4): p. 507-15.
9. Ding, K., et al., *Melatonin stimulates antioxidant enzymes and reduces oxidative stress in experimental traumatic brain injury: the Nrf2-ARE signaling pathway as a potential mechanism*. Free Radic Biol Med, 2014. **73**: p. 1-11.
10. Reiter, R.J., et al., *Melatonin: detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants*. Adv Exp Med Biol, 2003. **527**: p. 539-48.
11. Bonnefont-Rousselot, D. and F. Collin, *Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging*. Toxicology, 2010. **278**(1): p. 55-67.
12. Fischer, T.W., et al., *Melatonin enhances antioxidative enzyme gene expression (CAT, GPx, SOD), prevents their UVR-induced depletion, and protects against the formation of DNA damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in ex vivo human skin*. J Pineal Res, 2013. **54**(3): p. 303-12.
13. Korkmaz, A., et al., *Melatonin: an established antioxidant worthy of use in clinical trials*. Mol Med, 2009. **15**(1-2): p. 43-50.
14. Goc, Z., et al., *Protective effects of melatonin on the activity of SOD, CAT, GSH-Px and GSH content in organs of mice after administration of SNP*. Chin J Physiol, 2017. **60**(1).
15. Lopez, A., et al., *Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production*. J Pineal Res, 2009. **46**(2): p. 188-98.
16. Espino, J., et al., *Melatonin reduces apoptosis induced by calcium signaling in human leukocytes: Evidence for the involvement of mitochondria and Bax activation*. J Membr Biol, 2010. **233**(1-3): p. 105-18.
17. Baburina, Y., et al., *2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase as a messenger of protection of the mitochondrial function during melatonin treatment in aging*. Biochim Biophys Acta, 2017. **1859**(1): p. 94-103.
18. Slominski, A.T., et al., *Metabolism of melatonin in the skin: why is it important?* Exp Dermatol, 2016.

19. Fischer, T.W., et al., *Constitutive and UV-induced metabolism of melatonin in keratinocytes and cell-free systems*. FASEB J, 2006. **20**(9): p. 1564-6.
20. Tuli, H.S., et al., *Molecular aspects of melatonin (MLT)-mediated therapeutic effects*. Life Sci, 2015. **135**: p. 147-57.
21. Dong, W.G., et al., *Effects of melatonin on the expression of iNOS and COX-2 in rat models of colitis*. World J Gastroenterol, 2003. **9**(6): p. 1307-11.
22. Aranda, M., et al., *In vivo hepatic oxidative stress because of carbon tetrachloride toxicity: protection by melatonin and pinoline*. J Pineal Res, 2010. **49**(1): p. 78-85.
23. Zhu, Y., et al., *Reduction of patulin in apple juice products by UV light of different wavelengths in the UVC range*. J Food Prot, 2014. **77**(6): p. 963-71.
24. Gonzalez, S. and M.A. Pathak, *Inhibition of ultraviolet-induced formation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, erythema and skin photosensitization by polypodium leucotomos*. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 1996. **12**(2): p. 45-56.
25. Rastogi, R.P., et al., *Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair*. J Nucleic Acids, 2010. **2010**: p. 592980.
26. Begovic, L., et al., *Effect of UVC radiation on mouse fibroblasts deficient for FAS-associated protein with death domain*. Int J Radiat Biol, 2016. **92**(8): p. 475-82.
27. Ahmad, K.A., et al., *Antioxidant therapy for management of oxidative stress induced hypertension*. Free Radic Res, 2017. **51**(4): p. 428-438.
28. Ward, C.W., B.L. Prosser, and W.J. Lederer, *Mechanical stretch-induced activation of ROS/RNS signaling in striated muscle*. Antioxid Redox Signal, 2014. **20**(6): p. 929-36.
29. Loo, A.E., et al., *Effects of hydrogen peroxide on wound healing in mice in relation to oxidative damage*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e49215.
30. Chaki, M., et al., *Involvement of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) in sunflower-mildew interaction*. Plant Cell Physiol, 2009. **50**(2): p. 265-79.
31. Vanlangenakker, N., et al., *Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death*. Curr Mol Med, 2008. **8**(3): p. 207-20.
32. Vandenabeele, P., et al., *Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(10): p. 700-14.
33. Rampersad, S.N., *Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays*. Sensors (Basel), 2012. **12**(9): p. 12347-60.
34. Millan-Plano, S., et al., *Melatonin and structurally-related compounds protect synaptosomal membranes from free radical damage*. Int J Mol Sci, 2010. **11**(1): p. 312-28.
35. Al-Rasheed, N.M., et al., *Original research paper. Pulmonary prophylactic impact of melatonin and/or quercetin: A novel therapy for inflammatory hypoxic stress in rats*. Acta Pharm, 2017. **67**(1): p. 125-135.
36. Luchetti, F., et al., *Melatonin prevents apoptosis induced by UV-B treatment in U937 cell line*. J Pineal Res, 2006. **40**(2): p. 158-67.