

Revista de la  
Facultad de Ciencias Exactas,  
Químicas y Naturales

Volumen 13 - Octubre 2015  
ISSN 0328-6312

**UM**  
UNIVERSIDAD DE MORÓN

SUMANASA, S. y LIN, S. 2004. Zebrafish as a model system for drug target screening and validation. *Drug Discov. Today Targets* 3: 89-96.

TOPALIÁN, M.L., ROVEDATTI, M.G., CASTAÑÉ, P.M. y SALUBIÁN, A. 1999. Pollution in a lowland river system. A case study: the Reconquista River (Buenos Aires, Argentina). *Water, Air Soil Pollut.* 114: 287-302.

## LA MELATONINA COMO AGENTE ANTIOXIDANTE: ANALISIS DE ESTRÉS OXIDATIVO EN UN MODELO ANIMAL CON EXPOSICIÓN A HIERRO

Claudio O. Cervino<sup>1,2</sup>, Marcelo Hernando<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Fisiología, Facultad de Ciencias de la Salud; <sup>2</sup>Cátedra de Fisiología Animal Comparada, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad de Morón

ccervino@uimoron.edu.ar

### RESUMEN

A pesar de que el Fe es esencial para la vida, el exceso es tóxico debido a su habilidad para catalizar reacciones productoras de radicales libres (ROS). Estos procesos son responsables del daño oxidativo a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El estrés oxidativo se produce cuando la formación de ROS excede la capacidad de defensa antioxidante o se altera la señalización redox, afectando la funcionalidad celular y es un importante factor para el envejecimiento. Los antioxidantes enzimáticos catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) tienen un rol crucial protegiendo al organismo contra el estrés oxidativo edad-dependiente. Hace menos de 10 años se ha descubierto que la melatonina (ML), derivada del triptófano, puede actuar como un secuestrador de radicales libres. Posee una vida media de 30 min en plasma, es metabolizada principalmente en el hígado y su secreción está relacionada con el fotoperíodo. Además de poder neutralizar directamente a un número de radicales libres y especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, la ML estimula a varias enzimas antioxidantes lo que incrementa

### SUMMARY

*The melatonin as an antioxidant agent: oxidative stress analyses on an animal model with exposition to iron. Although the Fe is essential for life, the excess is toxic due to its ability to catalyze the production of reactive free radicals (ROS-reactive oxygen species). These processes are responsible for the oxidative damage to lipids, proteins and nucleic acids. Oxidative stress will occur when ROS formation exceeds antioxidant defences capability or disrupts redox signalling, affecting cell functionality, being in addition an important factor for aging. The antioxidative enzymes catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) play a crucial role protecting the organism against the age-dependent oxidative stress. Melatonin (ML), derivative of tryptophan, was discovered to be a direct free radical scavenger less than 10 years ago. It has a half-life of 30 minutes in plasma, is mainly metabolized in liver and its secretion is related to photoperiod. Besides its ability*

su eficiencia como molécula antioxidante. El hecho de que se produce un aumento en la incidencia de desórdenes neurodegenerativos en individuos ancianos ha promovido la investigación de factores comunes que declinan progresivamente con el incremento de la edad y que podrían relacionarse con un incremento del estrés oxidativo resultando en senescencia y enfermedades asociadas con la edad. Considerando que ML, la hormona secretada por la glándula pineal, tiene una propiedad antioxidante y que la tasa de producción disminuye con la edad, se ha sugerido que esta hormona tiene un rol crucial en la génesis de enfermedades neurodegenerativas. En este contexto, nuestro grupo de investigación está encarándo un estudio sobre la influencia de la melatonina en cambios en la actividad de CAT en cerebro e hígado de ratas luego de una exposición aguda a Fe. Adicionalmente, se tratará de evaluar la respuesta enzimática en exposiciones a diferentes fotoperíodos y se considerará también la edad de los individuos expuestos. Durante nuestra investigación se espera demostrar que el tratamiento con ML aumenta la actividad de los antioxidantes enzimáticos catalasa en cerebro e hígado en función del fotoperíodo aplicado durante el período de exposición aguda al Fe. Estos resultados apoyarían la hipótesis de que la melatonina aplicada en cantidades farmacológicas reduce efectivamente el estrés oxidativo. Adicionalmente esperamos demostrar que ML podría ser considerada como un agente terapéutico potencial en ratas adultas expuestas a Fe donde está implicada la generación de radicales libre.

**Palabras clave:** Estrés oxidativo, melatonina, antioxidantes, hierro, envejecimiento.

**Abreviaturas empleadas en el texto**  
 CAT, enzima catalasa; EO, estrés oxidativo; Fe, hierro; GPx, enzima glutatión peroxidasa; GRd, enzima glutatión reductasa; GSH, glutatión reducido; GST, enzima glutatión transferasa; ML, melatonina; NSQ, núcleo supraquiasmático; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, anión superóxido; RNS, especies reactivas al nitrógeno; ROS, especies reactivas del oxígeno; SOD, enzima superóxido dismutasa.

## INTRODUCCIÓN

Dada la toxicidad de las especies reactivas del oxígeno (ROS), las células requieren sistemas de eliminación de gran eficiencia para mantener bajas concentraciones en estado estacionario y así limitar el posible daño celular. La producción intracelular de ROS no necesariamente implica toxicidad celular, sin embargo se producirá una situación de estrés oxidativo cuando la formación de ROS exceda la capacidad de defensas antioxidantes o se dañe la señalización redox afectando la funcionalidad de la célula (Jones, 2006).

Un antioxidante es cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones, comparada a la de los sustratos oxidables, disminuye o previene de una manera significativa la oxidación de dicho sustrato. Los antioxidantes previenen la formación de ROS y especies reactivas del nitrógeno (RNS) eliminando enzimáticamente sus precursores o convirtiendo los radicales en moléculas menos reactivas.

Los antioxidantes se clasifican en enzimáticos y no-enzimáticos. Dentro de los primeros cabe

mencionar la actividad de: (I) enzima superóxido dismutasa (SOD); (II) enzima catalasa (CAT), que es un catalizador ampliamente distribuido en las células de los mamíferos, (III) enzima glutatión peroxidasa (GPx), y (IV) enzima glutatión reductasa (GRd) (Reiter, 1996). Los antioxidantes no-enzimáticos pueden a su vez clasificarse en *liposolubles* -(a) vitamina E, término que se aplica a una familia de compuestos estructuralmente relacionados: los tocoferoles; (b) pigmentos carotenoides, incluyendo el β-caroteno y (c) ubiquinol- e *hidrosolubles* -glutatión, triptérido de síntesis endógena en animales, y el ácido ascórbico o vitamina C (Halliwell y Gutteridge, 1989).

La melatonina (ML), entre otras funciones, cumple con el rol metabólico de ser un importante antioxidante que depura tanto ROS como RNS. Las propiedades antioxidantes de esta molécula dependen de su capacidad de depurar HO<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO<sup>-</sup>, ONOO<sup>-</sup>, y posiblemente O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Por otro lado, la ML regula la expresión y actividad de la mayoría de los enzimas antioxidantes (GPx, GRd, SOD, etc.) (Reiter y col., 2003).

El estrés oxidativo (EO) mediado por hierro (Fe) ha sido clásicamente vinculado a muerte celular por apoptosis y más recientemente a ferropoptosis, que representa una forma de muerte celular no-apoptótica dependiente de Fe. Diferentes protocolos de tratamiento con Fe en ratas, suplementado en la dieta o en forma parenteral, han sido determinantes de distintos perfiles en el contenido de Fe en los distintos tejidos (Piloni y Puntarulo, 2010; Piloni y col., 2013). Así, el tratamiento con Fe-dextrán constituye un modelo adecuado para evaluar la toxicidad del Fe.

En este trabajo de revisión se repasarán conceptos básicos sobre el estrés oxidativo y la ML como factor antioxidante y su relación con el envejecimiento. Asimismo, se presentará un modelo basado en el tratamiento con Fe para inducir EO.

### LA HORMONA MELATONINA

La ML es una hormona indólica derivada del triptófano (figura 1), un aminoácido esencial, y está implicada en muchos procesos fisiológicos: neuroendocrinos, reproducción, regulación de los ritmos circadianos, hormona moduladora de la actividad del sistema inmunitario, potente antioxidante y antiinflamatorio, y finalmente como una hormona fundamental en la regulación de la función mitocondrial para la producción de ATP (Beyer *et al.*, 1998).

La principal fuente de ML es la glándula pineal (Cagnaci, 1996). El fotoperíodo se asocia a la función pineal, dando lugar al ritmo circadiano de la hormona (Johnston y Skene, 2015), alcanzando un máximo de secreción hacia las 3 de la madrugada (figura 2). El ritmo de secreción de la ML está vinculado a la iluminación ambiental gracias al haz retinohipotalámico y la inervación simpática, vía ganglio cervical superior. Una vez producida, la ML pasa a la circulación cerebral y sistémica, así como al líquido cefalorraquídeo. La ML tiene una vida media de unos 30 min en plasma, se metaboliza principalmente en el hígado, y se elimina por la orina en forma de 6-sulfatoximelatonina (95%). En plasma, la ML va unida mayoritariamente a albumina (70%),

mientras que el 30% va libre y pasa a la saliva, reflejando aquí sus niveles sanguíneos. La ML liberada hacia la circulación general actúa primariamente en el SNC, particularmente a nivel del núcleo supraquiasmático (NSQ). Es decir, la melatonina no sólo controla la actividad oscilatoria del NSQ, sino que es controlada en su biosíntesis por el oscilador.

En la actualidad se han descrito fuentes extrapineales de ML: se sintetiza en la mayoría de los órganos y tejidos de nuestro organismo, a concentraciones mucho mayores que en la pineal, alcanzando 2-3 órdenes de magnitud superiores (Stefuli y col., 2001). La retina, las células del sistema inmune, el intestino, la médula ósea, ovarios, testículos, cerebro, hígado, corazón, entre otros, sintetizan su propia ML. Al contrario que la de origen pineal, esta ML extrapineal no se distribuye por la circulación, y la utiliza con fines de protección local el propio tejido u órgano que la sintetiza (Acuña-Castroviejo y col. 2014).

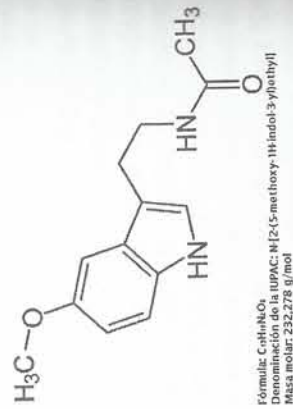


Figura 1. Molécula de melatonina. La melatonina sincroniza los ritmos circadianos, es un poderoso antioxidante, es un excelente citoprotector natural, estimula y potencia

el sistema inmune, puede resultar útil en el tratamiento contra el cáncer.

Los mecanismos de acción de la ML se pueden clasificar en dos principales: 1) efectos mediados por receptores (de membrana como nucleares, y muchas de estas acciones implican al AMPc o a la PLC como segundos mensajeros celulares), y 2) efectos independientes de receptores (propiedades antioxidantes y antiinflamatorias).

### EDAD Y PRODUCCIÓN DE MELATONINA

La producción de ML, como de muchas otras hormonas, disminuye con la edad (Waldhauser y col., 1998). La secreción de ML varía a lo largo de la vida según el siguiente modelo: a) durante los primeros seis meses de vida, los niveles nocturnos de ML son bajos; b) entre

los 1 a 3 años que es el período en el que se alcanzan los picos nocturnos más elevados y con ritmicidad circadiana; c) entre los 15 y 20 años ocurre una caída en los niveles de un 80% debida probablemente al incremento de la talla del cuerpo, a pesar de la producción constante de ML después de la infancia; d) la ML empieza a descender entre los 35-40 años, como parte importante de ese proceso de envejecimiento y e) hacia los 55-65 años, la amplitud del pico nocturno de ML se ha reducido un 40%, lo que hace que sea ya suficientemente pequeña como para no ser bien detectada por las células, lo que condiciona la pérdida de su capacidad para regular los ritmos circadianos, lo que da lugar a un proceso de desincronización interna. Se considera actualmente que el proceso de envejecimiento empieza hacia los 40 años, que es el momento de iniciar las medidas preventivas para envejecer con buena salud.

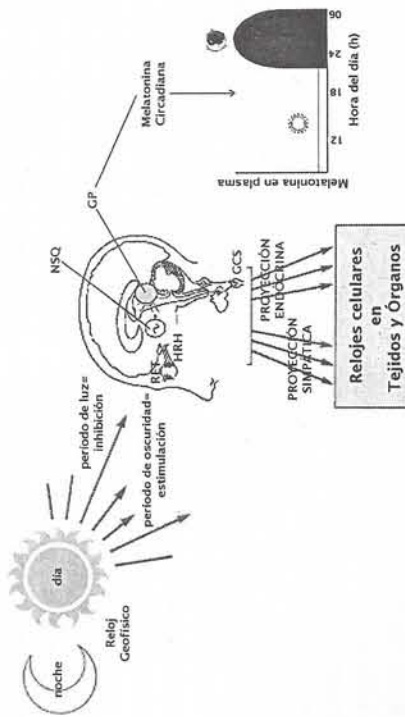


Figura 2. Regulación de los ritmos circadianos. La iluminación ambiental rige el ritmo de secreción de la melatonina a través de una vía multisináptica que tiene su origen en la retina (RET), sigue por el haz retinohipotalámico (HRH) y la vincula con el núcleo supraquiasmático (NSQ) en el

hipotálamo, verdadero reloj biológico endógeno. La actividad oscilatoria circadiana del NSQ, en virtud de la información así recibida, tiene una sincronización de 24 horas. La melatonina controla la actividad oscilatoria del NSQ y este controla, a su vez, la secreción de melatonina en la glándula pineal (GP), transductor de información luz/oscuridad. El NSQ, por sus proyecciones hacia las zonas de centros simpáticos y endocrinos, armoniza la anarquía de los osciladores primarios celulares y la ajusta a las variaciones del reloj geofísico. GCS, ganglio cervical superior.

#### LA MELATONINA COMO ANTIOXIDANTE

Hay evidencia científica que avala la eficacia de la ML como antioxidante y depurador de radicales libres (Antunes y col., 1999; Reiter y col., 2003). Debido a su estructura química indólica, y a un potencial redox elevado, la ML cede electrones fácilmente, lo que hace que actúe como un potente agente reductor.

La importancia de la ML como antioxidante se debe principalmente a que es lipofílica e hidrofílica, atravesando todos los compartimentos biológicos con facilidad, y así, disponible para todas las células y tejidos. Además, se distribuye por todos los compartimentos intracelulares, siendo especialmente alta en el núcleo y mitocondria. Muchos órganos pueden producir ML, lo que los hace independientes de sus niveles circulantes; esto les confiere una ventaja importante al no depender de los niveles circulantes de la hormona. La ML también protege contra el

electrón, debido a su alto potencial redox, así como por su capacidad de donar un átomo de hidrógeno al grupo NH del anillo pirrólico, lo que genera un radical de ML que reacciona con el  $O_2^-$  para producir metabolitos (AFMK y AMK) que a su vez son antioxidantes potentes y constituyen, junto a la ML, la denominada cascada oxidante de la ML.

Se calcula que una molécula de ML, a través de esta cascada, puede depurar hasta cuatro ROS. Es por esta razón que esta hormona es altamente eficaz como antioxidante. Esta actividad, sumada a su efecto como regulador endógeno de la expresión de las enzimas antioxidantes, GPx, GRd, y SOD, entre otros, hace que se considere a la ML como el antioxidante endógeno más potente del organismo.

Asimismo, la ML depura RNS tales como el anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). Estos aniones presentan una alta toxicidad, similar a la del radical  $\bullet OH$ , por lo que su eliminación por la ML proporciona una defensa antioxidante más eficaz que el GSH o las vitaminas antioxidantes.

Numerosos estudios ya han demostrado que la ML extrapineal es independiente de la pineal, no está sometida a un ritmo circadiano, y la produce cada órgano o tejido cuando lo necesita (Vanegas y col., 2012; Acuña-Castroviejo y col., 2014). Su acciones son las de antioxidante y antiinflamatorio, y la ML funciona como un citoprotector para mantener la "salud" celular (la ML remodela la conexión núcleo-mitocondria, regulando así la función celular).

#### ESTRÉS OXIDATIVO Y EL HIERRO

El Fe es un micronutriente esencial para todos los organismos, dado que funciona como cofactor de enzimas que catalizan reacciones redox (Robello *et al.*, 2009). Está presente en la dieta tanto en forma de compuestos hemo, como de Fe no hemínico.

Por otro lado, altos niveles de Fe en cerebro pueden generar EO que ha sido asociado a un desorden neurodegenerativo y muerte neuronal, probablemente por insuficiente sistema de protección antioxidante. Los animales necesitan consumir oxígeno con una consecuente reducción a agua para poder oxidar los alimentos y generar energía. Dicha reducción parcial resulta en la formación de ROS, incluyendo el anión superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). El  $H_2O_2$  por definición no es considerado un radical libre (Harris, 1992), sin embargo, es una especie altamente reactiva debido a la presencia de un enlace 0-0 muy lábil. La principal fuente de generación de  $H_2O_2$  es la dismutación del  $O_2^-$  catalizada por la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD). El  $\bullet OH$  es generado a través de diversos mecanismos: (a) a partir de la descomposición de  $H_2O_2$  a través de la reacción de Fenton y (b) a partir de la reacción de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  mediante la reacción de Haber-Weiss, catalizada por hierro.

La oxidación de  $Fe^{2+}$  conduce, a través de la pérdida de un electrón que es recibido por el  $O_2^-$  a la formación de  $O_2^-$ . La generación de  $O_2^-$  da origen a  $H_2O_2$ , que puede reaccionar con  $Fe^{2+}$  y producir  $\bullet OH$ . Así, el Fe resulta un catalizador adecuado de la producción de intermediarios de

la reducción parcial del O<sub>2</sub> de alta reactividad (Halliwell y Gutteridge, 1990).

La intervención del Fe en la generación de ROS se relaciona con la capacidad de favorecer la reacción de Fenton (Mimotti y Aust, 1987), que puede conducir a EO neuronal y neurodegeneración. Se han observado alteraciones en el metabolismo oxidativo y en las defensas antioxidantes celulares en hígado y sangre de animales sobrecargados con Fe (Galleano y Puntarulo, 1992). La administración parenteral de Fe incrementa marcadamente el Fe sérico, superando la capacidad fisiológica para unir Fe circulante, conduciendo a una situación de EO en plasma, con incrementos en el contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y disminución del contenido de  $\alpha$ -tocoferol plasmático. En cuanto a los antioxidantes enzimáticos se observa un aumento en las actividades de SOD y CAT y en el contenido de ubiquinol (Gutteridge, 1987). Se ha demostrado que una sobrecarga aguda de Fe es responsable de EO con un decrecimiento en el contenido de antioxidantes (Lucesoli y col., 1999).

#### ESTRÉS OXIDATIVO PROVOCADO POR FE EN CEREBRO DE RATA

Desde hace tres años, en nuestro laboratorio junto con el IBIMOL-CONICET (Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA) estamos realizando ensayos con hierro (Fe) como productor de EO en un modelo animal (rata) (Hernando y col., 2012; Reiteri y col., 2014).

El tratamiento con Fe-dextrán constituye un

modelo adecuado para evaluar la toxicidad del Fe. Galleano y Puntarulo (1992) han desarrollado un modelo *in vivo* en rata que consiste en la administración de una única dosis de Fe-dextrán. El efecto del contenido creciente de Fe en el cerebro de rata bajo este protocolo, aún no se conoce. El objetivo del estudio fue caracterizar el efecto de la sobrecarga aguda de Fe-dextrán sobre la distribución de Fe en áreas cerebrales: corteza, hipocampo y cuerpo estriado y su capacidad antioxidante.

El modelo de sobrecarga aguda de Fe en ratas Sprague-Dawley se realizó mediante la administración intraperitoneal (*i.p.*) de una única dosis de Fe-dextrán de 500 mg/kg de peso de rata (grupo sobrecargado con Fe) o solución fisiológica (grupo control). Las ratas fueron sacrificadas a las 6 y 8 h post-inyección y se les extrajo el cerebro para su posterior análisis. Se separaron las siguientes áreas cerebrales: corteza, hipocampo y cuerpo estriado según Czerniczyniec y col. (2011). Para la medición de contenido de Fe total y actividad antioxidante, se siguieron los métodos y técnicas que se han puesto a punto para estos trabajos (Piloni y Puntarulo, 2010; Piloni y col., 2013), a saber: *Contenido de Fe total*: determinado espectrofotométricamente; *Cantidad total de proteínas*: mediante la técnica de Lowry (1951); *Contenido de GSH*: medición de la absorbancia por espectrofotometría a 412 nm; *Actividad de CAT*: la actividad de la enzima antioxidante CAT se determinó por el método espectrofotométrico; *Antioxidantes liposolubles*: el contenido de  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -T) en los homogeneizados se cuantificó mediante HPLC en fase reversa con detección electroquímica.

Con estas investigaciones hemos demostrado

que la suplementación aguda con Fe-dextrán lleva a un aumento significativo del hierro en las 3 áreas cerebrales analizadas (corteza, cuerpo estriado e hipocampo). Los principales resultados hallados fueron (Reiteri y col., 2013, 2014):

1. La suplementación aguda con Fe-dextrán lleva a un aumento significativo del Fe en las 3 áreas cerebrales analizadas a las 6 y 8 h posteriores a la suplementación *i.p.*.
2. La respuesta antioxidante en corteza incluyó el consumo de GSH y un aumento significativo en la actividad de catalasa, sugiriendo una necesidad de controlar adecuadamente los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
3. En hipocampo, la concentración de  $\alpha$ -T fue significativamente mayor luego de las 6 h de la administración de Fe.
4. En el cuerpo estriado, que aumentó en mayor medida su contenido de Fe frente al tratamiento en comparación al resto de las áreas en estudio, el control antioxidante parece depender de la acción de  $\alpha$ -T.
5. Este perfil de respuesta aseguraría una adecuada protección antioxidante en el medio hidrofílico y el lipofílico.

#### RESPUESTAS ANTIOXIDANTES FRENTE A UN PREACONDICIONAMIENTO CON HIERRO

El tejido cerebral puede ser más susceptible que otros órganos a daño por ROS considerando que: (1) las neuronas poseen una gran cantidad de mitocondrias y esto se asocia con un alto metabolismo aeróbico con gran disponibilidad de oxígeno; (2) bajas concentraciones de algunos

antioxidantes enzimáticos; (3) alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (con mayor reactividad con las ROS) y (4) un alto contenido de Fe. Todas estas características pueden hacer que el cerebro sea particularmente susceptible a degeneración producida por especies reactivas del oxígeno (Halliwell, 2006).

En condiciones fisiológicas, el Fe neuronal no es reactivo a pesar de su alto nivel, probablemente por su absorción, transporte y almacenamiento, sin embargo, cuando se alcanza un exceso de Fe se induce el EO (Floyd y Carney 1992). El metabolismo anormal del Fe en humanos, puede resultar en desórdenes neurológicos tales como las Enfermedades de Alzheimer, de Parkinson y de Huntington (Gerlach y col., 1994).

Recientemente se ha enunciado el concepto de hormesis que se refiere a que células y organismos expuestos a condiciones moderadas de EO responden induciendo mecanismos protectivos que resultan en efectos beneficiosos (Videla, 2010). La respuesta hormética es inducida por dosis bajas de agentes tóxicos, irradiación, ROS, restricción calórica dietaria, ejercicio moderado y estrés por calor (Videla, 2010).

Hormesis es una respuesta dependiente de la dosis, que dispara mecanismos que dependen del tipo celular, del nivel de ROS alcanzado y de la duración de la exposición. Datos preliminares indican que la exposición a concentraciones moderadas de Fe lleva a controlar adecuadamente el daño dependiente de isquemia-reperfusion en hígado de rata.

En nuestro laboratorio nos planteamos como

objetivo de investigación identificar y caracterizar el mecanismo de pre-acondicionamiento con Fe, como un disparador oxidativo que condiciona la respuesta celular frente a situaciones de estrés en cerebro de rata.

Para cumplir con dicho objetivo, el modelo de pre-acondicionamiento con Fe en ratas *Sprague Dawley* se realizó mediante la administración i.p. de 50 mg Fe-dextran/kg cada 48 h durante 10 días. Se estableció la ventana temporal óptima donde no aparecieron daños oxidativos pero los valores de concentración en estado estacionario del Fe no hayan regresado a los valores controles. En homogeneizado de cerebro completo para cada grupo experimental se determinó: el contenido total de Fe para asegurar la efectividad del tratamiento y el contenido de antioxidantes liposolubles  $\alpha$ -tocopherol y  $\beta$ -caroteno.

Con un progresivo aumento en la carga de Fe, se excede la capacidad de almacenamiento del Fe, resultando en un incremento de la actividad catalítica del ion al superar el *pool* en tránsito en las células. El Fe cataliza la peroxidación de lípidos por lo que se pretende comprender el papel de este metal luego de diferentes tiempos de exposición en las neuronas. La peroxidación de lípidos es una medida de daño oxidativo. Cuando se produce un desbalance, ya sea por un aumento en la producción de radicales libres del oxígeno o una disminución en el contenido de antioxidantes, la concentración en estado estacionario de las especies activas aumenta y se llega a una situación de EO. Las especies activas del oxígeno reaccionan con moléculas celulares que pierden su estructura y función y aparece la condición de injuria celular que

puede conducir a la necrosis.

Del análisis de nuestros resultados pudimos determinar que el contenido total de Fe en cerebro de rata mostró un incremento significativo 2 h post-administración de la sexta dosis. El contenido de  $\alpha$ -tocopherol mostró una disminución significativa a las 2 y 8 h luego de la última dosis de Fe.

Estas observaciones nos permiten concluir que en experimentos con pre-acondicionamiento con Fe, y considerando que el Fe tiene una activa participación en la catálisis de la generación de ROS, se puede concluir preliminarmente que el preacondicionamiento con Fe podría evitar daños neurológicos debido a un consumo de antioxidantes liposolubles, en particular  $\alpha$ -tocopherol.

#### CUESTIONES A RESOLVER

En estos momentos, nuestro grupo de investigación está encarando una investigación para averiguar qué efecto protectoro tendrá la ML exógena cuando se exponen ratas a una sobrecarga de Fe.

La ML es liposoluble, y al ser administrada por cualquier vía, es absorbida rápidamente pudiendo atravesar todas las barreras biológicas; de esta forma parece que puede llegar hasta cualquier parte de la célula previniendo el daño oxidativo. Así, nuestra hipótesis de partida es: *La melatonina exógena protege al organismo (cerebro e hígado) frente a un estado de estrés oxidativo provocado por sobrecarga de Fe.*

A esta hipótesis se puede sumar una segunda: *En animales longevos la protección antioxidante de melatonina endógena disminuye, debido a la disminución de la concentración de la hormona, aumentando la actividad de antioxidantes.*

Nos proponemos caracterizar el efecto antioxidante de la ML en un modelo animal con sobrecarga aguda de Fe y, por otro lado, evaluar cómo el fotoperíodo ambiental y la longevidad de los animales influye sobre el efecto antioxidante de la ML en un modelo animal con sobrecarga aguda de Fe.

Como la secreción de ML desde la glándula pineal presenta un ritmo circadiano con máximos valores durante la noche (fase oscura), esta actividad de la glándula pineal media el acoplamiento fotoperiódico de ritmos biológicos endógenos y otras funciones fisiológicas. Así, surge el planteo del siguiente problema: ¿Cómo variará el efecto antioxidante de la ML endógena frente a la sobrecarga de Fe en ratas en *free running* (libre curso) de luz y de oscuridad?

#### CON VISTA AL FUTURO

Algunas de las patologías más directamente relacionadas con estados hiperoxidativos, tanto como causa patogénica de la enfermedad como responsables fisiopatológicos del curso de la misma, incluyen: anemias; excitotoxicidad y muerte neuronal; epilepsia; enfermedades neurodegenerativas; patología ocular; enfermedad pulmonar; patología renal; isquemia reperfusión; daño por radiaciones ionizantes, como rayos X o radiación ultravioleta; aterosclerosis; patología autoinmune; patología inflamatoria y sepsis; cáncer; distrofias musculares como Duchenne; diabetes y síndrome metabólico, e hipertensión; fibromialgia; fatiga crónica, entre otras.

Debido a su capacidad para asumir dos estados de oxidación en sistemas biológicos, el Fe

pueden considerarse un productor intrínseco de ROS, que puede conducir a EO neuronal y neurodegeneración (Núñez y col., 2012). Tanto la deficiencia como el exceso de Fe pueden afectar la función neuronal. Para el caso de enfermedades cerebrales degenerativas crónicas asociadas al Fe, se sabe poco acerca de los mecanismos que conducen a la acumulación del metal en el cerebro (Prohaska y col., 2012). Estos desórdenes pueden estar relacionados con la acumulación del metal o defectos en su metabolismo o de su homeostasis (Batista-Nascimento y col., 2012). El tejido cerebral podría ser más susceptible al daño dependiente de ROS que otros órganos. Esto puede deberse a que las neuronas: a) están enriquecidas en mitocondrias y poseen una tasa metabólica elevada; b) poseen bajos niveles de determinadas enzimas antioxidantes; c) contienen un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados de membrana, y d) muestran alto contenido de Fe, efectos que podrían combinarse y hacer del cerebro un órgano blanco para la degeneración debida al EO (Halliwell, 2006).

El Fe es importante en la toxicidad celular y puede iniciar por sí mismo un conjunto de reacciones oxidativas tóxicas, o alimentar el EO provocado por xenobióticos o metabolitos endógenos. Además, es muy importante considerar que el EO mediado por Fe ha sido clásicamente vinculado a muerte celular por apoptosis (Ott y col. 2007) y más recientemente a ferroptosis, que representa una forma de muerte celular no-apoptótica dependiente de Fe (Dixon y col. 2012).

Hay indicios de que los suplementos de ML

pueden ayudar a los adultos mayores a mejorar su protección antioxidante contra algunas de las enfermedades y el envejecimiento, tales como la Enfermedad de Alzheimer, la Enfermedad de Parkinson y los ACV. Sin embargo esta hipótesis aún no se ha terminado de demostrar experimentalmente. Además, la evidencia preliminar sugiere que puede ayudar a fortalecer el sistema inmunológico.

Así, con estas investigaciones se espera aportar nuevas evidencias de las acciones de la ML como un fuerte agente antioxidante y ampliar sus futuros posibles usos.

#### AGRADECIMIENTOS

Esta investigación es financiada con subsidios de la Fundación Universidad de Morón (PID 15-002/12 y PID 15-001/14). Los autores del trabajo desean expresar su agradecimiento a la Dra. Susana Puntarulo (IBIMOL-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA) por su guía y apoyo, y a las Lic. Natacha Piloni y Romina Reiteri por su participación durante las investigaciones.

#### BIBLIOGRAFÍA

- ACUÑA-CASTROVIEJO D., ESCAMES G., VENEGAS C., DÍAZ-CASADO M.E., LÍMA-CABELLO E., LÓPEZ L.C., ROSALES-CORRAL S., TAN D.X., REITER R.J. 2014. Extrajineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell. Mol. Life Sci.* 71(16): 2997-3025.
- ANTUNES F., L.R. BARCLAY, K. INGOLD, M. KING, J. NORRIS, J. SCAIANO, F. XI. 1999. On the antioxidant activity of melatonin. *Free Radic Biol. Med.* 26: 117-128.
- ARENDT J., ALDHOUS M.E., BOJKOWSKI C.J., ENGLISH J., FRANEY C., SKENE D. 1987. Effects of melatonin in human. En: Trentini G.P., De Gaetani C., Pévet P, eds. *Fundamentals and clinics in pineal research*. New York: Raven Press: 457-472.
- BATISTA-NASCIMENTO L., PIMENTEL C., MENEZES R.A., and RODRIGUES-POUSADA C. 2012. Iron and neurodegeneration: from cellular homeostasis to disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012: 1-8.
- BEYER C.H., STEKETEE J., SAPHIER D. 1998. Antioxidant properties of melatonin-An emerging mystery. *Biochem Pharmacol* 56: 1265-1272.
- CAGNACIA. 1996. Melatonin in relation to physiology in adult humans. *Jour Pineal Res.* 21: 200-213.
- CZERNICZYNIAC A, KARADAYIAN A, BUSTAMANTE J., CUTRERA R., LORES-ARNAZ S. 2011. Paraquat induces behavioral changes and cortical and striatal mitochondrial dysfunction. *Free Radic. Biol. Med.* 51: 1428-1436.
- DÍAZ RODRÍGUEZ E., GARNACHO GAVARRE N., VALDÉS CAÑEDO M., MARÍN FERNÁNDEZ B., DÍAZ LÓPEZ B. 2001. Efectos de la melatonina sobre el mantenimiento de parámetros corporales durante el envejecimiento. *Estudio en *Rattus norvegicus**. *Rev. Esp. Geriatr. Gerontol* 36(5): 287-292.
- DESAI I. 1984. Vitamin E analysis methods for animal tissue. *Meth. Enzymol.* 105: 138-146.
- DIXON S.J., LEMBERG K.M., LAMPRECHT M.R., SKOUTA R., ZAITSEV E.M., GLEASON C.E., PATEL D.N., BAUER A.J., CANTLEY A.M., YANG W.S., MORRISON B. 3rd, Stockwell B.R. 2012. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 149(5): 1060-1072.
- GALLEANO M. y PUNTARULO S. 1992. Hepatic chemiluminescence and lipid peroxidation in mice iron overload. *Toxicology* 76: 27-34.
- GALLEANO M. y PUNTARULO S. 1997. Dietary alpha-tocopherol supplementation on antioxidant defenses after in vivo iron overload in rats. *Toxicology* 124: 73-81.
- GALLEANO M., AIMO L., PUNTARULO S. 2002. Ascorbyl radical/ascorbate ratio in plasma from iron overloaded rats as oxidative stress indicator. *Toxicol. Lett.* 133: 193-201.
- GERLACH M., BEN-SHACHAR D., RIEDERER P., YODIN M. 1994. Altered brain metabolism iron as a cause of neurodegenerative diseases? *Jour Neurochem.* 63: 793-807.
- GUTTERIDGE J.M.C. 1987. Lipid peroxidation: some problems and concepts. In Halliwell B (ed) *Oxygen radicals and tissue injury: proceedings of an Ujiohn Symposium*, Bethesda, MD: FASEB, p. 9. 27.



- HALLIWELL B. y GUTTERIDGE J. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Meth Enzymol.* 186: 1-85.
- HALLIWELL B. y GUTTERIDGE J. 1989. *Free radicals in biology and medicine*, 2<sup>a</sup> edic., Oxford, London: Clarendon Press.
- HALLIWELL B. 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Jour Neurochem.* 97(6): 1634-1658.
- HERNANDO H., PILONI N., CERVINO C.O. y PUNTARULO S. 2012. Precondicionamiento con hierro: efecto sobre la respuesta oxidativa en cerebro de ratas. IV Jornadas de Ciencia y Tecnología UJM 2012.
- JOHNSTON J. y SKENE D. 2015. Regulation of mammalian neuroendocrine physiology and rhythms by melatonin. *Jour Endocrinol.* (in press)
- JONES D. 2006. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 8: 1865-1879.
- LUCESOLI F., CALIGURI M., ROBERTI M.F., PERAZZO J.C., FRAGA C.G. 1999. Dose-dependent increase of oxidative damage in the testes of rats subjected to acute iron overload. *Arch Biochem Biophys.* 372: 37-43.
- MINOTTI G. y AUST D. 1987. The role of iron in the initiation of lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids.* 44: 191-208.
- NUÑEZ M., URRUTIA P., MENA N., AGUIRRE P., TAPIA V., SALAZAR J. 2012. Iron toxicity in neurodegeneration. *Biometals* 25(4): 761-776.
- OTT M., GOGVADE V., ORRENIUS S., ZHIVOTOVSKY B. 2007. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 12: 913-922.
- PANG S.F. y TANG P.L. 1983. Decreased serum and pineal concentrations of melatonin and N-acetylserotonin in aged male hamsters. *Horm. Res.* 17: 228-234.
- PANG S.F., TANG C.W., HONG G.X., VIP P.C., TANG P.L., BROWN G.M. 1990. Fluctuation of blood melatonin concentrations with age: result of changes in pineal melatonin secretion, body growth, and ageing. *Jour Pineal Res.* 8: 179-192.
- PILONI N. y PUNTARULO S. 2010. Iron role in the oxidative metabolism of animal and plant cells. Effect of iron overload. In: Giménez M.S. (ed.), *Metals in Biology Systems*, Research Signpost, Trivandrum, Kerala, India, p. 29-50.
- PILONI N., FERNANDEZ V., VEDELA L., PUNTARULO S. 2013. Acute iron overload and oxidative stress in brain. *Toxicology* 314: 174-182.
- PROHASKA R., SIBON O.C.M., RUDNICKI D.D., DANEK A., HAYFLICK S.J., VERHAAG E.M., y col. 2012. Brain, blood, and iron: perspectives on the roles of erythrocytes and iron in neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* 46: 607-624.
- REITER R. 1996. Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals. *Fur Jour Endocrinol.* 134: 412-420.
- REITER R.J., TAN D.X., MAYO J.C., SHINZ R.M., LEÓN J., CZARNOCKI Z. 2003. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol.* 50 (4): 1129-1146.
- REITER M., PILONI N., HERNANDO M., CERVINO C.O., PUNTARULO S. 2013. Sobrecarga aguda de Fe: efecto sobre la capacidad antioxidante en áreas cerebrales de rata. Poster, Resúmenes de las SAIC, Mar del Plata, Argentina.
- REITER M., PILONI N., HERNANDO M., CERVINO C.O., PUNTARULO S. 2014. Sobrecarga Aguda de Fe: efecto sobre la capacidad antioxidante no-enzimática en áreas cerebrales de rata. I Encuentro Inst. Bioquím. Medic. Molec. (IBIMOL). Fac. Ccia. y Bioquím., UBA.
- ROBELLO E., GALATRO A., PUNTARULO S. 2009. Labile iron pool and ferritin content in developing rat brain-irradiated in utero. *NeuroToxicology* 30: 430-435.
- STEFULJ J., HÖRTNER M., GHOSH M., SCHAUENSTEIN K., RINNER I., WÖFLER A., SEMMLER J., LIEBMAN P.M. 2001. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *Jour Pineal Res.* 30(4): 243-247.
- VENEGAS C., GARCÍA J.A., ESCAMES G., ORTIZ F., LÓPEZ A., DOERRIER C., GARCÍA CORZO L., LÓPEZ L.C., ACUÑA-CASTROVIEJO D. 2012. Extrapineal melatonin: Analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *Jour Pineal Res.* 52: 217-227.
- VEDELA L.A. 2010. Hormetic responses of thyroid hormone calorigenesis in the liver: Association with oxidative stress. *JUBMB Life.* 62: 460-466.
- WALDHAUSER E., WEISZENBACHER G., TATZER E., GISINGER B., WALDHAUSER M., SCHEMPER M. 1998. Alterations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging. *Jour Clin. Endocrinol. Metab.* 66: 648-652.

