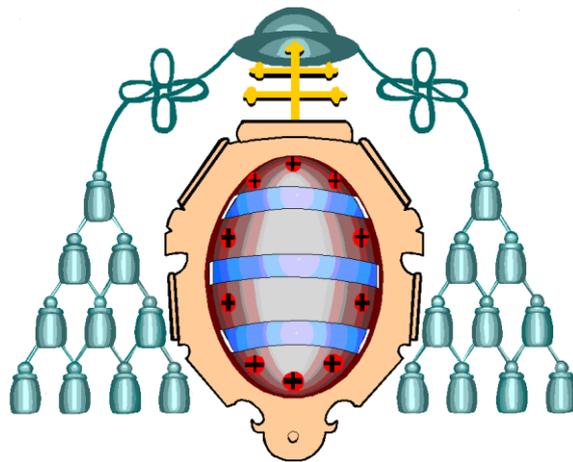


# **EFFECTOS DE LA MELATONINA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA AUTOFAGIA DEL MÚSCULO**



**Universidad de Oviedo**

Departamento de Bioquímica y Biología molecular

Trabajo de Investigación - 2013

**Ángel Álvarez Eguiluz**

## ABREVIATURAS

En la narrativa del presente trabajo se han empleado las abreviaturas especificadas a continuación:

---

<b>4-HNE</b>	<b>4-Hidroxi-2-NonEnal</b>
<b>BMD</b>	<i>Becker Muscular Dystrophy</i>
<b>CAT</b>	<b>CAT</b> alasa
<b>CMA</b>	<b>Chaperone-Mediated Autophagy</b>
<b>DM</b>	<b>Distrofia Muscular</b>
<b>DMD</b>	<i>Duchenne Muscular Dystrophy</i>
<b>DP</b>	<b>Daño oxidativo de Proteínas</b>
<b>EA</b>	<b>Enfermedad de Alzheimer</b>
<b>ELA</b>	<b>Esclerosis Lateral Amiotrófica</b>
<b>EM</b>	<b>Esclerosis Múltiple</b>
<b>ERNs</b>	<b>Especies Reactivas de Nitrógeno</b>
<b>EROs</b>	<b>Especies Reactivas de Oxígeno</b>
<b>Gly</b>	<b>Glicina</b>
<b>GSH-Px</b>	<b>Glutación Peroxidasa</b>
<b>IAM</b>	<b>Infarto Agudo de Miocardio</b>
<b>LAMP-2A</b>	<b>Lysosome-Associated Membrane Protein 2A</b>
<b>LC3-I</b>	<i>Light Chain 3-I</i>
<b>LC3-II</b>	<b>Light Chain 3-II</b> (LC3-I conjugada con PE)
<b>LPO</b>	<b>LipoPerOxidación</b>
<b>MAP-LC3</b>	<b>Microtubule-Associated Protein-Light Chain 3</b>
<b>MCP</b>	<b>Muerte Celular Programada</b>
<b>MDA</b>	<b>MalonilDiAldehido</b>
<b>mTOR</b>	<b>Mammalian Target Of Rapamycin</b>
<b>PAP</b>	<b>Complejo Peroxidasa-AntiPeroxidasa</b>
<b>PE</b>	<b>PhosphatidylEthanolamines</b>
<b>PVDF</b>	<b>PolyVinylidene DiFluoride</b>
<b>SDS</b>	<b>Sodium Dodecyl Sulfate</b>
<b>SOD</b>	<b>SuperÓxido Dismutasa</b>
<b>TBS</b>	<b>Tris-Buffered Saline</b>
<b>TBS-T</b>	<b>Mezcla de Tris-Buffered Saline y Tween-20</b>
<b>VPI</b>	<b>Velocidad de Procesamiento de la Información</b>
<b>ZT</b>	<b>Zeitgeber Time</b>

---

## INTRODUCCIÓN

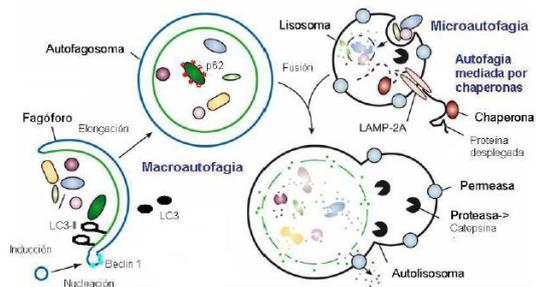
Las células eucariontes captan de forma continua líquidos y moléculas tanto grandes como pequeñas presentes en el espacio extracelular por medio de un mecanismo celular cobijado bajo el término *endocitosis*. El material a ingerir es encerrado, de modo progresivo, en una pequeña porción de la membrana plasmática, que primero se invagina y posteriormente se desprende dando lugar a la formación de una *vesícula* endocítica. Por último, el material ingerido se envía a los *lisosomas*, donde es digerido.

En función del tamaño de las vesículas endocíticas formadas (que a su vez es función de la naturaleza del material captado) se distinguen dos tipos principales de endocitosis y, por ende, dos vías diferentes hacia los lisosomas. Por una parte, las partículas extracelulares grandes son ingeridas por células fagocíticas especializadas [captadas por *fagocitosis* (siendo esta la forma más espectacular de endocitosis)] las cuales son capaces de internalizar incluso otras células. A continuación, los fagosomas formados se fusionan con los lisosomas, digiriéndose en estos últimos las partículas de alimento contenidas en las anteriormente mencionadas vesículas endocíticas (la fagocitosis es importante también en la mayoría de animales para distintos propósitos de la nutrición; un ejemplo de tal mención viene dado por el papel que desempeña en la defensa frente a la infección causada por microorganismos invasores). Por otra parte, los líquidos y las moléculas pequeñas pueden ser captados por *pinocitosis*, es decir, en forma de vesículas pinocíticas pequeñas que envían su contenido a los lisosomas a través de los *endosomas*.

Pero las células cuentan con una vía adicional para proveer materiales a los lisosomas; la *AUTOFAGIA*.

La **autofagia** es un proceso catabólico, altamente conservado a lo largo de la evolución dentro del dominio *Eukarya*. Acontece con la formación de vesículas de doble membrana llamadas *autofagosomas*, responsables de capturar material citoplasmático, incluyendo tanto macromoléculas celulares como el exceso de orgánulos o aquellos deteriorados o aberrantes (partes obsoletas de la célula en sí), para la degradación (resultado de la actividad de enzimas hidrolíticos) en los compartimentos ácidos celulares (lisosomas) y eventual reciclado de las macromoléculas resultantes, jugando, por tanto, un papel clave en el mantenimiento de la homeostasia celular (Levine & Klionsky, 2004). Su desarrollo juega una labor esencial en la adaptación al ayuno nutricional y a las condiciones ambientales cambiantes, en la defensa frente a infecciones microbianas, así como en la remodelación celular durante el desarrollo y acumulación de orgánulos dañados generadores de especies reactivas de oxígeno (EROs), tanto dentro de procesos fisiológicos, como patológicos. Existen distintos tipos de autofagia (**Figura 1**):

- **Microautofagia** → Secuestro de pequeñas porciones de citoplasma por invaginación de la membrana lisosomal. Está presente en todas las células de forma constitutiva y tiene por función la eliminación periódica de aquellas estructuras (orgánulos o proteínas) dañadas de forma natural por su uso en la célula.
- **Macroautofagia** → Se trata de la vía más estudiada, siendo las proteínas Beclin-1 (BECN1) y LC3, sus principales marcadores. Aunque el concepto "autofagia" engloba distintos mecanismos de degradación en los lisosomas, se



**Figura 1. Esquema resumen del proceso autofágico** detallando las distintas vías catabólicas que lo integran así como sus marcadores correspondientes (adaptado de Li y cols., 2011)

utiliza con frecuencia para referirse a esta ruta en particular por la cual, la célula, mediante estructuras de doble membrana (principalmente procedentes del retículo endoplásmico rugoso), secuestra partes del citoplasma y/u organelas enteras para su degradación en los lisosomas con intención primaria e inicial de supervivencia, dirigiéndose a sí misma de forma parcial. No obstante, si las condiciones adversas se mantienen, la macroautofagia se mantiene hasta alcanzar la digestión completa de la célula y pasa a denominarse Muerte Celular Programada tipo II (MCP tipo II), ya que conlleva la muerte celular.

- **Autofagia mediada por chaperonas (CMA)** → Vía de proteólisis selectiva. Las proteínas a degradar atraviesan directamente la membrana lisosomal. Se ha visto que las estructuras proteicas que se degradan por esta vía presentan un motivo relacionado con la secuencia KFERQ que es reconocido por la proteína de membrana lisosomal LAMP-2A.

Disfunciones en la vía autofágica basal se asocian con una mayor frecuencia de aparición de diversas patologías tales como el cáncer (Beth Levine, 2007), desórdenes de la función hepática (Masaaki Komatsu, 2012), síndromes clínicos tales como el infarto agudo de miocardio (IAM) (Hiromitsu Kanamori y cols., 2011), así como con el surgimiento de otras enfermedades de dispar naturaleza, tales como las neurodegenerativas (Taichi Hara y cols., 2006), cuya clasificación más frecuente se basa en la localización anatómica de las lesiones más importantes, lo que a veces produce problemas atribuibles a la variabilidad fenotípica de los síndromes. Hablamos de pérdida de memoria asociada a la edad, deterioro cognitivo, enfermedad de Alzheimer (EA), Parkinson, Esclerosis Múltiple (EM), Esclerosis lateral amiotrófica (ELA) así como de otros procesos tales como los neuromusculares, de los que, la *distrofia muscular*, se figura como un buen ejemplo.

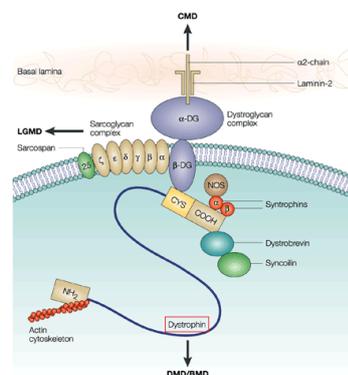
Aunque en algunos casos es sobradamente conocida la relación existente entre deficiencia en la ruta catabólica autofágica/lisosomal [mecanismo crucial, tanto en la limpieza total de orgánulos disfuncionales, como en impedir el daño tisular (Guillermo Mariño y cols., 2011)] e incidencia de un amplio abanico de patologías, poco se sabe del papel que juegan los defectos en dicho sistema de degradación en las distrofias musculares. De hecho, hace apenas un año que vio la luz el primer estudio en el cual se investiga su papel patogénico y su aplicabilidad como blanco para nuevas intervenciones terapéuticas en lo que a una distrofia muscular se refiere [la distrofia muscular de Duchenne (DMD), la forma más severa de este tipo de trastornos], poniéndose de manifiesto que la autofagia está gravemente deteriorada en músculos de pacientes afectados por DMD así como en ratones *mdx*, un modelo de la enfermedad con acumulación de orgánulos dañados (C De Palma y cols., 2012).

El concepto **distrofia muscular (DM)**, cuyo significado literal sería algo así como "desgaste y atrofia" de los músculos, encarna un cúmulo heterogéneo de más de 30 enfermedades, todas ellas genéticas (y, por ende, hereditarias) caracterizadas por defectos en las proteínas musculares, cuyas manifestaciones clínicas comienzan, en su mayoría, en edad infantil y que causan el deterioro de los **músculos esqueléticos**, pérdida progresiva de masa muscular, de reflejos, con o sin degeneración del tejido nervioso, así como dificultades motoras, contracturas, escoliosis, pseudo**hipertrofia** debida a la sustitución de tejido muscular por tejido graso y múltiples patologías asociadas. Una DM se distingue de todas las demás enfermedades neuromusculares por cumplir cuatro condiciones; es una **miopatía**, tiene base genética, curso progresivo y, en algún momento de la enfermedad, las fibras musculares mueren.

En la actualidad, se distinguen nueve tipos o formas de DM, algunos de los cuales aparecen en la infancia o en la niñez mientras que otros no se manifiestan hasta que se alcanza, como mínimo, la mediana edad. Otras disimilitudes observadas entre las distintas formas en las que se puede manifestar la DM pueden ser resumidas en; diferente severidad de la sintomatología, músculos afectados (pueden afectar también, por ejemplo, al músculo cardíaco y producir síntomas de insuficiencia cardíaca) y velocidad de progresión.

La más conocida de las DDMM es la distrofia muscular de Duchenne (DMD) cuyas características serán expuestas con más detalle por ser el objeto de nuestro estudio.

La **distrofia muscular de Duchenne o distrofia muscular progresiva (DMD)** (Guillaume Benjamin Amand Duchenne, 1861) es una miopatía de origen genético [enfermedad monogénica, causada por mutaciones en el *DMD gene*, codificante de la distrofina (**Figura 2**); proteína citoplasmática cuya secuencia aminoacídica está constituida por 3685 residuos. En cuanto a su función, es la responsable de la unión que se establece entre los filamentos de actina del citoesqueleto y la matriz extracelular (la cual evita el daño en la membrana de las células musculares, sarcolema) durante el proceso de **contracción muscular**]. Por lo tanto, se trata de una enfermedad hereditaria, herencia recesiva ligada al X, de ahí que sea mucho más común en varones. Se caracteriza por la destrucción progresiva e irreversible del tejido muscular estriado (responsable de los movimientos corporales voluntarios). De todas las formas conocidas en las que se puede presentar la DM, la distrofia muscular de Duchenne es la más común, observándose, similar **incidencia** en todas las razas con una esperanza de vida que raramente supera los 20-25 años.

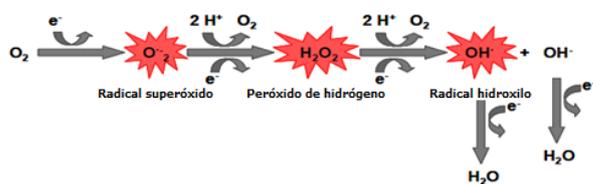


**Figura 2. Localización celular de la distrofina** (Tejvir S. Khurana & Kay E. Davies, 2003)

El, ya mencionado, gen *DMD*, diana de alteraciones moleculares que dan como resultado diversas distrofias, es el más grande que existe en la naturaleza, lo que hace imposible su secuenciación (conjunto de métodos y técnicas bioquímicas de especial interés en la búsqueda de mutaciones que den lugar a la enfermedad). Cuando la distrofina no está presente, como ocurre en los pacientes afectados por la distrofia muscular de Duchenne (las alteraciones moleculares en el gen *DMD* son desencadenantes de un "stop codon" prematuro y, en consecuencia, la expresión génica da lugar a una proteína no funcional que es rápidamente degradada), se pierde la función tan importante que ésta realiza, destruyéndose las membranas celulares como resultado de la contracción muscular. Esto permite la entrada/salida de las células de un conjunto de sustancias de naturaleza heterogénea [a destacar el Ca iónico ( $\text{Ca}^{2+}$ ) pues es responsable de la iniciación de mecanismos celulares tales como la MCP tipo I o apoptosis], rompiéndose la homeostasis y ocasionando, en definitiva, daño en el músculo. Las fibras musculares destruidas son reemplazadas por tejido conectivo y adiposo, con la consecuente pérdida tanto de masa como de función muscular lo que, a su vez, desencadena en un aumento de la aparición de contracturas, rigidez muscular así como en la pérdida del rango de movimiento, todas ellas manifestaciones clínicas características de esta enfermedad. A su vez, la sustitución de tejido muscular hace que el paciente muera prematuramente por insuficiencias respiratorias o cardíacas como principales agentes causales (Larry B. Goldstein & Nada El Hussein, 2011).

Por el momento no existe una cura o tratamiento efectivo para detener o revertir su desarrollo, sin embargo, existe una serie de tratamientos paliativos que pueden mejorar algunos de los síntomas, al menos en pequeño grado, o hacer más lento su inevitable avance. Efectivamente, estos tratamientos engloban una serie de medidas de apoyo, como la fisioterapia, la psicomotricidad, la logopedia y la terapia ocupacional, entre otras. No obstante, se sabe que estos pacientes con distrofinopatías muestran evidencias de un proceso inflamatorio crónico (Swarnali Acharyya y cols., 2007) así como un estrés oxidativo acrecentado (M. Christine Rodriguez & Mark A Tarnopolsky, 2003), efectos secundarios de vital importancia en la progresión de estas patologías neuromusculares. Razón por la cual, en la actualidad, también se están estudiando aunque en menor medida, como posibles bases terapéuticas. El **estrés oxidativo patológico** es un estado celular causado por alteración de la homeostasis óxido-reducción intracelular.

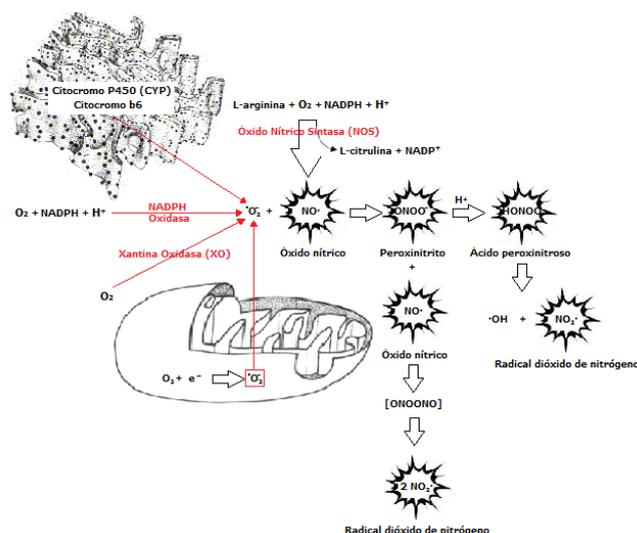
Es bien conocido por todos que, los sistemas biológicos, mantienen un entorno reductor dentro de sus células. Entorno que es preservado por acción de determinados enzimas (tales como la glutatión reductasa) para lo cual es necesario, además, un constante y continuo aporte de energía metabólica. Desbalances en este estado redox normal en condiciones fisiológicas (por algún tipo de deficiencia en los mecanismos celulares con función antioxidante o por exceso de producción de prooxidantes) pueden causar efectos tóxicos a través de la lenta, pero inexorable, producción de especies reactivas [Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) -principalmente el radical superóxido ( $\cdot\text{O}_2$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ )- (*Figura 3*)] con alta potencialidad citotóxica [**daño oxidativo**, (Kohen & Nyska, 2002)] y que no son más que el precio a pagar por mantener la incuestionable ventaja evolutiva que supone, desde el punto de vista energético (síntesis de ATP), la utilización del oxígeno molecular como último aceptor de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial.



**Figura 3. Metabolitos reactivos en la reducción monovalente del oxígeno.** La incorporación sucesiva de electrones en los orbitales del oxígeno molecular es un proceso favorable desde el punto de vista termodinámico como resultado del cual se generan en las células aerobias intermediarios altamente reactivos.

Por otra parte, en situaciones patológicas tales como durante el proceso inflamatorio, se produce un exceso de óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ), capaz de reaccionar con el anión superóxido, dando lugar a la formación de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), especie altamente reactiva capaz de nitrar residuos de tirosina, romper cadenas de DNA, así como de oxidar lípidos y enzimas críticos del metabolismo intermediario. Además, el  $\text{ONOO}^-$  también oxida y desencadena la depleción de antioxidantes endógenos, como el ascorbato o el glutatión. La presencia intracelular de peroxinitrito así como de otras especies reactivas derivadas del nitrógeno [Especies Reactivas de Nitrógeno (ERNs) -óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ), el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) y el radical dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2\cdot$ )- son los principales en este caso (*Figura 4*)], en conjunción con un estrés oxidativo acentuado (tal como el que se manifiesta durante la patogenia de la DMD), perpetua el proceso inflamatorio a través de mecanismos variopintos (Hurtado Bredda, FJ y cols.,

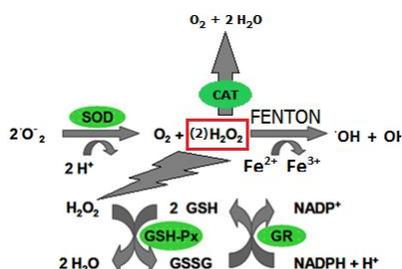
2005) y concurre, junto con las EROs, en el daño acumulativo de los principales componentes celulares (Harman, 1956), motivando por un estado celular que se denomina, de forma análoga al inducido por los radicales libres de oxígeno, **estrés nitrosativo**, pero que, a diferencia de este, no ha sido objeto de estudio en el presente trabajo.



**Figura 4. Origen y sucesión de transformaciones químicas que dan lugar a las especies reactivas de nitrógeno**

No obstante, llegados a este punto, también es importante señalar que, a bajas/moderadas concentraciones, los radicales libres juegan un papel beneficioso en el organismo, pues participan tanto en la defensa frente a agentes infecciosos como en rutas de señalización celular.

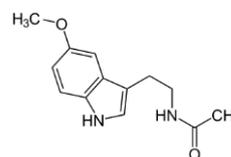
La producción de radicales libres como resultado del metabolismo celular desencadenó en la producción de una respuesta evolutiva adecuada para contrarrestar el daño que podrían ocasionar tanto EROs como ERNs, la cual se conoce como **defensa antioxidante**. El



**Figura 5. Sistemas enzimáticos con función de defensa antioxidante. Reacción de Fenton**

organismo cuenta con dos sistemas de defensa que le permiten contrarrestar el estado de estrés oxidativo; los enzimas antioxidantes [como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) o el tándem glutatión peroxidasa/glutatión reductasa (GSH-Px/GR)] por un lado (**Figura 5**), y los depuradores no enzimáticos de radicales libres (entre los que se hallan el glutatión, las vitaminas A y C y la melatonina, de especial interés para el presente trabajo) por otro. Ambos conforman una compleja red antioxidante con función principal de mantener la homeostasis tisular.

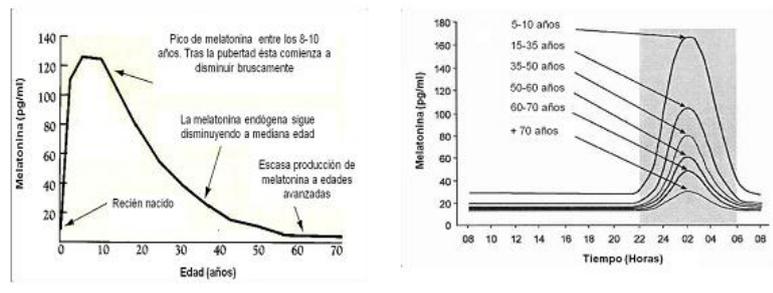
La **melatonina** [Mel, N-acetil-5-metoxitriptamina (**Figura 6**)] es considerada clásicamente como una hormona cuya presencia ha sido detectada no sólo en vertebrados sino también en bacterias, algas, hongos, plantas e invertebrados (Hardeland & Poeggeler, 2003). En lo que respecta a los vertebrados, la **glándula pineal** es la principal fuente de melatonina sérica, con un ritmo de secreción sincronizado con el ciclo luz/oscuridad, presentando un máximo nocturno y unos niveles basales diurnos. Sin embargo, actualmente se sabe que dicha **indolamina** se sintetiza de forma continua y en elevada concentración en múltiples órganos, tales como; la retina, la médula ósea, el tracto gastrointestinal, la piel y la glándula de Harder (Reiter y cols., 2000). Además de reguladora de ritmos circadianos y del ciclo sueño-vigilia (Pandi-Perumal y cols., 2006), existen otras funciones que la melatonina desempeña en los seres vivos; interviniendo en la fisiología neuroendocrina especialmente en la reproductiva (Reiter, 1973), es inmunomoduladora (Maestroni, 2001), interviene en el crecimiento tumoral (Blask y cols., 2005) además de actuar como antioxidante [tanto directo, al ser capaz de captar radicales libres (Hardeland y cols., 1993; Allegra y cols., 2003) como indirecto, al estimular la expresión y actividad de los principales enzimas antioxidantes (Tomás-Zapico y cols., 2002a/2002b)] y antiinflamatoria (funciones concebidas, fundamentalmente, por la melatonina de síntesis extrapineal).



**Figura 6. Estructura molecular de la melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina)**

Gracias a su pequeño tamaño y su naturaleza elevadamente lipofílica y moderadamente hidrofílica, la melatonina es capaz de penetrar en todas las células y compartimentos celulares del organismo (Reiter y cols., 2000). Además, es capaz de activar o inhibir determinadas cascadas de transducción de señales (Reiter, 1991).

La síntesis de esta indolamina no es constante a lo largo de la vida (**Figura 7**). En el caso de los humanos, su producción se inicia a los tres/cuatro meses de edad, alcanzándose los niveles máximos entre los ocho y diez años. Tras la pubertad, los niveles



comienzan a disminuir bruscamente de forma que en el individuo adulto, el

**Figura 7.** Los niveles séricos de melatonina experimentan importantes variaciones en su concentración a lo largo de la vida humana (**A**) de manera que el pico nocturno de esta indolamina es menor a medida que aumenta la edad (**B**). (Adaptado de Reiter y Robinson, 1996)

pico nocturno en la concentración de melatonina va decreciendo paulatinamente hasta la muerte. En las personas mayores, por encima de los 70 años, la concentración sérica de melatonina no supera el 10% de la observada en la pubertad (Reiter & Robinson, 1996).

En base al razonamiento anteriormente descrito no es de extrañar que la mayor parte de tratamientos farmacológicos que se están tratando de asentar a día de hoy (para uso en aquellas situaciones clínicas que cursen con estrés oxidativo e inflamación, tanto causa como consecuencia del proceso patogénico) tengan el uso de antioxidantes como principales agentes bioactivos. De entre todos ellos la melatonina se perfila como el candidato más atractivo, pues es un potente antioxidante y antiinflamatorio en la clínica animal, habiéndose encontrado recientemente relacionada con la autofagia (Coto-Montes y cols., 2012). En concreto, la DMD (como todas las formas de distrofia muscular) cursa con estrés oxidativo e inflamación (algo ya comentado en líneas previas), activándose las vías de producción de radicales libres y de moléculas proinflamatorias que son diana de la melatonina. Por ello, la administración de esta podría tener efectos muy beneficiosos en la patogenia de esta enfermedad, reduciendo la necrosis muscular y mejorando el status clínico, de ahí el objetivo principal que se ha planteado en este trabajo.

## OBJETIVOS

El objetivo general, del presente trabajo, es el estudio del papel que tiene la melatonina como modulador autofágico en el músculo esquelético, basándose en su efecto sobre el estrés oxidativo. A su vez, este objetivo general, se divide en dos objetivos parciales:

1. Caracterización de la situación oxidativa del músculo esquelético, en ambos sexos, tratado con melatonina.
2. Caracterización preliminar del efecto de la melatonina sobre los procesos autofágicos desarrollados por el músculo esquelético de ambos sexos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. POBLACIÓN DE ESTUDIO: ANIMALES

Se estudiaron un total de 15 hámsteres sirios (*Mesocricetus auratus*), 7 machos y 8 hembras, enjaulados en grupos de 4 y 3 sujetos en el caso de los machos mientras que, las hembras, fueron recluidas en dos grupos de 4 individuos para, a continuación, aclimatar (bioterio) todas y cada una de las 4 comunidades durante 5 semanas a una temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  siguiendo un ciclo habitual de luz/oscuridad de 14:10 h. Los alimentos y el agua fueron facilitados *ad libitum*. Finalmente, los animales fueron sacrificados a las ZT 6:00 ("Zeitgeber time" 0 h = ZT0 = Comienzo de la fase lumínica), por decapitación. Cercenamiento realizado a posteriori del tratamiento con un anestésico. El comité de ética de la Universidad de Oviedo aprobó todos los protocolos experimentales, y todas y cada una de las pruebas fueron llevadas a cabo de acuerdo con las legislaciones española (R.D. 1201/2005) y europea (Directiva 86/609/EEC) en materia de experimentación animal.

Un total de 8 animales (4 machos y 4 hembras) fueron pinchados intraperitonealmente a las ZT 10:00 (diariamente durante dos semanas) con melatonina (500  $\mu\text{g}$  melatonina/kg peso corporal), provista en solución salina. Dicha indolamina fue diluida junto con un

volumen determinado de etanol (concentración final no superior al 0.5%), que para nada altera los resultados experimentales. Los controles (resto de animales) recibieron el mismo volumen de solución salina y alcohol bajo las mismas condiciones.

## 2. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

### 2.1. HOMOGENEIZACIÓN DE TEJIDO

Se extrajo el músculo esquelético que conforma el cuádriceps de todos y cada uno de los animales sacrificados para, seguidamente, homogenizar independientemente (referente a cada uno de los individuos que conforman la población de estudio) una cuantía del ya mencionado tejido de 200 – 300 mg en 1 mL de tampón fosfato de potasio 10 mM a pH 7.4 y NaCl 50 mM, valiéndose de tritón X-100 0.1% como agente surfactante no iónico. Para ello se dispuso de un polytron "Ultra-turrax T25 (JANK & KUNKEL IKA-Labortechnik, USA)". El homogenizado se centrifugó a 3000 rpm y 4°C de temperatura "(OrtoAlresa Digicen 20R)" durante un tiempo igual a 6 minutos para, posteriormente, recuperar los sobrenadantes y emplearlos como base para la determinación de la concentración total de proteínas a partir del protocolo desarrollado por Bradford en 1976 ["método de Bradford" (Bradford, 1976)]. Por el contrario, los precipitados fueron descartados.

### 2.2. DAÑO OXIDATIVO DE PROTEÍNAS (DP)

La presencia de grupos carbonilo en los residuos aminoácidos en general que definen la secuencia característica de cada proteína en particular, puede ser explotada como un indicador de modificación oxidativa. La reacción de los mencionados grupos funcionales con determinados compuestos, tales como la 2,4-dinitrofenilhidracina [ $RR'C=O + C_6H_3(NO_2)_2NHNH_2 \rightarrow C_6H_3(NO_2)_2NHNCR'R' + H_2O$ ], proporciona un método para detectar y cuantificar la oxidación de proteínas catalizada por metales.

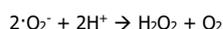
La determinación del daño oxidativo en proteínas se lleva a cabo haciendo uso del protocolo base desarrollado por Levine y colaboradores (Levine y cols., 1990), con las modificaciones confeccionadas por Coto-Montes y Hardeland (Coto-Montes & Hardeland, 1999).

### 2.3. DETERMINACIÓN DE LIPOPEROXIDACIÓN (LPO)

El término "lipoperoxidación" hace referencia a una serie de transformaciones bioquímicas en cascada que atañen a los lípidos en presencia de radicales libres, tanto en condiciones fisiológicas como en condiciones patológicas y que llevan a la generación de peróxidos de lípidos por un lado y de una serie de derivados, tales como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) por otro. Estos derivados, anteriormente mencionados, proveen un índice conveniente de la magnitud de la peroxidación lipídica (Esterbauer, 1990). Para determinar esta magnitud se emplea un reactivo cromógeno, N-metil-2-fenilindol [Bioxytech LPO-568 kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)], el cual reacciona tanto con el MDA como con el 4-HNE (**MDA + 4-HNE, SIGMA, 108383, 1,1,3,3-Tetramethoxypropane**) a 45°C de temperatura para formar un cromóforo estable con un máximo de absorbancia a 586 nm.

### 2.4. ENSAYO ENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

Para impedir el daño oxidativo por  $\cdot O_2$ , todas las células con respiración aerobia tienen varias formas del enzima **superóxido dismutasa**, el cual cataliza la siguiente reacción de dismutación



En condiciones fisiológicas, el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) así generado se vuelve inocuo por acción, tanto de la *glutación peroxidasa*, como de la *catalasa*, por lo que es necesario, por tanto, la existencia de una perfecta interacción enzimática. De no ser así, el  $H_2O_2$  generado será un precursor inmediato (por la reacción de Fenton, H.J.H Fenton, 1894) del radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), mucho más tóxico.

La determinación de la actividad de la SOD se lleva a cabo mediante un ensayo de autooxidación que tiene por base la transformación de la hematoxilina en hemateína, molécula portadora de un grupo cromóforo rosa brillante con un máximo de absorción bien definido (560 nm). La ya mencionada reacción de autooxidación es inhibida por la actividad de la SOD en un rango de pH que oscila entre 6.8 – 7.8.

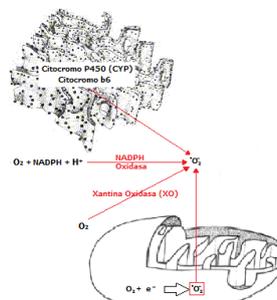
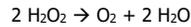


Figura 8. Posibles orígenes del radical superóxido

## 2.5. ENSAYO ENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA (CAT)

La **catalasa** es una hemoproteína, de localización intracelular [fundamentalmente en el interior de orgánulos tales como los peroxisomas (De Duve & Baudhuin, 1966), aunque también en el citosol], con actividad catalítica. Químicamente goza de una estructura similar a la de la hemoglobina; cuatro subunidades proteicas en cada una de las cuales se acomoda un grupo hemo y una molécula de NADPH.

Se halla muy activa en eritrocitos y en células hepáticas pero ha sido descrita en todos los tejidos, incluido el cerebro (Vega-Naredo y cols., 2005). Por otra parte, en lo que respecta a su funcionalidad, la catalasa puede desempeñar dos tipos de actividades catalíticas no acopladas; una primera actividad que tiene por objetivo la siguiente transformación



y una segunda actividad peroxidativa, al mediar la oxidación de donadores de hidrógeno (metanol, etanol o fenoles entre otros) transformándose, simultáneamente, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua. El hecho de que tenga lugar una u otra reacción depende de la concentración de peróxido de hidrógeno así como de la concentración de las especies moleculares donadoras de hidrógeno (Aebi, 1984).

Es bien sabido que, en general, la glutatión peroxidasa tiene mayor afinidad por el peróxido de hidrógeno que la catalasa, pero se satura antes. Por ello, la GSH-Px es la primera en actuar a bajas concentraciones mientras que la CAT es mucho más eficiente cuando las concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  son elevadas (Cisneros-Prego y cols., 1997).

La evaluación de la actividad de la catalasa (EC 1.11.1.6) se realiza a partir del protocolo desarrollado por Lubinsky y Bewley (Lubinsky & Bewley, 1979).

## 2.6. WESTERN BLOT

Se identificaron y semicuantificaron los siguientes marcadores proteicos de macroautofagia: Beclin-1 (BECN1) "(sc-10086, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, Ca., USA)" y LC3-I/II "(PD014, Medical & Biological Laboratories CO., LTC, Naka-Ku Nagoya, Japan)" mediante la técnica analítica (ensayo de inmunodetección de proteínas) conocida internacionalmente como Western Blot. El protocolo seguido fue el siguiente:

En primer lugar, se efectúa la desnaturalización de las muestras en tampón de carga comercial "[Tris/HCl 0.5 M, pH 6.8, SDS 2%, glicerol 50%, azul de bromofenol 0.01%] (Laemmli Sample Buffer, Cat. No. 161-0737, BIO-RAD Laboratories, CA, USA)" con  $\beta$ -mercaptoetanol 5% a 100°C durante 5 minutos, haciendo uso, para tal fin, de un baño termostático "(Termofin, Selecta)". Se continúa con una separación electroforética de las muestras, previamente tratadas, a través de un soporte restrictivo; geles de poliacrilamida y en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) a amperaje constante (30 mA por gel, "PowerPac Basic, BIO-RAD Labs. Inc. CA, USA") en buffer de reservorio (Tris 25 mM, Gly 192 mM, SDS 0.1%). Tras la migración proteica, las proteínas son transferidas a una membrana de PVDF a 110 V "(PowerPac Basic, BIO-RAD Labs. Inc. CA, USA)" durante un tiempo aproximado de 3 horas en buffer de transferencia (Tris 25 mM, Gly 190 mM, metanol 20%). Se prosigue con el bloqueo de la membrana, cuyo objetivo es evitar uniones inespecíficas, usando para tal fin tampón TBS 1X (Tris/HCl 20 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM) con leche desnatada en polvo a una concentración variable en función del anticuerpo primario al que esta se expondrá posteriormente [5% en el caso del Beclin-1 (BECN1) y 10% en el caso del LC3], a 4°C en agitación "(agitador basculante MBP-30)", durante toda una noche. Posteriormente se ejecuta la exposición de la membrana al anticuerpo primario de interés, previamente alicuotado y sometido a la dilución apropiada [Beclin-1 (BECN1); dilución 1:500 en TBS-T 1X + leche desnatada en polvo al 1% la cual tiene como única función servir como agente bloqueante. Por su parte el LC3 fue diluido 1:1000 también en TBS-T 1X pero a diferencia de la situación anterior no se agregó bloqueante alguno], a 4°C en "(MovilRod)" / sin agitación respectivamente durante un tiempo estimado en unas 24 horas [como control de carga se utiliza la  $\alpha$ -TUBULINA "(sc-23948, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, Ca., USA)". Se reanuda el experimento llevando a cabo 3 lavados de la membrana, de 10 minutos de duración cada uno en agitación "(IKA KS 130 basic)" a temperatura ambiente, con TBS-T 1X (el cual se ha de reemplazar entre lavado y lavado). Seguidamente, la membrana es incubada junto con el anticuerpo secundario apropiado en cada caso, pero en todos y cada uno de los mismos, conjugado con peroxidasa "(Cat. No. A5420, Sigma-Aldrich, MO, USA; #7074, Cell Signaling Technology, Inc., Beverly MA, USA)" durante 1 hora en agitación "(IKA KS 130 basic)" a temperatura ambiente. Todos los

anticuerpos secundarios fueron previamente alicuotados y sometidos a la dilución más apropiada (posteriormente citadas las empleadas en nuestro propio lance, **Tabla 1**) en función de su naturaleza bioquímica antes de hacer uso del mismo:

Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario oportuno en función del primario	Composición del preparado utilizado para el anticuerpo secundario
$\alpha$ -TUBULINA	AM	TBS-T 1X + 1% leche desnatada en polvo + 1:1000 AM
Beclin-1 (BECN1)	AG	TBS-T 1X + 1% leche desnatada en polvo + 1:2500 AG
LC3	AR	TBS-T 1X + 1% leche desnatada en polvo + 1:5000 AR

**Tabla 1. Composición del preparado utilizado para el anticuerpo secundario en función del primario.**

**AM** → Anti-Mouse, **AG** → Anti-Goat, **AR** → Anti-Rabbit. **TBS-T** → Mezcla de Tris-Buffered Saline y Tween-20

Una vez concluida la incubación, la membrana es sometida a un nuevo ciclo de lavados, en agitación "(IKA KS 130 basic)" y a temperatura ambiente con TBS-T 1X para, detrás, cometer su revelado con un kit comercial "(Cat. No. WBKLS0100, Millipore Headquarters, MA, USA)", el cual está basado en la reacción de quimioluminiscencia mediada por la peroxidasa. Para efectuar la cuantificación proteica se realiza una lectura densitométrica con ayuda del software "Quantity One 1-D Analysis Software (BIO-RAD Labs. Inc. CA, USA)".

### 3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se desarrolla un análisis estadístico de los resultados experimentales obtenidos, los cuales se representan como media  $\pm$  desviación típica, gracias a programas informáticos específicos. La distribución normal de los datos es evaluada tomando como base el test de Kolmogorov-Smirnov. Así mismo, se llevó a cabo un análisis estadístico de la varianza de dos factores (ANOVA) para poner de manifiesto, en caso de que existan, diferencias significativas dentro de los valores obtenidos tras la realización de cada una de las determinaciones estadísticas anteriormente especificadas para cada uno de los tratamientos individuales (aceptando un nivel de significación  $p$  inferior o igual a 0.05). Para tal fin, se ha empleado el siguiente programa informático estadístico: GraphPad Prism 5.01 "(GraphPad Software Inc. CA, USA, 2007)".

## RESULTADOS

### 1. MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

#### 1.1. DAÑO OXIDATIVO

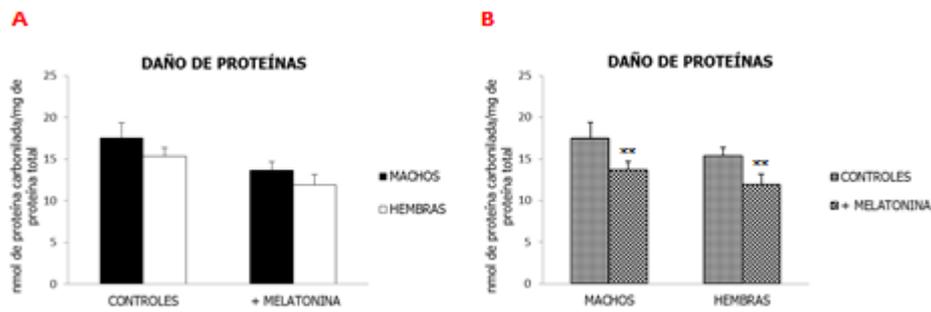
El objetivo fijado no es otro que evaluar cómo se puede ver afectado el estado de equilibrio redox existente en las células que conforman el tejido muscular del hámster sirio en condiciones fisiológicas al administrar un antioxidante, tal como la melatonina, sobre el estrés oxidativo imperante en el músculo estriado del hámster sirio de ambos sexos.

##### 1.1.1. DAÑO DE PROTEÍNAS (DP)

La carbonilación es una alteración habitual fruto de la exposición de proteínas a especies reactivas. Por ende, la tasa de carbonilación proteica representa una medida del daño oxidativo incidente sobre estas macromoléculas. A primera vista, los niveles de daño registrados en hembras son ligeramente inferiores a los observados en machos, sin que entre ellos existan diferencias significativas (tanto en lo que respecta a los grupos controles como a los tratados con melatonina).

El sometimiento al tratamiento farmacológico con melatonina, como era de esperar a priori, induce un descenso en los valores referentes al daño de proteínas de magnitud estadísticamente significativo, en lo que, tanto a los sujetos de género masculino ( $p \leq 0.010$ ) como a los de género femenino ( $p \leq 0.010$ ) se refiere.

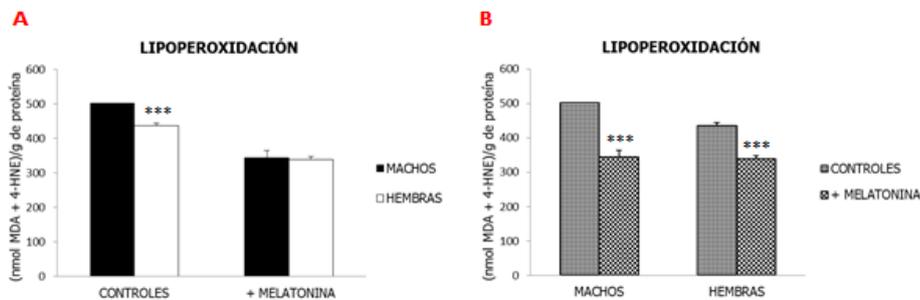
Esto parece indicar que la ya mencionada indolamina ha seguido un mecanismo de actuación en el músculo de ambos sexos de similar esencia, ya que, como se puede observar, desencadena efectos análogos (**Figura 9**).



**Figura 9.** Tasa de carbonilación proteica como medida del daño de proteínas en el tejido muscular de hámster sirio. (B) MACHOS → Controles vs +Melatonina (\*\*,  $p \leq 0,010$ ), HEMBRAS → Controles vs +Melatonina (\*\*,  $p \leq 0,010$ )

1.1.2. DETERMINACIÓN DE LIPOPEROXIDACIÓN (LPO). Con el fin de completar el estudio del daño oxidativo se han analizado las alteraciones moleculares desencadenadas por las EROs sobre los lípidos celulares: Los resultados conseguidos fruto de la determinación de la lipoperoxidación son parejos a los observados en el daño de proteínas. La administración de melatonina induce una disminución en los niveles de peróxidos lipídicos, de importancia significativa ( $p \leq 0,001$ ) en lo que a machos y hembras respecta.

En el caso del músculo del género femenino, los valores obtenidos en estado control son significativamente ( $p \leq 0,001$ ) más bajos que los adquiridos en machos (Figura 10).



**Figura 10.** Niveles de MDA + 4-HNE como medida del daño de lípidos en el tejido muscular de hámster sirio. (A) CONTOLES → Machos vs Hembras (\*\*\*,  $p \leq 0,001$ ); (B) MACHOS → Controles vs +Melatonina (\*\*\*,  $p \leq 0,001$ ), HEMBRAS → Controles vs +Melatonina (\*\*\*,  $p \leq 0,001$ )

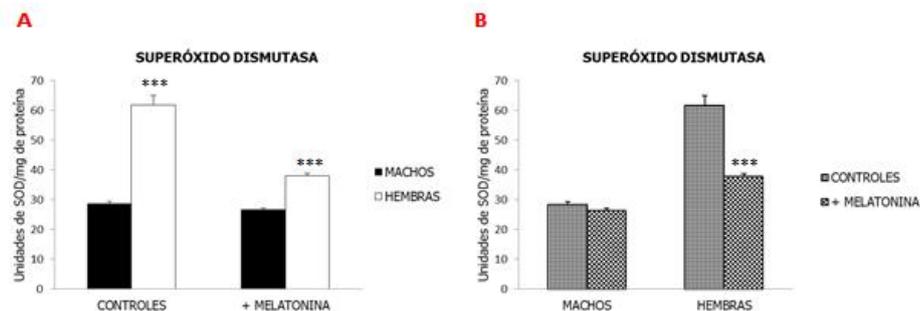
## 1.2. DEFENSA ANTIOXIDANTE

Tras interpretar los resultados anteriores y con el fin de valorar la defensa antioxidante, se estudiaron las actividades enzimáticas de la superóxido dismutasa y de la catalasa bajo las mismas condiciones experimentales.

### 1.2.1. ENSAYO ENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

Si se compara el nivel de actividad que exhibe la superóxido dismutasa en tejido muscular de sujetos de ambos sexos se puede observar que en las hembras es, aproximadamente, dos veces más funcional que en los machos existiendo entre ellos, como es de prever, diferencias significativas ( $p \leq 0,001$ ).

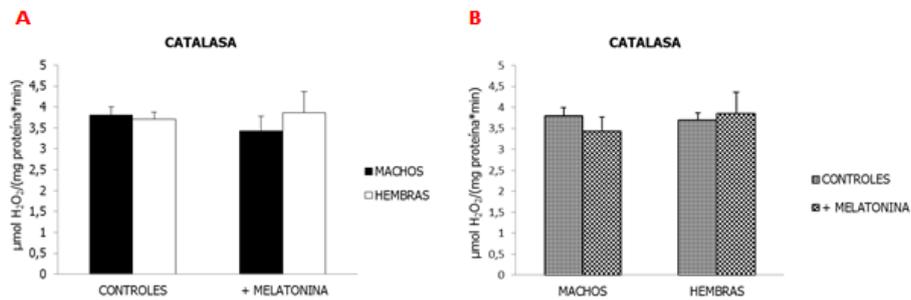
En base a los datos experimentales obtenidos se puede inferir que la melatonina motiva una disminución de la actividad del enzima en cuestión. Merma que, sólo en el caso de las hembras, es claramente significativa ( $p \leq 0,001$ ) (Figura 11).



**Figura 11.** Actividad de la superóxido dismutasa en el tejido muscular de hámster sirio. (A) CONTOLES → Machos vs Hembras (\*\*\*,  $p \leq 0,001$ ), +MELATONINA → Machos vs Hembras (\*\*\*,  $p \leq 0,001$ ); (B) HEMBRAS → Controles vs +Melatonina (\*\*\*,  $p \leq 0,001$ )

### 1.2.2. ENSAYO ENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA (CAT)

El estudio de la actividad enzimática de la catalasa reveló que esta no varía significativamente, ni entre sexos, ni después del tratamiento con melatonina, que sólo promovió un sutil incremento en el caso de las hembras (**Figura 12**).



**Figura 12.** Actividad de la catalasa en el tejido muscular de hámster sirio

## 2. RESPUESTA CELULAR AL ESTRÉS OXIDATIVO (MECANISMOS DE SUPERVIVENCIA)

### 2.1. ANÁLISIS DE MARCADORES DE AUTOFAGIA

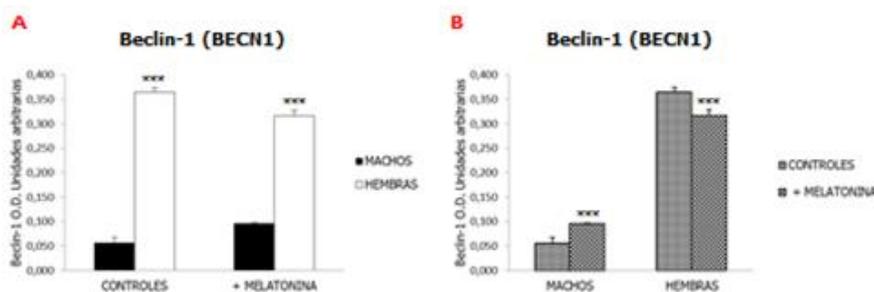
En lo que a este estudio se refiere, "autofagia" describe la caracterización de la macroautofagia. Pues bien, llegados a este punto, se han estudiado los principales marcadores correspondientes a esta vía en particular. Estos son: Beclin-1 (BECN1) y LC3.

#### 2.1.1. Beclin-1 (BECN1)

Homólogo en mamíferos de la proteína Atg6 (AuTophagy-related) de levaduras. Se trata de una proteína localizada en la membrana del retículo endoplásmico implicada en la iniciación de la formación del autofagosoma (R Kang y cols., 2011). Los resultados experimentales obtenidos mostraron diferencias significativas ( $p \leq 0.001$ ) entre sexos en lo que a los grupos controles, per se, se refiere, observándose una expresión y, por ende, una actividad autofágica, muy superior en sujetos hembras respecto a individuos machos. Por otra parte, en base a los resultados experimentales obtenidos, parece que la melatonina tiende a suavizar las diferencias, anteriormente especificadas, existentes entre sexos, induciendo un aumento estadísticamente significativo ( $p \leq 0.001$ ) en la biosíntesis de la proteína de membrana considerada (o, dicho de otra forma, en el mecanismo autofágico) si se trata de machos y un descenso de la misma en el caso de las hembras ( $p \leq 0.001$ ) (**Figura 14**).



**Figura 13.** Análisis por Western Blot de la proteína Beclin-1 (BECN1), así como del control de carga correspondiente (C=CONTROL, +MEL= +MELATONINA)



**Figura 14.** Histogramas de los Western Blot correspondientes a la proteína Beclin-1 (BECN1) (normalizada con  $\alpha$ -tubulina). (A) CONTROLES → Machos vs Hembras (\*\*\*,  $p \leq 0,001$ ), +MELATONINA → Machos vs Hembras (\*\*\*,  $p \leq 0,001$ ); (B) MACHOS → Controles vs +Melatonina (\*\*\*,  $p \leq 0,001$ ), HEMBRAS → Controles vs +Melatonina (\*\*\*,  $p \leq 0,001$ )

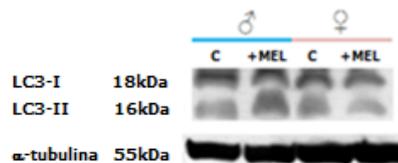
#### 2.1.2. MAP-LC3 (Microtubule-Associated Protein-Light Chain 3)

Homólogo en mamíferos de la proteína Atg8 (AuTophagy-related) de levaduras. Es una proteína asociada a los microtúbulos existente en dos isoformas posibles; LC3-I es la forma citosólica, la cual se transforma en LC3-II durante el proceso autofágico, pasando a localizarse en la membrana de los preautofosomas y de los autofosomas (Isei Tanida y cols., 2008).

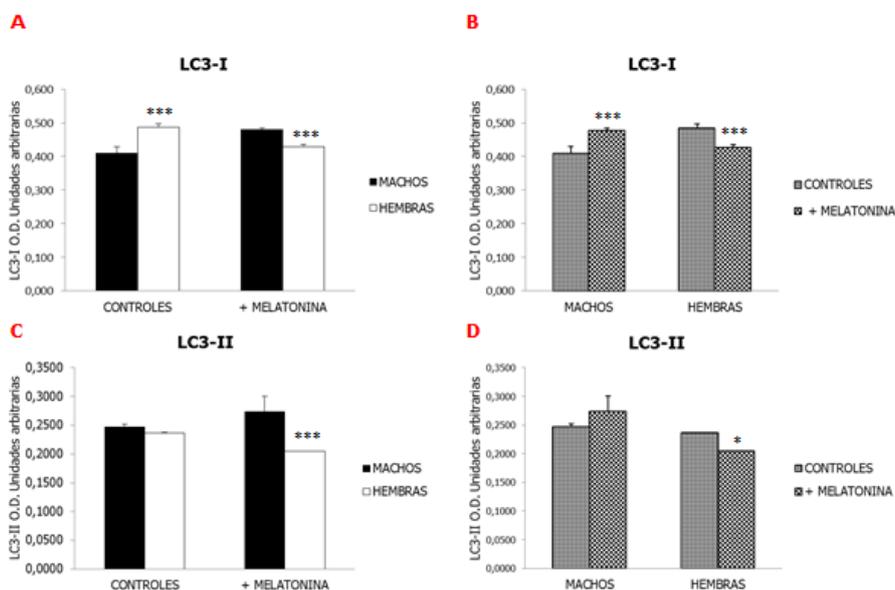
Siguiendo el curso del proceso autofágico, al examinar independientemente los niveles existentes de cada una de las dos isoformas en las que se puede manifestar la proteína en consideración, se puede observar que:

Contrariamente a lo que sucede en el caso de LC3-I [los resultados de LC3-I muestran, de forma análoga a lo observado para Beclin-1 (BECN1), diferencias relativamente acusadas en los niveles de expresión, siendo estos estadísticamente superiores en las hembras, en comparación, claro está, con los machos ( $p \leq 0.001$ )], la cuantía de LC3-II es muy levemente superior en los individuos de género masculino (no diferencias estadísticas significativas).

Por su parte, la melatonina, como ya se describió anteriormente para Beclin-1 (BECN1), suaviza los resultados diferenciales en ambos géneros, desencadenando un incremento en la biosíntesis de LC3-I en lo que a los machos tratados con melatonina se refiere y una reducción significativa ( $p \leq 0.001$ ) cuando se trata de hembras, tendencia que se conserva con plenitud en el caso de LC3-II, a excepción de las diferencias estadísticas, solamente significativas en sujetos hembras ( $p \leq 0.050$ ). Agudizando por tanto, en este último caso, la disparidad de los niveles y, en definitiva, del desarrollo autofágico (**Figura 16**).

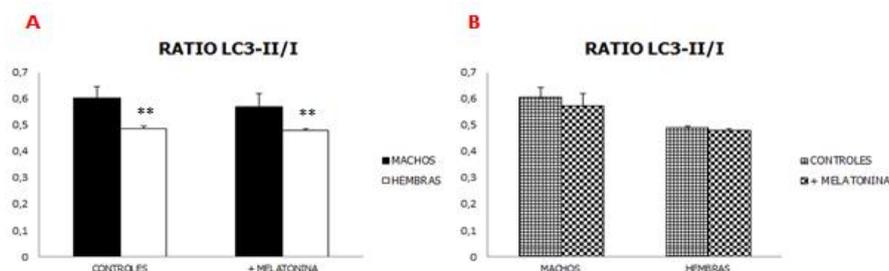


**Figura 15. Análisis por Western Blot de la proteína LC3-I/II, así como del control de carga correspondiente (C=CONTROL, +MEL= +MELATONINA)**



**Figura 16. Histogramas de los Western Blot correspondientes a la proteína LC3 (normalizada con  $\alpha$ -tubulina). (A) CONTROLES  $\rightarrow$  Machos vs Hembras (\*\*\*,  $p \leq 0,001$ ), +MELATONINA  $\rightarrow$  Machos vs Hembras (\*\*\*,  $p \leq 0,001$ ); (B) MACHOS  $\rightarrow$  Controles vs +Melatonina (\*\*\*,  $p \leq 0,001$ ), HEMBRAS  $\rightarrow$  Controles vs +Melatonina (\*\*\*,  $p \leq 0,001$ ); (C) +MELATONINA  $\rightarrow$  Machos vs hembras (\*\*\*,  $p \leq 0,001$ ); (D) HEMBRAS  $\rightarrow$  Controles vs +MELATONINA (\*,  $p \leq 0,050$ )**

En lo que respecta al flujo autofágico, es decir, al ratio LC3-II/LC3-I, se puede observar que, mientras que las hembras mantienen un flujo autofágico óptimo, sin diferencias estadísticas de trascendencia significativa entre los dos grupos experimentales, en los machos la autofagia se ve disminuida, aunque no de forma significativa, en la comunidad tratada con melatonina (**Figura 17**).



**Figura 17. Histogramas correspondientes a la relación LC3-II/I (normalizados con  $\alpha$ -tubulina). (A) CONTROLES  $\rightarrow$  Machos vs Hembras (\*\*,  $p \leq 0,010$ ); +MELATONINA  $\rightarrow$  Machos vs hembras (\*\*,  $p \leq 0,010$ )**

## DISCUSIÓN

El tejido muscular, objeto de estudio del presente trabajo, puede ser blanco de trascendentales alteraciones, de heterogénea naturaleza, desencadenantes, en última instancia, de numerosas enfermedades (tales como las distrofias musculares) así como de una pérdida degenerativa, tanto de masa como de fuerza muscular (sarcopenias en individuos de avanzada edad). El análisis experimental y teórico

de los mecanismos fisiológicos que regulan y, en definitiva, definen su *modus operandi*, nos permitiría conocer las bases que pueden ayudar, en términos concluyentes, a la lucha contra los mencionados procesos patológicos.

Este tejido posee una gran capacidad intrínseca para responder, rápida y tanto morfológica como bioquímicamente, a estímulos variopintos en lo que a su naturaleza se refiere. Estímulos que, a su vez, pueden ser endógenos o exógenos.

Entre ellos, los estrógenos tienen una notable influencia, ya que, una caída en su concentración fisiológica (análoga a la que se produce cuando las mujeres entran en la menopausia), se asocia con una mayor incidencia de lesiones así como con un retardo en la recuperación de las mismas (Deborah L. Enns & Dr Peter M. Tiidus, 2010).

Estrógeno es el término bajo el que se amparan las hormonas esteroideas endógenas, cuya síntesis acontece, a partir del colesterol como primer precursor en lo que a humanos respecta, en las gónadas masculinas y femeninas y en la placenta. Son responsables del desarrollo y mantenimiento de los órganos sexuales femeninos así como de las características sexuales secundarias propias de las hembras (hormonas sexuales femeninas) (JA McLachlan & RR Newbold, 1987). Las concentraciones circulantes de los mismos difieren marcadamente entre sujetos machos y hembras (H.E. Murray y cols., 2003), siendo superiores en éstas.

Es conocido que los estrógenos son capaces de retardar o evitar la oxidación molecular y, por ende, de contrarrestar el daño instigado por los radicales libres, atesorando, por tanto, propiedades antioxidantes (Etsuo Niki & Minoru Nakano, 1990), lo que, en conjunto, puede, en cierta medida, esclarecer los resultados experimentales obtenidos en lo que al estrés oxidativo se refiere, a través de los cuales se ponía de manifiesto la existencia de niveles inferiores en hembras, significativos cuando se trata de la lipoperoxidación ( $p \leq 0.001$ ) y sólo reducidos en el daño de proteínas.

En definitiva, tales hallazgos se relacionan con la capacidad protectora endógena que portan los estrógenos frente al estrés oxidativo (Adam M. Persky y cols., 2000). Asimismo, y en base a los datos adquiridos, esta competencia defensora parece relacionada también con el acrecentamiento de la actividad de enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa, lo cual ha sido ya observado en otros tejidos como la glándula de Harder del hámster sirio (Vega-Naredo y cols., 2009).

A la vista del comportamiento seguido, en términos de actividad catalítica, por los enzimas con funcionalidad antioxidante estudiados (especialmente en lo que al ensayo de la superóxido dismutasa respecta, pues se han obtenido resultados significativos desde el punto de vista estadístico) es sensato afirmar que el tratamiento a base de agentes antioxidantes, como la melatonina, posibilitaría que los valores de acción de los mismos se hiciesen más semejantes entre sexos.

En los últimos años han visto la luz centenares de publicaciones científicas (algunas de las cuales, aludidas en el desarrollo del presente trabajo) que tienen como objetivo desvelar el papel preponderante de los mecanismos moleculares que conducen a la muerte celular así como de las mitocondrias en situaciones fisiológicas y de acrecentado estrés. Así, se ha documentado cómo la mitocondria se encuentra en el límite entre la vida y la muerte de la célula (Hsin-Chen Lee & Professor Yau-Huei Wei, 2000) y cómo su sumisión al estrés oxidativo es clave en desatar el daño que, en última instancia, resuelve en la aparición de cuantiosas patologías. La disfunción mitocondrial inducida por el estrés oxidativo juega un papel crucial en la patogénesis de una amplia gama de enfermedades, incluyendo, por supuesto, los trastornos musculares. No se ha cumplido ni un lustro de la difusión de una investigación en la que se demuestra como la melatonina "rescata" rápidamente a las mitocondrias del trastorno motivado por el estrés oxidativo previniendo, eficientemente y en última instancia, la apoptosis de la fibra muscular (Hibaoui Y y cols., 2009).

Esta indolamina pertenece al grupo de los antioxidantes directos (o *scavengers*) (Hardeland y cols., 1993; Allegra y cols., 2003), quienes llevan a cabo un efecto neutralizador, directo como su propio nombre indica, de radicales libres, entre otros del radical anión superóxido (Anna-Rebekka Ressmeyer y cols., 2003), lo que permite explicar la acentuada disminución exhibida en la actividad funcional propia de la superóxido dismutasa, cuando se considera la comunidad de hembras pinchadas intraperitonealmente con la hormona en cuestión (en comparación con un grupo control) (A.B. Rodríguez y cols., 1998). Sin embargo, es bien sabido también que la melatonina es capaz de estimular la expresión y actividad de los principales enzimas antioxidantes, como sucede en este estudio con la catalasa (Tomás-Zapico y

cols., 2002a/2002b) que se traduce, en última instancia, en el descenso significativo de los niveles de especies reactivas, pudiéndose catalogar también, en base a tal mención, en la categoría de antioxidantes indirectos.

En conclusión, por todo ello, el tratamiento a base de esta biomolécula termina por reducir el estrés oxidativo en sujetos de ambos sexos.

Por su parte, la autofagia juega un papel clave en el mantenimiento de la homeostasia de la célula (Levine & Klionsky, 2004) y, por ende, en la supervivencia de ésta, pues su desarrollo es esencial en la adaptación al ayuno nutricional y a las condiciones ambientales cambiantes, en la defensa frente a infecciones microbianas, así como en la remodelación celular durante el desarrollo y acumulación de orgánulos dañados generadores de especies reactivas de oxígeno (EROs), tanto dentro de procesos fisiológicos, como patológicos (en otros términos, la considerada ruta catabólica atesora una aptitud endógena muy importante en la depuración de orgánulos inservibles o afectados por heterogéneos agentes tóxicos).

En consideración con el progreso de la vía autofágica, y en base a los resultados obtenidos, se percibe que el tejido muscular esquelético de hembras ostenta un importante bloqueo del mismo, pues sus células mantienen altísimos niveles de expresión cuando de la proteína Beclin-1 (BECN1) se trata, valores que no son correspondidos con incrementos análogos, en orden de magnitud, de LC3-II, ni tampoco del flujo autofágico (LC3-II/LC3-I). Estos resultados, en definitiva, indicadores de obstrucción, también han sido observados cuando se llevan a cabo análisis homólogos en lo que al protocolo experimental de evaluación se refiere, pero tomando otros órganos [glándula de Harder (Vega-Naredo y cols., 2012) y músculo de cerdo (Potes Y, 2013)] como objeto de estudio, encontrándose las células integrantes en dispareas condiciones fisiológicas, pero mostrando cómo se produce un bloqueo de la unión del autofagosoma con el lisosoma. Debido a ello, los niveles de LC3-II se hayan incrementados en el grupo que presentaba el bloqueo.

La melatonina, que ha sido mostrada, en diversas situaciones, como inductora de la autofagia (Coto-Montes y cols., 2012), parece ser capaz de reducir el aludido bloqueo, proyectando nuevamente (de forma análoga a lo esclarecido en líneas previas en referencia a la actividad catalítica de los enzimas antioxidantes) una equiparación en la evolución de esta ruta catabólica, entre sujetos de ambos sexos, ya que, como se puede visualizar, el tratamiento a base de esta hormona reduce los niveles de expresión de los principales marcadores macroautofágicos, a saber, Beclin-1 (BECN1) y flujo autofágico (entendido como LC3-I y LC3-II).

El mecanismo molecular por el cual, la melatonina, es capaz de motivar este efecto, es desconocido, por lo que deberá ser objeto de estudio en posteriores investigaciones.

## **CONCLUSIONES**

- Los estrógenos provocan que el músculo de las hembras esté más protegido que el de los machos contra el estrés oxidativo.
- El músculo de las hembras presenta, en condiciones normales, un bloqueo de la autofagia que puede ser revertido parcialmente por la acción de antioxidantes.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Acharyya, S., Villalta, SA., Bakkar, N. y cols., 2007. Interplay of IKK/NF- $\kappa$ B signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *J Clin Invest* **117**, 889-901.
- Acuña-Castroviejo, D., Martín, M., Macías, M. y cols., 2001. Melatonin, mitochondria and cellular bioenergetics. *J Pineal Res* **30**, 65-74.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* **105**, 121-126.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2011. Introducción a la Biología Celular. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana; pp: 522-523, 526-527.
- Allegra, M., Reiter, RJ. y Tan, DX., 2003. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res* **34**, 1-10.

- Blask, DE., Brainard, GC. y Dauchy, RT., 2005. Melatonin-depleted blood from premenopausal women exposed to light at night stimulates growth of human breast cancer xenografts in nude rats. *Cancer Res* **65**, 11174-11184.
- Bradford, MM., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Cisneros-Prego, E., Pupo-Balboa, J. y Céspedes-Miranda, E., 1997. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: III. Glutatión peroxidasa. *Rev Cubana Invest Bioméd* **16**, 10-15.
- Coto-Montes, A., Boga, JA., Rosales-Corral, S. y cols., 2012. Role of melatonin in the regulation of autophagy and mitophagy: A review. *Mol Cell Endocrinol* **361**, 12-23.
- Coto-Montes, A. y Hardeland, R., 1999. Antioxidative effects of melatonin in *Drosophila Melanogaster*: Antagonization of damage induced by the inhibition of catalase. *J Pineal Res* **27**, 154-158.
- Coto-Montes, A., Tomás-Zapico, C., Martínez-Fraga, J. y cols., 2009. Sexual autophagic differences in the androgen-dependent flank organ of Syrian hamsters. *J Androl* **30**, 113-121.
- Dean, RT., Fu, S., Stocker, R. y cols., 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *J Biochem* **324**, 1-18.
- De Duve, C. y Baudhuin, P., 1966. Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev* **46**, 323-357.
- De Palma, C., Morisi, F., Cheli, S. y cols., 2012. Autophagy as a new therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy. *Cell Death and Disease* **3**, e418.
- Enns, DL. y Tiidus, PM., 2010. The influence of estrogen on skeletal muscle. *Sports Medicine* **40**, 41-58.
- Esterbauer, H. y Cheeseman, KH., 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hidroxyonenal. *Methods Enzymol* **186**, 407-421.
- Franco, AA., Odom, RS. y Rando, TA. Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle. *Free Radical Biol Med* **27**, 1122-1132.
- Goldstein, LB. y El Hussein, N., 2011. Neurology and Cardiology: Points of Contact. *Revista Española de Cardiología (English Edition)* **64**, 319-327.
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., y cols., 2006. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **441**, 885-889.
- Hardeland, R. y Poeggeler, B., 2003. Non-vertebrate melatonin. *J Pineal Res* **34**, 233-241.
- Harman, D., 1956. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* **11**, 298-300.
- Hibaoui, Y., Roulet, E. y Ruegg, T., 2009. Melatonin prevents oxidative stress-mediated mitochondrial permeability transition and death in skeletal muscle cells. *J Pineal Res* **47**, 238-252.
- Hurtado Bredda, FJ., Nin Vaeza, N. y Rubbo Amonini, H., 2005. Estrés oxidativo y nitrosativo en la sepsis. *Medicina Intensiva* **29**, 159-165.
- Kanamori, H., Takemura, G., Goto, K. y cols., 2011. Autophagy limits acute myocardial infarction induced by permanent coronary artery occlusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **300**, 2261-2271.
- Kang, R., Zeh, HJ., Lotze, MT. y Tang, D., 2011. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death and Differentiation* **18**, 571-580.
- Kohen, R. y Nyska, A., 2002. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* **30**, 620-650.
- Lee, H-C. y Wei, Y-H., 2000. Mitochondrial role in life and death of the cell. *Journal of Biomedical Science* **7**, 2-15.
- Levine, B., 2007. Cell biology: Autophagy and cancer. *Nature* **446**, 745-747.
- Levine, RL., Garland, D., Oliver, CN. Y cols., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* **186**, 464-478.
- Levine, B. y Klionsky, DJ., 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* **6**, 463-477.
- Loschen, G., Azzi, A., Richter, C. y Flohe, L., 1974. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett* **15;42**, 68-72.

- Lubinsky, S. y Bewley, GC., 1979. Genetics of catalase in *Drosophila Melanogaster*: Rates of synthesis and degradation of the enzyme in flies aneuploid and euploid for the structural gene. *Genetics* **91**, 723-742.
- Maestroni, GJM., 2001. The immunotherapeutic potential of melatonin. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **10**, 467-476.
- Mariño, G., Madeo, F. y Kroemer, G., 2011. Autophagy for tissue homeostasis and neuroprotection. *Current Opinion in Cell Biology* **23**, 198-206.
- Martin, JPJr., Daily, M. y Sugarman, E., 1987. Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin oxidation. *Arch Biochem Biophys* **255**, 329-336.
- McLachlan, JA. y Newbold, RR., 1987. Estrogens and development. *Environ Health Perspect* **75**, 25-27.
- Mizushima, N., Yoshimori, T. y Levine, B., 2010. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* **140**, 313-326.
- Mizushima, N. y Yoshimori, T., 2007. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* **3**, 542-545.
- Murray, HE., Pillai, AV. y McArthur, SR., 2003. Dose- and sex-dependent effects of the neurotoxin 6-hydroxydopamine on the nigrostriatal dopaminergic pathway of adult rats: Differential actions of estrogen in males and females. *Neuroscience* **116**, 213-222.
- Niki, E. y Nakano, M., 1990. Estrogens as antioxidants. *Methods Enzymol* **186**, 330-333.
- Pandi-Perumal, SR., Srinivasan, V., Maestroni, GJM. y cols., 2006. Melatonin. *FEBS Journal* **273**, 2813-2838.
- Persky, AM., Green, PS. y Stuble, L., 2000. Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle *In Vivo* and *In Vitro*. *Proceedings of the Society for the Experimental Biology and Medicine* **223**, 59-66.
- Potes, Y., Estudio de los procesos autofágicos en la maduración de la carne de cerdo. Búsqueda de marcadores de bienestar animal y su efecto sobre la calidad del producto final. *Proyecto fin de Máster*.
- Reiter, RJ., 1973. Pineal control of a seasonal reproductive rhythm in male golden hamsters exposed to natural daylight and temperatura. *Endocrinology* **92**, 423-430.
- Reiter, RJ., 1991. Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* **12**, 151-180.
- Reiter, RJ. y Robinson, JO., 1996. Melatonina: La maravillosa hormona natural de nuestro cuerpo. *SIRIO*. ISBN: 9788478081882.
- Reiter, RJ., Tan, DX., Osuna, C. y Gitto, E., 2000. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *A review. J Biomed Sci* **7**, 444-458.
- Ressmeyer, A-R., Mayo, JC., Zelosko, V. y cols., 2003. Antioxidant properties of the melatonin metabolite N<sup>1</sup>-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): Scavenging of free radicals and prevention of protein destruction. *Redox Report* **8**, 205-213.
- Rodríguez, AB., Nogales, G., Ortega, E. y Barriga, C., 1998. Melatonin controls superoxide anion level: Modulation of superoxide dismutase activity in ring dove heterophils. *J Pineal Res* **24**, 9-14.
- Rodríguez, MC. y Tarnopolsky, MA., 2003. Patients with dystrophinopathy show evidence of increased oxidative stress. *Free Radical Biol Med* **34**, 1217-1220.
- Tanida, I., Ueno, T. y Kominami, E., 2008. LC3 and Autophagy. *Methods in Molecular Biology* **445**, 77-88.
- Tomás-Zapico, C., Caballero, B., Sierra, V. y cols., 2005. Survival mechanisms in a physiological oxidative stress model. *Faseb J* **19**, 2066-2068.
- Tomás-Zapico, C., Coto-Montes, A., Martínez-Fraga, J. y cols., 2002a. Effects of delta-aminolevulinic acid and melatonin in the Harderian gland of female Syrian hamsters. *Free Radical Biol Med* **32**, 1197-1204.
- Tomás-Zapico, C., Martínez-Fraga, J., Rodríguez-Colunga, M. y cols., 2002b. Melatonin protects against delta-aminolevulinic acid-induced oxidative damage in male Syrian hamster Harderian glands. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 544-553.
- Tsujimoto, Y. y Shimizu, S., 2005. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ* **12**, 1528-1534.
- Vega-Naredo, I., Caballero, B., Sierra, V. y cols., 2009. Sexual dimorphism of autophagy in Syrian hamster Harderian gland culminates in a holocrine secretion in female glands. *Autophagy* **5**, 1004-1017.
- Vega-Naredo, I., Caballero, B., Sierra, V. y cols., 2012. Melatonin modulates autophagy through a redox-mediated action in female Syrian hamster Harderian gland controlling cell types and gland activity. *J Pineal Res* **52**, 80-92.
- Vega-Naredo, I., Poeggeler, B., Sierra-Sánchez, V. y cols., 2005. Melatonin neutralizes neurotoxicity induced by quinolinic acid in brain tissue culture. *J Pineal Res* **39**, 266-275.

## GLOSARIO

**Contracción muscular:** La contracción muscular (creación de tensión muscular, siendo esta la fuerza engendrada por el músculo que se contrae) nos permite concebir fuerza para mover o resistir una carga. Es un proceso activo desde el punto de vista energético (gasto de ATP). Para que se produzca la contracción de cualquier músculo es necesaria la existencia de una transmisión neuro-muscular. Las neuronas que inervan un músculo son neuronas motoras. Los eventos celulares responsables de la contracción muscular son los siguientes:

**1.** Llegada de un impulso nervioso a la unión neuro-muscular. Liberación de acetilcolina. **2.** Difusión del neurotransmisor y unión de este a los receptores de la superficie de la fibra muscular. **3.** Despolarización del sarcolema por entrada de sodio, lo que genera un potencial de acción. **4.** El potencial de acción anteriormente generado desencadena, de forma indirecta, la apertura de canales de  $Ca^{2+}$  localizados en la membrana del retículo sarcoplásmico. Liberación de dicho divalente al citosol, distribuyéndose por todo el sarcolema. **5.** Unión  $Ca^{2+}$  troponina. Unión fuerte Miosina-Actina. **6.** Golpe de fuerza de las cabezas de miosina (necesario ATP). **7.** El filamento de actina se desliza hacia el centro del sarcómero.

**Endosoma:** Compartimento de una célula eucarionte delimitado por membrana por el que pasa el material captado por endocitosis en su camino hacia los lisosomas.

**Fagosoma:** De forma análoga a endosomas -véanse líneas previas-; compartimento de una célula eucarionte delimitado por membrana por el que pasa el material captado por fagocitosis en su camino hacia los lisosomas.

**Glándula pineal:** Estructura pequeña algo aplanada y con forma de cono, unida por un pedículo al epítalamo.

**Hipertrofia:** Aumento excesivo del volumen de un órgano.

**Incidencia:** Número de nuevos casos de una enfermedad en una población determinada y en un periodo determinado.

**Indolamina:** Categoría de neurotransmisores/neuromoduladores monoamina. Serotonina y melatonina.

**Lisosoma:** Orgánulo rodeado por una membrana que se encuentra en el citoplasma de células eucariotas; contiene muchos enzimas hidrolíticos y actúa como un centro de degradación y reciclado de componentes prescindibles.

**Miopatía:** Desorden muscular de etiología variopinta que ocasiona debilitación progresiva de los músculos con la correspondiente distrofia.

**Músculo esquelético:** Tipo de **músculo estriado** constituido por células o fibras cilíndricas, alargadas y multinucleadas (varios núcleos) [otros orgánulos y estructuras celulares son → sarcolema, sarcoplasma, retículo sarcoplásmico, mitocondrias y miofibrillas, siendo estas últimas las principales estructuras intracelulares; haces muy organizados de proteínas contráctiles (miosina y actina) y elásticas (reguladoras -tropomiosina y troponina- y accesorias gigantes -titina y nebulina-)]. Se une a los huesos a través de los tendones. Es, generalmente, de contracción voluntaria a través de la inervación nerviosa. Entre sus funciones se encuentran; el recubrimiento y protección óseo, inducción de movimiento en esqueleto axial y apendicular así como el mantenimiento de la postura corporal.

**Músculo estriado:** (Músculo esquelético y cardiaco). Tejido compuesto por numerosas fibras esqueléticas, agrupadas en fascículos y envueltas en sucesivas vainas de tejido conjuntivo, encargado de desarrollar el movimiento corporal.

**Surfactante (agente):** Los detergentes o surfactantes son sustancias anfipáticas que forman micelas en agua, modificando la tensión superficial. Solubilizan las proteínas uniéndose por un extremo a las partes hidrofóbicas del péptido e interaccionando con el medio acuoso en el otro extremo. En bioquímica y biología, tienen diferentes aplicaciones, como la extracción de proteínas ligadas a la membrana o la lisis de algunas células.

**Vesícula:** Orgánulo de geometría esférica, de pequeño tamaño y delimitado por una membrana, localizado en el citoplasma de las células eucariotas.

**Zeitgeber time (ZT):** [*zeit* (tiempo) y *geber* (dador)] Término alemán. El concepto hace referencia a cualquier variable exógena que es capaz de sincronizar un ritmo endógeno. El Zeitgeber o sincronizador más efectivo y común tanto para plantas como animales es la luz, aunque también funcionan como sincronizadores la temperatura, la disponibilidad de alimento, las interacciones sociales y manipulaciones farmacológicas.