

ISSN: 1988-2688

<http://www.ucm.es/BUCM/revistasBUC/portal/modulos.php?name=Revistas2&id=RCCV&col=1>

<http://dx.doi.org/10.5209/RCCV.55221>



*Revista Complutense de Ciencias Veterinarias 2017 11(especial):101-106*

**EFFECTO DE LA MELATONINA COMO TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE LAS RESPUESTAS INFLAMATORIA Y APOPTÓTICA ASOCIADAS A UNA LESIÓN ISQUÉMICA EN CEREBRO INDUCIDAS POR BLOQUEO DE LA ARTERIA CEREBRAL MEDIA.**

**ACUTE AND PREVENTIVE PROTECTIVE EFFECT OF MELATONIN AGAINST INFLAMMATORY AND APOPTOTIC HIPPOCAMPUS RESPONSE TO ISCHEMIC BRAIN INJURY INDUCED BY MIDDLE CEREBRAL ARTERY BLOCKADE IN AGING RATS**

**Muñoz, P., Bermudo, B., Shahani, P.M., García, I., Paredes, S.D. y Rancan, L.**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid

Correspondencia del autor: [pedromun@ucm.es](mailto:pedromun@ucm.es)

**RESUMEN**

El objetivo fue comparar el efecto preventivo frente al terapéutico de la administración de melatonina en una lesión isquémica en el hipocampo de ratas senescentes. Se realizó una obstrucción de la arteria cerebral media (MCAO) a ratas Wistar de 18 meses de edad. La expresión de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , GFAP, BAD, y BAX aumentó significativamente en el hipocampo tras la cirugía, mientras que los niveles de SIRT1 y Bcl2 disminuyeron. Los animales tratados con melatonina desde las 24 horas previas a la cirugía (PrevT) experimentaron un descenso significativo en los niveles de marcadores en hipocampo. Los animales del grupo tratado con melatonina sólo tras la cirugía (AT) experimentaron los mismos efectos, pero en menor magnitud que en el grupo PrevT. La melatonina se muestra

como un valioso agente terapéutico que puede proteger a la población de avanzada edad de los efectos dañinos del infarto cerebral.

**Palabras clave:** Infarto cerebral, melatonina, daño por isquemia/reperfusión, estrés oxidativo.

### **ABSTRACT**

The present study aimed to compare the effect of preventive vs. acute melatonin administration on hippocampus ischemic injury of aging rats. 18 months old Wistar rats were subjected to middle cerebral artery obstruction (MCAO). Expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , GFAP, BAD, and BAX increased significantly in hippocampus after MCAO whereas SIRT1 and Bcl2 significantly decreased. PrevT animals experienced a significant decrease in TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , BAD, and BAX. AT decreased BAD and BAX expression in the contralateral hippocampus with no effect ipsilaterally. Melatonin counteracted hippocampal decrease of SIRT1. This effect was more evident in PrevT group. Our results suggest that melatonin could be a valuable therapeutic agent that may protect the elderly from the damaging effects of brain stroke.

**Key words:** Stroke, melatonin, ischemia/reperfusion injury, oxidative stress

### **INTRODUCCIÓN**

El infarto cerebral es un accidente cerebrovascular o episodio cerebral que representa la principal causa de muerte y discapacidad a largo plazo en la población mundial. La edad es el factor de riesgo más importante asociado a esta patología, siendo considerado el marcador más significativo en el pronóstico del infarto cerebral (Rojas *et al* 2007). La inflamación y sobreproducción de radicales libres son dos mecanismos cuya implicación en la muerte y pérdida de funcionalidad neuronal ya ha sido descrita. Se prevé que la incidencia del infarto cerebral crezca sustancialmente a lo largo de los próximos diez años como resultado del envejecimiento de la población y se estima que podrá contribuir a un 6% de las patologías en 2020 (Menken *et al.*(2000). Sin embargo, habitualmente la población de avanzada edad no se ve adecuadamente representada en ensayos clínicos, lo que genera incertidumbre y desconocimiento sobre cuáles son los cuidados médicos óptimos de este grupo de pacientes (Alhusban *et al.* (2011).

La sobreproducción de radicales libres durante el infarto cerebral, asociada también a la lesión por isquemia/reperfusión, entre otros mecanismos fisiopatológicos como la apoptosis que tiene lugar en la zona adyacente a la lesión, se han mostrado como factores que contribuyen al daño y muerte neuronal (Cheung 2003). Como resultado, se ha planteado la posibilidad de que la melatonina se comporte como un fármaco neuroprotector frente al daño por

isquemia/reperfusión, a la vista de su carácter antioxidante que se opone al efecto nocivo del estrés oxidativo y los factores proapoptóticos para las células (Cheung 2003) (Reiter *et al.* 2010). Sin embargo, no se conocen en profundidad los posibles efectos de la melatonina en los pacientes de edad avanzada afectados por isquemia cerebral. Además, los estudios previos se han enfocado a una posterior etapa de reperfusión. No obstante, durante la isquemia se forma una circulación colateral que irriga parcialmente la zona afectada por la lesión. De esta manera, la lesión puede dividirse en dos zonas: en la denominada zona umbral tiene lugar la necrosis de las neuronas, mientras que en la zona de penumbra, las neuronas quedan dañadas pero no necrosadas. La capacidad de la segunda de ellas de ser reperfundida otra vez es evidente, y la melatonina, por tanto, podría ejercer sus efectos beneficiosos en ella. Sin embargo, esta posibilidad aún debe ser esclarecida en los individuos de edad avanzada.

Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que el tratamiento con melatonina puede disminuir los niveles de marcadores inflamatorios y apoptóticos en el cerebro. El objetivo de este estudio fue comparar el efecto preventivo y terapéutico de la administración de melatonina en las respuestas inflamatoria y apoptótica generadas en el hipocampo de ratas senescentes tras un bloqueo de la arteria cerebral media.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Para realizar este estudio, se sometió a ratas macho de la cepa Wistar, de 18 meses de edad, a una obstrucción de la arteria cerebral media. Los animales se dividieron en tres grupos: no tratados (NT), tratados con una dosis diaria de melatonina (10 mg/kg) desde las 24 horas previas a la intervención (PrevT) y tratados únicamente tras la cirugía durante 7 días (AT). Se recogieron muestras de hipocampo de ambos hemisferios y se midió la expresión de mRNA de interleuquina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), proteína ácida fibrilar glial (GFAP), sirtuina 1 (SIRT1), BAD, BAX y Bcl2 mediante RT-PCR.

## **RESULTADOS**

La expresión de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , GFAP, BAD, y BAX aumentó significativamente en el hipocampo, ipsilateral y contralateral, tras la cirugía, mientras que los niveles de SIRT1 y Bcl2 disminuyeron significativamente. Los animales PrevT experimentaron un descenso estadísticamente significativo en los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , BAD, y BAX en ambos hemisferios del hipocampo. Los animales del grupo AT también disminuyeron la expresión de estos marcadores, pero este descenso fue en general menor que el experimentado en el caso

del grupo PrevT. La melatonina contrarrestó el descenso de SIRT1 y Bcl2 de modo más evidente en el grupo PrevT.

## DISCUSIÓN

El infarto cerebral es un problema de salud de gran importancia tanto en los pacientes individualmente, como en la población general. La isquemia neuronal puede ocurrir de manera local (isquemia focal) cuando únicamente se ve afectado un vaso sanguíneo, o afectar al cerebro entero (isquemia global), como puede suceder durante un episodio de arritmia. Independientemente del carácter local o global del proceso, los mecanismos de daño neuronal mediados por la acción de radicales libres tienen muchos puntos en común.

El modelo más frecuentemente empleado en el estudio de la capacidad de melatonina para limitar el daño que generan los radicales libres como resultado de una isquemia es la obstrucción de la arteria cerebral media (Reiter *et al.* 2010). Dado que el proceso requiere también la oclusión de la arteria carótida primitiva, el daño no queda circunscrito al hemisferio ipsilateral, sino que afecta también al contralateral, como ya ha sido descrito con anterioridad (Crespi *et al.* 1997). En este estudio, la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , BAD y BAX aumentó significativamente en el hipocampo de ambos hemisferios (ipsilateral y contralateral a la lesión) tras la oclusión de la arteria cerebral media. Los animales de los grupos PrevT y AT, ambos tratados con melatonina, experimentaron un descenso significativo en los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en las áreas isquémicas ipsilateral y contralateral del hipocampo, aunque de modo más evidente en el grupo PrevT.

Los efectos protectores de la melatonina han sido atribuidos a la capacidad de esta indolamina de captar radicales libres, que se generan en grandes cantidades durante la isquemia/reperfusión (Reiter *et al.* 2010) (Maldonado *et al.* 2007). Nuestros resultados sugieren que la melatonina podría mediar una neuroprotección contra el daño isquémico, al menos parcialmente, mediante la inhibición de la respuesta inflamatoria asociada, ayudando a limitar la destrucción del tejido en la región afectada del cerebro (Lee *et al.* 2007).

Igualmente, la melatonina podría ayudar a reducir el daño neuronal en la lesión inducido por isquemia limitando la apoptosis. En este estudio, los animales PrevT presentaron unos niveles significativamente menores de BAD y BAX en las áreas isquémicas ipsilateral y contralateral de ambos hemisferios del hipocampo. En el grupo AT se observó el mismo efecto, pero de nuevo, este descenso fue significativamente menor que el experimentado por el grupo PrevT.

Numerosos estudios avalan la idea de que las sirtuinas podrían desempeñar un papel terapéutico en las enfermedades neurodegenerativas como el infarto cerebral o la lesión

isquémica cerebral (Raghavan *et al.* 2012). Sirtuina 1 también ha sido relacionada con reducción de la apoptosis, mientras que su inactivación parece promover la translocación de BAX desde el citosol hasta la mitocondria (Cohen *et al.* 2004). En investigaciones previas, nuestro equipo observó que la expresión de sirtuina 1 se reducía en el giro dentado de ratas de edad avanzada y su expresión se incrementaba tras el tratamiento con melatonina (Kireev *et al.* 2013). En el presente estudio, también pudo comprobarse que la melatonina es capaz de contrarrestar el descenso en los niveles de sirtuina 1 en el hipocampo debido al bloqueo de la arteria cerebral media. Estos resultados apoyan datos previos que sugerían que la melatonina era capaz de incrementar la desacetilación de los sustratos de sirtuina 1 y tenía un efecto estimulador en su vía de acción (Sarlak *et al.* 2013).

## CONCLUSIÓN

A la luz de los presentes resultados, la melatonina se presenta como un valioso agente terapéutico que podría proteger a la población de avanzada edad de los efectos dañinos del infarto cerebral, pudiendo también contribuir a prevenir la extensión de la lesión.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alhusban A, Fagan SC. Secondary prevention of stroke in the elderly: a review of the evidence. *Am J Geriatr Pharmacother.* 9:143-152
- Cheung RT. 2003. The utility of melatonin in reducing cerebral damage resulting from ischemia and reperfusion. *J Pineal Res.* 34:153-160
- Cohen HY, Lavu S, Bitterman KJ, et al. 2004. Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell.* 13:627-638
- Crespi F, Pietra C. 1997. Middle cerebral artery occlusion alters neurotransmitter activities in ipsilateral and contralateral rat brain regions: an ex vivo voltammetric study. *Neurosci Lett.* 230:77-80
- Kireev RA, Vara E, Tresguerres JA. . 2013. Growth hormone and melatonin prevent age-related alteration in apoptosis processes in the dentate gyrus of male rats. *Biogerontology;* 14:431-442
- Lee MY, Kuan YH, Chen HY, et al. 2007. Intravenous administration of melatonin reduces the intracerebral cellular inflammatory response following transient focal cerebral ischemia in rats. *J Pineal Res.* 42:297-309
- Maldonado MD, Murillo-Cabezas F, Terron MP, et al. 2007. The potential of melatonin in reducing morbidity-mortality after craniocerebral trauma. *J Pineal Res.* 42:1-11

- Menken M, Munsat TL, Toole JF. 2000. The global burden of disease study: implications for neurology. *Arch Neurol.* 57:418-420
- Raghavan A, Shah ZA. 2012. Sirtuins in neurodegenerative diseases: a biological-chemical perspective. *Neurodegener Dis.* 9:1-10
- Reiter RJ, Tan DX, Fuentes-Broto L, Paredes SD, Sanchez-Barcelo E, Mediavilla MD 2010. Melatonin salvages neural tissue from ischemia/reperfusion injury. *The Open Neuroendocrinol J.* 3:112-120
- Rojas JI, Zurrú MC, Romano M, Patrucco L, Cristiano E. 2007. Acute ischemic stroke and transient ischemic attack in the very old--risk factor profile and stroke subtype between patients older than 80 years and patients aged less than 80 years. *Eur J Neurol.* 14:895-899
- Sarlak G, Jenwitheesuk A, Chetsawang B, Govitrapong P. 2013. Effects of melatonin on nervous system aging: neurogenesis and neurodegeneration. *J Pharmacol Sci.*;123:9-240