

Scacchi Bernasconi, Pablo Antonio

*Síndrome metabólico y melatonina: estudio de
dos modelos experimentales en ratas*

Tesis de Doctorado
Facultad de Ciencias Médicas

Este documento está disponible en la Biblioteca Digital de la Universidad Católica Argentina, repositorio institucional desarrollado por la Biblioteca Central "San Benito Abad". Su objetivo es difundir y preservar la producción intelectual de la Institución.

La Biblioteca posee la autorización del autor para su divulgación en línea.

Cómo citar el documento:

Scacchi Bernasconi, PA. Síndrome metabólico y melatonina : estudio de dos modelos experimentales en ratas [en línea]. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Católica Argentina ; 2012. Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/sindrome-metabolico-melatonina-estudio-dos-modelos.pdf> [Fecha de consulta:.....]



Pontificia Universidad Católica Argentina

“Santa María de los Buenos Aires”

Facultad de Ciencias Médicas

SÍNDROME METABÓLICO Y MELATONINA: ESTUDIO DE DOS MODELOS EXPERIMENTALES EN RATAS

**Médico Pablo Antonio Scacchi
Bernasconi**

Director: Dr. Daniel P. Cardinali

**TRABAJO TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN
CIENCIAS BIOMÉDICAS**

Octubre de 2012

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Dr. Daniel P. Cardinali, con quien me inicié en Investigación y ser mi mentor desde entonces. Un especial agradecimiento por su generosidad y predisposición para compartir sus conocimientos, su tiempo y experiencia en la investigación.

A mi compañera y esposa Elsa por estar a mi lado en los momentos en que el estudio y el trabajo ocuparon mi tiempo y esfuerzo.

A mi hija Milagros por 10 meses de su alegría y fuente de inspiración.

A mis padres, Pablo y María Teresa por haber prestado su ayuda siempre que fuera necesario.

A las Dras. María Roxana Reynoso y Nancy Cardoso, que me ayudaron con las tareas de Investigación y las mediciones realizadas.

A mis colegas de la Universidad Complutense de Madrid, Dras. Ana Esquifino, María Ríos-Lugo, Pilar Cano, Vanesa Jiménez-Ortega y Pilar Fernández-Mateos, por su generosidad para compartir resultados en el proyecto conjunto que llevamos a cabo.

A los Drs Osvaldo Ponzo y Silvia Carbone por todo el tiempo compartido en el laboratorio, por su comprensión y paciencia.

A mis compañeros Dres. Horacio Romeo y Eleonora Pagano y al resto del personal docente y no docente de la Facultad de Ciencias Médicas de la UCA.

A Pablo Cepero, por su inestimable tarea en los bioterios de la Universidad.

Este Trabajo de Tesis fue llevado a cabo con ayuda de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), Argentina (PICT 2007 1045) y la Universidad de Buenos Aires (M 006 y M048). Durante los años 2005-2009, el Doctorando fue Becario Doctoral de la ANPCyT y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Distintas partes de este Trabajo de Tesis han sido comunicadas parcialmente en las siguientes publicaciones y reuniones científicas:

1. Melatonin effect on plasma adiponectin, leptin, insulin, glucose, triglycerides and cholesterol in normal and high fat-fed rats. M.J. Ríos-Lugo, P. Cano, V. Jiménez-Ortega, M. P. Fernández-Mateos, P. A. Scacchi, D. P. Cardinali, A. I. Esquifino. **Journal of Pineal Research** 49:342–348; 2010
2. Effect of a high-fat diet on 24-hour pattern in expression of prolactin and redox pathway enzymes in the rat adenohypophysis. P. Cano, D.P. Cardinali, V. Jiménez-Ortega, M.J. Ríos-Lugo, P.A. Scacchi, A. I. Esquifino. **The Open Obesity Journal** 2: 1-9; 2010
3. Chronophysiology of melatonin: therapeutical implications. D. P. Cardinali, P. A. Scacchi. **The Open Neuroendocrinology Journal** 3, 72-84; 2010.
4. Cadmium-induced disruption in 24-h expression of clock and redox enzyme genes in rat medial basal hypothalamus: Prevention by melatonin. V. Jiménez-Ortega, P. Cano-Barquilla, P. A. Scacchi, D. P. Cardinali, A. I. Esquifino. **Frontiers in Neurology (Sleep and Chronobiology)** 2011 Mar 16;2: art13, 1-9

5. Effect of cadmium on 24-hour pattern in expression of redox enzyme and clock genes in medial basal hypothalamus. V. Jiménez-Ortega, D.P. Cardinali, M.P. Fernández-Mateos, M J Ríos-Lugo, P.A. Scacchi, A.I. Esquifino. **Biomaterials** 23 (2):327–337; 2010
6. Process starzenia, melatonina I choroby zwyrodnieniowe układu nerwowego. D. P. Cardinali, A. M. Furio, Luis I. Brusco, P. A. Scacchi Bernasconi. En: **Aspekty Medyczne starzenia się człowieka** M. Karasek (ed), Lódzkie Towarzystwo Naukowe, Łódź, ISBN 978-83-60655-20-7, 2008, pp. 299-331
7. Disrupted chronobiology of sleep and cytoprotection in obesity: possible therapeutic value of melatonin. D.P. Cardinali, E.S. Pagano, P.A. Scacchi Bernasconi, R. Reynoso, P. Scacchi. **Neuroendocrinology Letters** 32(5):588–606, 2011.
8. Melatonin and mitochondrial dysfunction in the central nervous system. D.P. Cardinali, E.S. Pagano, P.A. Scacchi Bernasconi, R. Reynoso, P. Scacchi. **Hormones and Behavior** Early Online (2012) DOI: 10.1016/j.yhbeh.2012.02.0207.
9. LIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del Plata, noviembre de 2011. Alteraciones del eje reproductor en el síndrome metabólico. Efecto de la administración de melatonina. Cardoso N., Scacchi Bernasconi P, Cardinali DP, Scacchi P, Reynoso R. (publicado en **Medicina Buenos Aires** vol 71 suppl III (2011) 106)
10. VIII Congreso Argentino y VII Congreso Latinoamericano de Endocrinología Clínica. Sociedad Argentina de Ginecología y Reproducción. Buenos Aires, abril de 2012. Alteración de la función reproductiva en ratas con Síndrome metabólico. Efectos de la administración de melatonina. Cardoso, N., Scacchi Bernasconi, P. A., Cardinali, D.P., Pandolfi, M, Molaro, N, Scacchi, P., Reynoso, M.R.

TABLA DE CONTENIDO

Agradecimientos	2
Resumen.....	7
Abstract	8
Abreviaturas empleadas	9
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1. Síndrome Metabólico.....	14
1.1.1. Características	14
1.1.2. Fisiopatología del SM	17
1.1.3. Vínculo entre el SM y la alteración de los ritmos circadianos	21
1.1.4. Evolución y comorbilidades del SM.....	23
1.1.5. Modelos animales de SM	24
1.2. Melatonina	26
1.2.1. Biología básica de la melatonina.....	26
1.2.2. Síntesis de melatonina	27
1.2.3. Pleiotropía de la melatonina	28
1.3. SM y Melatonina	41
1.4. Objetivos y Diseño Experimental del Trabajo de Tesis	44
1.5. Construcción de la Hipótesis del Trabajo de Tesis	45
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
2.1. Animales.....	47
2.1.1. Producción del SM por dieta rica en grasa.....	47
2.1.2. producción de SM por dieta rica en fructosa.....	47
2.1.3. Administración de melatonina	48
2.1.4. Determinación de la presión arterial sistólica.....	48

2.1.5. Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal	48
2.2. Procedimientos bioquímicos.....	48
2.2.1. Colesterol total.....	48
2.2.2. Colesterol HDL.....	49
2.2.3. Colesterol LDL.....	51
2.2.4. Triglicéridos	52
2.2.5. Creatinina	53
2.2.6. Ácido úrico.....	54
2.2.7. Urea	55
2.2.8. Testosterona	56
2.2.9. LH y FSH.....	57
2.2.10. Melatonina	59
2.2.11. Insulina, leptina y adiponectina	60
2.3. Procedimientos estadísticos	62
3. Resultados	63
3.1. Objetivo de la Parte 1.....	63
3.1.1. Parámetros somáticos y bioquímicos en el SM establecido luego de una dieta rica en grasas.....	63
3.1.3. Cambios en el eje hipófiso-gonadal del SM establecido producido por una dieta rica en grasas.....	68
3.1.4. Cambios en el eje hipófiso-gonadal del SM establecido producido por fructosa.....	68
3.2. Objetivo de la Parte 2.....	70
3.2.1. Niveles de melatonina obtenidos luego su administración en el agua de bebida....	70
3.2.2. Efecto de la melatonina sobre parámetros somáticos y bioquímicos en el SM establecido luego de una dieta rica en grasas	71
3.2.3. Efecto de la melatonina sobre parámetros somáticos y bioquímicos en el SM establecido luego de la administración de fructosa	72
3.2.3. Efecto de la melatonina sobre las secuelas hipófiso-gonadales del SM establecido producido por una dieta rica en grasas.....	75

3.2.4. Efecto de la melatonina sobre las secuelas hipófiso-gonadales del SM establecido producido por fructosa	77
3.3. Objetivo de la Parte 3.....	78
3.3.1. Comparación de parámetros somáticos y bioquímicos en el SM incipiente vs. SM constituido por administración de fructosa.....	78
3.3.2. Efecto de la melatonina sobre parámetros somáticos y bioquímicos en el SM incipiente por administración de fructosa	82
3.4. Objetivo de la Parte 4.....	84
3.4.1. Efecto de la melatonina sobre los ritmos circadianos de adiponectina, leptina, insulina, glucosa, triglicéridos y colesterol en plasma de ratas normales	84
3.4.2. Eficacia de la melatonina para normalizar la alteración de los ritmos circadianos de adiponectina, leptina, insulina, glucosa, triglicéridos y colesterol en el SM de ratas con dieta hipergrasa	84
4. DISCUSIÓN.....	89
5. CONCLUSIONES	97
6. REFERENCIAS.....	98

RESUMEN

El presente Trabajo de Tesis persiguió analizar y comparar algunas de las secuelas del síndrome metabólico (SM) en dos modelos experimentales en ratas, la ingesta de una dieta hipergrasa y la administración de fructosa en el agua de bebida. La comparación de distintos parámetros del SM en ambos modelos experimentales indicó que comparten secuelas somáticas y bioquímicas relevantes como el aumento de peso corporal y de la PA sistólica, la intolerancia a una sobrecarga de glucosa indicativa de una anormalmente alta resistencia a la insulina y cambios en analitos usados en clínica para el diagnóstico de SM tales como la hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hiperuricemia y el aumento en colesterol-LDL.

Pudo verificarse que tanto en el SM por ingesta de una dieta rica en grasa como en el producido por la administración de fructosa se detecta una inhibición del eje hipófiso-gonadal de origen testicular, indicado por la inhibición de la secreción de testosterona en presencia de niveles anormalmente elevados de LH circulante. Se analizó también la evolución del SM mediante el estudio de las etapas incipiente y establecida del SM por administración de fructosa, verificándose que existe una etapa inicial de mayor tolerancia a una sobrecarga de glucosa (indicativa de menor resistencia a la insulina), que coexiste con un aumento de PA sistólica y un desarrollo parcial de secuelas dislipémicas (hipercolesterolemia). En el SM por dieta rica en grasas se producen alteraciones en los ritmos diarios de adiponectina, leptina, insulina, glucosa, triglicéridos y colesterol plasmáticos, compatibles con un relevante efecto de la dieta en la sincronización del sistema circadiano.

En vista de que la melatonina combina propiedades cronobióticas y citoprotectoras que pueden ser de relevancia en la prevención y el tratamiento del SM estudiamos distintos aspectos de la actividad de la melatonina en los dos modelos experimentales citados. La administración concomitante de melatonina en el agua de bebida fue eficaz para revertir los aumentos de peso y de PA sistólica, la anormal resistencia a la insulina, la dislipemia y la hiperuricemia que se producen tanto en el SM por ingesta de una dieta rica en grasa como en el producido por la administración de fructosa. Este efecto correctivo de la melatonina es ya evidente en la etapa inicial de sensibilidad aumentada a la insulina que se observa en el SM incipiente por administración de 5% de fructosa.

La melatonina no corrigió la inhibición del eje hipófiso-gonadal de origen testicular en el SM y mostró una actividad inhibitoria de la síntesis de testosterona cuando se administró a ratas con dieta normal. La melatonina fue eficaz para normalizar las alteraciones en los ritmos diarios de adipocitoquinas y señales metabólicas circulantes que se observan en el SM.

En conclusión, debido a sus efectos sobre el sistema circadiano y a sus potentes propiedades citoprotectoras la melatonina puede ser de utilidad terapéutica en el SM.

ABSTRACT

The objective of this Doctoral Thesis work was to analyze and to compare some of the consequences of metabolic syndrome (MS) in two experimental models, i.e. rats eating a high fat diet and rats drinking a high fructose solution. The comparison of various parameters of the MS in both experimental models indicated that they share relevant biochemical sequelae such as increased body weight and abnormally high systolic blood pressure, impaired glucose overload (indicative of an abnormally high insulin resistance) and changes in analytes used clinically for the diagnosis of MS like hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia, hyperuricemia and increased cholesterol-LDL. In both types of MS an inhibition of the pituitary-gonadal axis at the testicular level was detectable, as indicated by the inhibition of the secretion of testosterone in the presence of abnormally high circulating LH.

We also analyzed the development of MS by studying the early stage and the established stage of MS brought about by fructose administration, verifying that initially there is a higher tolerance to a glucose load (indicative of lower insulin resistance), which coexists with an increased systolic and partial development of dyslipidemic sequelae (hypercholesterolemia). In the established MS following a high fat diet, alterations of daily rhythms of circulating adiponectin, leptin, insulin, glucose, triglycerides and cholesterol levels were found, consistent with a significant effect of diet on the circadian timing system.

In view that melatonin combines chronobiotic and cytoprotective properties which may be relevant in the prevention and treatment of MS, the activity of melatonin in the two experimental models above cited was examined. The concomitant administration of melatonin in the drinking water was effective in reversing the increase in weight and systolic BP, abnormal insulin resistance, dyslipidemia and hyperuricemia occurring both in MS. The corrective effect of melatonin was already evident at the initial stage of increased insulin sensitivity after the administration of 5% fructose. Melatonin did not correct the inhibition of the pituitary-gonadal axis in MS; rather it showed an inhibitory activity per se on testosterone synthesis in rats fed with a normal diet. Melatonin was effective to normalize the disrupted daily rhythms of circulating adipocytokines and metabolic signals found in MS. In conclusion, the results demonstrate that due to its effects on the circadian system and its potent cytoprotective properties, melatonin could be therapeutically useful in the MS.

ABREVIATURAS EMPLEADAS

°C: grado centígrado.

µg: microgramo.

µL: microlitro.

•OH: radical hidroxilo.

1-IRS: receptor de insulina soluble tipo 1

5-HT_{2c}: receptor de serotonina 2C.

AANAT: arilalquilamina N-acetiltransferasa.

Ac: anticuerpo.

ACTH: hormona adenocorticotropa.

ADNmt: ácido desoxirribonucleico mitocondrial.

AFMK: *N*¹-acetyl-*N*²-formyl-5-methoxykynuramine

Ag: antígeno.

AMK: *N*¹-acetyl-5-methoxy-kynuramine

AMPc: adenosinmonofosfato cíclico.

ANMAT: administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnologías Médicas.

ANOVA: análisis de la varianza.

apoB: apolipoproteína B.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

ATP: adenosíntrifosfato.

Bc: unión de la hormona marcada con el Ac.

BKCa: Canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺

Bo: unión máxima de la hormona marcada con el Ac.

c3OHM: 3-hidroximelatonina cíclica.

CaM: calmodulina.

cAMP: adenosina monofosfato cíclico.

CAT: catalasa.

CCK: colecistoquinina

cGMP: guanosil monofosfato cíclico.

CL: cardiolipina.

c-mtNOS: óxido nítrico sintasa mitocondrial constitutiva.

CO₂: dióxido de carbono.

Cholesterol-HDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad.

COX-2: ciclooxigenasa-2.

cpm: cuentas por minuto.

CREB: elemento de unión y respuesta al cAMP

CRH: hormona liberadora de ACTH.

CRP: proteína C reactiva.

CuZn SOD: cobre zinc superóxido dismutasa.

DAG: diacilglicerol.

DCFS: diclorofenolsulfonato.

dL: decilitro.

EGIR: Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina.

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

ERK: quinasa reguladas por señales extracelulares.

ES: error standard.

ETC: Cadena Transportadora de Electrones.

FDA: Food and Drug Administration.

FFA: ácido graso libre.

FOS: Framingham Offspring Study

FOSOX: fosforilación oxidativa.

FSH: hormona folículo estimulante.

g: gramo.

GABA: ácido-γ-aminobutírico.

GCS: ganglio cervical superior.

Gi: proteína G inhibidora.

glc-6-P: glucosa-6-fosfato.

GLUT2: transportador de glucosa tipo 2.

GLUT4: transportador de glucose tipo 4.

GLUT5: transportador de glucosa tipo 5.

GMPC: guanosímonofosfato cíclico.

GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas.

GPCR: receptor acoplado a la proteína G.

GPR50: Receptor acoplado a la proteína G 50.

GPx: glutatión peroxidasa.

GRD: glutatión reductasa.

GSH: Glutación

H₂O₂: peróxido de hidrógeno.

hCG: gonadotropina coriónica humana.

HCl: ácido clorhídrico.

HIOMT: hidroxindol-O-metiltransferasa

i.p.: intraperitoneal.

I: iodo

IDF: Federación Internacional de Diabetes

IDF: International Diabetes Foundation.

IL:interleuquina.

IMC: índice de masa corporal.

i-mtNOS : óxido nítrico sintasa mitocondrial inducible.

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible.

IP₃:inositol-1,4,5-tris-fosfato.

IRS-2: receptor soluble de insulina-2

Kcal/g: kilocaloría/gramo.

Kcal: kilocaloría.

Kir:canal de potasio rectificador de entrada.

LDL: lipoproteína de baja densidad.

LH: hormona luteinizante

LPL: lipasa lipoproteica

L-SAPE: esstreptoavidina-ficoeritrina.

MAP: proteína asociada a microtúbulos

mCi: microcurie.

MEK: MAP quinasa de ERK.

MFI: fluorescencia media.

mGlu3: receptor de glutamato tipo 3.

min: minuto.

mmHg: milímetros de mercurio.

mmol: milimol.

Mn-SOD: magnesio superóxido dismutasa.

MPO: mieloperoxidasa

mPT: transición de permeabilidad mitocondrial

MT₁: receptor de melatonina 1.

MT₂: receptor de melatonina 2.

MT₃: receptor de melatonina 3.

mtNOS: óxido nítrico sintasa mitocondrial.

N.S.: no significativo.

n: número.

NaClO: hipoclorito de sodio.

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido.

NCEP ATP III: Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol – 3er. Panel del Tratamiento de Adultos.

Ne: reactividad residual o no específica.

NF-κB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

ng: nanogramo

NH₄⁺: amoníaco.

NIAMDD: National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases.

NIDDK: National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases.

nm: nanómetro.

nNOS: enzima óxido nítrico sintasa neuronal

NO: óxido nítrico.

NSQ: núcleos supraquiasmáticos.

O₂•-: radical anión superóxido

OMS: Organización Mundial de la Salud.

ONOO-: peroxinitrito.

p/v: peso/volumen.

PA: presión arterial.

pAANAT: arilalquilamina N-acetiltransferasa fosforilada.

PAI-1: inhibidor de activador del plasminógeno.

pg: picogramo.

PG: prostaglandina.

PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa.

PKA: fosfoquinasa A.

PKB: fosfoquinasa B.

PKC: fosfoquinasa C.

PLC: Fosfolipasa C.

PNPP: p-nitrofenil fosfato.

PT: parstuberis de la hipófisis anterior.

QR2:quinona reductasa 2.

Raf: homólogo de quinasa retroviral, producto del oncogén v-raf.

RIA: radioinmunoanálisis.

RNS: especies reactivas de nitrógeno.

ROR α : receptor huérfano asociado a RAR α .

ROS: especies reactivas de oxígeno.

rpm: revoluciones por minuto.

RZR α : receptor Z de retinoides subtipo α .

RZR β : receptor Z de retinoides subtipo β .

SIRT3: Sirtuína-3deacetilasa dependiente de NAD.

SIRT4: sirtuína-4deacetilasa dependiente de NAD

SIRT5: sirtuína-5deacetilasa dependiente de NAD.

SM: síndrome metabólico.

SNA: sistema nervioso autónomo.

SNC: sistema nervioso central.

SOD: enzima superóxido dismutasa

TG: triglicéridos.

TNF- α : factor de necrosis tumoral α .

TRH: hormona liberadora de tirotropina

TRIS: tris (hidroximetil) aminometano.

TSH: tirotropina.

U/mL: unidades / mililitro.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. SÍNDROME METABÓLICO

1.1.1. CARACTERÍSTICAS

La hipertensión, la diabetes y la obesidad son patologías comunes pero no independientes y en los seres humanos su combinación se conoce como síndrome metabólico (SM) o síndrome X o de resistencia a la insulina [1,2]. El SM afecta a un 25-30% de la población mundial. Los criterios diagnósticos para calificar al SM han evolucionado desde la definición original hecha en 1998 por la Organización Mundial de la Salud y ello traduce el número cada vez mayor de evidencias clínicas y de análisis hechos en conferencias de consenso y por organizaciones profesionales.

El SM comprende un grupo de anormalidades metabólicas que incrementan el riesgo de enfermedad cardiovascular y de diabetes mellitus. La opinión preponderante es que el SM es una consecuencia del desequilibrio dietético y de hábitos de vida más que una enfermedad genéticamente programada. El SM incluye obesidad central, resistencia a la insulina, presión arterial elevada, intolerancia a la glucosa y dislipemia [1,2]. Todos estos componentes son aceptados factores de riesgo para la enfermedad cardiovascular y la diabetes de tipo 2 [3-5].

El SM se asocia también con un mayor riesgo de patología de hígado graso no alcohólico y la disfunción renal [6,7]. Del mismo modo, existe evidencia que correlaciona al SM con la demencia y con cánceres de mama, páncreas y vejiga [7-11].

Los estilos de vida y la dieta están fuertemente implicados en la génesis del SM [5,12]. En la exploración física puede haber mayor circunferencia abdominal y aumento del nivel de la presión arterial (PA). La presencia de uno o ambos signos debe alertar al clínico a buscar otras anormalidades bioquímicas que pueden vincularse con el síndrome. Con menor frecuencia, en la exploración se identifica lipoatrofia o acantosis nigricans. Los signos físicos mencionados acompañan típicamente a la resistencia a la insulina.

Los signos principales del síndrome incluyen obesidad central, hipertrigliceridemia, disminución del colesterol de lipoproteínas de alta densidad (colesterol-HDL), hiperglucemia e hipertensión. Su definición clínica incluye la presencia de al menos tres de los siguientes elementos: circunferencia de cintura mayor a 94 cm en hombres (latinos) y 88 cm en mujeres, nivel de triglicéridos en plasma superior a 150 mg/dL, colesterol-HDL inferior a 40 mg/dL, PA de más de 130/85 mmHg y glucemia en ayunas mayor de 110 mg/dL.

La prevalencia del SM varía de un país a otro y ello refleja en parte la edad y la composición étnica de las poblaciones estudiadas y los criterios diagnósticos aplicados. En términos generales, la prevalencia de dicho síndrome aumenta con el envejecimiento. La prevalencia mayor registrada a nivel mundial corresponde a ciertos grupos indígenas estadounidenses y en ellos, en promedio, 60% de las mujeres de 45 a 49 años y 45% de los varones de la misma categoría de edad, cumplen con los criterios (Tabla 1.1).

El número de adultos con SM es sustancial y la prevalencia está aumentando en todo el mundo [13]. En 2002, la prevalencia del síndrome metabólico en los EE.UU. fue del 24% y del 23,4% en varones y mujeres, respectivamente [14,15]. En 2005 y 2006, esta prevalencia ha aumentado a un 34%, tanto en hombres como en mujeres [16]. En los EE.UU., el SM es menos frecuente en afroamericanos que en latinos. No hay diferencias de sexo en cuanto a su incidencia en los EE.UU. [16] mientras que en Singapur y Australia existe mayor proporción de mujeres [17,18].

En el Japón ocurre predominante en los hombres [19]. En Francia, la cohorte de 30 a 64 años de edad presenta una prevalencia <10% para cada sexo, si bien 17.5% están afectados entre los 60 y 64 años.

La industrialización creciente a nivel mundial se acompaña de cifras cada vez mayores de obesidad, que según cálculos, aumenta extraordinariamente la prevalencia del SM, en particular cuando la población envejece. Además, la prevalencia y la intensidad cada vez mayores de la obesidad en niños constituyen signos preliminares del SM en poblaciones más jóvenes.

La incidencia de SM en la región se calcula en 32 – 34% siendo la prevalencia consistente entre países. En términos generales puede afirmarse que una de cada tres o cuatro personas mayores de 20 años cumple en América Latina criterios para el diagnóstico de SM. Esta prevalencia aumenta con la edad, es un poco más frecuente en mujeres y se ha incrementado en la última década. Tal comportamiento epidémico puede ser explicado por la participación de diversos factores como son la reducción de las horas de sueño, los cambios en el estilo de vida incluyendo el proceso de urbanización, envejecimiento de la población y la malnutrición materno-infantil.

En Argentina, la población total según censo del 2010 es de 40.091.359 habitantes. Con estos datos, existirían en nuestro país unos 13.300.000 afectados por el SM. Según el censo de 2010, el total de habitantes mayores de 60 años es de 5 813 247 (el 14.5% de la población). Puede estimarse que para el 2050 uno de cada tres argentinos tendrá más de 60 años y por lo tanto

Tabla 1.1. Diferentes definiciones de síndrome metabólico. EGIR, Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina; NCEP ATP III, Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol – 3er. Panel del Tratamiento de Adultos; IDF, Federación Internacional de Diabetes

Diferentes Definiciones de Síndrome Metabólico

OMS (1999)	EGIT (1999)	NCEP ATP III (2001)	IDF (2005)
Diabetes o tolerancia disminuida a la glucosa o resistencia a la insulina, más 2 o más de los que siguen:	Resistencia a la insulina o hiperinsulinemia (en no diabéticos) más 2 o más de los que siguen:	Tres o más de los que siguen:	Perímetro abdominal (corregido por grupo étnico), más 2 o más de los que siguen:
IMC > 30 kg/m ² o relación cintura cadera > 0.9 en los hombres, > 0.85 en mujeres.	Perímetro abdominal: > 94 cm en hombre, ≥ 80 cm en mujeres	Perímetro abdominal: > 102 cm en hombre, ≥ 88 cm en mujeres	
Triglicéridos ≥ 1.7 mmol/L	Triglicéridos: > 2 mmol/L	Triglicéridos: > 1.7 mmol/L	Triglicéridos: > 1.7 mmol/L
Colesterol-HDL < 0.9 mmol/L en hombre, < 1,0 mmol/L en mujeres.	Colesterol-HDL: < 1.0 mmol/L	Colesterol-HDL < 1.03 mmol/L en hombre, < 1,29 mmol/L en mujeres.	Colesterol-HDL < 1.03 mmol/L en hombre, < 1,29 mmol/L en mujeres.
PA: ≥140/90 mmHg o medicado	PA: ≥ 140/90 mmHg o medicado	PA: ≥ 130/85 mmHg o medicado	PA: ≥ 130/85 mmHg o medicado
Excreción de albúmina urinaria ≥ 2 µg/min o relación albúmina: creatinina > 30 mg/g	Glucemia en ayunas: > 6.1 mmol/L	Glucemia en ayunas: > 6.1 mmol/L	Glucemia en ayunas: > 5.6 mmol/L o diabetes tipo 2.

aumentará más aún la incidencia de SM. Organismos como la OMS ya han alertado sobre las posibles consecuencias de este hecho y urgen a los gobiernos a tomar medidas que reduzcan el impacto socio-sanitario de esta situación.

Estos datos remarcan la tremenda importancia que en el sector socio-económico y productivo tiene el diagnóstico y prevención adecuados del SM y sus comorbilidades.

Uno de los factores que epidemiológicamente se han vinculado con la prevalencia del SM es la reducción de horas de sueño en la sociedad actual. Existe un vínculo demostrable entre la privación de sueño y un mayor riesgo de obesidad, diabetes y enfermedad cardiovascular [20-25].

Los adultos mayores son un grupo particularmente vulnerable en este aspecto: hay más de 80% de comorbilidad entre las alteraciones del ritmo sueño/vigilia, obesidad, diabetes, isquemia cerebral, enfermedad cardíaca, deterioro cognitivo y depresión [24]. El vínculo entre el SM y la demencia es tal que se ha acuñado el término de “diabetes tipo 3” para describir a esta nueva situación [11].

En los comienzos del siglo XX se planteó la primera descripción del SM, pero la epidemia mundial de sobrepeso/obesidad ha sido el elemento que impulsó la caracterización más reciente del síndrome. La adiposidad abdominal (central) es el signo patognomónico del SM y traduce el hecho de que la prevalencia del mismo depende de la relación íntima entre la circunferencia abdominal y mayor adiposidad. Sin embargo, a pesar de la importancia de la obesidad, algunas personas con peso normal también pueden mostrar resistencia a la insulina y presentar SM [12,13,17].

La inactividad física es un factor predisponente de enfermedades cardiovasculares y de la mortalidad que conllevan. Muchos componentes del SM se vinculan con la vida sedentaria, como son el incremento del tejido adiposo (predominantemente abdominal), la disminución del nivel de colesterol-HDL y una tendencia a la hipertrigliceridemia, con una mayor PA e hiperglucemia en individuos genéticamente susceptibles.

En comparación con personas que miran la televisión o videos o utilizaron su computadora por menos de 1 h al día, las que realizaron las actividades mencionadas por más de 4 h diarias tuvieron un riesgo dos veces mayor de presentar el SM [2,5,6].

La diabetes mellitus está incluida en las definiciones del SM tanto de NCEP como de la International Diabetes Foundation (IDF) (Tabla 1.1). Se ha estimado que la mayoría de los pacientes (en promedio, 75%) con diabetes de tipo 2 o con intolerancia a la glucosa presentan SM [4].

Existe una mayor prevalencia de enfermedad cardiovascular en personas con diabetes de tipo 2 o intolerancia a la glucosa. La prevalencia aproximada del SM en personas con cardiopatía coronaria es de 50%, y la prevalencia con dicha cardiopatía en su forma precoz es de 37% (personas de 45 años o menores), particularmente en mujeres [3,5]. Con la rehabilitación cardíaca adecuada y los cambios en el modo de vida (p. ej., nutrición, actividad física, disminución ponderal y en algunos casos el uso de fármacos), es posible disminuir la prevalencia del SM.

Los trastornos lipodistróficos, en términos generales, se vinculan con el SM. Las formas genética (p. ej., la lipodistrofia congénita de Berardinelli-Seip) y adquirida (p. ej., la vinculada con virus de VIH en personas tratadas con antirretrovíricos de alta eficacia) pueden originar una enorme resistencia a la insulina y muchos de los componentes del SM [26].

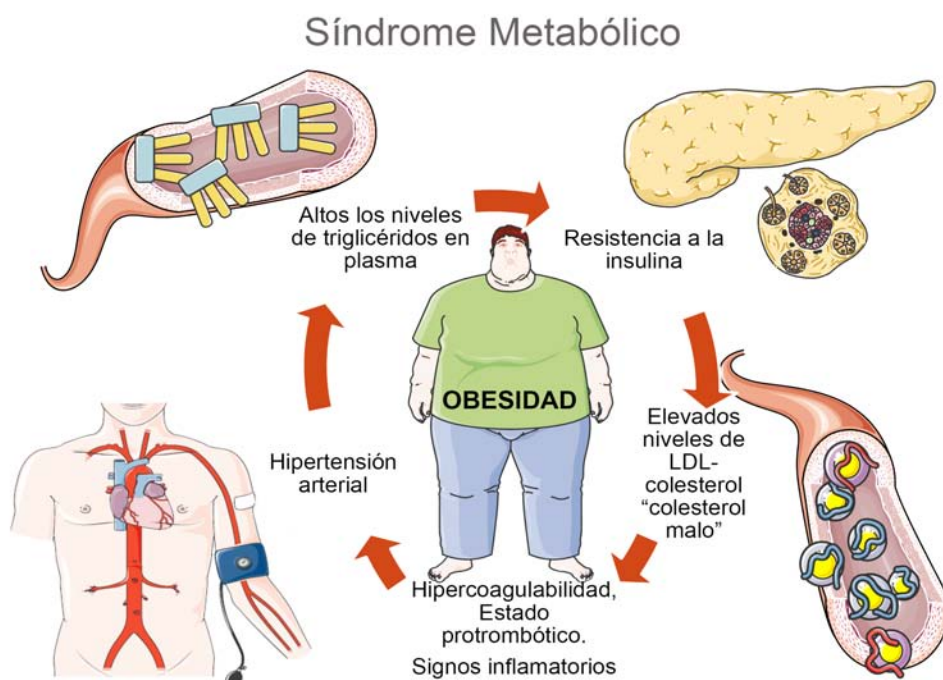


Fig. 1.1. SM. Principales características.

La hipótesis más aceptada y unificadora para describir los aspectos fisiopatológicos del síndrome incluye la resistencia a la insulina, causada por un defecto no totalmente esclarecido en la acción de dicha hormona (Fig. 1.1 y 1.2) [1,4]. El comienzo de la resistencia mencionada es antecedido de hiperinsulinemia postprandial, seguido de hiperinsulinemia en el ayuno y por último hiperglucemia. Uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral es caracterizar en un modelo animal aceptado de SM (la administración de fructosa) las etapas tempranas del desarrollo del SM.

Un elemento temprano e importante que contribuye a la aparición de la resistencia a la insulina es el aumento de triglicéridos y la abundancia de ácidos grasos libres (FFA) circulantes (Fig. 1.1 y 1.2). Los FFA unidos a la albúmina plasmática provienen predominantemente de las reservas de triglicéridos de tejido adiposo y son liberados por la lipasa hormono sensible. Los FFA también son producidos por lipólisis de lipoproteínas con abundantes triglicéridos en tejidos, por acción de la lipasa lipoproteica (LPL). La insulina media la acción antilipolítica y la estimulación de LPL en tejido adiposo [1,4].

Como aspecto destacable, la inhibición de la lipólisis en el tejido adiposo constituye la vía más sensible de la acción de la insulina. De este modo, al surgir resistencia a la insulina, el incremento de la lipólisis genera más FFA y ello a su vez disminuye el efecto antilipolítico de la insulina. El exceso de FFA incrementa la disponibilidad del sustrato y genera resistencia a la insulina al modificar las señales ulteriores. Los FFA disminuyen la captación de glucosa mediada por insulina y se acumulan en la forma de triglicéridos en músculos de fibra estriada y miocardio, en tanto que en el hígado aumenta la producción de glucosa y la acumulación de triglicéridos [4,12,26,27].

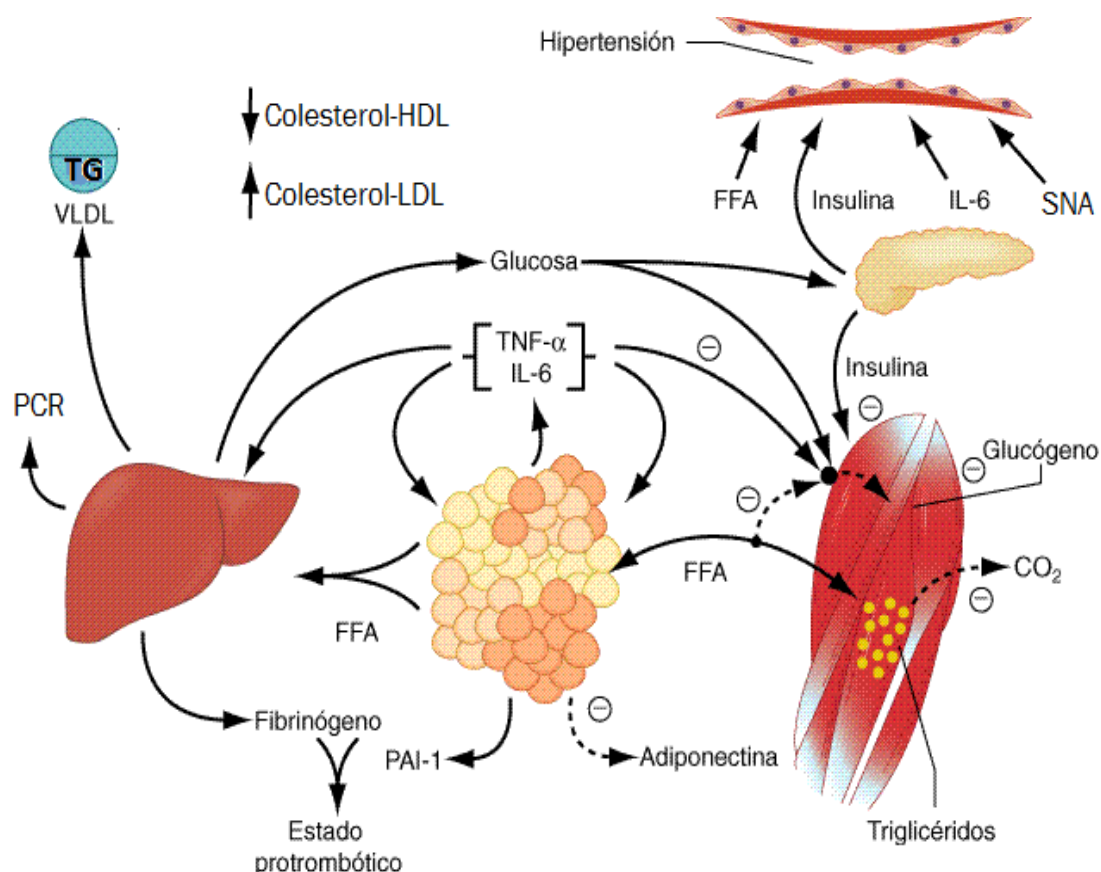


Fig. 1.2. Fisiopatología del SM. Los FFA son liberados abundantemente a partir de la masa total de tejido adiposo. En el hígado, la presencia de FFA hace que aumente la producción de glucosa, triglicéridos y se secreten VLDL. Las anomalías concomitantes en los lípidos/lipoproteínas incluyen disminución del colesterol-HDL y aumento de colesterol-LDL. Los FFA también disminuyen la sensibilidad a la insulina en los músculos al inhibir la captación de glucosa. Otros defectos coexistentes comprenden una mayor acumulación de lípidos en triglicéridos (TG). Los incrementos en la glucosa circulante hacen que aumente la secreción de insulina por el páncreas y con ello surge hiperinsulinemia; esta última estimula la reabsorción de sodio y aumenta la actividad del sistema nervioso autónomo (SNA) con hipertensión arterial. Existe un estado proinflamatorio que contribuye a la resistencia a la insulina. Las citoquinas y los FFA también aumentan la producción de fibrinógeno por el hígado y la producción de inhibidor del PAI-1 por adipocitos, todo lo cual origina un estado protrombótico. También se estimula la producción de PCR.

Los FFA son liberados abundantemente a partir de la masa total de tejido adiposo. En el hígado, la presencia de dichos ácidos hace que aumente la producción de glucosa, triglicéridos y se secreten lipoproteínas de muy baja densidad. Las anomalías concomitantes en los lípidos/lipoproteínas incluyen disminución del colesterol-HDL y un incremento en el nivel de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Los FFA también disminuyen la sensibilidad a la insulina en los músculos al inhibir la captación de glucosa mediada por la hormona [4,12,26,27].

Otros defectos coexistentes comprenden disminución en la síntesis de glucógeno y una mayor acumulación de lípidos en triglicéridos. Los incrementos en la glucosa circulante hacen que aumente la secreción de insulina por el páncreas y con ello surge hiperinsulinemia; esta última puede hacer que se intensifique la reabsorción de sodio y también aumente la actividad del sistema nervioso simpático y contribuya a la hipertensión y que aumenten los niveles de FFA circulantes (Figuras 1.1 y 1.2). Experimentalmente se ha descrito un desbalance autonómico de los territorios abdominal y tóraco-muscular en el SM con predominio parasimpático abdominal y simpático en tórax y musculatura esquelética [28] (Fig. 1.3). El resultado es la hipertensión, aumento de la resistencia a la insulina y obesidad abdominal (Fig. 1.1 y 1.2).

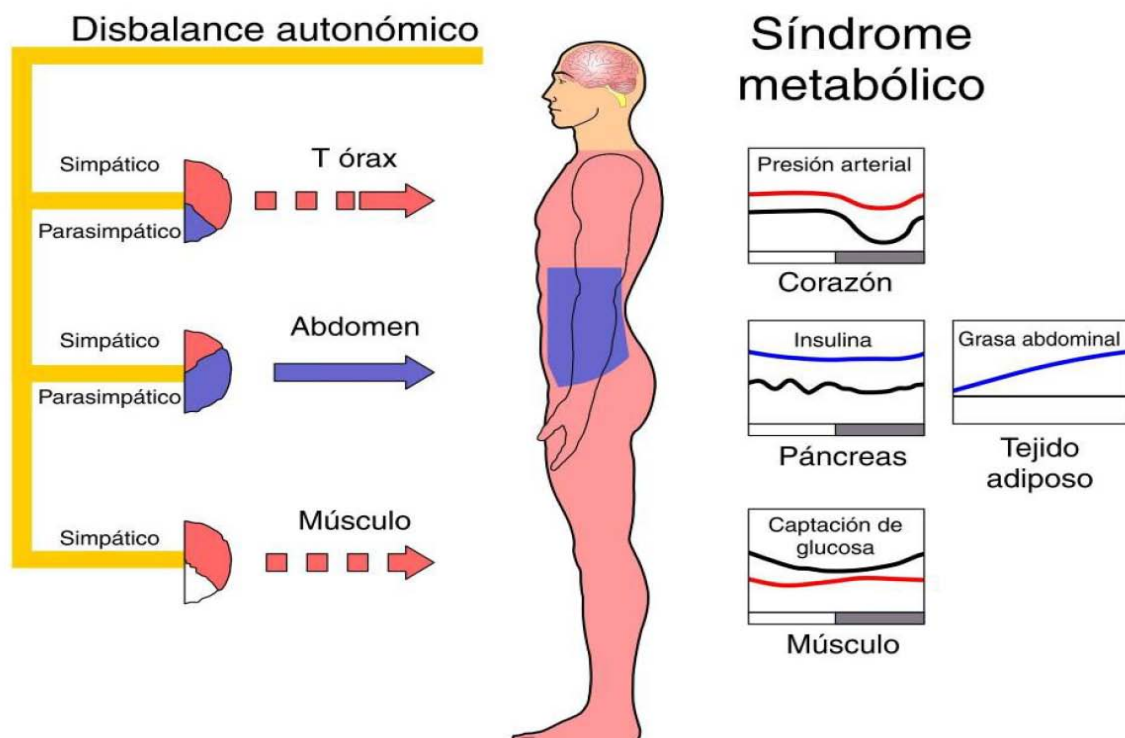


Fig. 1.3. Organización circadiana de la respuesta autonómica. Cambios en el SM.

El estado proinflamatorio se sobreañade y contribuye a la resistencia a la insulina [29-31]. La mayor secreción de interleuquina (IL)-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) generado por adipocitos y macrófagos derivados de monocitos intensifican la resistencia a la insulina y la lipólisis de los depósitos de triglicéridos en tejido adiposo, que se transforman en FFA circulantes. IL-6 y otras citoquinas proinflamatorias también intensifican la producción de glucosa por el hígado, la producción de LDL y la resistencia a la insulina en los músculos. Las citoquinas y los FFA también aumentan la producción de fibrinógeno por el hígado y la producción de inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI-1) por adipocitos, todo lo cual origina un estado protrombótico (Fig. 1.1 y 1.2). Los niveles mayores de citoquinas circulantes también estimulan la producción de proteína C reactiva (PCR) por el hígado. La menor producción de la adiponectina, un producto del tejido adiposo de acción antiinflamatoria y sensibilizante a la insulina, también es parte del SM [29-31].

La hipótesis de la agresión oxidativa (estrés) permite contar con una teoría unificadora del envejecimiento y la predisposición al SM. En investigaciones hechas en sujetos insulinoresistentes obesos o con diabetes de tipo 2, en los hijos de pacientes de diabetes de tipo 2 y en los ancianos, se identificó un defecto en la fosforilación oxidativa (FOSOX) de mitocondrias que permitió la acumulación de triglicéridos y moléculas lipídicas similares en el músculo. La acumulación de lípidos en el músculo se vinculó con la resistencia a la insulina [4,12,31,32].

En el SM la circunferencia abdominal es un componente importante de los criterios diagnósticos recientes y aplicados a menudo (Tabla 1.1) [17]. Sin embargo, la medición de tal circunferencia no permite diferenciar con certeza entre una gran cintura por incremento en el tejido adiposo subcutáneo, y la grasa visceral; tal diferenciación obliga a utilizar tomografía computada o imágenes por resonancia magnética.

Al aumentar el tejido adiposo en vísceras, los FFA provenientes de tal tejido se canalizan al hígado. Por otra parte, el incremento en la grasa subcutánea abdominal hace que se liberen productos de lipólisis a la circulación general y se eviten efectos más directos en el metabolismo del hígado.

En términos generales, la llegada de FFA al hígado se acompaña de una mayor producción de lipoproteínas de baja densidad (LDL) con abundantes triglicéridos y que contienen apoB. La participación de la insulina en tal proceso es compleja, pero la hipertrigliceridemia es un marcador excelente del cuadro de resistencia a la insulina [4,12,17] (Fig. 1.1 y 1.2).

La otra perturbación de lipoproteínas importantes en el SM es la disminución del nivel de colesterol-HDL; tal disminución es consecuencia de cambios en la composición y el metabolismo de HDL (Fig. 1.2). En presencia de hipertrigliceridemia, la disminución del contenido de colesterol-HDL es consecuencia de un menor contenido de éster de colesterol del centro lipoproteico, en combinación con alteraciones mediadas por la proteína de transferencia de dicho éster en triglicéridos, de tal manera que las partículas se tornan pequeñas y densas.

Dicho cambio en la composición de lipoproteínas también origina una mayor eliminación de HDL de la circulación. Las relaciones de tales cambios de HDL con la resistencia a la insulina posiblemente sean indirectas, y surjan asociadamente con las modificaciones en el metabolismo de lipoproteínas ricas en triglicéridos [4,12,17].

Además de HDL, se modifica la composición de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Cuando el nivel de triglicéridos séricos en el ayuno es alto casi siempre predominan las lipoproteínas de baja densidad densas pequeñas. Dichas lipoproteínas de baja densidad pequeñas son más aterógenas. Pueden ser tóxicas para el endotelio y transitar a través de la membrana basal de dicha capa y adherirse a los glucosaminoglucanos. También muestran una mayor susceptibilidad a la oxidación y a ligarse selectivamente a receptores antioxidantes que están en los macrófagos derivados de monocitos. Los pacientes con un incremento en el nivel de las partículas de LDL densas pequeñas e hipertrigliceridemia también tienen un mayor contenido de colesterol-LDL; estas partículas también pueden contribuir al riesgo aterógeno en individuos con SM.

Los defectos en la acción de la insulina hacen que disminuya la supresión de la producción de glucosa por parte del hígado y el riñón y haya una menor captación y metabolismo de dicho carbohidrato en tejidos sensibles a la insulina como el músculo y la grasa corporal [4,12]. La relación entre el trastorno de la glucosa en ayunas o de la tolerancia a dicho carbohidrato y la resistencia a la insulina ha sido un hecho perfectamente corroborado en estudios en seres humanos, primates y roedores. Para compensar los defectos en la acción de la insulina, es necesario modificar la secreción, la eliminación (o ambos fenómenos) de la hormona, para lograr la euglucemia sostenida. Por último, si es ineficaz dicho mecanismo compensador, por defectos en la secreción de insulina, el resultado sería una "progresión" hasta llegar a la diabetes mellitus (Fig. 1.1 y 1.2).

Es un hecho confirmado la relación entre la resistencia a la insulina y la hipertensión [3,5]. Como aspecto paradójico, en situaciones normales fisiológicas la insulina es un vasodilatador que ejerce efectos secundarios en la reabsorción de sodio por el riñón. En el marco de la resistencia a insulina se pierde su efecto vasodilatador, pero se conserva el efecto renal en la reabsorción de sodio.

Por último, la resistencia a la insulina se caracteriza por los trastornos y disminución específicos de vías en las señales de 3-quinasa de fosfatidilinositol. En el endotelio ello puede originar un desequilibrio entre la producción de óxido nítrico y la secreción de endotelina 1, de tal forma que disminuya la corriente sanguínea.

Los incrementos en las citoquinas proinflamatorias, que incluyen IL 1, IL-6, IL-18, resistina, TNF- α y PCR, reflejan su producción excesiva con la mayor masa de tejido adiposo [29-31]. Los macrófagos provenientes de tejido adiposo parecen ser las fuentes primarias de citoquinas proinflamatorias a nivel local y en la circulación general. Sin embargo, para tales citoquinas no se conoce con certeza la fracción de la resistencia insulínica causada por los efectos paracrinós en comparación con los endocrinos (Fig. 1.2).

La adiponectina es una citoquina antiinflamatoria producida exclusivamente por adipocitos. Ella intensifica la sensibilidad a la insulina e inhibe muchas etapas del proceso inflamatorio. En el hígado, la adiponectina inhibe la expresión de las enzimas gluconeogénicas y el índice de producción de glucosa. En los músculos, la adiponectina intensifica el transporte de glucosa y también la oxidación de ácidos grasos en parte por activación de la proteína quinasa cAMP-dependiente. El nivel de adiponectina disminuye en el SM. No se ha dilucidado la contribución relativa que hace la deficiencia de adiponectina (en comparación con la abundancia excesiva de citoquinas proinflamatorias) en SM [29-31].

1.1.3. VÍNCULO ENTRE EL SM Y LA ALTERACIÓN DE LOS RITMOS CIRCADIANOS

Los trastornos circadianos se correlacionan con el desarrollo de enfermedades metabólicas [27]. La alteración en los ritmos circadianos promueve la intolerancia a la glucosa [20]. Por ejemplo, la obesidad y la diabetes tipo 2 son más frecuentes en los trabajadores por turnos con alteraciones del ritmo circadiano y falta de sueño [33,34].

Existe clara vinculación entre regímenes de alimentación, nutrientes y el sistema circadiano. Una dieta alta en grasas, que contribuye a la resistencia a la insulina, metabolismo alterado de la glucosa, diabetes tipo 2, accidentes cerebrovasculares y enfermedad coronaria, influye significativamente en la organización cronobiológica [35]. Esto podría explicar por qué la oscilación circadiana de muchas hormonas que intervienen en el metabolismo de la insulina, tales como los glucocorticoides, glucagón, adiponectina, leptina o ghrelina, se alteran en la obesidad.

Nuestro laboratorio ha estado interesado en estudiar el impacto de la obesidad sobre distintos aspectos de la organización circadiana. En un estudio previo se ha determinado que una dieta alta en contenido de grasas produce alteración del ritmo de 24 h en las concentraciones plasmáticas de TSH, LH, testosterona y prolactina, conjuntamente con una disminución de la amplitud del ritmo de melatonina (el más preciso marcador del reloj circadiano) [36]. Los niveles plasmáticos de corticosterona aumentaron en ratas obesas con desaparición de su variación de 24 h. Esto condujo a una hiperglucemia significativa, correlacionándose los valores individuales de glucemia con los de corticosterona circulante en ratas alimentadas con dieta hipergrasa. En conjunto estos resultados subrayan los efectos significativos que la obesidad tiene sobre la organización circadiana de la secreción hormonal [36]. En un grupo similar de animales obesos se observó que una dieta alta en contenido de grasas interfiere con la expresión de los genes circadianos en hipófisis anterior de rata [37]. La expresión normal (en antifase) de los genes *Clock* y *Bmal1* vs. *Per1* y *Per2* se interrumpe en los animales obesos. En particular, la ritmicidad de *Per1*, *Per2*, *Cry1* y *Cry2* se invierte debido a la dieta alta en grasas, lo que sugiere que la transcripción intrínseca, la traducción y las modificaciones post-traduccionales que dan al reloj de su ritmicidad propia pueden verse seriamente alteradas en la obesidad [37]. En la presente Tesis Doctoral se examinarán los cambios en ritmos de 24 h de

adiponectina, leptina, insulina, glucosa, triglicéridos y colesterol en ratas sometidas a dietas hipergrasas y la forma en que la melatonina interfiere en este efecto.

El tejido adiposo participa en la regulación de la homeostasis del peso corporal, glucosa y metabolismo de los lípidos, inmunidad e inflamación a través de las adipocitoquinas [38]. En estudios previos de este laboratorio se examinó si la alteración significativa en los ritmos hormonales de 24 h coexisten en ratas alimentadas con dieta hipergrasa con los cambios en el patrón diario de adipocitoquinas circulantes [39]. Se detectaron en estos animales aumento de los niveles circulantes de leptina y disminución de la ghrelina, junto con signos de resistencia a la insulina (hiperglucemia, hiperinsulinemia). Los mayores niveles medios de IL-1, IL-6, TNF- α y proteína quimiotáctica de monocitos indican la naturaleza inflamatoria del proceso de obesidad examinado [39].

Desde el punto de vista circadiano, existe evidencia sobre la división corporal en dos compartimientos autonómicos funcionales: (a) un compartimiento torácico – muscular, (b) un compartimiento visceral [28] (Fig. 1.3). En el período de vigilia, el aparato locomotor utiliza la glucosa y FFA. Como reacción homeostática, el SNC facilita la liberación de la energía desde los órganos de almacenaje, tales como el hígado y el tejido adiposo. Si esta actividad se repite diariamente con regularidad, el sistema nervioso autónomo será programado para facilitar el funcionamiento en forma de ritmo diario anticipativo de los requerimientos energéticos. Durante el período del sueño lento el sistema nervioso autónomo cambia hacia un estado de control anabólico, de recuperación, con acumulación de energía en los órganos de depósito y menor utilización periférica de glucosa. En el SM se produce un desbalance de los ritmos circadianos de los territorios abdominal y tóraco-muscular, con predominio parasimpático abdominal y simpático en tórax y musculatura esquelética, lo que lleva a hipertensión,

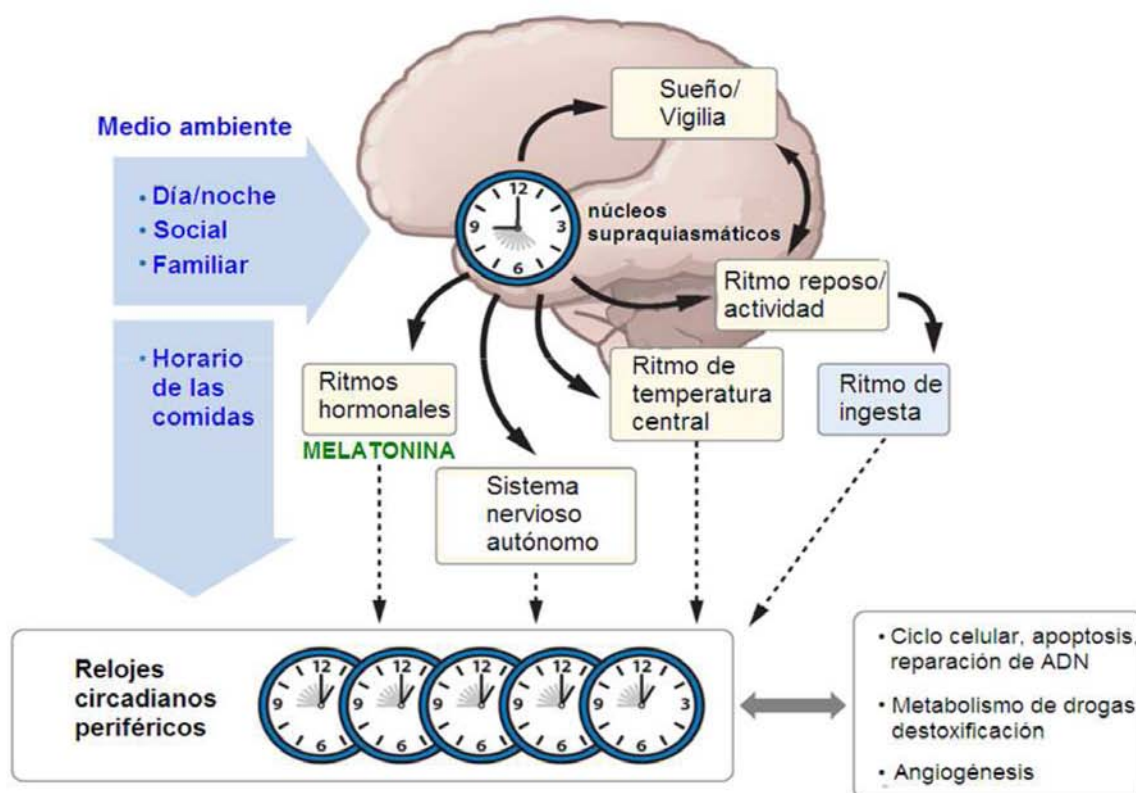


Fig.1.4. Organización jerárquica del aparato circadiano.

aumento de la resistencia a la insulina y obesidad abdominal [28] (Fig. 1.3).

Para generar estas respuestas fisiológicas y de comportamiento coherentes, las fases de la multitud de relojes celulares están bajo la coordinación de un marcapasos circadiano maestro que reside en los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) del hipotálamo [40] (Fig. 1.4). Los NSQ son un regulador clave de muchas funciones corporales que siguen un ritmo circadiano, como el sueño y la vigilia, la termorregulación, la homeostasis de la glucosa o el metabolismo de las grasas. El aparato circadiano incluye: (a) el NSQ, (b) vías de salida endocrinas (melatonina, cortisol) y autonómicas moduladas por el NSQ, y (c) relojes moleculares en las células de los tejidos periféricos (Fig. 1.4). Se han reportado cambios neurodegenerativos en el NSQ de pacientes con SM con aumento del área de innervación por fibras CRH en correlación inversa a neuronas vasopresinérgicas y neurotensinérgicas [28].

El prevalente sedentarismo de la sociedad actual es una causa posible del desbalance autonómico esquematizado en la Figura 1.3, ya que el sistema nervioso autónomo pierde estímulos de importancia como para mantener un ritmo circadiano de amplitud suficiente que oscile entre los estados anabólico y catabólico. Las alteraciones inmunohistoquímicas reportadas en los NSQ de pacientes con SM [28] pueden explicar cambios tales como ausencia de la caída fisiológica en la presión arterial en la noche. Asimismo, la disminución en la amplitud de los cambios fisiológicos día-noche que ocurre en los adultos mayores se correlaciona con la alta incidencia de SM en esta franja etaria. Una desincronización permanente como la impuesta por el trabajo en turnos también resulta en alteraciones metabólicas.

1.1.4. EVOLUCIÓN Y COMORBILIDADES DEL SM

El riesgo relativo de que surja enfermedad cardiovascular de comienzo reciente en sujetos con el SM en caso de no haber diabetes, es de 1.5 a tres veces, en promedio [3,5]. En el estudio de seguimiento durante ocho años de varones y mujeres en la etapa media de la vida en el Framingham Offspring Study (FOS), el riesgo de origen poblacional (atribuible) de que los pacientes con el SM terminaran por mostrar enfermedad cardiovascular fue de 34% en varones y de 16% en mujeres. En la misma investigación, la presencia del SM y la diabetes anticiparon la aparición de accidentes vasculares cerebrales isquémicos, con un mayor peligro para pacientes del síndrome, que los que tenían la diabetes sola (19% en comparación con 7%), particularmente en mujeres (27% en comparación con 5%). Los pacientes con SM también están más expuestos a vasculopatías periféricas [3,5].

En forma global, el riesgo de que surja diabetes tipo 2 en individuos con el SM aumenta tres a cinco veces [4]. En el seguimiento del estudio FOS durante ocho años, en varones y mujeres en etapa intermedia de la vida, el riesgo de presentar diabetes de tipo 2 atribuible a la población fue de 62% en varones y 47% en mujeres.

Además de los signos específicos que integran el SM, la resistencia a la insulina se acompaña de otras alteraciones. Ellas incluyen incrementos en el nivel de apoB y C III, ácido úrico, factores protrombóticos (fibrinógeno, inhibidor del activador de plasminógeno 1), viscosidad sérica, dimetilarginina asimétrica, homocisteína, número de leucocitos y citoquinas proinflamatorias, CRP, microalbuminuria, esteatosis hepática no alcohólica, esteatohepatitis no alcohólica, ambas entidades juntas, síndrome de ovario poliquístico y apnea obstructiva del sueño.

La esteatosis hepática es relativamente frecuente [6]. Sin embargo, en la esteatosis hepática no alcohólica coexisten la acumulación de triglicéridos y la inflamación. La esteatosis hepática no alcohólica afecta a 2 a 3% de la población. Al incrementarse la prevalencia de sobrepeso/obesidad y del SM, la esteatosis hepática no alcohólica se ha tornado una de las causas más frecuentes de hepatopatía terminal y carcinoma hepatocelular [6]. La

hiperuricemia traduce defectos en la acción de la insulina en la reabsorción de ácido úrico por parte de túbulo renales, en tanto que el incremento de la dimetilarginina, inhibidor endógeno de la sintasa de óxido nítrico, se vincula con la disfunción endotelial [7]. La microalbuminuria también puede ser causada por alteraciones en la fisiopatología endotelial en un estado de resistencia a la insulina.

El síndrome de ovario poliquístico acompaña muy frecuentemente al SM y su prevalencia va de 40 a 50%. Las mujeres con este síndrome tienen una posibilidad dos a cuatro veces mayor de presentar el SM, en comparación con aquellas sin el ovario poliquístico [15].

La apnea obstructiva del sueño suele acompañar a la obesidad, la hipertensión, el incremento de las citoquinas circulantes y la resistencia a la insulina. Ante las asociaciones mencionadas no es sorpresa de que surja a menudo el diagnóstico de SM en estos pacientes. Aún más, cuando se comparan los biomarcadores de resistencia a la insulina entre individuos con apnea obstructiva del sueño y testigos de igual peso, la resistencia a dicha hormona es más grave en pacientes con apnea obstructiva del sueño. El tratamiento con CPAP (continuous positive airway pressure) en personas con apnea obstructiva del sueño mejora la sensibilidad a la insulina.

1.1.5. MODELOS ANIMALES DE SM

La prevalencia de SM indica una necesidad urgente de estudiar las causas pertinentes y la progresión de sus signos. Estos estudios requieren modelos animales viables que imiten adecuadamente los principales aspectos de la enfermedad humana, especialmente la obesidad, la diabetes, la dislipemia, la hipertensión arterial y el hígado graso.

Los roedores se han utilizado durante muchos años como modelos para simular enfermedades humanas, para mejorar la comprensión de las causas y la progresión de los síntomas y para poner a prueba nuevas intervenciones terapéuticas. En el caso del SM estos modelos se han referido a la hipertensión, la diabetes y la obesidad [41-44]. El criterio principal para un modelo de SM es que presente todos los signos del síndrome. Como ellos dependen fundamentalmente de la dieta hipergrasa o con alto contenido en carbohidratos (fructosa, p.ej.) puede concluirse que los modelos más adecuados son aquellos producidos por una ingesta alterada. A continuación se examinan los modelos de roedores existentes para componentes del SM y en qué medida imitan el alcance de los cambios en los seres humanos y si son suficientes para evaluar los posibles tratamientos para el SM humano.

1.1.5.1. MODELOS GENÉTICOS DE OBESIDAD Y DIABETES TIPO 2

Los modelos genéticos de obesidad y diabetes incluyen ratones db/db, ratones ob/ob, ratas Zucker obesas diabéticas y ratas Otsuka Long-Evans Tokushima obesas; otras cepas como las ratas Goto-Kakizaki son diabéticas pero no obesas. Estos modelos son útiles en la evaluación de determinados mecanismos moleculares que pueden estar implicados en el desarrollo de la obesidad en roedores, pero debe tenerse en cuenta que el SM en los humanos no es una enfermedad monogénica. Por lo tanto, hay que preguntarse si los cambios genéticos que se ven en animales son similares a los observados en los seres humanos y si estos modelos muestran la gama de signos que caracteriza al SM. Como ejemplo, varios de estos modelos tienen mutaciones en el gen de la leptina o de su receptor, pero las mutaciones similares en SM humano son una muy rara enfermedad genética recesiva con sólo 4 mutaciones en 15 pacientes informados hasta el año 2009 [45]. Además, aunque la colecistoquinina es importante como señal de saciedad, sólo hay unos pocos informes de mutaciones en el receptor CCK-1, como se encuentran en los Otsuka ratas Long-Evans Tokushima, induciendo la obesidad en los seres humanos [46,47].

Estos modelos genéticos desarrollan obesidad y diabetes de tipo 2 pero no hipertensión [48]. Como el SM es una constelación más amplia de cambios fisiopatológicos, incluyendo especialmente la hipertensión (Fig. 1.1 y 1.2) tales modelos genéticos de roedores, aunque son válidos en la investigación de la obesidad, no replican ni las causas ni los cambios que ocurren en el SM humano.

En los últimos años, el avance de la ingeniería genética ha permitido el desarrollo de modelos de ratones, ya sean transgénicos o por knockout, para estudiar los efectos normales y anormales de una proteína en particular o de un conjunto de proteínas. Así las diferentes proteínas, moléculas de señalización y hormonas, importantes en el desarrollo de la diabetes y la obesidad, se pueden eliminar por cambios en el genoma de los ratones. Algunas de las proteínas importantes estudiadas han incluido al receptor de insulina, GLUT4, IRS-1 y el IRS-2. Los ratones null para el receptor de insulina no sobreviven más de 72 h a medida que desarrollan cetoacidosis grave [49] con hiperglucemia e hiperinsulinemia [50]. Por lo tanto, no se pueden utilizar en estudios a largo plazo. Además, los ratones knockout para el receptor de insulina es poco probable que imiten las condiciones humanas ya que tal pérdida de receptor es muy rara en los seres humanos. Otros modelos que carecen de GLUT4, IRS-1 e IRS-2 pueden dar información útil acerca de los roles de cada proteína [51-53], pero no imitan la causa del SM humano.

1.1.5.2. MODELOS DE INDUCCIÓN QUÍMICA DE DIABETES

El aloxano y estreptozotocina son análogos estructurales de la glucosa que entran en las células β pancreáticas mediante el transportador de GLUT2 [54]. Inyecciones únicas de aloxano o estreptozotocina producen la necrosis selectiva de las células β pancreáticas en ratas, ratones y conejos siendo un modelo de diabetes tipo 1. En contraste con los pacientes con SM, las ratas diabéticas inducidas por aloxano o estreptozotocina no aumentan de peso y por lo general presentan hipotensión [54].

Se puede inducir una diabetes tipo 2 por bajas dosis de estreptozotocina neonatalmente lo que produce hiperglucemia moderada en ratas adultas con disminución del colesterol-HDL, pero sin otras anormalidades en los lípidos [55]. En ratas tratadas en el día 2 de vida con estreptozotocina se observó a las 14 semanas resistencia a la insulina y un aumento de los niveles plasmáticos de PCR y TNF- α [56]. Sin embargo, estos cambios no son suficientes para definir los signos del SM.

1.1.5.3. MODELOS DE INDUCCIÓN DE SM POR CAMBIOS EN LA DIETA

La dieta juega un papel importante en el crecimiento y desarrollo y su composición decide la importancia nutricional. La dieta moderna, sobre todo en los países occidentales, es rica en carbohidratos como la fructosa y la sacarosa, así como en grasas saturadas. Este tipo de ingesta calórica se ha asociado con SM, enfermedades cardiovasculares e hígado graso no alcohólico [57,58]. En este Trabajo de Tesis compararemos ambos modelos (dieta rica en grasas y dieta rica en fructosa) en su capacidad para producir SM experimental.

A. MODELO DE ADMINISTRACIÓN DE FRUCTOSA

La fructosa se ha convertido en un ingrediente importante y generalizado en las dietas occidentales [59]. El promedio mundial per cápita de consumo de fructosa aumentó en un 16% entre 1986 y 2007. Junto con el aumento en el consumo de fructosa en la dieta durante los últimos cincuenta años, ha habido un aumento proporcional en la incidencia de obesidad.

Las principales fuentes de fructosa en la dieta son la sacarosa, jarabe de maíz de alto contenido de fructosa, frutas y miel. A diferencia de la glucosa, la alimentación con niveles altos de fructosa induce en roedores el desarrollo de los síntomas del SM incluyendo presión arterial alta, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa y dislipemia [59]. La administración prolongada de fructosa lleva a dilatación ventricular, hipertrofia ventricular y disminución de la fuerza contráctil del ventrículo, infiltración de células inflamatorias en el corazón y esteatosis hepática [59-61]. En el hígado, la alimentación con exceso de fructosa produce tanto esteatosis microvesicular como macrovesicular, fibrosis periportal e inflamación lobular [62]. En el riñón hay daño tubular, deposición de colágeno en el intersticio y aumento de la infiltración de macrófagos junto con la proliferación e hiperplasia de los túbulos proximales renales [63].

La fructosa, a diferencia de la glucosa, no estimula la secreción de insulina en las células β del páncreas, posiblemente debido a la ausencia del transportador de fructosa (GLUT5) en estas células [59]. La fructosa también carece de la capacidad para estimular la secreción de leptina, aunque tiene la capacidad de activar la lipogénesis de novo en el hígado. Durante su metabolismo, la fructosa no pasa por el paso limitante de la fosfofructoquinasa, lo que la hace una fuente no controlada de sustrato de la lipogénesis hepática [64]. La sacarosa es una fuente dietética de fructosa y también se ha usado para simular el SM humano en modelos animales.

B. MODELO DE DIETA RICA EN GRASAS

Estas dietas altas en grasa se han utilizado como modelo eficiente de obesidad, dislipemia y resistencia a la insulina en roedores. Las complicaciones desarrolladas por dietas ricas en grasas se parecen mucho al SM humano incluyendo la hipertrofia cardiaca, fibrosis cardiaca, necrosis del miocardio y esteatosis hepática [65-67]. Una alimentación rica en grasas en ratones aumenta la PA arterial sistólica y la disfunción endotelial [68]. Los diferentes tipos de dietas ricas en grasas que se han utilizado oscilan entre 20% y 60% de energía en forma de grasa, ya sea de origen animal (sebo o manteca de cerdo o carne de vaca) o aceites vegetales tales como aceite de oliva o de coco. El aumento de peso es evidente después de 4 semanas de alimentación con una dieta alta en grasas [69]. Una alimentación a largo plazo con dietas enriquecidas en grasas finalmente conduce a una moderada hiperglucemia e intolerancia a la glucosa en la mayoría de las cepas de ratas y ratones [70].

En vista de lo expuesto empleamos en el presente estudio tanto una dieta rica en fructosa como en grasas para inducir SM en ratas.

1.2. MELATONINA

1.2.1. BIOLOGÍA BÁSICA DE LA MELATONINA

El metoxindol melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) fue descubierto en la década de 1950 como la hormona de la glándula pineal [71]. Su nombre es indicativo de la primera función identificada, es decir su propiedad para aclarar la piel de anfibios. Sin embargo, estas propiedades fueron sólo de interés para algunos especialistas ya que no resultaron ser aplicables a los mamíferos, cuyos melanocitos no contienen melanosomas móviles fisiológicamente controlados.

La melatonina recibió considerablemente más atención cuando se caracterizó su efecto como regulador y sincronizador de los ritmos biológicos [72] y como mediador de las respuestas ante cambios en el fotoperiodo. La propiedad de la melatonina de ser el “código químico” de la noche es crítica para que ocurra la sincronización estacional de la reproducción, del metabolismo y del comportamiento. La presencia de una alta concentración de receptores de

melatonina en regiones reconocidas como marcapasos circadianos, tales como los NSQ o la pars tuberalis de la hipófisis anterior (PT), sitio de particular relevancia para la reproducción controlada periódicamente [73-75], respalda firmemente la principal relevancia de este rol fisiológico de la melatonina.

En la percepción de muchos investigadores, el control circadiano y de la ritmicidad estacional representan la principal función fisiológica de la melatonina. Aunque esta visión generalmente no se discute, las acciones del metoxindol no están de ninguna manera limitadas a estos efectos. Durante las últimas décadas, la melatonina demostró poseer numerosas funciones aún en tejidos y células que expresan receptores melatonérgicos en muy bajas concentraciones [76].

Se ha confirmado la presencia de melatonina en muchas plantas [77], hierbas [78] y organismos unicelulares [79]. El hecho que la presencia de melatonina no se limite a los vertebrados, sino que esté ubicuamente presente a través de taxones que comprenden bacterias, eucariotas unicelulares y plantas indica que esta molécula ha ganado muchas funciones adicionales en el curso de la evolución.

En los mamíferos la melatonina está implicada en el control de funciones fisiológicas, tales como la reproducción estacional [80], regulación del sueño y de la función inmune [81-83], inhibición del crecimiento tumoral [84], regulación de la PA [85], fisiología de la retina [86], control de los ritmos circadianos [87], modulación del estado de ánimo y el comportamiento humano [88] y la captación y remoción de radicales libres [89].

1.2.2. SÍNTESIS DE MELATONINA

La melatonina se sintetiza a partir de la serotonina a través de dos pasos enzimáticos. Un primer paso es la N-acetilación por arilalquilamina N-acetiltransferasa (AANAT) para producir N-acetilserotonina (Fig. 1.5). La regulación fisiológica de la AANAT, con su fuerte aumento de la actividad en la noche y un descenso muy rápido con el inicio de luz, ha recibido considerable atención como fenómeno regulador fundamental para controlar el comienzo y terminación de la síntesis de la melatonina [90].

El segundo paso en la síntesis de la melatonina es la transferencia de un grupo metilo de la S-adenosilmetionina al grupo 5-hidroxil de la N-acetilserotonina para producir melatonina. Esta reacción es catalizada por la enzima hidroxindol-O-metil transferasa (HIOMT), más recientemente llamada acetilserotonina O-metiltransferasa en bases de datos genéticos humanos. Aunque los cambios de día/noche de HIOMT son menos prominentes [91,92], ahora se sabe que son responsables de la amplitud de los picos de melatonina durante la oscuridad [93,94] (Figura 1.5).

La luz ambiental, a través del ojo de los mamíferos adultos, y en parte directamente en la glándula pineal en los vertebrados inferiores y aves, tiene profundos efectos sobre el ritmo de biosíntesis de la melatonina pineal. La exposición de los animales a la luz en la noche rápidamente deprime la síntesis de melatonina pineal. Sobre la base de estudios de estimulación o deservación se propuso un modelo simple de regulación pineal basado en dos premisas (Figura 1.6):

- (i) la vía neural para el control por la iluminación ambiental de la secreción de melatonina es el circuito neuronal "retina - tracto retinohipotalámico - NSQ - hipotálamo periventricular - columna intermediolateral torácica de la médula espinal - ganglio cervical superior - nervios carotídeos internos - glándula pineal";
- (ii) la norepinefrina liberada de las terminales simpáticas en la noche activa receptores β -adrenérgicos postsinápticos acoplados al sistema adenilato ciclasa-AMPC los que con una aportación de receptores α_{1B} -adrenérgicos activan la fosfolipasa $C\beta$ lo que

conduce a aumentos en Ca^{2+} , proteína quinasa C y calmodulina (CaM) quinasas. Estos procesos conjuntamente estimulan la síntesis de melatonina y la liberación.

Debe notarse que la presencia adicional de vías pinealopetales centrales peptidérgicas y de numerosos receptores hormonales indica que la regulación de la biosíntesis de la melatonina es más compleja y multifactorial de lo que comúnmente se infiere del esquema de la Figura 1.6 [95-98].

1.2.3. PLEIOTROPÍA DE LA MELATONINA

La melatonina muestra una multiplicidad excepcional de acciones (pleiotropía), como se describirá a continuación. Éstas son entendidas sobre la base del papel integrador que distingue a la melatonina de muchas otras moléculas importantes. La pleiotropía de la melatonina puede ser analizada desde diferentes niveles:

- Multiplicidad y distribución de receptores
- Multiplicidad de sitios de síntesis y órganos efectores
- Multiplicidad de efectos intracelulares – con un enfoque particular sobre sus acciones mitocondriales –

1.2.3.1. MULTIPLICIDAD Y DISTRIBUCIÓN DE RECEPTORES

Se detectan receptores de melatonina en numerosos tejidos. Los primeros trabajos utilizando ^3H -melatonina [99] fueron confirmados mediante el uso de ^{125}I -2-iodomelatonina [100] y condujeron a la identificación y clonación de los receptores MT_1 y MT_2 en membranas celulares [101,102].

Estos receptores se identificaron en varios sitios del SNC y en órganos periféricos, tales como el tracto gastrointestinal, el hígado, el pulmón, la piel, glándula harderiana, glándula adrenal, gonadas y órganos accesorios masculinos, tejido mamario, riñón, corazón, vasos sanguíneos, tejido adiposo, neutrófilos, linfocitos y tejido linfoide (revisado en [103,104]).

Los receptores clásicos de melatonina asociados a membrana, llamados en los mamíferos MT_1 y MT_2 [105], están involucrados en numerosas acciones cronobiológicas y son, en particular, responsables del cambio de fase y aumento de amplitud de los ritmos circadianos (efecto cronobiótico) [87]. Entre otros órganos periféricos se demostraron receptores melatonérgicos de membrana en enterocitos (MT_2 , [106,107]), colon, ciego y apéndice (subtipos no identificados, [108,109]), epitelio vesicular (MT_1 , [110]), glándula parótida (MT_1 , MT_2 , [111]), páncreas exócrino (MT_1 , [110]), células β pancreáticas (MT_1 , MT_2 , [112,113]), células de la granulosa y luteales (MT_1 , MT_2 , [114]), piel (MT_1 , MT_2 , [115]), epitelio mamario [116], miometrio (MT_1 , MT_2 , [117]), placenta (MT_1 , MT_2 , [118]), riñón fetal (MT_1 , [119]), pared ventricular cardíaca (MT_1 , MT_2 [120]), arterias aorta, coronaria y cerebral y otras partes de la vasculatura periférica (MT_1 , MT_2 , [121,122]), tejido adiposo pardo y blanco (MT_1 , MT_2 [123]), plaquetas (subtipo no identificado, [124]) y varias células inmunes (MT_1 , quizás también MT_2 , [125,126]).

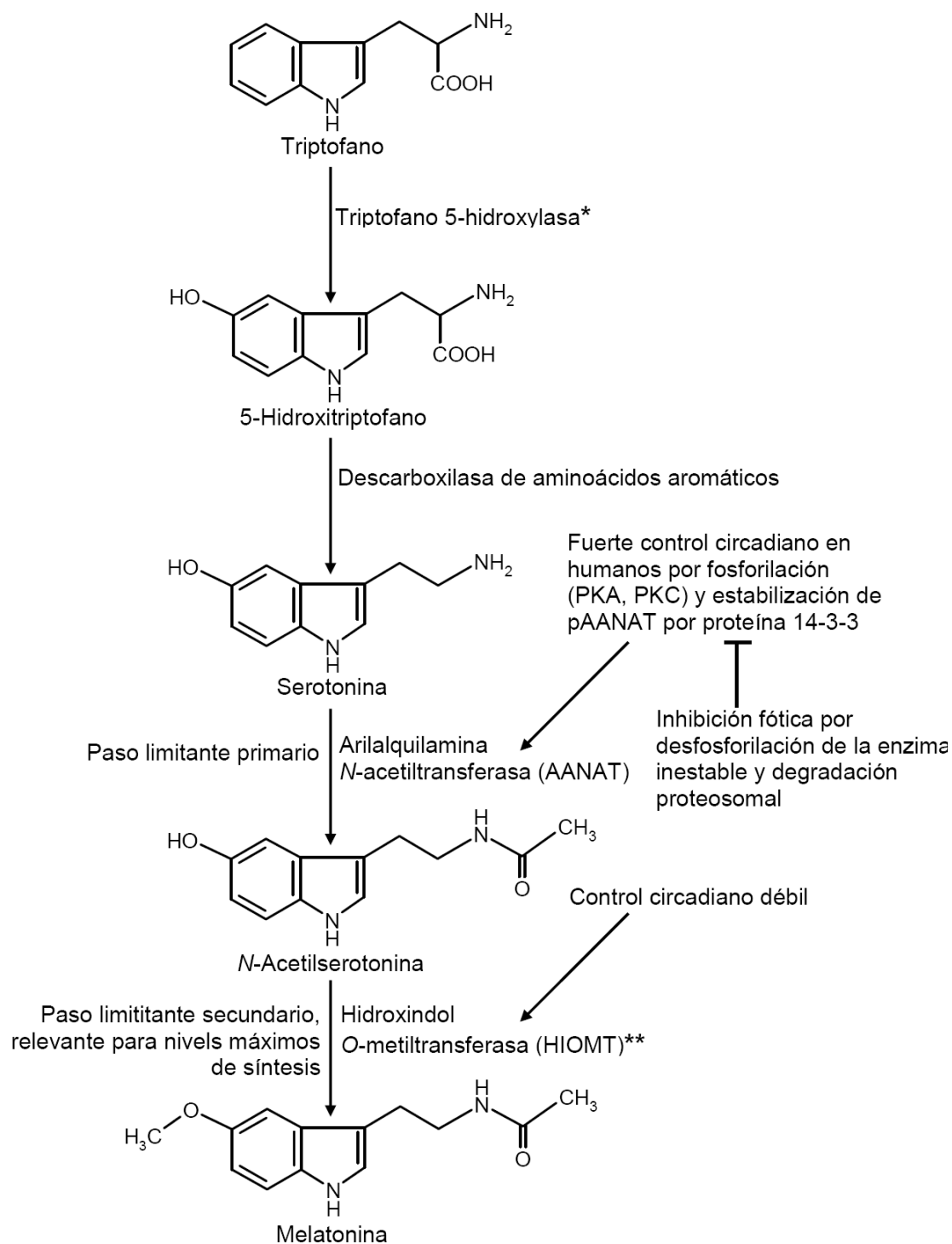


Fig. 1.5. Vía biosintética de la melatonina en la glándula pineal. El aumento de la actividad circadiana de AANAT en causada por una fuerte estimulación de la expresión génica. El complejo de un dímero pAANAT con proteínas 14-3-3 es sólo moderadamente estable. Después de su disociación, pAANAT es fácilmente desfosforilada. La inhibición por luz se inicia por una disminución en cAMP y Ca^{2+} . Esto conduce a una falta de re-fosforilación de las subunidades de la AANAT, por disminución de pCREB del cual depende la transcripción de AANAT.

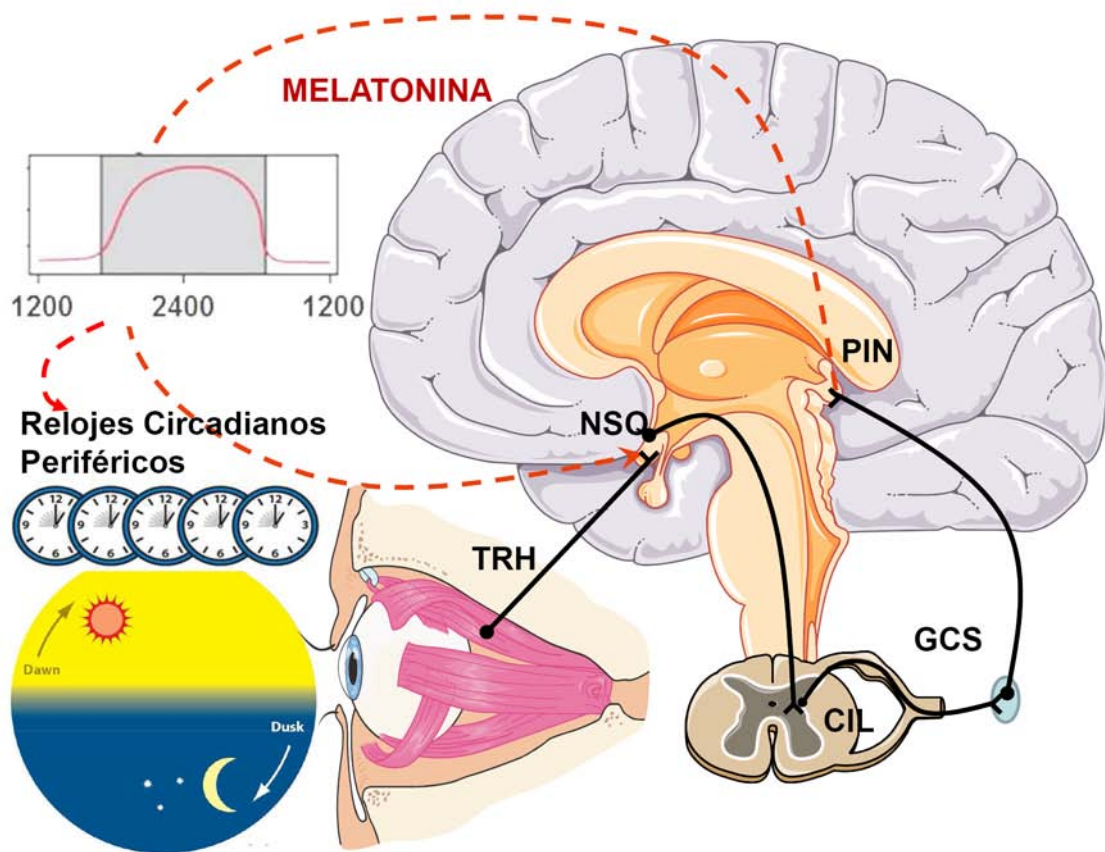


Fig. 1.6. Vía de control neural de la síntesis de melatonina pineal. Comprende el circuito neuronal siguiente: retina - tracto retinohipotalámico - núcleo supraquiasmático (NSQ) - hipotálamo periventricular - columna intermediolateral torácica de la médula espinal - ganglio cervical superior - nervios carotídeos internos - glándula pineal. La melatonina codifica la longitud de la noche para varios relojes celulares periféricos y retroalimentando negativamente al NSQ, desencadena el sueño.

Un tercer receptor de membrana (MT₃) resultó finalmente ser la enzima quinona reductasa 2 (QR2 [127]). La melatonina inhibe esta enzima, pero en rango micromolar [128], siendo el resveratrol mucho más potente. A pesar del desarrollo de gran cantidad de ligandos de QR2 y la descripción de varios efectos, este sitio de unión ya no es considerado un receptor específico para la melatonina.

También, la melatonina se une a factores de transcripción que pertenecen a la superfamilia de los receptores del ácido retinoico, en particular, la variantes de ROR α designadas como ROR α 1 (isoforma a de ROR α), ROR α 2 (isoforma b de ROR α) e isoforma d de ROR α (inicialmente llamada RZR α), y el producto de otro gen, RZR β [129-131]. Aunque la naturaleza de receptor de melatonina de estas proteínas de unión nuclear es tema de debate y aunque su afinidad a la melatonina es inferior en comparación con la de MT₁, su clasificación como receptor nuclear parece estar justificada. Un ligando sintético, CGP 52608, ha sido usado, en varias ocasiones, para identificar los efectos mediados por estas proteínas nucleares.

En cuanto a los niveles de dichos receptores nucleares, la pleiotropía de la melatonina es tanto o más obvia que en los casos de los receptores de membrana. Las subformas ROR α están ubicuamente expresadas en todos los tejidos de mamíferos estudiados [129]. Se detectaron niveles relativamente altos especialmente en linfocitos T y B, neutrófilos y monocitos [81,130]. Una relevancia funcional particular también parece existir en el hueso [132], piel, incluyendo

los folículos pilosos [133] y células endoteliales [134]. Frecuentemente, los niveles de expresión de ROR α dependen del estado de diferenciación de las células o varían dentro del ciclo celular [135]. Contrariamente a la ROR α , RZR β está más o menos específicamente expresada en el cerebro, la glándula pineal y la retina, y es también hallada en el hígado [136].

La melatonina se une también a otros sitios intracelulares. Se ha descrito la unión a dos proteínas expresadas ubicuamente: la calmodulina (CaM) [137] y calreticulina [138]. Estudios recientes sobre la CaM indicaron que su afinidad a la melatonina podría ser suficiente para unirse a concentraciones fisiológicas altas [137]. La afinidad de unión de melatonina del complejo CaM/CaM quinasa II es considerablemente más alta que la de la CaM sola [139].

La importancia de las interacciones de la melatonina con calreticulina es incierta como lo es también la unión a tubulina [140,141]. Sin embargo, existen numerosos efectos de la melatonina sobre la estructura del citoesqueleto incluyendo cambios en la tubulina [142].

Sobre la base de lo que se conoce en la actualidad, la acción de la melatonina como un agente antioxidante parece ser independiente de los receptores hasta acá mencionados (León-Blanco et al., 2004). Sin embargo, la regulación positiva por melatonina de la enzima antioxidante γ -glutamylcisteína sintetasa implica transcripción nuclear regulada por RZR / ROR α [143]. De la misma forma, la protección del daño oxidativo de hígado y corazón por el ramelteon, agonista melatonérgico MT₁/MT₂ que no tiene actividad antioxidante per se, sugiere que los receptores melatonérgicos MT₁/MT₂ pueden desencadenar mecanismos antioxidantes [144].

1.2.3.2. RECEPTORES DE MELATONINA EN EL SNC

Los receptores de melatonina en el SNC son accesibles a su ligando a través de varias rutas. En virtud de ser una molécula anfifílica, la melatonina puede cruzar fácilmente la barrera hematoencefálica a través de los capilares cerebrales y la hematocefalorraquídea a través del epitelio corioideo [145]. La pineal libera el metoxindol a concentraciones altas directamente a través del receso pineal al tercer ventrículo, hallazgo principalmente observado en ovejas [146]. Recientemente, se ha demostrado que la presencia de melatonina en el tercer ventrículo de los humanos, pero la cantidad reportada de 8,75 pg/mL es relativamente moderada [145].

Los receptores de melatonina se expresan en varias partes del SNC. Limitándonos a las estructuras relacionadas con la estacionalidad y la reproducción, se encontraron receptores en la corteza prefrontal, corteza cerebelosa, el hipocampo, los ganglios basales, la sustancia negra, el área tegmental ventral, el núcleo accumbens y, en la retina, en las células horizontales, amácrinas y ganglionares (resumido por [103]), así como en el plexo corioideo [147]. En humanos, además de los NSQ, los receptores MT₁ se encuentran en varias otras partes del hipotálamo y áreas cerebrales relacionadas, tales como los núcleos paraventricular, periventricular y supraóptico, la banda diagonal de Broca, núcleo basal de Meynert, el núcleo infundibular, los núcleos tuberomamilares y los núcleos talámicos paraventriculares [148]. Existe información detallada sobre la expresión tanto de los receptores MT₁ como MT₂ en el cerebro humano incluyendo la corteza cerebral, el tálamo, la corteza cerebelosa (no sólo en neuronas, sino en las células gliales de Bergmann y otros astrocitos), la sustancia negra, la amígdala y el hipocampo (ver para ref. [149]). En confirmación de los primeros estudios sobre la unión específica de la ³H-melatonina pineal [150], se demostró que existen tanto receptores MT₁ como MT₂ en la glándula pineal humana [151], un hallazgo que es consistente con las acciones autocrinas y paracrinas frecuentemente observadas para la melatonina, además de su rol como hormona [152].

En la retina humana se detectan receptores MT₁ en los fotorreceptores, células amácrinas y ganglionares, en capa plexiforme interna y en algunos vasos retínicos [149] mientras que los MT₂ se expresan en las células ganglionares y bipolares, en los segmentos internos de los

fotorreceptores y los procesos internos y externos de la capa plexiforme [153]. En muchas especies, la presencia de receptores de melatonina retinales se correlacionan con los posibles efectos autocrinos y paracrinos de la melatonina sintetizada en el ojo [154-156].

En vista de la importancia del marcapasos circadiano en la homeostasis (Figuras 1.4 y 1.6) la descripción de los receptores de melatonina en los NSQ ha sido de interés primordial. Esta estructura es reconocida como ubicación de alta densidad de receptores de melatonina, que en los humanos es de tipo MT_1 [157]. El receptor MT_1 en NSQ humano está particularmente expresado en las neuronas vasopresinérgicas [148,158], un hecho relevante en tanto que la liberación de vasopresina representa una salida circadiana importante de los NSQ [158-160].

Es de destacar que no se han detectado receptores MT_2 en NSQ humanos [157], lo que constituye un hecho discordante con lo observado en otras especies. El receptor MT_2 se expresa en los NSQ de numerosos mamíferos y cuando está presente es particularmente importante para los cambios de fase de los ritmos circadianos [161]. Surge la necesidad de evaluar con técnicas más sensibles la ausencia de receptores MT_2 en los NSQ humanos, sobre todo desde la perspectiva del diseño de drogas con actividad melatónica. Si los NSQ humanos no tienen receptores MT_2 , el cambio de fase producido por la melatonina, que fue demostrado y documentado en detalle por curvas de respuesta de base [162,163], sería inducido por señalización MT_1 .

Con respecto a los restantes sitios receptores presuntos para la melatonina, la enzima QR2 (receptores " MT_3 ") se expresa en el cerebro de mamíferos [164]. Sin embargo, ante la ausencia de una vía de señalización identificada no es posible evaluar su significado fisiológico.

El caso es distinto para las subforma $ROR\alpha$, entre las cuales el receptor nuclear $RZR\beta$ de melatonina se expresa en varias regiones del SNC, tales como los NSQ y otras partes del hipotálamo, el tálamo, la glándula pineal, la retina y la médula espinal, y también, en la PT [129,165]. Existe una estrecha correlación entre intensidad de expresión de los receptores $RZR\beta$ y MT_1 , lo que sugiere algún tipo de cooperación entre receptores de membrana y los nucleares, especialmente en las estructuras que participan en el control de los ritmos circadianos. De hecho, en ratones "knockout" para $RZR\beta$ se demostraron cambios significativos en los ritmos circadianos, caracterizados por avances en la curva de respuesta de fase y períodos más prolongados antes de completar la resincronización [166].

Tanto bajo condiciones in vivo como in vitro, la melatonina afecta la fase y amplitud de las oscilaciones circadianas. En animales que expresan ambos subtipos de receptores de melatonina en los NSQ, el desplazamiento de fase es preferentemente ejercido a través de los receptores MT_2 , mientras que la descarga de las neuronas es intensamente suprimida a través de los MT_1 [167,168]. En especies que expresan pobremente el MT_2 , como el hombre, el cambio de fase es ejercido por MT_1 , eventualmente en una acción que involucra también al $RZR\beta$.

Otro efecto específico de la melatonina sobre los NSQ está relacionado con el sueño. Los efectos de la melatonina mediados por receptores MT_1 en los NSQ favorecen la iniciación del sueño a través del "switch" hipotalámico del sueño, una estructura caracterizada por una respuesta típicamente "on-off", sin estados intermedios. Se piensa que este mecanismo activa alternativamente tanto las vías neuronales aguas abajo relacionada a la vigilia como promueve las relacionadas con el sueño [169].

Además de la promoción del sueño, la melatonina ejerce efectos sedativos y antiexcitatorios que claramente van más allá de su vínculo con el sueño ya que también se observan en los animales de actividad nocturna. Esto se estudió principalmente en relación a la actividad anticonvulsivante [170,171] y condujo a la identificación del papel facilitador de la melatonina en la neurotransmisión en la que participa el ácido- γ -aminobutírico (GABA) [172]. Esta actividad anticonvulsivante de la melatonina puede ser mediada por receptores de membrana,

MT₁ y/o MT₂, ya que se observaron efectos similares con el ramelteon, un agonista melatoninérgico sintético puro MT₁/MT₂. La acción antiexcitatoria de la melatonina parece representar una propiedad antigua de la molécula, ya que se observa en *Caenorhabditis elegans*, un organismo desprovisto de un ritmo melatoninérgico robusto [173]. En mamíferos, también se relacionó la acción antiexcitatoria con efectos ansiolíticos, antihiperalgésicos y antinociceptivos de la melatonina.

1.2.3.3. MULTIPLICIDAD DE SITIOS DE SÍNTESIS Y DE ACCIÓN

Otra desviación de la visión clásica del rol fisiológico de la melatonina resulta de la observación que, en mamíferos y otros vertebrados, el metoxindol es sintetizado no solamente por la glándula pineal o estructuras relacionadas, como la retina, sino también en numerosos órganos o grupos celulares. Estos sitios incluyen al tracto gastrointestinal, médula ósea, leucocitos, membrana coclear, glándulas harderianas y la piel (para ref. ver [149]). No se conoce con exactitud si la melatonina es liberada a partir de estos sitios de formación aunque hay evidencia de que en el intestino existe liberación asociada con estímulos postprandiales [174]. Las cantidades de melatonina en tejidos extrapineales no son insignificantes: debido al tamaño de dichos órganos ellas son órdenes de magnitud superiores a las producidas por la glándula pineal.

En el tracto gastrointestinal, la estimulación vagal y simpática hacen que las células enteroendocrinas movilicen melatonina, la que estimula vía receptor MT₂ y elevación de Ca²⁺ citosólico la secreción del bicarbonato por las células endoteliales [175]. Además, el flujo sanguíneo mucoso es incrementado por la melatonina [176]. En el colon, las dosis farmacológicas de melatonina prolongan la duración del tránsito intestinal; los efectos que están asociados con la regulación del contenido de agua fecal y reducción de la motilidad [176]. Esta disminución de la motilidad ha sido frecuentemente observada. La melatonina presenta una circulación enterohepática y se acumula en el líquido biliar.

Otros sistemas hormonales son también afectados por la melatonina. En la glándula paratiroides de ratas, la melatonina estimula la secreción, un efecto principalmente mediado por receptores MT₂ y también observados en glándulas desnervadas [111]. En los islotes pancreáticos inhibe la secreción de insulina por un mecanismo dependiente de receptores MT₂. De acuerdo a estudios en células INS1 de insulinomas, la vía de señalización involucra la inhibición de la guanilato ciclase citosólica y de los canales con compuertas que se abren por nucleótidos aromáticos [177-179]. En presencia de células α , la liberación de insulina por células β aumenta tras la exposición a melatonina, un efecto explicado por la estimulación simultánea de la secreción de glucagón, el cual anula la inhibición dependiente de la melatonina [113].

También se ha reportado que la melatonina modula la secreción de glucocorticoides. En primates (*Cebus capucinus*) la melatonina suprimió a través de receptores MT₁, la secreción de cortisol inducida por ACTH y, en la glándula suprarrenal fetal, la producción de ARNm de la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa lo que indica una regulación en menos de la síntesis de glucocorticoides [180]. Estos hallazgos son compatibles con el ritmo circadiano en la expresión de MT₁ descrito en la glándula adrenal). Sin embargo, la información no parece ser aplicable en humanos ya que los efectos supresivos de la melatonina sobre la secreción de cortisol nocturno, como el observado en los individuos ciegos, parecen estar mediados indirectamente por la inducción del sueño [181].

Existen también acciones sobre hormonas gonadales. En un estudio de células granulosa/lúteas humanas, la melatonina reguló en más a los receptores de LH y en menos a GnRH y los ARNm de receptores de GnRH. Sin afectar su liberación basal, aumenta la formación de progesterona estimulada por hCG [182].

En el sistema vascular, el efecto de la melatonina depende fuertemente de la distribución regional de receptores MT₁ y MT₂. El receptor MT₁ conduce a una vasoconstricción sensible a la toxina pertussis a través de la apertura de los canales BKCa, mientras que los MT₂ producen vasodilatación [183]. Si bien en ratas la constricción prevalece en los vasos cerebrales investigados hasta el momento, este efecto está acompañado por una respuesta dilatadora a la hipercapnia considerablemente aumentada [184]. Esta es la razón por la cual la melatonina atenúa las fluctuaciones diurnas en el flujo sanguíneo cerebral y disminuye el riesgo de hipoperfusión.

En relación con el tema de esta Tesis Doctoral es de interés destacar que en adipocitos pardos humanos PAZ6, la exposición a la melatonina disminuye la expresión del transportador de glucosa Glut4 y el ingreso de glucosa a través de un descenso del cGMP intracelular inducido por receptores MT₂[123]. Tales hallazgos han atraído considerable interés en relación a la potencialidad de la melatonina para combatir la obesidad humana. Uno de los objetivos primordiales de este Tesis Doctoral es el análisis de la eficacia de la melatonina para revertir los signos de SM en ratas administradas con dietas ricas en grasas o en fructosa.

1.2.3.4. NIVELES MÚLTIPLES DE ACCIONES CELULARES

Los MT₁ y MT₂ son típicos receptores acoplados a la proteína G (GPCRs). La traducción de señales de ambos receptores se hace a través de la proteína Gi sensible a la toxina pertussis, que produce la disminución del AMPc, seguido de un declive en la actividad de la fosforilación por PKA y el CREB [185] (Fig. 1.7). Las subformas de G α i más frecuentemente implicadas son la G α i2 y G α i3.

Aunque la inhibición de adenilato ciclasa mediada por α i representa un efecto destacado, la señalización a través de los receptores MT₁ y MT₂ es, de hecho, más compleja [185]. Esto no es sorprendente, ya que la regulación en menos de los procesos dependientes de AMPc difícilmente puede explicar los múltiples efectos de la melatonina. La señalización en paralelo o alternante a través de diferentes subformas de proteínas G y también heterodímeros $\beta\gamma$ se observaron en repetidas ocasiones (Fig. 1.7) [185]. Se demostró la señalización a través de diferentes subunidades de proteínas G tanto para MT₁ como para MT₂. En los NSQ de mamíferos, se reportó la señalización múltiple para MT₂. Por ejemplo, en los NSQ de rata, se observó que la activación de receptores MT₂ no sólo causa una disminución en el AMPc, sino que incrementa los niveles de PKC, la que es bloqueada específicamente por un antagonista selectivo de receptores MT₂[185].

Se requiere la activación del PKC para el cambio de fase de los ritmos circadianos y esta activación implica la participación de otras subunidades de proteína G además de la disminución de AMPc. Así se demostró la señalización en paralelo a través de la inhibición de la adenilato ciclasa y la vía del fosfatidilinositol 4-5-bis-fosfato en células CHO transfectadas [186]. La activación de la isoforma PLC β o PLC η de fosfolipasa C (PLC) puede ser transmitida tanto por acoplamiento α i a estas enzimas, la cuales mantendría la sensibilidad observada a la toxina pertussis, o alternativamente, por otra subforma, como la α q o la $\beta\gamma$ [185].

También se demostró la activación de la PLC por el incremento de IP₃ (inositol-1,4,5-tris-fosfato) en células INS1 de insulinoma [187]. Los efectos indirectos a través de la apertura de los canales iónicos dependiente de proteína G también podrían incrementar la actividad de la PKC en la membrana, pero esta posibilidad requeriría documentación adicional. De hecho, se ha demostrado en reiteradas ocasiones el acoplamiento de las α q.

Los efectos de la melatonina corriente abajo inducido por la activación de la PLC β pueden ser altamente específicos y variables en cada tejido (Fig. 1.7). En miocitos uterinos de ratas, puede conducir a una apertura de canales de K⁺ activados por Ca²⁺ (BKCa) [188]. Se reportó que el bloqueo de los BKCa inhibe la acción vasoconstrictora de la melatonina en las arterias

cerebrales y caudales [189] y puede reflejar el mismo mecanismo de señalización o similar, aunque esto no fue absolutamente confirmado. Los efectos antinociceptivos de la melatonina también fueron atribuidos a los canales BKCa, con una contribución de la activación de los canales de K^+ [190]. En el hipocampo de rata, la melatonina estimuló la apertura de los canales BKCa bajo condiciones de hipoxia [191]. En las células β pancreáticas, la activación de la PLC promovió la liberación de insulina, aunque la supresión de la secreción de insulina dependiente de α parece prevalecer [177]. En las células ganglionares de la retina de rata, la señalización de MT_2 estimuló a través de las vías PKC/PLC, la corriente de glicina [192]. En el NSQ de ratas se requirió la señalización vía $PLC\beta$ para el desplazamiento del ritmo circadiano [193].

Se ha propuesto la función de los canales de K^+ de rectificadores de entrada como blanco de la melatonina (Fig. 1.7). Se observó la activación del $Kir3.1$ y 3.2 vía MT_1 en el sistema de ovocitos de *Xenopus* y en células AtT20 transfectadas [194]. En este caso, se asume que la activación es mediada por $\beta\gamma$, ya que estos heterodímeros son conocidos por acoplarse directamente a los canales Kir. Esto es apoyado por la mutagénesis directa del sitio en el gen MT_1 , la cual permite una disección de la regulación en menos del AMPc y uniéndose a los canales Kir3. A su vez, el aumento del K^+ extracelular abre los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes, un efecto que es inhibido por la melatonina de una manera dependiente del tiempo [195]. Como se observa en la hipófisis de la rata, la modulación de los canales de Ca^{2+} por la melatonina puede ser igualmente mediada por $\beta\gamma$. Estos hallazgos sobre la señalización de los MT_1 a través de los Kir y los canales de calcio son de alta importancia potencial porque ellos pueden presumiblemente explicar los efectos supresores mediados por MT_1 de la melatonina sobre la descarga neuronal en los NSQ, donde se expresan los canales. En el SNC, la modulación de los canales iónicos por la melatonina se cree que contribuye a varias acciones antiexcitatorias del metoxindol.

Aparte de los hallazgos hasta acá mencionados, se han descrito varios otros mecanismos asociados con la melatonina tales como la modulación de los receptores GABA y glutamato [196,197], que involucra la disminución secundaria del Ca^{2+} celular a través de receptores GABA C o los receptores metabotrópicos mGlu3 de glutamato [198]. Finalmente, la regulación en menos de la nNOS [199] así como de la iNOS astrocítica y microglial impide o pone límites a la sobreexcitación [149].

Los numerosos mecanismos de señalizaciones primarias y secundarias, que incluye la modulación de los canales iónicos y el GMPc, conducen a una serie de efectos adicionales, especialmente en cuanto a que involucran al Ca^{2+} intracelular [105]. La activación del PLC y el PKC, y también el dímero $\beta\gamma$ liberado de la G_i , estimula factores de la vía de la MAP quinasa, fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y sus elementos corriente abajo, tales como el Akt (PKB) y varios factores de transcripción (Fig. 1.7).

La situación es aún más complicada en la medida que el ERK puede ser activado a través de la β -arrestina 2 activada unida al receptor de melatonina fosforilado, como se observó para muchos GPCRs. La relativa propensión a formar homodímero de MT_1 o heterodímeros de MT_1/MT_2 es similar mientras que la de los homodímeros de MT_2 es 3-4 veces menor [200]. Un receptor ortólogo de melatonina, llamado GPR50, comparte el 45% de la secuencia de aminoácidos con los MT_1 y MT_2 pero no se une a la melatonina. Es de considerable interés que la GPR50, aunque le falta capacidad para unirse a la melatonina, suprime la unión de alta afinidad a los receptores MT_1 mediante la heterodimerización. De esta manera, la GPR50 puede tener un rol importante en la función de la melatonina al alterar su unión a los receptores MT_1 [201].

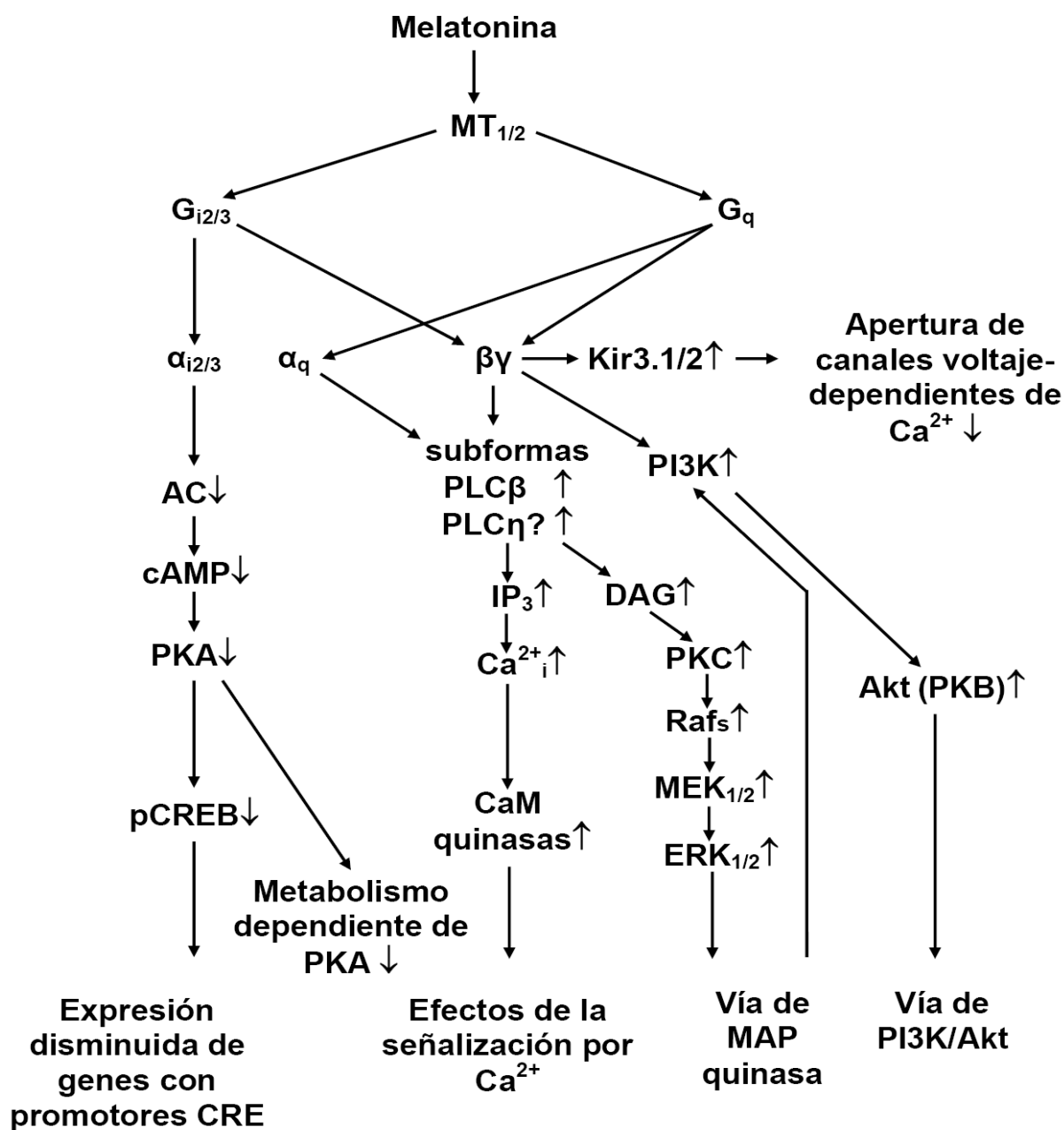


Fig. 1.7. Esquema general de las principales rutas de señalización de los receptores de membrana de melatonina MT₁ y MT₂. La figura combina diversas vías, que siempre coinciden en cada célula efectora. Además, las vías de señalización MT₁ y MT₂ pueden combinarse debido a la heterodimerización posible MT₁ / MT₂. No es claro si predominan los aumentos o disminuciones de cGMP, por disminución de la fosfodiesterasa o disminución de NO, respectivamente. Abreviaturas: AC: adenilciclase; Akt quinasa: homólogo de quinasa de retrovirus AKT8; CaM: calmodulina; DAG: diacilglicerol; ERK: quinasa regulada por señal extracelular; IP3: inositol 1,4,5-tris-fosfato; Kir3.1 / 2: subtipo 3.1 / 2 de canal rectificador de K⁺ rectificadores; MAP quinasa: proteína quinasa activada por mitógeno; MEK: MAP quinasa de ERK; Raf: homólogo de quinasa retroviral, producto del oncogén v-raf.

Otro efecto de la activación de la melatonina potencialmente importante concierne a la expresión del RORα, que fue investigada en células mononucleares de sangre periférica humana, en linfocitos T y células Jurkat. Se vio que la disminución de la actividad MT₁,

producida por prostaglandina E2, por luzindol o por “antisense” MT_1 promueve considerablemente la regulación en menos de la expresión de $ROR\alpha$ [126] apoyando la correlación positiva entre los receptores de membrana y los nucleares arriba mencionada. Así, muchos efectos primariamente iniciados por MT_1 podrían ser secundariamente reforzados por una subforma de las $ROR\alpha$ o eventualmente por la $RZR\beta$. Esto requiere niveles de melatonina suficientemente altos, lo que pueden ser alcanzados en las células productoras de melatonina tales como los linfocitos. El espectro de los efectos de la melatonina a través de la $ROR\alpha1$, $ROR\alpha2$ y la $RZR\beta$ aún no fue suficientemente explorado.

1.2.3.5. MELATONINA Y FUNCIÓN MITOCONDRIAL

La función principal de las mitocondrias es generar ATP en la célula a través de la Cadena Transportadora de Electrones (ETC) que resulta en fosforilación oxidativa (FOSOX). La producción de energía mitocondrial requiere la coordinación de varios pasos secuenciales estrechamente interconectados. Incluso en condiciones normales, 1-2% del flujo de electrones es la consecuencia de la reducción incompleta de O_2 , que conduce a la producción de radical anión superóxido ($O_2\bullet^-$) que posteriormente se convierte en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Por lo tanto, las mitocondrias son la fuente principal de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células [202].

Mientras que un aumento leve en ROS puede actuar como una señal para producir una serie de respuestas fisiológicas, aumentos mayores pueden comprometer la integridad mitocondrial y conducir a la muerte celular. Por ejemplo, la producción de $O_2\bullet^-$ es muy sensible a una disminución en el gradiente electroquímico de H^+ a nivel de la membrana mitocondrial. Así, la modulación de la permeabilidad a H^+ en la membrana mitocondrial interna a través de proteínas de desacoplamiento, canales mitocondriales de iones o ácidos grasos son acontecimientos importantes en la regulación de la producción de radicales libres por las mitocondrias [203].

Los componentes de la ETC, que están presentes en la membrana mitocondrial interna, incluyen una serie de portadores de electrones agrupados en cuatro complejos de enzimas: C-I (NADH ubiquinona reductasa), C-II (ubiquinona succinato reductasa), C-III (ubiquinol citocromo c reductasa) y C-IV (citocromo c oxidasa) [204]. La principal función de la ETC es convertir la energía redox en un gradiente electroquímico de protones que posteriormente causa la formación de ATP. El producto final de la cadena respiratoria es el agua que se genera en una reducción de cuatro electrones del O_2 por C-IV. Durante este proceso (fuga de electrones, especialmente en el complejo I y III), un pequeño porcentaje de O_2 se convierte en ROS, tales como $O_2\bullet^-$ y sus productos secundarios H_2O_2 y el muy reactivo radical hidroxilo ($\bullet OH$) [204].

La melatonina reacciona a una velocidad alta con radicales como $\bullet OH$ y a tasas bajas con respecto a otros tales como $O_2\bullet^-$. La melatonina es un eficaz inhibidor de la peroxidación lipídica por barrido de especies altamente reactivas, tales como $\bullet OH$, que inician el proceso de degradación [205] (Fig. 1.8).

La óxido nítrico (NO) sintasa mitocondrial (mtNOS), localizada en la membrana mitocondrial interna, es responsable de la generación del radical NO ($\bullet NO$) a partir de L-arginina [206]. mtNOS comprende dos isoformas a saber, constitutiva (c-mtNOS) e inducible (i-mtNOS). Debido a la fácil difusión de NO a través de la membrana mitocondrial, las isoformas de NOS en el citoplasma son también relevantes para la generación de $\bullet NO$ intramitocondrial.

Las altas tasas de síntesis de NO, que normalmente se producen en estados celulares excitados Ca^{2+} -dependientes contribuye al estrés oxidativo y nitrosativo. La disponibilidad de $\bullet NO$ determina la velocidad con que se generan el aducto peroxinitrito (ONOO-) y otros os productos de descomposición [206].

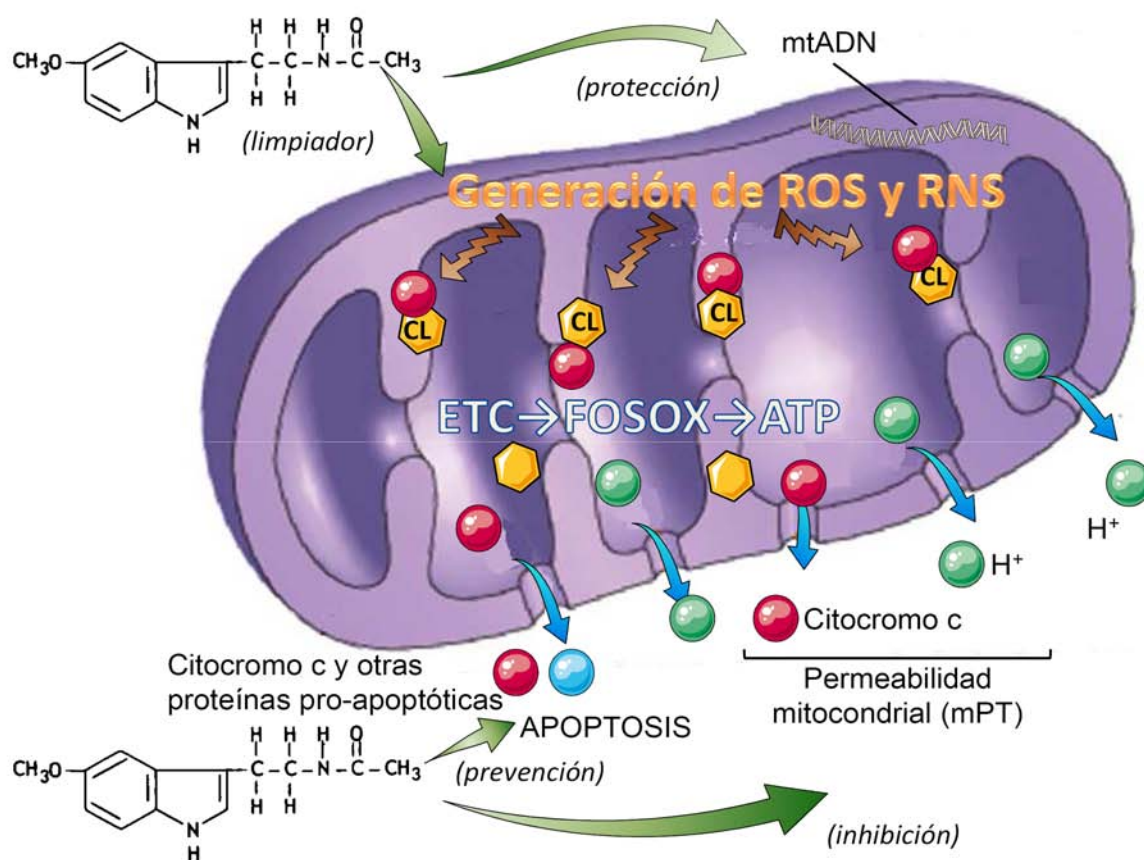


Fig.1.8. Melatonina y fisiopatología mitocondrial. Los mecanismos implicados en la alteración de la ETC dependen principalmente de la generación de ROS y RNS en las mitocondrias que conduce a estrés oxidativo y a la depleción de ATP. La producción de ROS mediada por ETC, en parte a través de la peroxidación de cardiolipina (CL), provoca el desprendimiento de citocromo c de la membrana mitocondrial interna y cambios en mPT lo que lleva a la liberación de citocromo c y de otras proteínas pro-apoptóticas. La apoptosis se produce por la activación de la cascada de caspasas en el citoplasma que conduce a la muerte celular. La melatonina y sus metabolitos (AFMK, AMK) evitan esta cascada, actuando en múltiples sitios en la mitocondria. La melatonina también aumenta la actividad transcripcional del ADNmt y mejora la fisiología mitocondrial.

- NO interfiere fuertemente con los componentes de la cadena respiratoria, en particular la citocromo c oxidasa. Su metabolito ONOO⁻ y los radicales derivados de éste pueden dañar las proteínas en los complejos respiratorios. Se pueden producir otros procesos de nitrosación, como transnitrosación o nitrosación reversible y la nitración, así como la oxidación irreversible de ADN, proteínas y lípidos [206]. El daño a la ETC mitocondrial puede causar disrupción del potencial electroquímico de H⁺ y así la apoptosis, o dar lugar a una generación adicional de radicales libres, llevando así un círculo vicioso que finalmente resulta en la muerte celular.

La melatonina protege la ETC y el ADNmt del daño oxidativo inducido por ROS / RNS (Fig. 1.8). Limita la pérdida de GSH intramitocondrial, reduce el daño del ADN mitocondrial y aumenta la expresión y la actividad de C-IV y la actividad de C-I, lo que mejora la respiración mitocondrial y

aumenta la producción de ATP [203]. La producción de NO se inhibe también en el nivel de transcripción génica de NOS [199].

El Ca^{2+} mitocondrial es crucial en el control del ritmo de producción de energía celular y juega un papel fundamental en la apoptosis celular y necrosis. Las mitocondrias toman Ca^{2+} a través de un uniporte calcio, dependiente del gradiente electroquímico de H^+ . En la apoptosis un aumento descontrolado de la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial (mPT) es inducido por el aumento de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial [207]. Se define como mPT al aumento repentino de la permeabilidad de la membrana que permite la transferencia de moléculas de hasta 1500 Da en tamaño y que lleva a la disipación del gradiente electroquímico de H^+ , al desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y a la depleción de ATP. Con la sobrecarga de Ca^{2+} hay una inhibición completa del uniporte, hinchamiento mitocondrial, pérdida del control respiratorio y liberación de calcio de la matriz. Aunque la naturaleza exacta de mPT molecular sigue siendo difícil de explicar, su contribución a la neurodegeneración es inequívoca [207]). La melatonina previene eficazmente la inducción de la mPT en gran número de circunstancias (Fig. 1.8).

Puesto que las mitocondrias contienen mecanismos específicos para la activación tanto de la vía intrínseca de la apoptosis como de la muerte necrótica es que pueden ser vistas como reguladores centrales del destino de la célula. La vía apoptótica implica la activación y posterior translocación a la mitocondria de los miembros de la familia Bcl2 (Bax, Bak) que después de la inserción en la membrana mitocondrial externa se comportan como “canales de muerte”. A través de estos canales se liberan una serie de proteínas, por ejemplo citocromo c, desde el espacio intermembrana las que son responsables de la activación de la cascada de señales de la muerte celular a través de la proteólisis caspasa-9 y -3-dependiente [208]. La melatonina ejerce un fuerte efecto antiapoptótico [209] (Fig. 1.8).

Numerosos mecanismos enzimáticos participan en el control de la producción de radicales libres. Entre ellas, la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD), que se encuentra en el lado interno de la membrana mitocondrial interna (Mn-SOD) y que elimina $\text{O}_2^{\bullet-}$ es de importancia [207]. El $\text{OH}^{\bullet}$ generado a partir de H_2O_2 en presencia de metales de transición reducidos es eliminado por la enzima glutatión peroxidasa (GPx) durante el proceso de oxidación de GSH a glutatión disulfuro. Éste se reduce de nuevo a GSH por acción de la enzima glutatión reductasa (GRD). Estas enzimas forman parte del sistema de defensa antioxidante endógeno y suprimen los niveles de ROS dentro de la célula, así como en la mitocondria.

Además de ser un antioxidante, la melatonina promueve la síntesis de novo de GSH mediante la estimulación de la actividad de la enzima γ -glutamyl-cisteína sintetasa y también a través de sus efectos sobre la expresión del gen de la glutatión peroxidasa, GRD, SOD y CAT [149]. Esto promueve el reciclaje de GSH, poniendo así de manifiesto el importante papel que desempeña la melatonina en la fisiología mitocondrial.

En resumen, el papel de la melatonina en la homeostasis mitocondrial puede considerarse como definitivamente demostrado. La melatonina es un potente eliminador de ROS y RNS y naturalmente actúa en las mitocondrias, el sitio de mayor producción de ROS / RNS en la célula. La melatonina mejora el ciclo redox y aumenta el contenido de GSH mediante la estimulación de su síntesis en el citoplasma y mitocondrias en función de la captación de GSH desde el citoplasma. Por último, la melatonina ejerce importantes efectos antiapoptóticos sobre la mayoría de las señales apoptóticas que se originan a partir de la mitocondria [207].

Como se mencionó anteriormente, los datos acumulados en la última década indican fuertemente que la melatonina desempeña un papel importante en la defensa antioxidante a través de la regulación de las enzimas implicadas en el metabolismo redox y directamente a través de una vía no enzimática. Esta incluye el efecto eliminador de radicales que la

melatonina y algunos de sus metabolitos (en particular AFMK y AMK) tienen en relación a ROS, RNS y radicales orgánicos [149].

La melatonina reacciona a una velocidad alta con radicales como $\bullet\text{OH}$ y a tasas bajas con respecto a otros tales como $\text{O}_2\bullet^-$ [210]. En cualquier caso, la melatonina inhibe eficazmente la peroxidación de lípidos al eliminar las especies altamente reactivas, tales como $\bullet\text{OH}$, que inician el proceso de degradación, por atrapado de radicales peroxilo. Un concepto alternativo explica los efectos antioxidantes de la melatonina en el ámbito de la generación de radicales en lugar de desintoxicación de radicales ya formados (Fig. 1.9).

En una reciente publicación Galano et al. han subrayado las razones por las que la melatonina cumple la mayoría de las características deseables de un buen antioxidante: (i) se distribuye ampliamente en el organismo y está presente en concentraciones adecuadas, (ii) es un antioxidante de amplio espectro, (iii) se transporta fácilmente través de las membranas celulares; (iv) se puede regenerar, después de inactivación de radicales, y sus metabolitos todavía presentan propiedades antioxidantes; (v) tiene una mínima toxicidad [211]. Estos efectos de la melatonina y sus metabolitos parecen ser únicos y no compartidos por agonistas melatonérgicos MT_1/MT_2 como el ramelteon o la agomelatina, en los que existe modificación del anillo indol.

Así la salvaguarda del flujo de electrones, la reducción de la formación de oxidantes mediante la reducción de la fuga de electrones y la inhibición de los eventos mPT son algunos de los efectos más importantes de la melatonina en las mitocondrias [207].

La melatonina ha sido demostrada repetidamente como eficaz para reducir, en diversas condiciones, la formación de ROS y RNS mitocondrial y para proteger componentes mitocondriales contra el daño oxidativo o nitrosativo, así como para prevenir la peroxidación lipídica en la membrana interna y, por lo tanto, favorecer el flujo de electrones y su eficiencia energética. Las inyecciones de melatonina contrarrestan el efecto inhibitor de rojo de rutenio en Cl, C-IV y GPx enzima. En otro estudio, 100 nM melatonina fue encontrado para evitar la oxidación de GSH a disulfuro de glutatión inducida por t-butilo, hidroperóxido de restauración de la actividad normal de ambos GPx y GRD [212].

Recientemente, se ha explorado el papel de la melatonina sobre la cardiolipina mitocondrial [213]. La cardiolipina es un fosfolípido situado a nivel de la membrana mitocondrial interna que se requiere para varios procesos bioenergéticos mitocondriales. Las alteraciones en la estructura de cardiolipina, el contenido y la composición de la cadena de acilo se han asociado con una disfunción mitocondrial en diversos tejidos bajo una variedad de condiciones fisiopatológicas [213].

La melatonina protege a las mitocondrias del daño oxidativo en parte mediante la prevención de la oxidación de cardiolipina (ver Fig. 1.8). La melatonina también puede actuar sobre la biogénesis mitocondrial a través de las sirtuinas. Las sirtuinas son deacetilasas de proteínas NAD^+ -dependientes que promueven la longevidad en numerosos organismos. Al menos SIRT3, SIRT4 y SIRT5 se localizan en las mitocondrias y las protegen de la hiperacetilación [214].

Las sirtuinas también estimulan la biogénesis mitocondrial [215]. Varios estudios han indicado la regulación positiva de SIRT1 por melatonina, por ejemplo, en el cerebro de ratones con senescencia acelerada SAMP8 [216] y en cultivos primarios neuronales de cerebelo de rata [217].

En cultivos neuronales de cerebelo, la melatonina aumentó la desacetilación de diversos sustratos SIRT1, efectos que fueron revertidos por el inhibidor de SIRT1 sirtinol. La promoción por melatonina de la desacetilación inducida por SIRT1 indica que la biogénesis mitocondrial podría ser estimulada por el metoxindol.

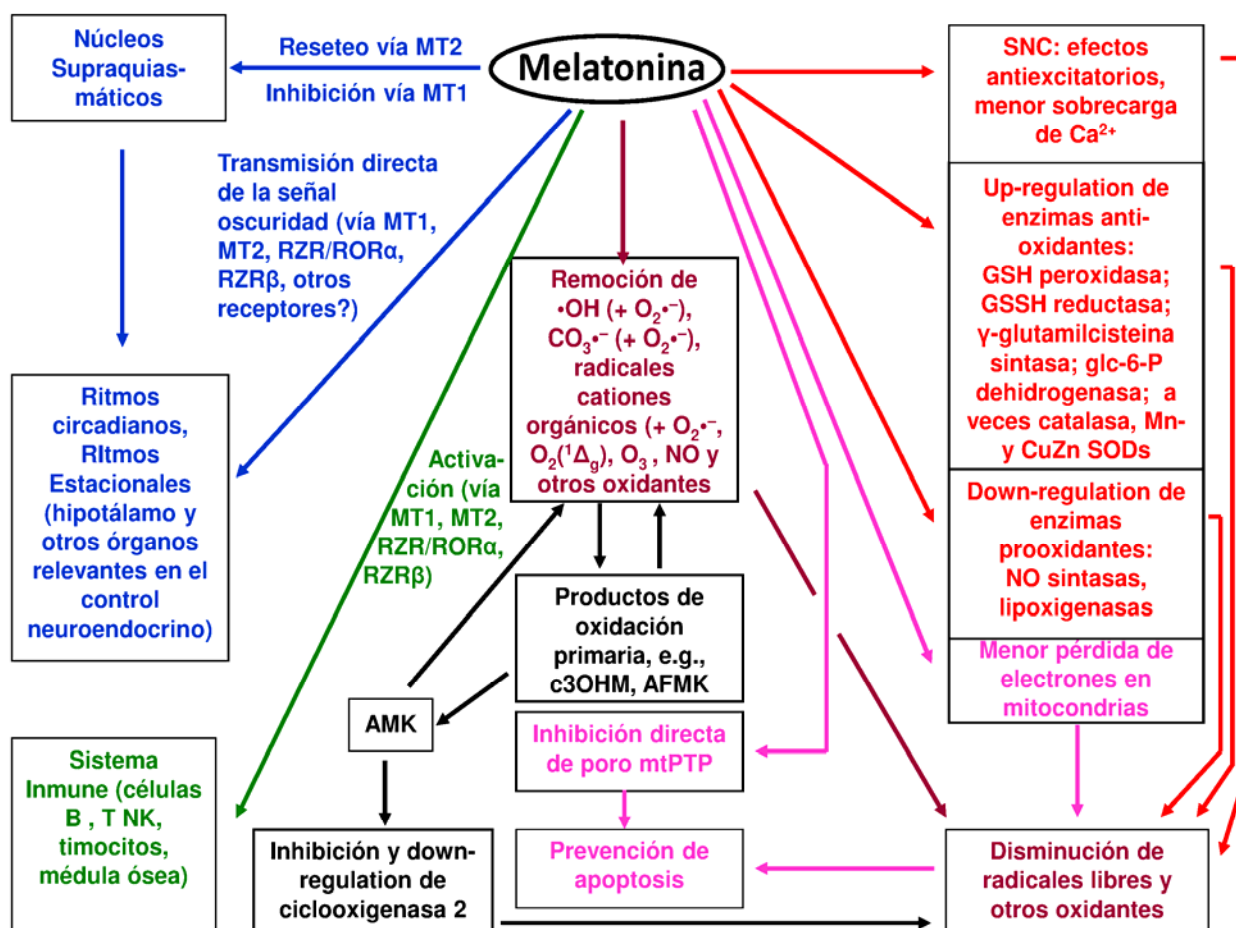


Fig. 1.9. Efectos celulares de la melatonina mediados y no mediados por receptores.

De hecho, la administración crónica de melatonina aumenta el número y tamaño de las mitocondrias en la glándula pineal y en el epitelio endotelial del plexo coroideo. La Fig. 1.9 es un resumen de las complejas vías de acción de la melatonina.

1.3. SM Y MELATONINA

Distintas evidencias experimentales, a las cuales ha contribuido nuestro grupo de investigación, indican que la melatonina combina dos propiedades de aplicación en medicina humana: cronobiótica y citoprotectora. La melatonina es el prototipo de los cronobióticos (drogas que actúan sobre el reloj circadiano modificando su fase o amplitud de oscilación, y por lo tanto la fase y oscilación del ritmo sueño/vigilia) [218,219]. En el año 2007 la European Medicines Agency (EMA) aprobó a la melatonina como monoterapia para el tratamiento del insomnio en el geronte.

En nuestro país, además de la existencia de melatonina como fármaco aprobado por ANMAT en 1995, se introdujo en 2009 un análogo de la melatonina, la agomelatina, para los trastornos cronobiológicos de la depresión. La melatonina tiene además una importante actividad citoprotectora *per se* y a través de la cascada de metabolitos a los que da origen (Figura 1.9) [220]. Esta citoprotección deriva en parte de las demostradas propiedades de antioxidante y también de efectos evidenciados en condiciones de isquemia sin reperfusión, donde los radicales libres no juegan un papel relevante.

Como se ha analizado más arriba, los datos acumulados en los últimos diez años indican claramente que la melatonina desempeña un papel importante en las defensas antioxidantes. La regulación de las enzimas implicadas en la vía redox es una de las vías por las que la melatonina ejerce sus efectos antioxidantes. Esta acción es complementaria a la no enzimática, eliminadora de radicales que la melatonina y algunos de sus metabolitos (especialmente AFMK y AMK) como “scavengers” de ROS, RNS y radicales orgánicos [149,221].

La inflamación es un fenómeno complejo que involucra numerosos mediadores [31]. La mayoría de los estímulos proinflamatorios en los tejidos inflamados y células migratorias activan tanto la ciclooxygenasa-2 (COX-2) como la iNOS. Esta sobreproducción de PGs y de NO desempeña un papel importante en la inflamación aguda, siendo responsable de la vasodilatación local, así como de los síntomas locales y sistémicos (fiebre, dolor, edema). Por lo tanto, ya que tanto la COX-2 y iNOS son formas inducibles reguladas en respuesta ante la inflamación, han sido foco de interés para la comprensión de la función de la melatonina en la fisiopatología de la inflamación [222].

Uno de los primeros estudios sobre el papel de la melatonina en la inflamación fue el de Costantino et al. [223] utilizando zymosan activado por plasma para inducir la inflamación en patas de rata. El Zymosan activado desencadena la producción de ROS y RNS. La inyección de zymosan activado en las patas de rata evoca una reacción inflamatoria evidenciada por la presencia de edema dentro de 30 min [223]. La administración local de melatonina redujo significativamente el edema producido por zymosan. El tratamiento con melatonina también redujo los niveles de nitrito / nitrato, la mieloperoxidasa (MPO) y el malonaldehído.

En este laboratorio se obtuvo la primera indicación de un efecto inhibitor de la melatonina sobre la COX [224]. En efecto melatonina inhibe a muy bajas concentraciones la COX-2 [225].

Tabla 1.2. Estudios sobre el efecto de la melatonina en modelos animales de hiperadiposidad.

Observación	Referencia (s)
En ratas alimentadas con dieta hipergrasa disminuye la ganancia de peso corporal, eficiencia de alimentación y niveles plasmáticos de glucosa, leptina y triglicéridos	Prunet Marcassus et al. <i>Endocrinology</i> . 2003. 144:534.
En ratas envejecidas alimentadas con dieta líquida hipercalórica la melatonina reduce la ganancia de peso, la glucemia y la insulinemia.	Puchalski et al. <i>Endocrine</i> . 2003. 21:163.
En ratones alimentados con dieta hipergrasa la melatonina mejora la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa	Sartori et al. <i>Endocrinology</i> . 2009. 150:5311.
En ratas ovariectomizadas la melatonina fue efectiva en normalizar el peso corporal.	Ladizesky et al. <i>J Pineal Res</i> . 2003. 34:143. Sanchez-Mateos et al. <i>Maturitas</i> . 2007. 58:91.
En ratas OLETF con diabetes tipo 2 la melatonina disminuyó la obesidad.	Hussein et al. <i>Int J Exp Pathol</i> . 2007. 88:19-29.
En ratas tratadas con olanzapina la melatonina disminuyó la obesidad.	She et al. <i>Pharmacol Res</i> . 2009. 59:248.
La melatonina fue efectiva en reducir la obesidad en conejos alimentados con dieta hipergrasa.	Raskind et al, <i>Neuropsychopharmacology</i> . 2007. 32:284.
La melatonina y su análogo NEU-P11 inhibieron la ganancia de peso y mejoraron la sensibilidad a la insulina en ratas alimentadas con dieta hipergrasa.	She et al, <i>Pharmac Res</i> . 2009. 59:248.
En ratas alimentadas con dieta hipergrasa la melatonina atenúa el aumento de peso, la hiperglucemia y la hiperinsulinemia y el aumento de los niveles plasmáticos de adiponectina, leptina y triglicéridos y colesterol.	Rios-Lugo et al. <i>J Pineal Res</i> . 2010. 49:342.
La melatonina reduce la ganancia en peso corporal, adiposidad visceral, trigliceridemia, insulinemia y TBARS producida en ratas por dieta hipercalórica. También reduce el tamaño de los infartos miocárdicos y facilita la recuperación funcional cardíaca	Nduhirabandi et al. <i>J Pineal Res</i> . 2011. 50:171
En ratas Zucker diabéticas jóvenes la melatonina disminuye la ganancia de peso sin afectar el tamaño de la ingesta, reduce la PA y mejora la dislipemia.	Agil et al. <i>J Pineal Res</i> . 2011:50:207

Otros posibles mecanismos anti-inflamatorios de la melatonina incluyen la activación de NF- κ B [226] y la inhibición de la infiltración por neutrófilos [227]. La melatonina y sus metabolitos AFMK o AMK pueden funcionar como agentes moduladores durante el proceso inflamatorio y tienen el potencial de ser una nueva clase de agentes anti-inflamatorios [228]. La melatonina suprime la expresión de los genes de las enzimas proinflamatorias COX-2 y iNOS por un mecanismo común que implica la inhibición de la transcripción de actividad histona acetiltransferasa p300 y la acetilación de p52 suprimiendo de este modo su unión y transactivación [229].

La formación de potentes oxidantes catalizada por MPO ha sido implicada en la patogénesis de varias enfermedades, incluyendo la obesidad y aterosclerosis y hasta el momento no existen eficaces inhibidores para la MPO. Galijasevic et al. demostraron que la melatonina actúa como un potente inhibidor de la MPO [230]. En presencia de cloruro, MPO es inactivada por melatonina en dos puntos en el ciclo de peroxidasa mediante la unión a MPO para formar un complejo inactivo, la melatonina MPO-Cly acelerar la formación de MPO compuesto II, una forma inactiva de MPO. Esta doble regulación por melatonina es única y puede representar un nuevo medio a través de los que la melatonina puede controlar MPO y sus vías inflamatorias [230].

En la Tabla 1.2 se resumen los estudios que indican la actividad preventiva de la melatonina sobre la hiperadiposidad experimental. El tratamiento con melatonina en ratas tiene la capacidad de reducir la obesidad, la diabetes tipo 2 y la esteatosis hepática [179] Además, el tratamiento con melatonina induce la regeneración y proliferación de células β pancreáticas lo que lleva a una disminución de la glucosa en sangre en ratas diabéticas tipo 1 por estreptozotocina [231] La pinealectomía resulta en hiperinsulinemia marcada y acumulación de triglicéridos en el hígado [232] mientras que la administración crónica de melatonina

Tabla 1.3. Estudios clínicos sobre la acción de la melatonina en el SM.

Observación	Referencia (s)
Bajos niveles de melatonina en plasma de pacientes con diabetes tipo 2.	Tutuncu et al. 2005. <i>J Pineal Res</i> 39, 43-49.
Regulación en más de receptores de melatonina en pacientes tipo 2.	Peschke et al. 2007. <i>J Pineal Res</i> 42, 350-358.
Polimorfismos en gen que codifica receptores para melatonina asociados con mayor riesgo de diabetes tipo 2.	Prokopenko et al. 2009. <i>Nat Genet.</i> 41, 77-81.
Secreción nocturna de melatonina en pacientes coronarios, independientemente del tratamiento con bloqueantes beta.	Sakotnik et al, 1999. <i>Eur.Heart. J</i> 20, 1314-1317. Girotti et al. 2000. <i>J Pineal Res.</i> 29,138-142. Dominguez-Rodriguez et al, 2002. <i>J Pineal Res.</i> 33, 248-252; Yaprak et al. 2003. <i>Int J Cardiol</i> , 89, 103-107.
La administración de melatonina reduce PA nocturna en hipertensos.	Scheer et al. 2004. <i>Hypertension</i> , 43, 192-197. Grossman et al. 2006. <i>Am J Med.</i> 119, 898-902.
La administración de melatonina reduce la PA nocturna en mujeres menopáusicas.	Cagnacci et al, 2005. <i>Am J Hypertens.</i> 18, 1614-1618.
La administración de melatonina reduce PA y mejora el perfil lipídico y estado antioxidante en paciente s con SM.	Kozirog et al, <i>J Pineal Res.</i> 2011. DOI:10.1111/j.1600-079X.2010.00835.x
La administración de melatonina reduce PA nocturna en pacientes con diabetes tipo 1.	Cavallo et al. 2004. <i>J Pineal Res.</i> 36, 262-266.
La administración de melatonina previene la hipercoagulabilidad por catecolaminas ante el estrés en voluntarios sanos.	Wirtz PH, Spilmann M, Bartschi C, Ehlert U von Kanel R. 2008. <i>J pineal Res.</i> 44, 127,133.
La administración de melatonina inhibe la agregación plaquetaria.	Del Zar et al. 1990. <i>Acta Endocrinol. (Copenh)</i> 123, 453-458. Vacas et al. 1991. <i>J Pineal Res.</i> 11,135-139.

mejora el metabolismo de lípidos en ratas diabéticas tipo 2, reduciéndose la resistencia a la insulina [233]

La melatonina aumenta el contenido de glucógeno del hígado en ratas [234]. En ratones diabéticos por dieta hipergrasa la inyección intraperitoneal de melatonina mejora la utilización de glucosa y la sensibilidad a la insulina con un aumento de glucógeno hepático y reducción de la esteatosis en hígado [235]. En nuestro Laboratorio hemos analizado diversos aspectos de la acción de la melatonina en modelos experimentales de diabetes mellitus. En un estudio en ratas inyectadas con estreptozotocina y con grave depresión de insulina (modelo de diabetes tipo 1) reportamos que el deterioro de la reactividad vascular es función de la severidad de la hiperglucemia, en particular la relajación por efecto endotelial, y es revertido por la melatonina [236]. También la melatonina previno el deterioro de contractilidad arterial producido en un medio con alta concentración de glucosa, un fenómeno dependiente de la generación anormal de ROS y RNS. Asimismo, examinamos estos indicadores en un modelo de diabetes tipo 2 avanzada (ratas con pancreatectomía subtotal), con los mismos resultados, mejorando la melatonina la relajación mediada por endotelio en anillos aórticos de animales diabéticos [237]. En una preparación mitocondrial de hígado la melatonina (a partir de 0,1 μ M) redujo el estado 3 del proceso de respiración mitocondrial sin afectar el estado 4 [238]. Los mismos resultados se observaron in vivo luego del tratamiento con melatonina [239] indicando que la inhibición de la sobreestimulación por sustratos del ciclo de Krebs dada por la melatonina protegen a la mitocondria del daño oxidativo.

Existen asimismo datos clínicos que vinculan a la melatonina con el SM (Tabla 1.3). Se presentan niveles más bajos de melatonina circulante en pacientes con diabetes tipo 2 [240] concomitantemente con la disregulación de la expresión del ARNm de receptores melatonérgicos [241]. Mutaciones en el gen del receptor de melatonina se asociaron con el aumento del riesgo de diabetes tipo 2 [242-244]. Estos resultados clínicos indican que la melatonina puede participar en la homeostasis de la glucosa en sangre y que los niveles bajos de melatonina podrían estar relacionados con el desarrollo de diabetes de tipo 2. La secreción nocturna de melatonina fue menor en pacientes con enfermedad coronaria [245-248]. La administración de melatonina durante la noche redujo la presión arterial nocturna en pacientes hipertensos [249-251] y en adolescentes con diabetes tipo 1 [252]. En un estudio abierto en pacientes con SM se ha verificado la eficacia del tratamiento con melatonina para normalizar en parte su sintomatología [253].

1.4. OBJETIVOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL DEL TRABAJO DE TESIS

El presente Trabajo de Tesis persiguió analizar y comparar algunas de las secuelas del SM en dos modelos experimentales en ratas, la ingesta de una dieta hipergrasa y la administración de fructosa en el agua de bebida, como paso previo para caracterizar la posible actividad terapéutica de la melatonina en ellos. Para ello se siguieron 4 fases.

El objetivo general de la primera fase de la Tesis Doctoral fue comparar distintos parámetros del SM obtenido por dieta hipergrasa vs. SM por administración de fructosa al 10% en el agua de bebida. Se estudió el síndrome desde varios puntos de vista: sus consecuencias sobre el peso corporal y la PA sistólica, los cambios en analitos usualmente determinados en clínica para el diagnóstico de SM y las consecuencias sobre el eje hipófiso-gonadal.

Los experimentos llevados a cabo tuvieron como objetivos específicos:

- (i) Analizar parámetros somáticos y bioquímicos en el SM establecido luego de una dieta rica en grasas
- (ii) Analizar parámetros somáticos y bioquímicos en el SM establecido luego de la administración de fructosa (10%) en el agua de bebida.

- (iii) Estudiar las consecuencias sobre el eje hipófiso-gonadal del SM establecido producido por una dieta rica en grasas
- (iv) Estudiar las consecuencias sobre el eje hipófiso-gonadal del SM establecido producido luego de la administración de fructosa (10%) en el agua de bebida.

En una segunda fase de la Tesis Doctoral, el objetivo general fue examinar la eficacia de la melatonina para corregir las alteraciones somáticas, bioquímicas y hormonales observadas en el SM establecido con las dos técnicas de alimentación empleadas. Para ello se agregó en cada caso melatonina en el agua de bebida o su vehículo con los siguientes objetivos específicos:

- (v) Estudiar el efecto de la melatonina sobre parámetros somáticos y bioquímicos del SM producido por una dieta rica en grasas
- (vi) Estudiar el efecto de la melatonina sobre parámetros somáticos y bioquímicos del SM producido por la administración de fructosa (10%) en el agua de bebida
- (vii) Analizar el efecto de la melatonina sobre el eje hipófiso-gonadal en el SM producido por una dieta rica en grasas
- (viii) Analizar el efecto de la melatonina sobre el eje hipófiso-gonadal en el SM producido por la administración de fructosa (10%) en el agua de bebida.

El objetivo general de la tercera fase de esta Tesis Doctoral fue la evaluación de parámetros somáticos y bioquímicos en el SM en una fase incipiente (obtenido por la administración de 5% de fructosa) vs. el SM constituido (luego de administrar 10% de fructosa). Los objetivos específicos de los experimentos efectuados fueron:

- (ix) Analizar parámetros somáticos y bioquímicos en el SM incipiente luego de la administración de fructosa (5%) en el agua de bebida vs. el SM establecido luego de la administración de fructosa (10%) en el agua de bebida.
- (x) Estudiar la eficacia de la melatonina para prevenir los cambios somáticos y bioquímicos en el SM incipiente.

En vista que la melatonina combina propiedades cronobióticas y citoprotectoras que pueden ser de relevancia en la prevención y el tratamiento del SM, el objetivo general de la cuarta fase de la presente Tesis Doctoral fue analizar su efecto sobre los ritmos circadianos de adiponectina, leptina, insulina, glucosa, triglicéridos y colesterol plasmáticos en ratas en el modelo de SM por dieta hipergrasa. Los objetivos específicos de los experimentos efectuados fueron:

- (xi) Analizar el efecto de la melatonina sobre los ritmos circadianos de adiponectina, leptina, insulina, glucosa, triglicéridos y colesterol en plasma de ratas normales.
- (xii) Estudiar la capacidad de la melatonina para normalizar la alteración de los ritmos circadianos en los parámetros señalados que se observan en ratas con dieta hipergrasa.

1.5. CONSTRUCCIÓN DE LA HIPÓTESIS DEL TRABAJO DE TESIS

Las hipótesis de esta Tesis Doctoral a someterse a verificación experimental fueron:

- Tanto el SM por ingesta de una dieta rica en grasa como el producido por la administración de fructosa comparten secuelas somáticas como bioquímicas que los hacen modelos experimentales adecuados para las consecuencias de la “dieta chatarra” tan comúnmente consumida hoy en nuestra sociedad.
- Se detectan alteraciones del eje hipófiso-gonadal en ambos tipos de SM que pueden explicar en parte la reducción de la fertilidad que acompaña a la pandemia de obesidad que enfrenta el mundo actual.

- En etapas sucesivas del desarrollo el SM producido por agregado de fructosa a la dieta se pasa por una etapa inicial de sensibilidad aumentada a la insulina que coexiste con cambios somáticos y un desarrollo parcial de las secuelas dislipémicas.
- En el SM (tomando como modelo al obtenido por dieta rica en grasas) se producen alteraciones en los ritmos diarios de adipocitoquinas y señales metabólicas circulantes, compatibles con un relevante efecto de la dieta como “Zeitgeber” agregado al fótico en la sincronización del sistema circadiano.
- La melatonina, debido a su actividad citoprotectora, particularmente de la integridad mitocondrial, es eficaz para revertir los aumentos de peso y de PA sistólica, la anormal resistencia a la insulina y la dislipemia que se producen tanto en el SM por ingesta de una dieta rica en grasa como en el producido por la administración de fructosa.
- Este efecto correctivo de la melatonina es ya evidente en la etapa inicial de sensibilidad aumentada a la insulina que se observa en el SM incipiente por administración de 5% de fructosa.
- La melatonina, agente prototípico de fármacos cronobióticos, es eficaz para normalizar las alteraciones en los ritmos diarios de adipocitoquinas y señales metabólicas circulantes que se ven en el SM.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. ANIMALES

Todas las experiencias referidas en el presente trabajo se realizaron en ratas Wistar de un peso aproximado de 150 gramos al comienzo del experimento. Los animales fueron separados en grupos de dos o tres y alojados en jaulas de alambre de acero bajo condiciones ambientales de temperatura y humedad controladas (22 ± 2 °C) y con un régimen de 12 horas de luz (08:00 a 20:00 h) y 12 horas de oscuridad. En las jaulas se colocó viruta de madera esterilizada por autoclave. Diariamente se controló el agua y la comida y día por medio se procedió al cambio de la viruta y la limpieza de las jaulas.

Los animales dispusieron en todo momento de agua y comida “*ad libitum*” consistiendo esta última en alimento balanceado para ratas, tipo Purina, excepto cuando se aclare lo contrario. El análisis de este alimento realizado por de la Asociación de Cooperativas Argentinas, División Nutrición Animal (Lic. Romina Hernández), muestra los siguientes resultados (en %): Humedad 9,20; Proteína Bruta 25; Extracto Etéreo 5; Acidez de las grasas 2.1; Fibra Bruta 3; Ceniza 6.1.

2.1.1. PRODUCCIÓN DEL SM POR DIETA RICA EN GRASA

Las características de la dieta rica en grasa y del control utilizado están resumidas en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1: Composición del régimen y consumo.

	Control	Dieta rica en grasa
% de grasas	3	35
% de carbohidratos	60	35
% de proteínas	16	20
% de vitaminas y minerales	21	10
Contenido calórico (Kcal/g)	2,9	5,4
Grasas consumidas (Kcal/día/animal)	4,86	56,7
Carbohidratos consumidos (Kcal/día/animal)	43,2	25,2
Proteínas consumidas (Kcal/día/animal)	11,5	14,4

El régimen fue balanceado para proteínas como un porcentaje de proteínas ingeridas y para las vitaminas esenciales y minerales. Las grasas con la que se conformaron los regímenes fueron extraídas del aceite de maíz. La ingesta diaria individual de comida fue de 17 ± 1 g en el régimen normal y $13,5 \pm 1$ g en la dieta rica en grasa. De esta manera, el ingreso de calorías fue alrededor de 50 % mayor en las ratas que ingerían la dieta rica en grasas

2.1.2. PRODUCCIÓN DE SM POR DIETA RICA EN FRUCTOSA

Se agregó fructosa en el agua de bebida durante todo el tratamiento. Para obtener el SM establecido la fructosa fue disuelta en una concentración de 100 gramos por litro de agua (10 %). Para obtener un SM incipiente la fructosa fue disuelta en una concentración de 50 gramos por litro de agua (5 %). Día por medio fueron medidos los volúmenes de agua ingeridas y se lavaron los depósitos con sus respectivos bebederos. Los animales controles tomaron agua sin fructosa. El consumo de agua individual fue de alrededor de 20 mL/día.

2.1.3. ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA

Se preparó una solución madre de 2,5 g de melatonina (Gador S.A.) en 100 mL de alcohol etílico la que fue guardada en un frasco de vidrio color caramelo forrado con una protección de aluminio con el objeto de evitar la degradación por luz de la melatonina. A la mitad de los animales se les administró en el agua de bebida 1 mL de la solución de melatonina por litro de agua y los animales controles recibieron 1 mL de alcohol por litro de agua, vehículo de la solución de la melatonina. Las ratas tomaron unos 20 ml/día con 90-95% de este total diario ingerido durante el periodo de oscuridad. Por lo tanto, la dosis usada de melatonina es de aproximadamente 500 µg /día/animal.

2.1.4. DETERMINACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA

Se midió la presión arterial por el método del manguito de cola usando un esfigmomanómetro en ratas no anestesiadas 1 día antes del sacrificio. Posteriormente a una serie de sesiones de entrenamiento de 3 días, se midió la presión sanguínea sistólica de cada rata en un ambiente lo más calmo posible y se calcularon los valores promedio de las presiones sistólicas de tres determinaciones.

2.1.5. PRUEBA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA INTRAPERITONEAL

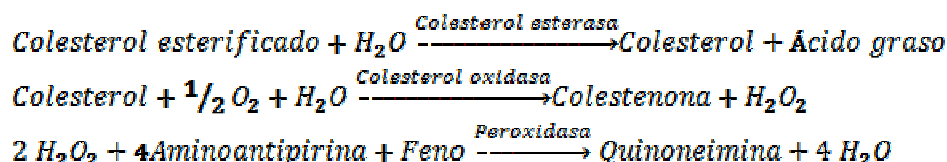
Se efectuó a los 40 días de tratamiento mediante la administración de una única dosis de glucosa (2 g glucosa /kg de peso corporal) por vía intraperitoneal a una concentración de 50 % p/v en solución fisiológica. Se extrajo una muestra de sangre basal (tiempo 0) de la cola del animal y muestras adicionales a los 30, 60 y 120 minutos de la administración de glucosa.

Para tomar la muestra de sangre se frotó la cola de la rata con una torunda con alcohol (96°) en un ambiente cálido. A continuación, se realizó un corte pequeño en el extremo distal de la cola con una tijera y se recolectó una gota de sangre obtenida de la herida (aprox. 0,1 µL) directamente sobre la tira reactiva, previamente insertada en un glucómetro digital (On-Call EZ. ACON Laboratories Inc.). La gota de sangre al ser colocada sobre la tira de examen es automáticamente absorbida en la celda de reacción con la glucosa oxidasa. Se forma una corriente eléctrica transitoria durante la reacción y la concentración de glucosa en sangre es calculada partiendo de la corriente detectada por el analizador, mostrándose el resultado en la pantalla del glucómetro. Se utilizaron muestras patrón para el control de las tiras y del equipo de medición.

2.2. PROCEDIMIENTOS BIOQUÍMICOS

2.2.1. COLESTEROL TOTAL

Se utilizaron los reactivos enzimáticos colesterol oxidasa/peroxidasa de BioSystems S.A. para medir la concentración total de la muestra de plasma. Tanto el colesterol libre como el esterificado presente en plasma, según las reacciones acopladas descritas a continuación, genera un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría a 500 nm[254,255].



COMPOSICIÓN

Reactivo A. Pipes 35 mmol/L, colato sódico 0,5 mmol/L, fenol 28 mmol/L, colesterol esterasa > 0,2 U/mL, colesterol oxidasa > 0,1 U/mL, peroxidasa > 0,8 U/mL, 4-aminoantipirina 0,5 mmol/L, pH 7,0. Patrón S de Colesterol. Colesterol 200 mg/dL equivalente a 5,18 mmol/L.

PROCEDIMIENTO

Los pasos que se utilizaron para la medición del colesterol fueron las siguientes:

- Se llevó el Reactivo (A) a temperatura ambiente
- Se pipeteó en tubos de Kahn según el siguiente protocolo.

	Blanco	Patrón	Muestra
Patrón Colesterol	-	10 µL	-
Muestra	-	-	10µL
Reactivo(A)	1,0 mL	1,0mL	1,0mL

- Se agitaron las muestras y se incubaron los tubos durante 5 minutos a 37 °C.
- Se leyó la absorbancia (A) del Patrón y de la Muestra a 500 nm frente al Blanco antes de transcurridas 2 h, ya que luego de este tiempo el color de la muestra se vuelve inestable.

CÁLCULO

La concentración de color en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

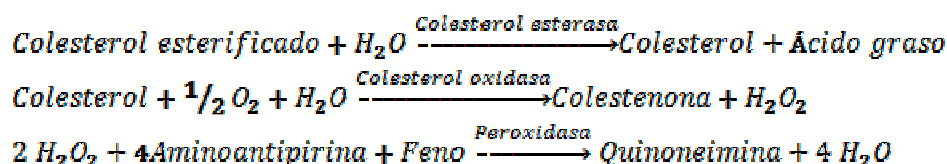
$$\frac{A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Patrón}}} \times C_{\text{Patrón}} = C_{\text{Muestra}}$$

Se utilizó para calibrar el Patrón de Colesterol suministrado por el fabricante.

	Plasma
$\frac{A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Patrón}}}$	$\times 200 = \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \text{colesterol}$

2.2.2. COLESTEROL HDL.

Las VLDL y las LDL presentes en la muestra se precipitan en presencia de fosfotungstato e iones magnesio. El sobrenadante contiene las HDL, cuyo colesterol se cuantifica espectrofotométricamente mediante las reacciones acopladas descriptas a continuación[256,257].



COMPOSICIÓN

Reactivo A: Fosfotungstato 0,4 mmol/L, cloruro de magnesio 20 mmol/L.

Reactivo B: Fosfatos 35 mmol/L, colesterol esterasa > 0,2 U/mL, colesterol oxidasa > 0,1 U/mL, peroxidasa > 1 U/mL, 4-aminoantipirina, 0,5 mmol/L, colato sódico 0,5 mmol/L, diclorofenol-sulfonato 4 mmol/L, pH 7,0.

Patrón de Colesterol HDL: 1 x 5 mL. Colesterol 15 mg/dL. Patrón primario acuoso.

PROCEDIMIENTO

Los pasos que se utilizaron para la medición del colesterol fueron los siguientes:

- a) Se pipeteó en un tubo de Kahn:

Muestra	0,2 mL
Reactivo	0,5 mL

- b) Se agitó y se dejó durante 10 min a temperatura ambiente.
c) Se centrifugó durante 10 min a un mínimo de 4.000 r.p.m.
d) Se recogió con cuidado el sobrenadante.
e) Se atemperó el Reactivo B a temperatura ambiente.
f) Se pipeteó en tubos de ensayo:

	Blanco	Patrón	Muestra
Agua destilada	50 µL	-	-
Patrón Colesterol HDL (S)	-	50 µL	-
Sobrenadante muestra	-	-	50µL
Reactivo(B)	1,0 mL	1,0mL	1,0mL

- g) Se agita bien la muestra y se incuban los tubos durante 30 min a temperatura ambiente (15-26°C) o durante 5 minutos a 37°.
h) Se leyó la absorbancia (A) del Patrón y de la Muestra a 500±10 nm frente al Blanco antes transcurridas 30 min, periodo en el que el color de la muestra es estable.

CÁLCULO

La concentración de colesterol HDL en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

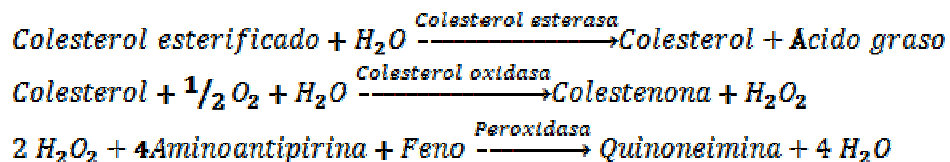
$$\frac{A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Patrón}}} \times C_{\text{Patrón}} = C_{\text{Muestra}}$$

Se utilizó para calibrar el Patrón de colesterol HDL suministrado.

	Plasma
$\frac{A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Patrón}}}$	$\times 52,5 = \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \text{ colesterol HDL}$

2.2.3. COLESTEROL LDL

Mediante el polivinil sulfato un detergente específico se hace precipitar las LDL. Posteriormente se cuantifica el colesterol espectrofotométricamente mediante las reacciones acopladas descritas a continuación.



La concentración de colesterol LDL se calcula por diferencia entre los valores de colesterol en el suero y en el sobrenadante obtenidos tras la precipitación[258].

COMPOSICIÓN

Reactivo A. Polivinil sulfato 3 g/L, polietilenglicol 3 g/L.

Reactivo para Colesterol. Pipes 35 mmol/L, colato sódico 0,5 mmol/L, fenol 28 mmol/L, colesterol esterasa > 0,2 U/mL, colesterol oxidasa > 0,1 U/mL, peroxidasa > 0,8 U/mL, 4-aminoantipirina 0,5 mmol/L, pH 7,0. Patrón S de Colesterol. Colesterol 200 mg/dL equivalente a 5,18 mmol/L.

PROCEDIMIENTO

Los pasos que se utilizaron para la medición del colesterol fueron las siguientes:

- a) Se pipeteó en un tubo de Kahn.

Muestra	0,2mL
Reactivo A	0,2mL

- b) Se agitaron las muestras y se las dejaron reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
c) Se centrifugaron las muestras durante 15 min a 4.000 r.p.m.
d) Se recogió el sobrenadante con cuidado de no arrastrar el precipitado.

Colorimetría

- e) Se llevó a temperatura ambiente el reactivo para la medición de Colesterol.
f) Se pipeteó en cubetas.

	Blanco	Patrón	Muestra
Agua destilada	20 µL	-	-
Patrón Colesterol	-	20 µL	-
Sobrenadante muestra	-	-	20µL
Reactivo para Colesterol	1,0 mL	1,0mL	1,0mL

- g) Se mezcló y después de 30 min a temperatura ambiente (16 - 25°C) se leyeron las absorbancias (A) del Patrón y de las muestras a (A) a 500 nm.

CÁLCULO

La concentración de colesterol en sobrenadante se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

$$\frac{A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Patrón}}} \times C_{\text{Patrón}} = C_{\text{Muestra}} \text{ colesterol sobrenadante}$$

Como se utilizó para calibrar el Patrón de Colesterol, incluido en el Kit de Colesterol:

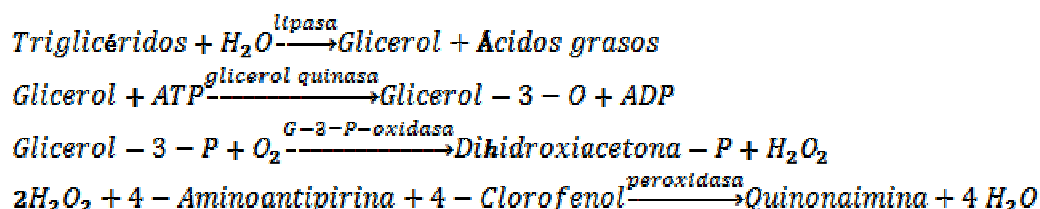
	Plasma
$\frac{A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Patrón}}}$	$\times 200 = \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \text{ colesterol}$

La concentración de colesterol LDL en la muestra se calcula:

$$\text{Colesterol LDL} = \text{Colesterol Total} - \text{Colesterol en sobrenadantes}$$

2.2.4. TRIGLICÉRIDOS

Los triglicéridos presente en la muestra originan, según las reacciones acopladas descriptas a continuación, un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría[259,260].



COMPOSICIÓN

Reactivo A: Pipes 45 mmol/L, 4 - clorofenol 6 mmol/L, cloruro magnésico 5 mmol/L, lipasa > 100 U/mL, glicerol quinasa > 1,5 U/mL, glicerol-3-fosfato oxidasa > 4 U/mL, peroxidasa > 0,8 U/mL, 4-aminoantipirina 0,75 mmol/L, ATP 0,9 mmol/L, pH 7,0.

Patrón S de Triglicéridos: Glicerol equivalente a trioleina 200 mg/dL (2,26 mmol/L). Patrón primario acuoso.

PROCEDIMIENTO

- a) Se atemperó el Reactivo a temperatura ambiente y se Se pipeteó en tubos de ensayos según el esquema;

	Blanco	Patrón	Muestra
Patrón triglicéridos	-	10 µL	-
Muestra	-	-	10µL
Reactivo(A)	1,0 mL	1,0mL	1,0mL

- Se agitó bien y se incubaron los tubos durante 15 min a temperatura ambiente.
- Se leyó la absorbancia (A) del Patrón y de la Muestra a 500 nm frente al Blanco antes de transcurridas 2 h tiempo que es estable el color.

CÁLCULO

La concentración de triglicéridos en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

$$\frac{A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Patrón}}} \times C_{\text{Patrón}} = C_{\text{Muestra}}$$

Se utilizó para calibrar el Patrón de Triglicéridos suministrado:

	Plasma
$\frac{A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Patrón}}} \times 200 = \frac{mg}{dL} \text{ triglicéridos}$	

2.2.5. CREATININA

La creatinina presente en la muestra reacciona con el picrato en medio alcalino originando un complejo coloreado. Se mide la velocidad de formación de dicho complejo en periodos iniciales cortos, evitándose así la interferencia de otros compuestos[261,262].

COMPOSICIÓN

Reactivo A. Hidróxido sódico 0,4 mol/L, detergente.

Reactivo B. Acido pícrico 25 mmol/L.

Patrón S de Creatinina: creatinina 2 mg/dL (177 mmol/L). Patrón primario acuoso.

PROCEDIMIENTO

Los pasos que se utilizaron para la medición de la creatinina fueron los siguientes:

- Se precalentaron los reactivos a 37°C durante unos minutos.
- Se pipeteó en una cubeta:

Reactivo de Trabajo	1,0 mL
Patrón S o Muestra	0,1mL

- Se colocó la mezcla en 1 cubeta que se insertó en el espectrofotómetro e inmediatamente se puso un cronómetro
- Se leyó la absorbancia a 500 nm después de 30 s (A₁) y de 90 s (A₂).

CÁLCULO

La concentración de creatinina en la muestra se calculó a partir de la siguiente fórmula general:

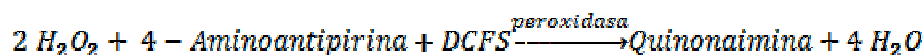
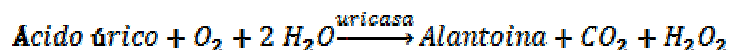
$$\frac{(A_1 - A_2)_{Muestra}}{(A_1 - A_2)_{Calibrador}} \times C_{Calibrador} \times \text{Factor de Dilución}_{Muestra} = C_{Muestra}$$

Se utilizó para calibrar el patrón de Creatinina suministrados:

	Plasma
$\frac{(A_1 - A_2)_{Muestra}}{(A_1 - A_2)_{Calibrador}}$	$\times 2 = \frac{mg}{dL} \text{ Creatinina}$

2.2.6. ÁCIDO ÚRICO

El ácido úrico presente en las muestras origina, según las reacciones acopladas descritas a continuación, un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotométricamente[263].



COMPOSICIÓN

Reactivo A: Fosfatos 100 mmol/L, detergente 1,5 g/L, diclorofenolsulfonato 4 mmol/L, uricasa > 0,12 U/mL, ascorbato oxidasa > 5 U/mL, peroxidasa > 1 U/mL, 4-aminoantipirina 0,5 mmol/L, pH 7,8.

Patrón S de Ácido Úrico: Ácido úrico 6 mg/dL

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Reactivo B y Patrón S: Están listo para su uso.

Reactivo A: mezclar en la proporción: 1 mL Reactivo A2 + 24 mL Reactivo A1. Es reactivo ya constituido es estable por 2 meses a 2-8°C.

PROCEDIMIENTO

Los pasos que se utilizaron para la medición fueron los siguientes:

- Se atemperaron los Reactivos a temperatura ambiente
- Se pipeteó en tubos de ensayo:

	Blanco	Patrón	Muestra
Agua Destilada	25 µL		
Patrón S de Ácido Úrico		25 µL	
Muestra			25 µL
Reactivo A	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

- c) Se agitaron e incubaron los tubos durante 10 minutos a temperatura ambiente a (16-25°C)
- d) Se leyeron las absorbancias (A) del patrón y de las Muestras a 520 nm frente al Blanco antes de transcurridos 30 minutos, tiempo en que el color deja de ser estable.

CÁLCULO

Las concentraciones de urea en las muestras se calcularon a partir de la siguiente fórmula general:

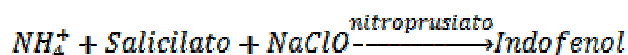
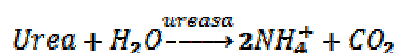
$$\frac{A_{Muestra}}{A_{Patrón}} \times C_{Patrón} \times Factor\ de\ Dilución_{Muestra} = C_{Muestra}$$

Se utilizó para calibrar el patrón de ácido úrico suministrado:

	Plasma
$\frac{A_{Muestra}}{A_{Patrón}}$	$\times 6 = \frac{mg}{dL} \text{ Ácido Úrico}$

2.2.7. UREA

La urea presente en la muestra de suero, según las reacciones descritas a continuación un indofenol coloreado que se cuantifica espectrofotométricamente a 600 nm [264,265].



COMPOSICIÓN

Reactivo A1: Salicilato sódico 62 mmol/L, nitroprusiato sódico 3,4 mmol/L, buffer fosfatos 20 mmol/L, pH 6,9.

Reactivo A2: Ureasa > 500 U/mL.

Reactivo B: Hipoclorito sódico 7 mmol/L, hidróxido sódico 150 mmol/L.

Patrón S de Urea: urea 50 mg/dL (8,3 mmol/L, BUN 23,3 mg/dL). Patrón primario acuoso.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Reactivo B y Patrón S: Están listo para su uso.

Reactivo A: mezclar en la proporción: 1 mL Reactivo A2 + 24 mL Reactivo A1. Es reactivo ya constituido es estable por 2 meses a 2-8°C.

PROCEDIMIENTO

Los pasos que se utilizaron para la medición de urea fueron los siguientes:

- a) Se pipeteó en una cubeta:
b) Se atemperaron los Reactivos a temperatura ambiente

	Blanco	Patrón	Muestra
Patrón S de Urea		10 µL	
Muestra			10 µL
Reactivo A	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

- c) Se agitaron e incubaron los tubos durante 10 minutos a temperatura ambiente a (16-25°C)
d) Se pipeteó:

	Blanco	Patrón	Muestra
Reactivo B	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

- e) Se agitó bien e incubaron los tubos durante 10 minutos a temperatura ambiente (16-25°C),
f) Se leyeron las absorbancias (A) del patrón y de las Muestras a 600 nm frente al Blanco antes de transcurridas las 2 horas tiempo en que el color deja de ser estable.

CÁLCULO

Las concentraciones de urea en las muestras se calcularon a partir de la siguiente fórmula general:

$$\frac{A_{Muestra}}{A_{Patrón}} \times C_{Patrón} \times Factor\ de\ Dilución_{Muestra} = C_{Muestra}$$

Se utilizó para calibrar el patrón de Urea suministrados:

	Plasma
$\frac{A_{Muestra}}{A_{Patrón}} \times 50 = \frac{mg}{dL} Urea$	

2.2.8. TESTOSTERONA

Para la determinación de testosterona plasmática se utilizó la técnica de Radioinmunoanálisis (RIA), marca DAsource TESTO-RIA-CT kit y fabricado por DAsource ImmunoAssays S.A. Rue de l'Industrie, 8, B-1400, Nivelles, Belgium[266]

PRINCIPIO DEL MÉTODO

En tubo recubierto con anticuerpos anti-testosterona inmovilizados en el interior del mismo, una cantidad fija de testosterona marcada con I^{125} compete con la testosterona a medir presente en la muestra ó en el calibrador, por los epitopes de los anticuerpos inmovilizados. Después de la incubación, se mide las cpm por el I^{125} del fondo en las diferentes muestras y la concentración se calcula por interpolación en la curva generada por los calibradores.

PROCEDIMIENTO

- 1) Se marcaron los tubos recubiertos con los anti- testosterona por duplicado para cada uno de los estándares alto y bajo, las muestras y los controles. También se marcaron 2 tubos normales, para la determinación de las Cuentas Totales.
- 2) Después de agitar brevemente los calibradores, las muestras y los controles se agregó 2 µL de cada uno de los tubos.
- 3) Se agregó 0,5 mL de testosterona marcada con I^{125} en cada tubo, incluyendo los tubos no recubiertos para las Cuentas Totales.
- 4) Se agitó suavemente la grilla de tubos para soltar cualquier burbuja cautiva de las paredes de los tubos.
- 5) Se incubaron los tubos durante 3 hs a 37 °C.
- 6) Se aspiró el contenido de los tubos (excepto los de las Cuentas Totales) asegurándose que la punta de la pipeta toque el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
- 7) Se lavaron los tubos con 3 ml de Solución de lavado (TRIS-HCl) (excepto los de las Cuenta Totales) evitando la formación de espuma y se lo aspiró.
- 8) Se dejaron los tubos en posición invertida durante 2 minutos y se volvió a aspirar el líquido restante,
- 9) Se midió la radioactividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

CÁLCULO

- 1) Se calculó la media de cpm de cada uno de los tubos duplicados.
- 2) Se calculó la radioactividad (R) unida como un porcentaje de la unión con respecto a la del calibrador cero (0) de acuerdo con la siguiente fórmula.

$$R/R0(\%) = \frac{cpm \text{ (calibrador ó muestra)}}{cpm \text{ (calibrador Cero)}} \times 100$$

- 3) Utilizando papel semilogaritmico se representaron los valores de (R/R0 (%)) de cada calibrador en función de las concentraciones de TESTO de cada calibrador.
- 4) Se determinaron los valores de las concentraciones de las muestras por interpolación de los valores de radioactividad de las muestras en porcentajes (R/R0 (%)) en la curva de calibración.
- 5) En todos los ensayos, se calculó el porcentaje total de enlace del trazador en ausencia de testosterona no marcada (B0/T).

2.2.9. LH Y FSH

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La concentración sérica de LH y FSH fue determinada por duplicado utilizando RIAs por doble anticuerpo. Los materiales para el ensayo fueron provistos por el NIAMDD Rat Pituitary

Program. El método se basa en la inhibición competitiva por la unión a su anticuerpo (Ac) específico de una sustancia fría (no marcada radiactivamente), que es el antígeno (Ag), y la misma sustancia previamente marcada con un isótopo radiactivo, el antígeno marcado (Ag*). Se obtienen así complejos antígeno-anticuerpo marcados (Ag*-Ac) y sin marcar (Ag-Ac).

PROCEDIMIENTO DE MARCADO

Las hormonas puras se presentan liofilizadas, siendo necesario reconstituirlas para su utilización, según las instrucciones del NIDDK. Como marcador para las hormonas peptídicas se ha utilizado el I^{125} . El marcaje se lleva a cabo mediante el método de la lactoperoxidasa. Con este método se consigue, por medio de una reacción enzimática, que el ión yoduro radiactivo pase a yodo molecular, que es capaz de desplazar al hidrógeno del anillo fenólico de la tirosina, que forma parte de la estructura molecular de las proteínas. Para ello, sobre una alícuota de la hormona se añaden:

- 1) 25 μ L de buffer para tamponar la solución a pH 7,6.
- 2) 0,5 mCi de I^{125} .
- 3) 0,5mg de lactoperoxidasa (Sigma)/ 10mL de agua destilada. Se deja reaccionar durante cuatro minutos, en agitación constante.

La reacción se detiene por la adición de buffer que permite separar la hormona marcada del radioisótopo que no ha reaccionado. Una vez terminada la reacción, se purifica el producto de la radioyodación mediante una cromatografía en columna con gel de Sephadex G-50 fino (Pharmacia LKB), con el fin de separar la hormona marcada del yodo libre

CURVA PATRÓN

La curva patrón se utiliza para calcular la relación entre la hormona yodada ligada al anticuerpo y la concentración de hormona fría. Para ello, se preparan diluciones sucesivas de una solución de hormona fría de concentración conocida. Cada punto de la curva patrón se pipetea por triplicado y se utilizan al menos dos curvas patrón, una al principio y otra al final del ensayo, para controlar las posibles variaciones debidas a los diferentes tiempos de incubación entre las primeras y las últimas muestras. También se utilizan los siguientes puntos de referencia (todos por triplicado):

- 1) Controles de la actividad total añadida, expresados en cuentas por minuto (cpm). Contienen únicamente hormona yodada en la misma cantidad que el resto de los tubos del ensayo.
- 2) Controles de unión máxima, que miden la unión máxima de la hormona marcada con el Ac en ausencia de hormona fría.
- 3) Controles de unión no específica, que miden la radiactividad residual como consecuencia de la unión de la hormona marcada a la pared del tubo en el que se realiza el ensayo. No contiene ni anticuerpo ni hormona fría.

De cada punto de la curva patrón se determina las cpm, procedentes de los complejos Ag*-Ac. Cada punto de la curva se valora por triplicado, obteniéndose las cpm medias de cada uno de ellos. La captación se determina mediante la fórmula:

$$\frac{B_c - N_e}{B_0 - N_e} \times 100$$

Donde B_c mide la unión de la hormona marcada con el Ac en presencia de concentraciones conocidas de la hormona sin marcar, B_0 mide la unión máxima de la hormona marcada con el Ac en ausencia de la hormona sin marcar y N_e mide la radiactividad residual o no específica. Para su representación se usa un papel semilogarítmico, con el eje de ordenadas dividido de forma lineal y el eje de abscisas logarítmicamente.

PROCEDIMIENTO

Los RIAs de LH y FSH se realizan siguiendo el protocolo detallado a continuación:

- 1) Se pipetea alícuotas de la dilución patrón (concentraciones conocidas descendentes a partir de 25 ng/mL) en 200 µL de buffer.
- 2) Se pipetea 25 µL de cada uno de los plasmas problema, completándose hasta 200 µL con tampón III.
- 3) Se pipetea 200 µL del anticuerpo
- 4) Se preincuba 24 horas a 4°C.
- 5) Se añaden 200 µL de hormona marcada (10.000 cpm/tubo) y se agitan los tubos.
- 6) Se incuba 72 horas a 4°C.
- 7) Se añade *Staphylococcus aureus*, (10% p/v en 0,5% de Triton X-100), en un volumen igual al de plasma usado en el análisis. Agitar.
- 8) Se incuba 20 minutos a 4°C.
- 9) Una vez transcurridos los 20 minutos de incubación, se centrifuga a 3.000 rpm, 15 min a 4°C, y se aspira el sobrenadante. Posteriormente, se mide la radiactividad del precipitado en un contador de radiación gamma
- 10) Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron del 8% y 10% respectivamente. Los datos son expresados en ng/ml de acuerdo a la preparación de los estándares de referencia.

2.2.10. MELATONINA

PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se utilizó la prueba de ELISA (IBL IMMUNO Biological Laboratories, Hamburgo). El procedimiento de ensayo sigue el principio básico de los ELISAs competitivos, donde existe competencia entre el antígeno biotinilado y el no biotinilado por un número fijo de sitios de unión. La cantidad de antígeno biotinilado unido al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración del analito en la muestra. Cuando el sistema está en equilibrio, el antígeno biotinilado libre se elimina con una etapa de lavado y el antígeno biotinilado unido al anticuerpo se determina empleando una estreptavidina fosfatasa alcalina como marcador y p-nitrofenil fosfato como sustrato. La cuantificación se logra por comparación de la actividad enzimática de la muestra desconocida con una curva de respuesta preparada con estándares conocidos.

PROCEDIMIENTO

Se usan muestras de plasma extraídas con metanol mediante las columnas de extracción provistas con el kit. El rendimiento de extracción con este procedimiento es aproximadamente 90-100%. El procedimiento consistió en:

- 1) Pipeteo de 50 μ L de cada Estándar extraído, Control extraído y muestra extraída en los pozos respectivos de la Placa de Microtitración.
- 2) Pipeteo de 50 μ L de Melatonina Biotina en cada pozo.
- 3) Pipeteo de 50 μ L de Antisero de Melatonina en cada pozo. Agitar la placa cuidadosamente.
- 4) Cubrir la placa con un folio adhesivo e incubar 14-20 h a 2-8 °C.
- 5) Descargar la solución de incubación y lavar la placa 3 x con 250 μ L de Solución Buffer de Lavado diluida. Remover el exceso de solución golpeando cuidadosamente la placa invertida sobre una toalla de papel.
- 6) Pipetear 150 μ L de Conjugado Enzimático preparado fresco en cada pozo.
- 7) Incubar 120 min a temperatura en un agitador orbital (500 rpm).
- 8) Aprox. 10 min antes de finalizar la incubación prepare la Solución de Substrato PNPP.
- 9) Descargar la solución de incubación. Lavar la placa 3 x con 250 μ L de Solución Buffer de Lavado diluida. Remover el el exceso de solución.
- 10) Pipetear 200 μ L de Solución de Substrato PNPP preparado fresco en cada pozo.
- 11) Incubar 20-40 min a temperatura ambiente en un agitador orbital (500 rpm).
- 12) Detener la reacción del sustrato añadiendo 50 μ L de Solución de Parada PNPP en cada pozo.
- 13) Medir la densidad óptica con un fotómetro a 405 nm (Longitud de onda de referencia: 600-650 nm) dentro de los 60 min después de pipetear la Solución de Parada.

CÁLCULO

La densidad óptica de los estándares (eje-y, lineal) se plotea contra su concentración (eje-x, logarítmico) en papel semi-logarítmico. La concentración de las muestras se puede leer directamente de la curva estándar. La variación intra- e interensayo fue de 7 y 9 respectivamente y la sensibilidad de 10 pg/mL.

2.2.11. INSULINA, LEPTINA Y ADIPONECTINA

PRINCIPIO DEL MÉTODO

Los niveles plasmáticos de Insulina, leptina y adiponectina, se han determinado utilizando la técnica de inmunoensayo, mediante kits comerciales, utilizando el sistema Luminex 100™ IS, (Luminex Corporation, Osterhout. The Netherlands) y los kits Milliplex MAP (Millipore Corporation, Billerica, MA 01821, USA). Los kits utilizados para la medida de hormonas en el

presente estudio, han sido: #RGT-88K para insulina y leptina, y el kit RADPK-81K-ADPN para la medida de adiponectina. Los datos de fluorescencia han sido analizados mediante el software Master Plex™ QT. Todos los análisis se realizaron de acuerdo a los protocolos y especificaciones de los kits antes mencionados. El método se basa en la utilización de microesferas, donde cada microesfera posee un color específico interno, el cual varía de un rojo hasta llegar a tonalidad verde. Se han definido 100 colores diferentes de microesferas, permitiendo así, que cada esfera se encuentre identificada por su color interno. Cada microesfera lleva unidos anticuerpos específicos para un analito. Cuando el analito presente en la muestra es capturado por la microesfera, se añade un anticuerpo marcado con biotina, que al ser incubado con streptavidina- ficoeritrina (L-SAPE), genera una reacción sobre la superficie de la esfera, que emite fluorescencia. Para obtener las concentraciones hormonales, las microesferas pasan una a una, a través de dos tipos de láser; uno, que posee la función de excitar el color interno, identificando así la microesfera; y un segundo láser que excita la ficoeritrina unida a la microesfera, obteniendo así la fluorescencia media (MFI). Esta fluorescencia obtenida; es convertida en concentración, haciendo uso de la curva estándar específica de cada analito [267].

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- 1) Preparación de las microesferas; se sonica el vial que contiene las microesferas, se agita en vórtex durante 1 minuto, se añaden 150µL de cada microesfera y se lleva a un volumen final de 3mL con reactivo diluyente.
- 2) Preparación de los controles de calidad; se reconstituyen con 250µL de agua destilada, se invierte varias veces el vial hasta mezclar completamente. Después de 5-10 minutos en reposo, se transfiere a un tubo de polipropileno.
- 3) Preparación del tampón de lavado; se deja a temperatura ambiente el tampón de lavado (10X) y se mezcla. Se diluyen 30mL en 270mL de agua destilada.
- 4) Preparación de la solución matriz; se añade 1mL de agua destilada al vial y se mezcla (solo en el caso de insulina y adiponectina).
- 5) Preparación de los estándares; se añaden 250µL de agua destilada al stock de estándar, se invierte varias veces el vial, se deja reposar por 5 minutos, después se transfiere a un tubo de polipropileno y se realizan subsecuentes diluciones para obtener la curva estándar.

PROCEDIMIENTO

- 1) Humedecer los 96 pocillos de la placa con buffer de lavado.
- 2) Añadir 25µL de muestra, estándar y controles de calidad en los pocillos designados para cada analito.
- 3) Añadir los anticuerpos (microesferas), e incubar durante 16-18 horas, en agitación constante a 4°C.
- 4) Realizar dos lavados de la placa con buffer de ensayo.
- 5) Agregar 25µL del anticuerpo de detección en cada pocillo.
- 6) Incubar durante 1 hora, a temperatura ambiente y en agitación constante.
- 7) Sin lavar, agregar a cada pocillo, 25µL de la solución que contiene ficoeritrina- estreptomicina.

- 8) Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, en agitación constante y protegido de la luz.
- 9) Lavar la placa 3 veces con buffer de lavado.
- 10) Añadir a cada pocillo 100 μ L del líquido del sistema.
- 11) Inmediatamente leer en el aparato Luminex 100™ IS, aplicando las especificaciones y el protocolo de lectura, según el proveedor.

2.3. PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS

Después de verificar la normalidad de la distribución de los datos, el análisis estadístico de los resultados se realizó por test de t de Student o análisis de la varianza (ANOVA) de una vía o factorial de dos víasseguido por pruebas de comparación múltiple de Bonferroni como se indica. Los valores de P inferiores a 0.05 se tomó como indicación de significación estadística.

3. RESULTADOS

3.1. OBJETIVO DE LA PARTE 1

Estudiar distintas secuelas somáticas y bioquímicas del SM producido por dieta hipergrasa en comparación con las del SM por administración de fructosa al 10% en el agua de bebida.

3.1.1. PARÁMETROS SOMÁTICOS Y BIOQUÍMICOS EN EL SM ESTABLECIDO LUEGO DE UNA DIETA RICA EN GRASAS

En la Fig. 3.1 se muestran los cambios en peso corporal y PA sistólica en ratas alimentadas con una dieta hipergrasa luego de 11 semanas de tratamiento. El peso corporal aumentó en un 35% y la PA en un 12% (13 mmHg) siendo ambas diferencias significativas ($t= 2.567$, $P< 0.03$ y $t= 3.606$, $P< 0.004$, respectivamente).

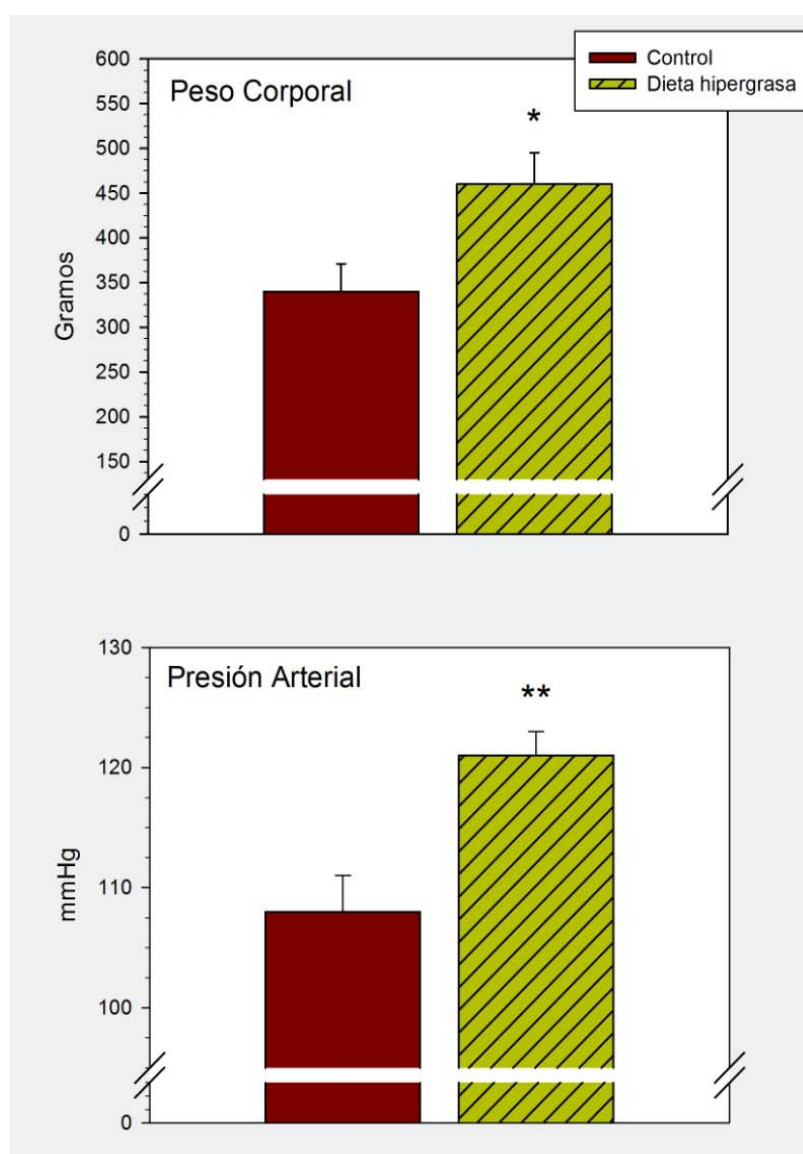


Fig. 3.1. Efecto de una dieta hipergrasa sobre el peso corporal y la PA sistólica. Media $\pm$ ES (n= 8 por grupo) * $p< 0.03$, ** $p< 0.004$ vs .control.

En la Fig. 3.2 se grafican los resultados de la prueba de tolerancia a la glucosa i.p. en ratas con SM establecido luego de recibir una dieta hipergrasa durante 11 semanas. Excepto en el basal, los valores de glucemia fueron superiores en las ratas con SM a todos los tiempos examinados ($P < 0.001$ para el factor dieta en un ANOVA factorial). La mayor diferencia fue notada a los 30 min de la administración de glucosa (control, 281 mg/dL vs dieta hipergrasa, 360 mg/dL, $P < 0.001$).

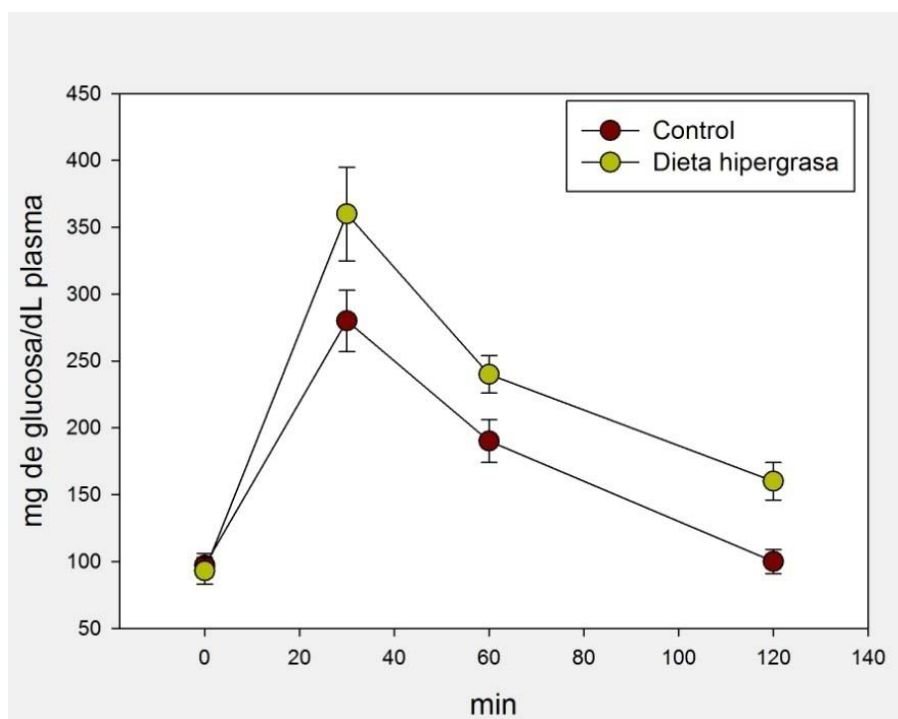


Fig. 3.2. Curva de tolerancia a la glucosa en ratas sometidas a una dieta hipergrasa durante 11 semanas vs. controles. Media $\pm$ ES (n= 6-8 por grupo)

La Fig. 3.3 resume los cambios en varios analitos en ratas con SM por dieta hipergrasa. Los valores de colesterol-LDL fueron significativamente mayores en las ratas con SM ($t = 3.606$, $P < 0.0001$), así como los de colesterol total ($t = 3.62$, $P < 0.003$) mientras que los de colesterol-HDL, creatinina, urea o ácido úrico no difirieron de los controles.

De la misma forma los valores de trigliceridemia (Fig. 3.4) fueron significativamente mayores en las ratas con SM por dieta hipergrasa ($t = 2.731$, $P < 0.02$).

3.1.2. PARÁMETROS SOMÁTICOS Y BIOQUÍMICOS EN EL SM ESTABLECIDO LUEGO DE LA ADMINISTRACIÓN DE FRUCTOSA

El análisis estadístico del peso corporal de los animales que recibieron fructosa al 10% en agua de bebida y su control mostró que su peso era 14% mayor que los controles (Fig. 3.5) ($t = 4.07$; $P < 0.001$). Con respecto a la PA se observó que el tratamiento con fructosa produjo un aumento de 15 mmHg ($t = 2.6$; $P < 0.02$). (Fig. 3.5).

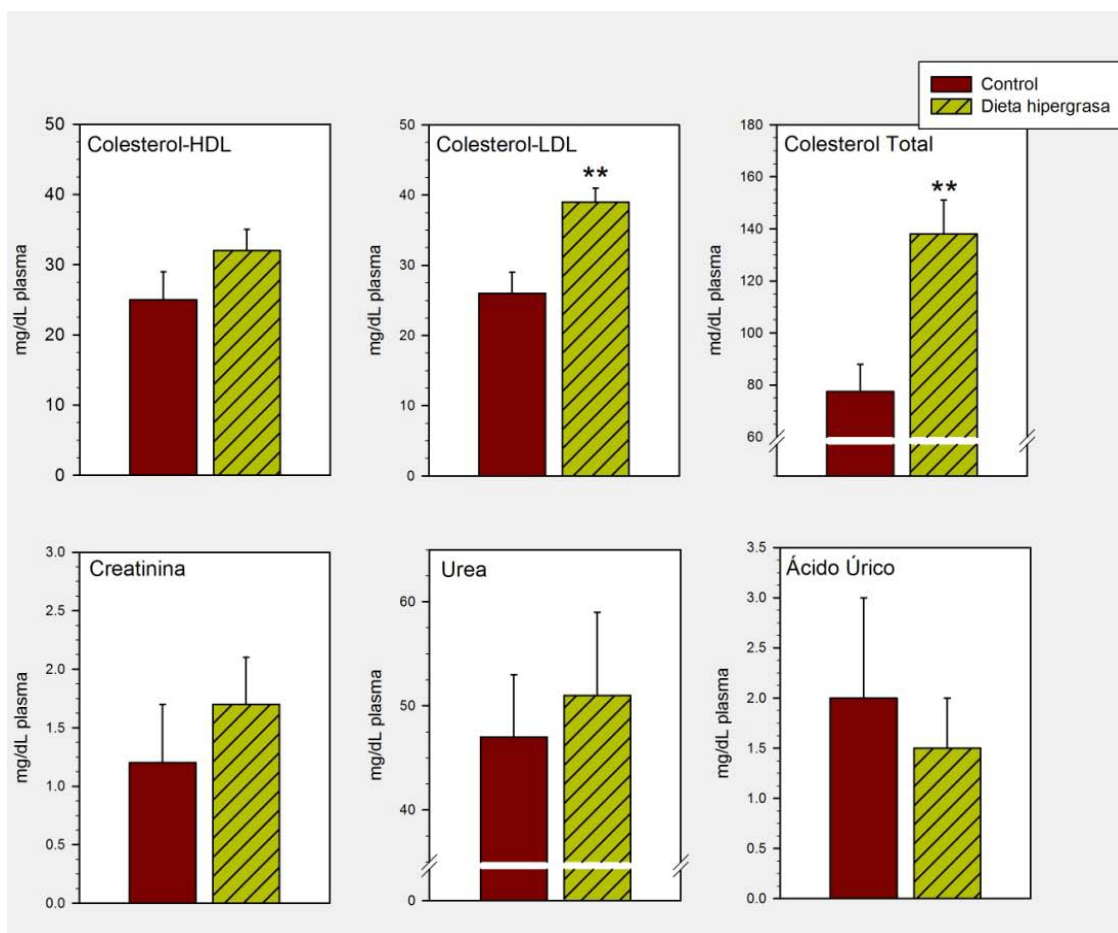


Fig. 3.3. Valores plasmáticos de varios analitos en plasma de ratas sometidas a una dieta hipergasa durante 11 semanas. Media $\pm$ ES (n= 6-8 por grupo) ** $P < 0.01$ vs. Control.

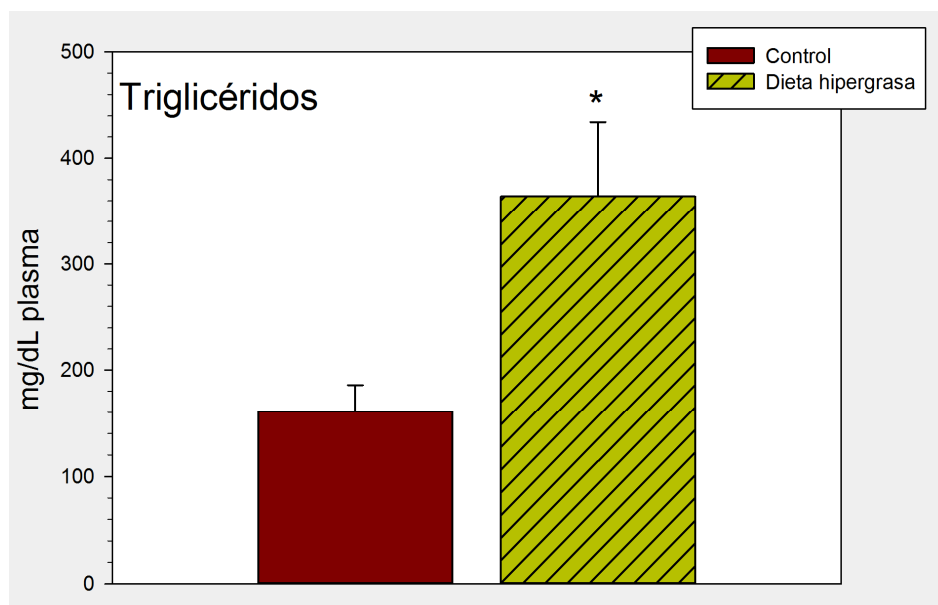


Fig. 3.4. Trigliceridemia en ratas sometidas a una dieta hipergasa durante 11 semanas. Media $\pm$ ES (n= 8 por grupo) * $P < 0.02$ vs. Control.

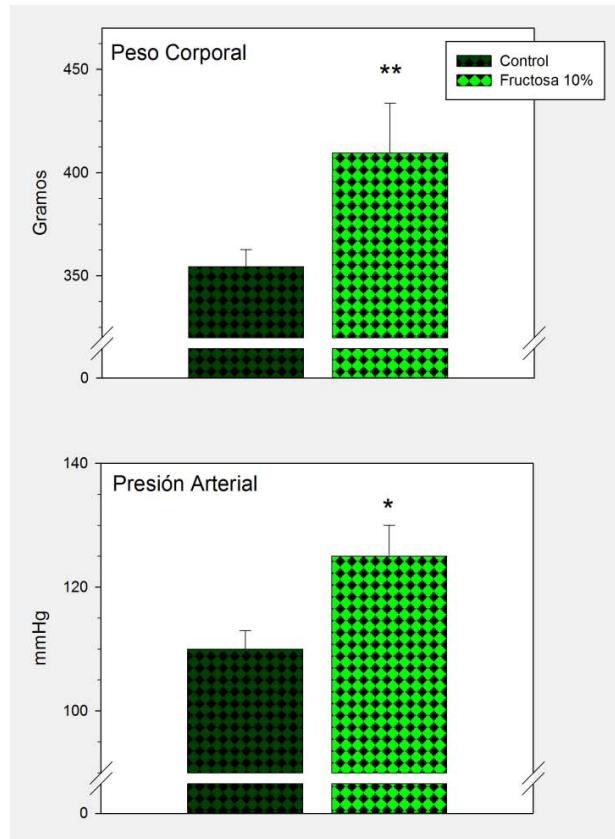


Fig. 3.5. Efecto del SM por fructosa al 10% sobre el peso corporal y la PA sistólica. Media $\pm$ ES (n= 8 por grupo)
 * $p < 0.02$. ** $p < 0.01$ vs .control.

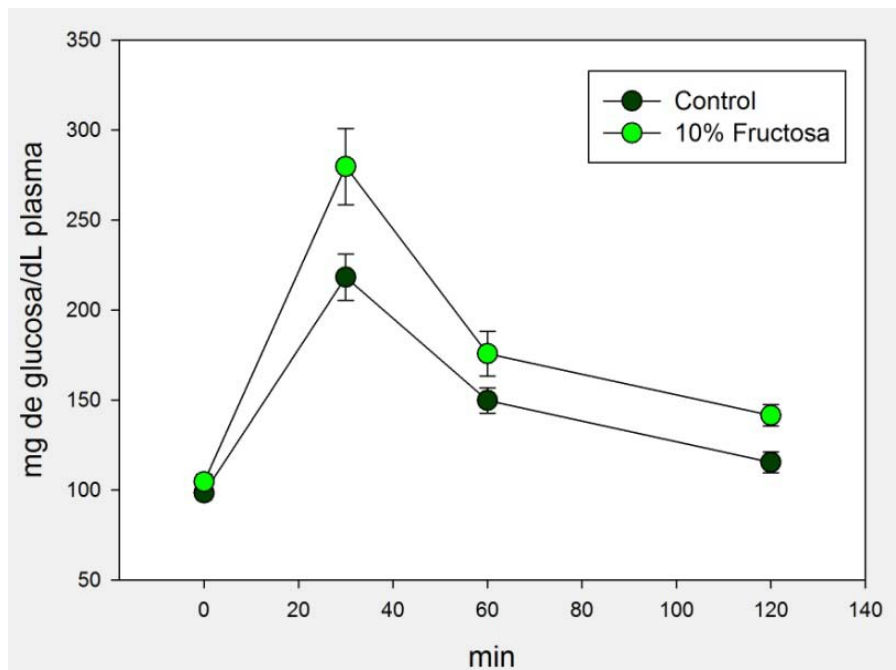


Fig. 3.6. Curva de tolerancia a la glucosa en ratas con SM por administración de fructosa al 10%. Media $\pm$ ES (n= 6-8 por grupo)

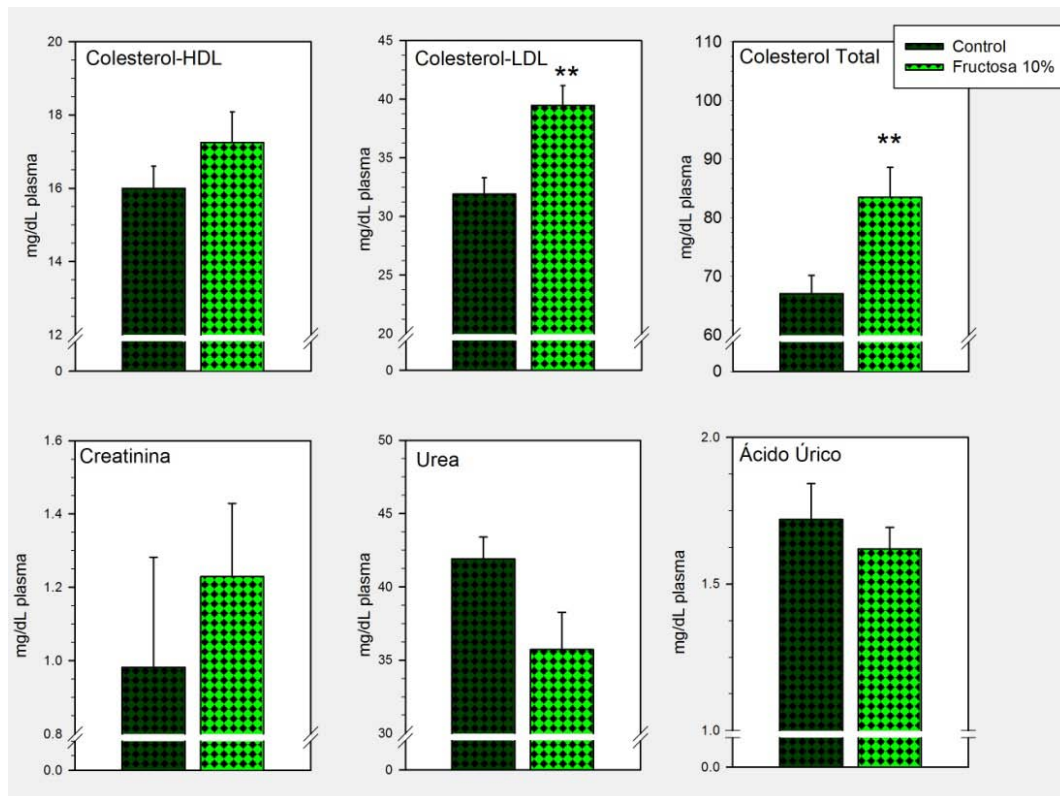


Fig. 3.7. Valores plasmáticos de varios analitos en plasma de ratas con SM por dieta rica en fructosa. Media $\pm$ ES (n= 6-8 por grupo) ** $P < 0.01$ vs. Control.

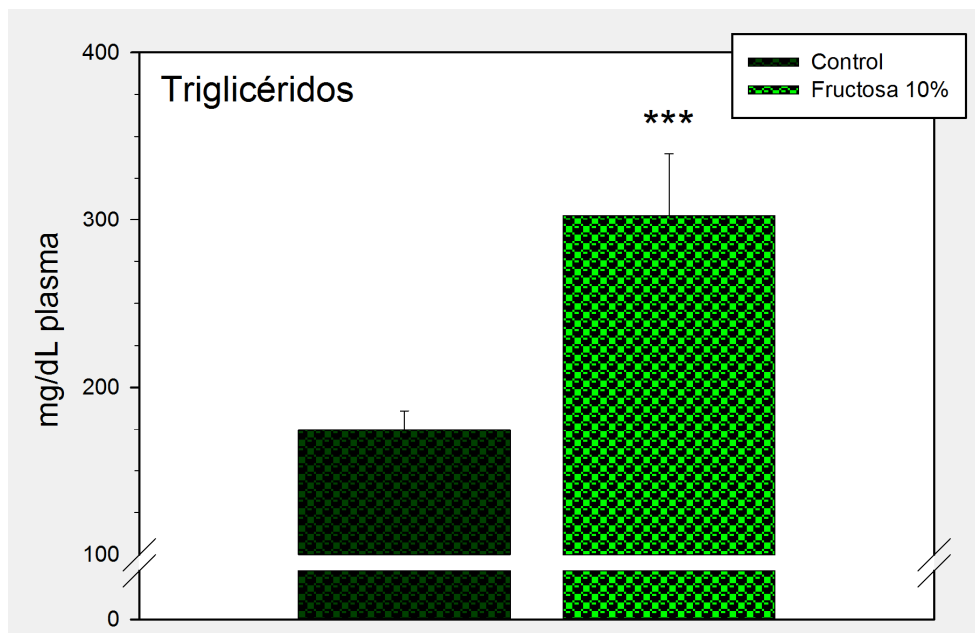


Fig. 3.8. Concentración de triglicéridos en plasma de ratas con SM por administración de fructosa. Media $\pm$ ES (n= 8 por grupo) * $P < 0.001$**

En la Fig. 3.6 se grafican los resultados de la prueba de tolerancia a la glucosa i.p. en ratas con SM por administración de fructosa al 10%. Excepto en el basal, los valores de glucemia fueron superiores en las ratas con SM a todos los tiempos examinados ($P < 0.001$ para el factor dieta en ANOVA factorial). La mayor diferencia fue notada a los 30 min de la administración de glucosa (Control, 218 mg/dL vs. Fructosa 279 mg/dL, $P < 0.001$).

La Fig. 3.7 muestra los cambios en varios analitos en ratas con SM por dieta rica en fructosa. Los valores de colesterol-LDL fueron 26% mayores ($t = 3.46$, $P < 0.01$) y los de colesterol total 24% mayores en las ratas con SM así como los de colesterol total ($t = 2.82$, $P < 0.01$) mientras que los de colesterol-HDL, creatinina, urea o ácido úrico no difirieron de los controles.

Con respecto a los triglicéridos (Fig. 3.8) sus niveles se duplicaron en los animales que recibieron fructosa en el agua de bebida en comparación al control ($t = 3.3$; $P = 0.005$).

3.1.3. CAMBIOS EN EL EJE HIPÓFISO-GONADAL DEL SM ESTABLECIDO PRODUCIDO POR UNA DIETA RICA EN GRASAS

En la Fig. 3.9 se muestran los cambios en niveles plasmáticos de LH, FSH y testosterona y las variaciones del peso testicular, del epidídimo y de las vesículas seminales producidos por una dieta rica en grasas en ratas.

Este tipo de SM se acompaña de un incremento de 211% en los niveles de LH ($t = 4.92$, $P < 0.01$) y de una disminución de 38% en los de testosterona ($t = 3.334$, $P < 0.01$) sin cambios en el resto de los parámetros examinados.

3.1.4. CAMBIOS EN EL EJE HIPÓFISO-GONADAL DEL SM ESTABLECIDO PRODUCIDO POR FRUCTOSA

En la Fig. 3.10 se observan los cambios producidos por una sobrecarga de 10% fructosa en la concentración plasmática de LH, FSH y testosterona y sobre los pesos testiculares y de epidídimos y vesículas seminales. En relación a la testosterona plasmática, los animales tratados presentaron niveles indetectables (menor a 0.1 ng/dL) vs 1.76 ± 0.413 ng/dL en controles ($t = 4.0$; $P = 0.001$)

A su vez, en el estudio de los niveles de las hormonas hipofisarias, se observó que los animales que ingirieron 10% fructosa tenían una concentración de LH dos veces mayor que los animales control ($t = 2.12$; $P < 0.05$) no observándose cambios significativos en los niveles plasmáticos de FSH.

Si bien los pesos testicular y epididimario no mostraron diferencias entre grupos, el peso de las vesículas seminales aumentó un 34% en el grupo tratado con fructosa ($t = 3.02$; $P < 0.02$).

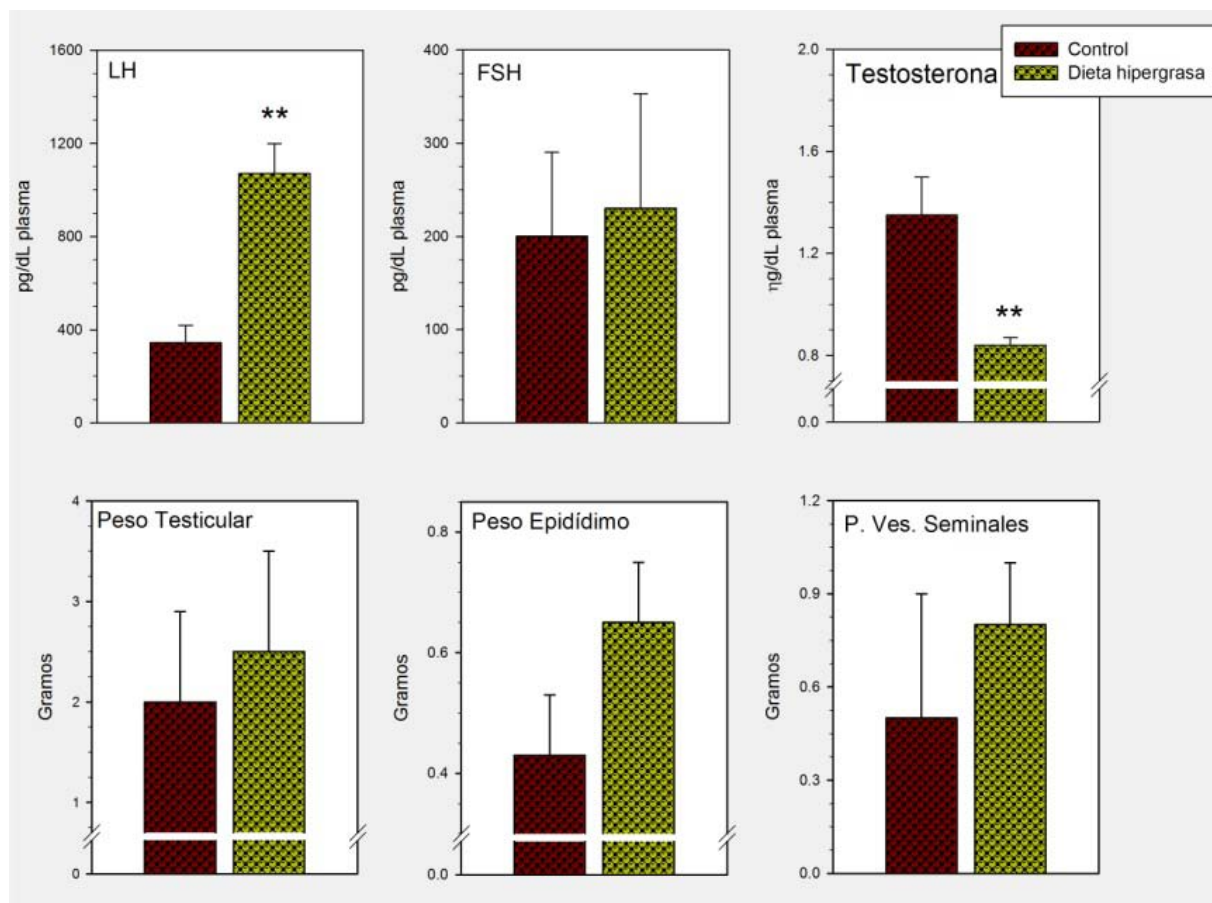


Fig. 3.9. Cambios de la concentración plasmática de LH, FSH y testosterona y variaciones del peso testicular, del epidídimo y de las vesículas seminales producidos por una dieta rica en grasas. Media $\pm$ ES (n= 6-8 por grupo) ** P< 0.03 vs. Control.

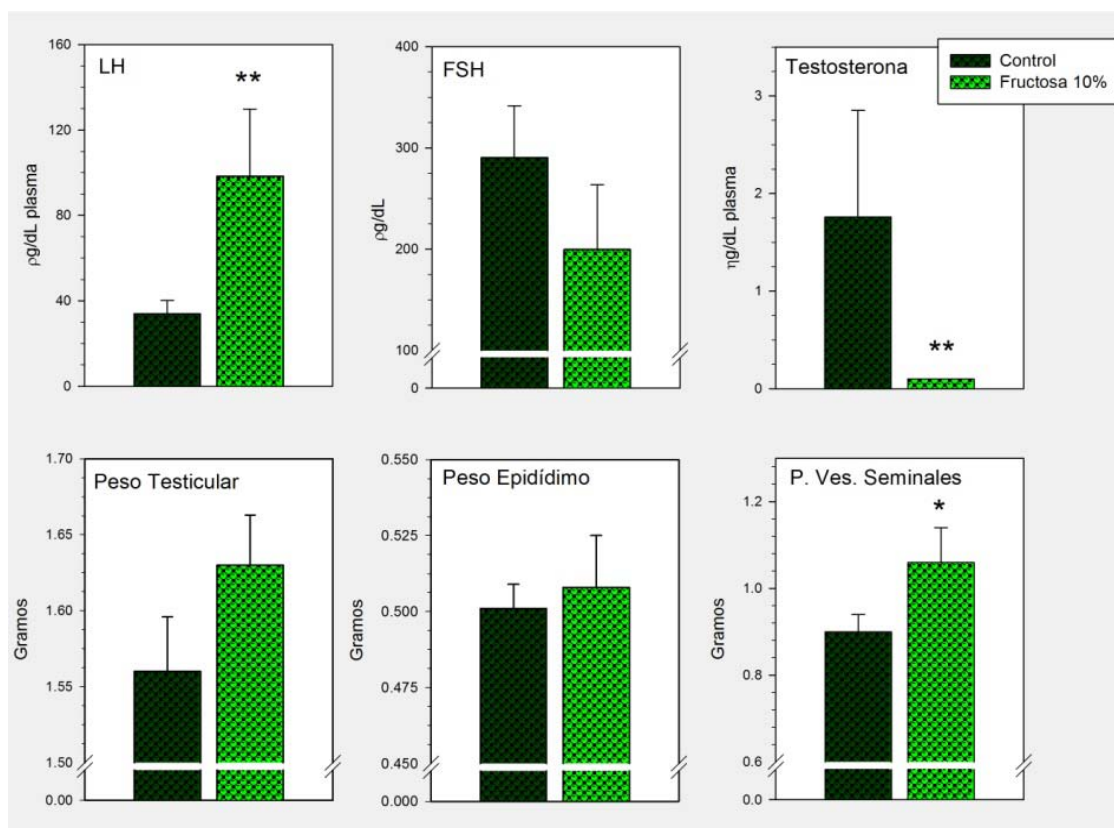


Fig. 3.10. Cambios de la concentración plasmática de LH, FSH y testosterona y variaciones del peso testicular, del epidídimo y de las vesículas seminales en el SM producido por una dieta rica en fructosa. Media $\pm$ ES (n= 6-8 por grupo) ** P< 0.01, * P< 0.02 vs. Control)

3.2. OBJETIVO DE LA PARTE 2

Evaluar la eficacia de la melatonina para corregir las alteraciones somáticas, bioquímicas y hormonales observadas en el SM producido por dieta hipergrasa y por administración de fructosa

3.2.1. NIVELES DE MELATONINA OBTENIDOS LUEGO SU ADMINISTRACIÓN EN EL AGUA DE BEBIDA

Quisimos en primer término evaluar los cambios en la concentración de melatonina plasmática que se producían luego de la administración del metoxindol en el agua de bebida (25 µg/ml).

Para ello se mantuvieron 2 grupos de 36 ratas, uno de ellos recibiendo melatonina, durante 2

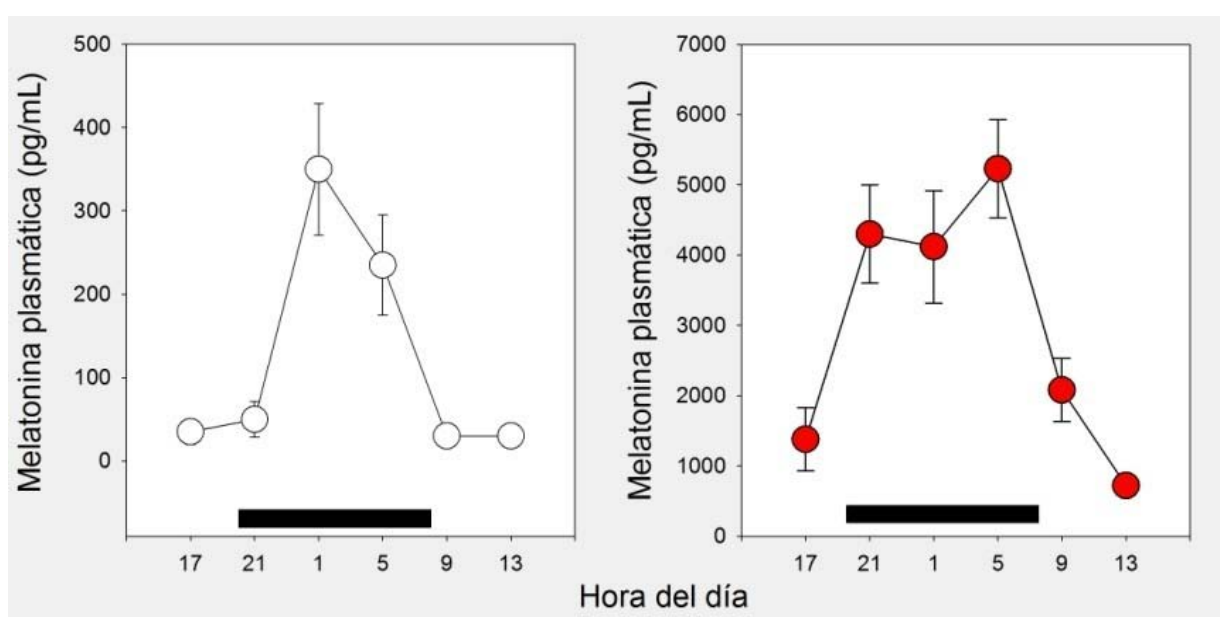


Fig. 3.11. Cambios de la concentración plasmática de melatonina en ratas tratadas con vehículo (panel izquierdo) o melatonina (panel derecho) o en el agua de bebida. Media ± ES (n= 6-8 por grupo)

semanas al cabo de las cuales se sacrificaron los animales (n= 6/grupo) a seis intervalos distintos en un ciclo de 24 h.

Como se muestra en la Fig. 3.11, el nivel de máximo de melatonina endógena en plasma en ratas tratadas con vehículo fue de 350 ± 79 pg/mL a las 0100 h, con valores de fotofase e iniciales de escotofase <30 pg / mL.

En el caso de las ratas que bebieron la solución de melatonina, la concentración alcanzada en los tres intervalos de tiempo examinados durante la escotofase (2100, 0100 y 0500 h) fue de 4310 ± 715 , 4120 ± 798 y 5230 ± 6990 pg/mL, respectivamente, sin diferencias significativas entre ellos.

3.2.2. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE PARÁMETROS SOMÁTICOS Y BIOQUÍMICOS EN EL SM ESTABLECIDO LUEGO DE UNA DIETA RICA EN GRASAS

En la Fig. 3. 12 se muestra el efecto del tratamiento con melatonina sobre el peso corporal y PA sistólica en ratas con SM por dieta hipergrasa vs. controles.

La administración de melatonina en el agua de bebida fue eficaz para revertir los cambios producidos por la dieta hipergrasa en ambos parámetros. Asimismo, la administración de melatonina a ratas con dieta normal resultó en reducción significativa del peso (Fig. 3.12)

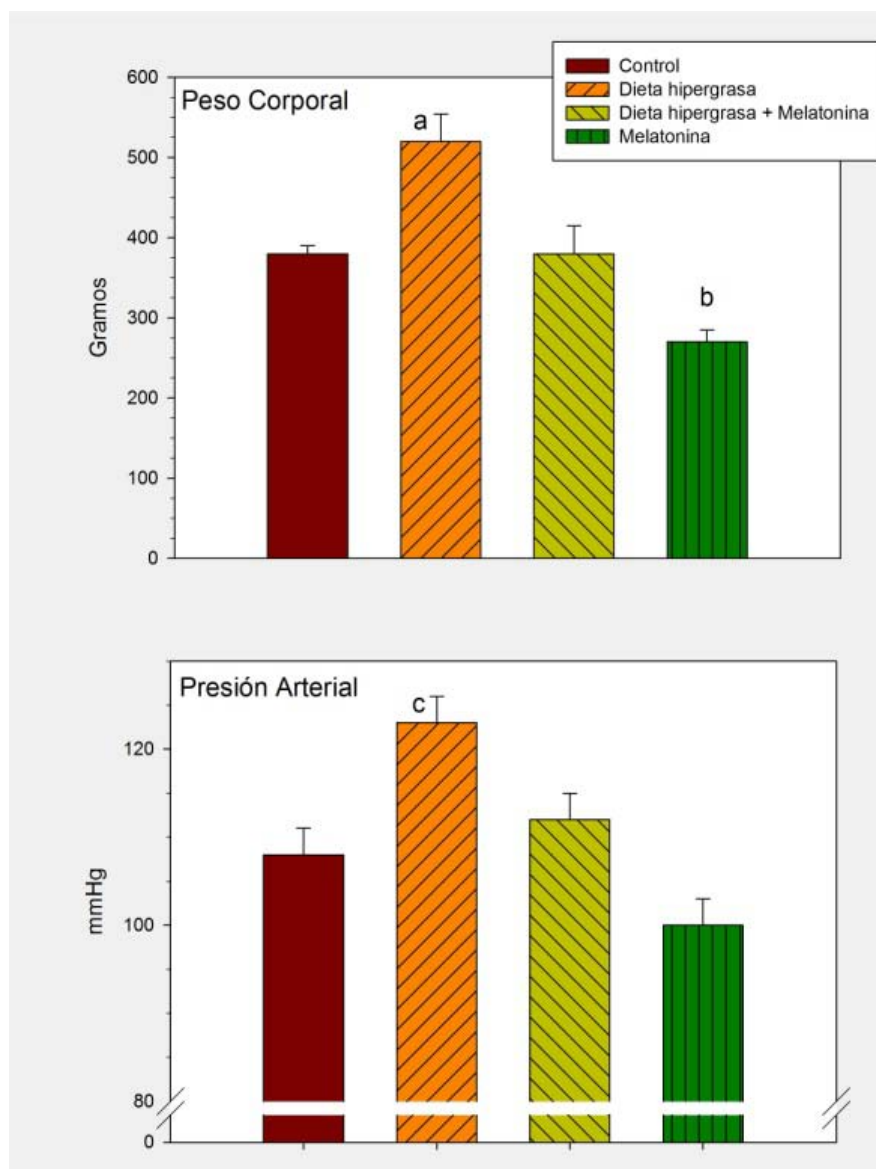


Fig. 3.12. La melatonina revierte los cambios en peso corporal y PA sistólica del SM producido por dieta hipergrasa en ratas. Media $\pm$ ES (n= 6-8 por grupo) ^a $P < 0.01$ vs. los otros grupos, ^b $P < 0.01$ vs. control y dieta hipergrasa, ^c $P < 0.01$ vs. control y melatonina sola, ANOVA de una vía.

La melatonina fue también eficaz para revertir la intolerancia a la glucosa observada en el SM por dieta hipergrasa (Fig. 3.13).

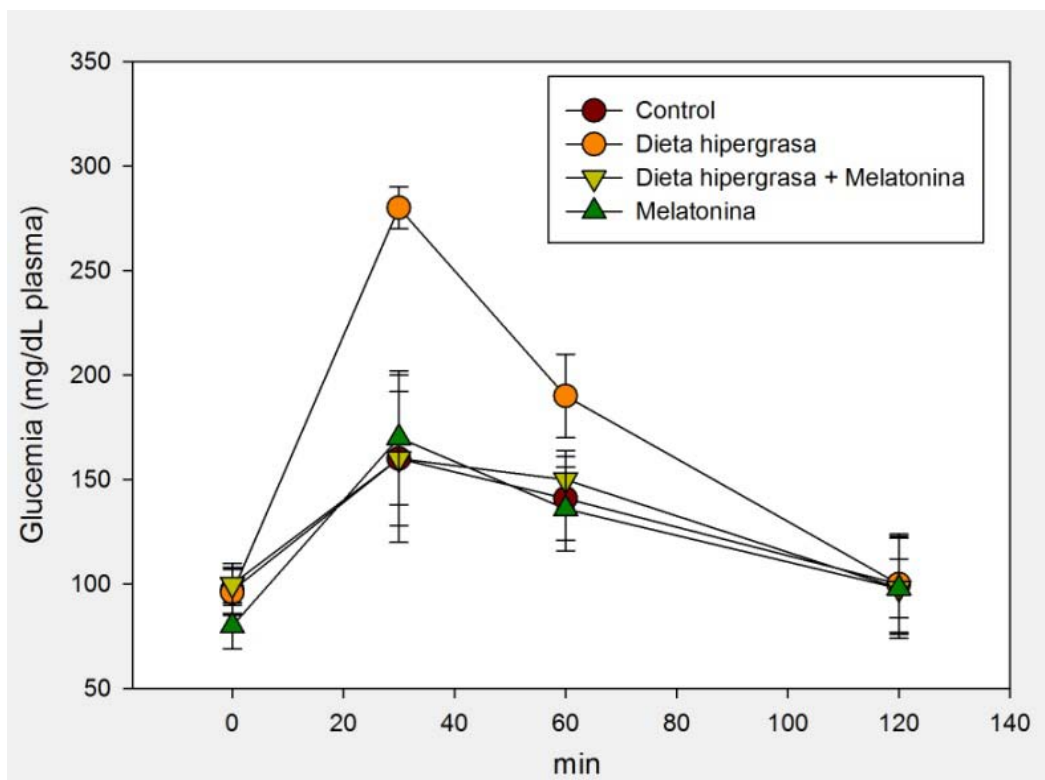


Fig. 3.13. Curva de tolerancia a la glucosa en ratas con SM por dieta hipergrasa administradas o no con melatonina. Media $\pm$ ES (n= 6-8 por grupo)

Los niveles de hiperglucemia alcanzados luego de la administración i.p. de glucosa fueron significativamente mayores en ratas con SM ($P < 0.001$) y fueron significativamente revertidos al nivel normal por la administración de melatonina ($P < 0.001$), la que no tuvo efectos *per se*.

Las Fig. 3.14 y 3.15 muestran el efecto de la melatonina sobre los cambios en varios analitos en ratas con SM por dieta hipergrasa. La melatonina fue eficaz para prevenir los aumentos en colesterol-LDL y colesterol, pero no los de colesterol-HDL (Fig. 3.14). Con respecto a los triglicéridos (Fig. 3.15) sus niveles aumentaron un 126% en los animales con SM por dieta hipergrasa, siendo este efecto prevenido por la melatonina.

3.2.3. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE PARÁMETROS SOMÁTICOS Y BIOQUÍMICOS EN EL SM ESTABLECIDO LUEGO DE LA ADMINISTRACIÓN DE FRUCTOSA

En la Fig. 3.16 se resume el efecto del tratamiento con melatonina sobre el peso corporal y PA sistólica en ratas con SM por administración de fructosa al 10%. La administración de melatonina en el agua de bebida fue eficaz para revertir los cambios producidos por la dieta hipergrasa en ambos parámetros ($P < 0.05$).

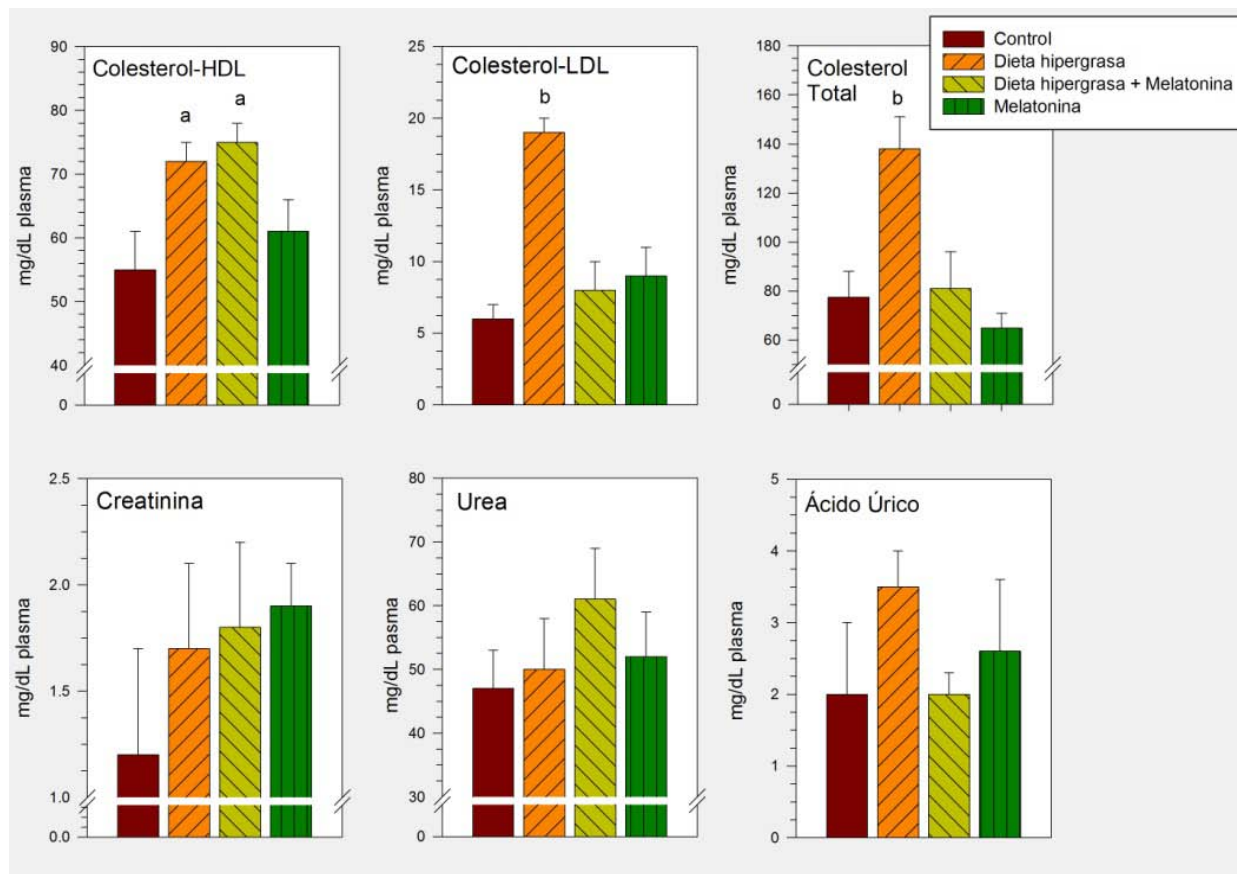


Fig. 3.14. Valores plasmáticos de varios analitos en plasma de ratas sometidas a una dieta hipergrasa y tratadas o no con melatonina. Media $\pm$ ES (n= 6-8 por grupo) ^a $P < 0.01$ vs. control, ^b $P < 0.01$ vs. los otros grupos, ANOVA de una vía.

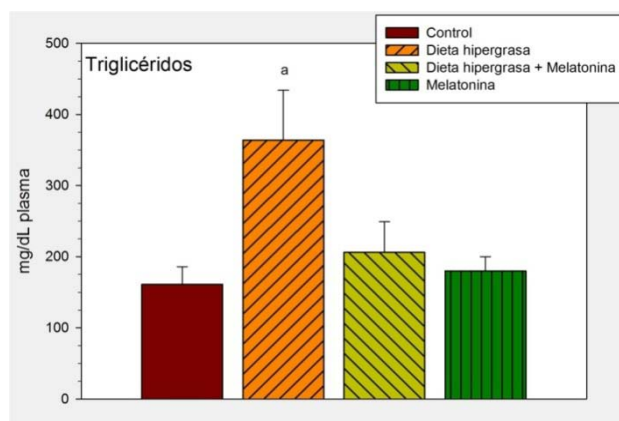
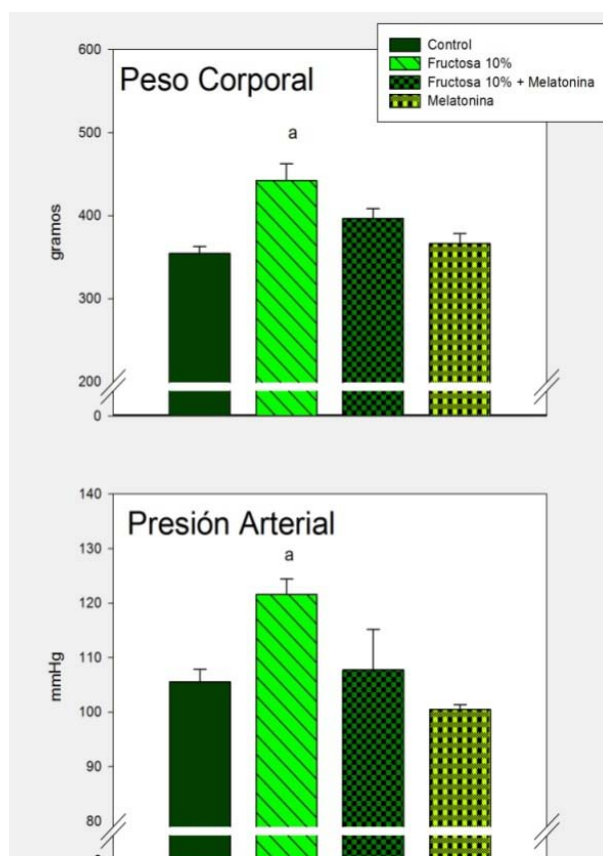


Fig. 3.15. Trigliceridemia en ratas sometidas a una dieta hipergrasa y tratadas o no con melatonina. Media $\pm$ ES (n= 6-8 por grupo) ^a $P < 0.01$ vs. los otros grupos, ANOVA de una vía.

En la Fig. 3.17 se presenta la curva de tolerancia a la glucosa i. p. Se midió la glucemia antes de la administración (tiempo 0) y a los 30, 60 y 120 min después de la administración de glucosa.

Fig. 3.16 La melatonina revierte los cambios en peso corporal y PA sistólica del SM producido por dieta rica en fructosa. Media $\pm$ ES (n=8 por grupo) ^a P< 0.05 vs. los otros grupos, ANOVA de una vía.



La melatonina fue eficaz también para revertir la intolerancia a la glucosa observada en el SM por dieta rica en fructosa. Los niveles de hiperglucemia alcanzados luego de la administración i.p. de glucosa fueron significativamente mayores en ratas con SM ($P < 0.05$) y fueron revertidos al nivel normal por la administración conjunta de melatonina ($P < 0.05$), la que no tuvo efectos *per se* (Fig. 3.17).

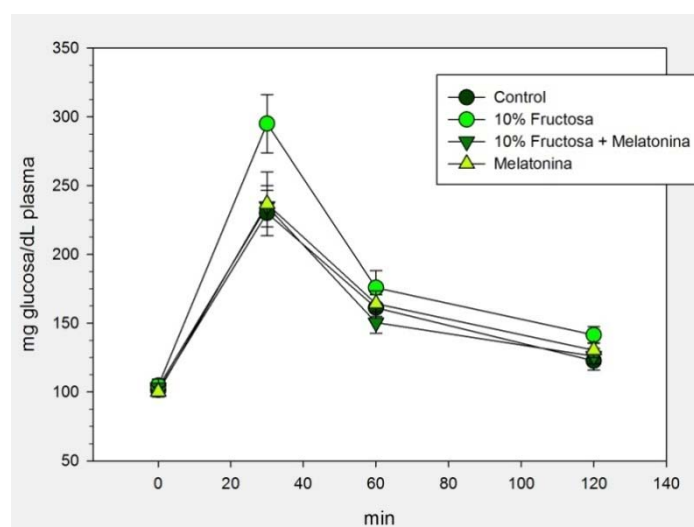


Fig. 3.17. Curva de tolerancia a la glucosa en ratas con SM por dieta rica en fructosa administradas o no con melatonina. Media $\pm$ ES (n= 6-8 por grupo)

Las Figura 3.18 resume la actividad de la melatonina para modificar algunos analitos indicadores del SM en ratas tratadas con fructosa. La administración de melatonina no sólo normalizó los niveles de colesterol-LDL y de ácido úrico sino que los hizo caer a valores por debajo del control ($P < 0.01$). En el caso del colesterol total el tratamiento con melatonina normalizó los niveles en ratas con SM por fructosa (Fig. 3.18).

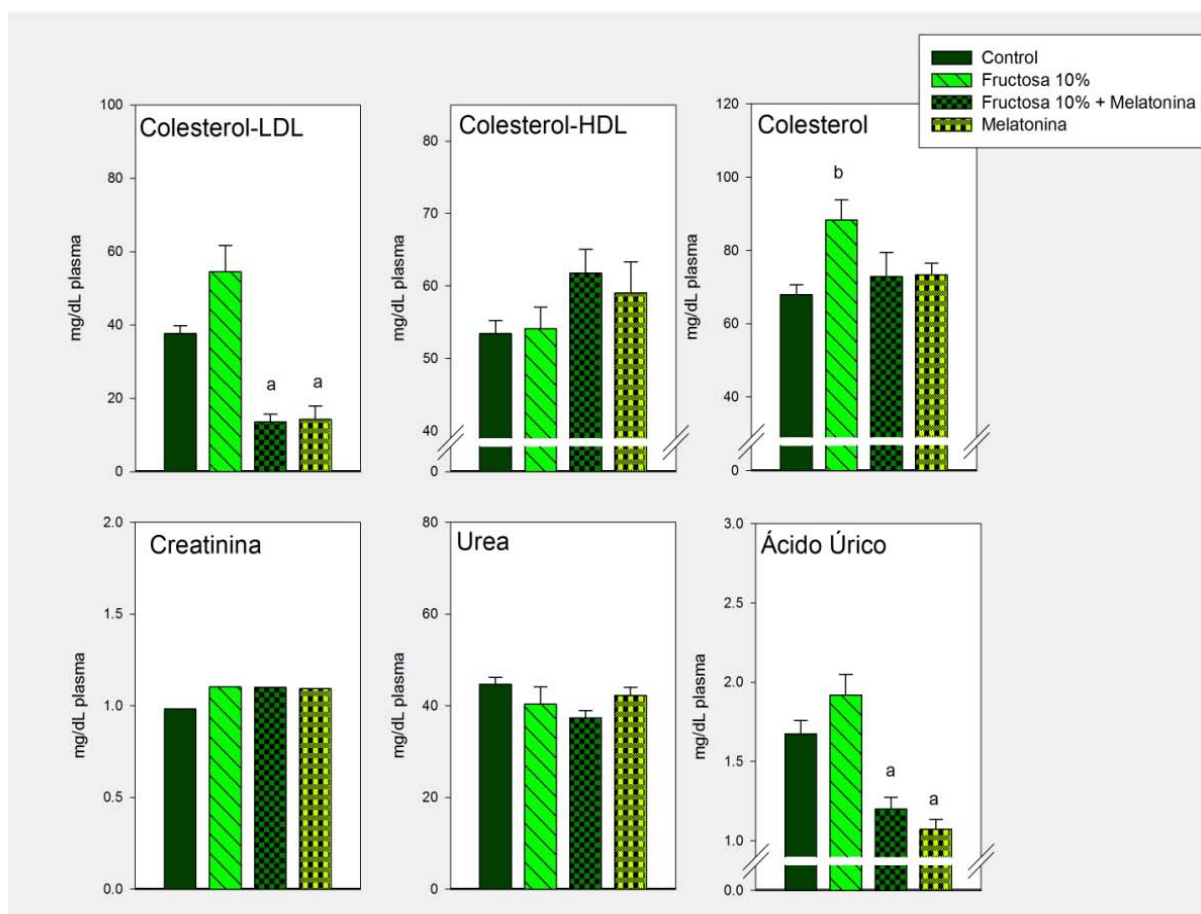


Fig. 3.18. Valores plasmáticos de varios analitos en plasma de ratas sometidas a una dieta de fructosa al 10% y tratadas o no con melatonina. Media $\pm$ ES (n= 6-8 por grupo) ^a $P < 0.01$ vs. control o fructosa 10%, ^b $P < 0.01$ vs. los otros grupos, ANOVA de una vía.

La melatonina fue también parcialmente efectiva en revertir el aumento en los niveles de triglicéridos en de ratas con SM por fructosa (Fig. 3.19).

3.2.3. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LAS SECUELAS HIPÓFISO-GONADALES DEL SM ESTABLECIDO PRODUCIDO POR UNA DIETA RICA EN GRASAS

En la Fig. 3.20 se resume la eficacia de la melatonina para revertir los cambios en el eje reproductor que se observan en ratas con SM por dieta hipergrasa. La administración de melatonina fue eficaz para normalizar el aumento de LH mientras que careció de efectos sobre la depresión de testosterona producida por la dieta hipergrasa.

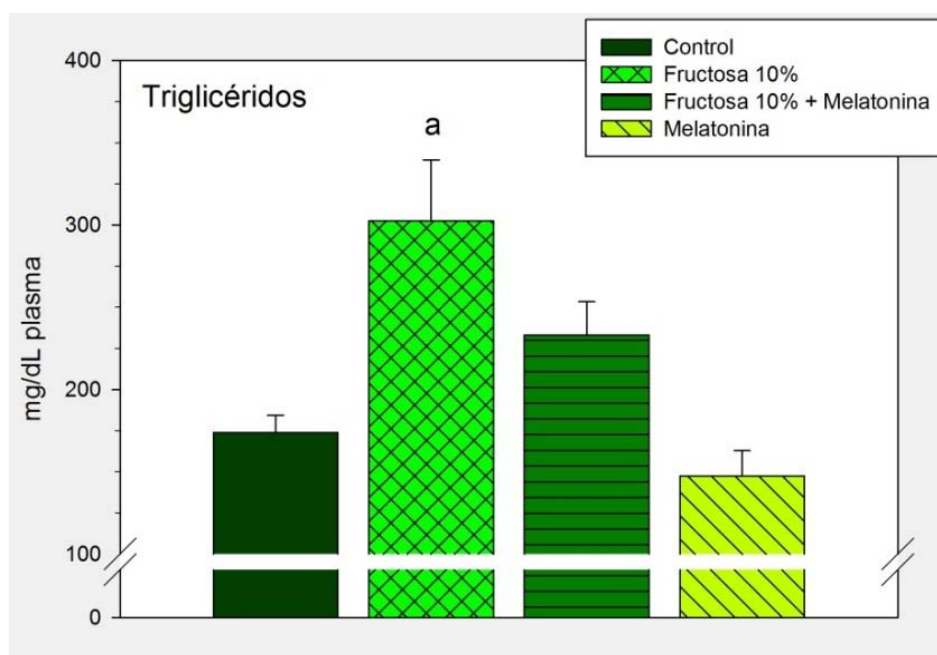


Fig. 3.19. Trigliceridemia en ratas sometidas a una dieta rica en fructosa y tratadas o no con melatonina. Media $\pm$ ES (n= 6-8 por grupo) ^a $P < 0.01$ vs. control y melatonina, ANOVA de una vía.

Se detectó una inhibición significativa de la secreción de testosterona por la administración de melatonina en ratas controles ($P < 0.01$) (Fig. 3.20).

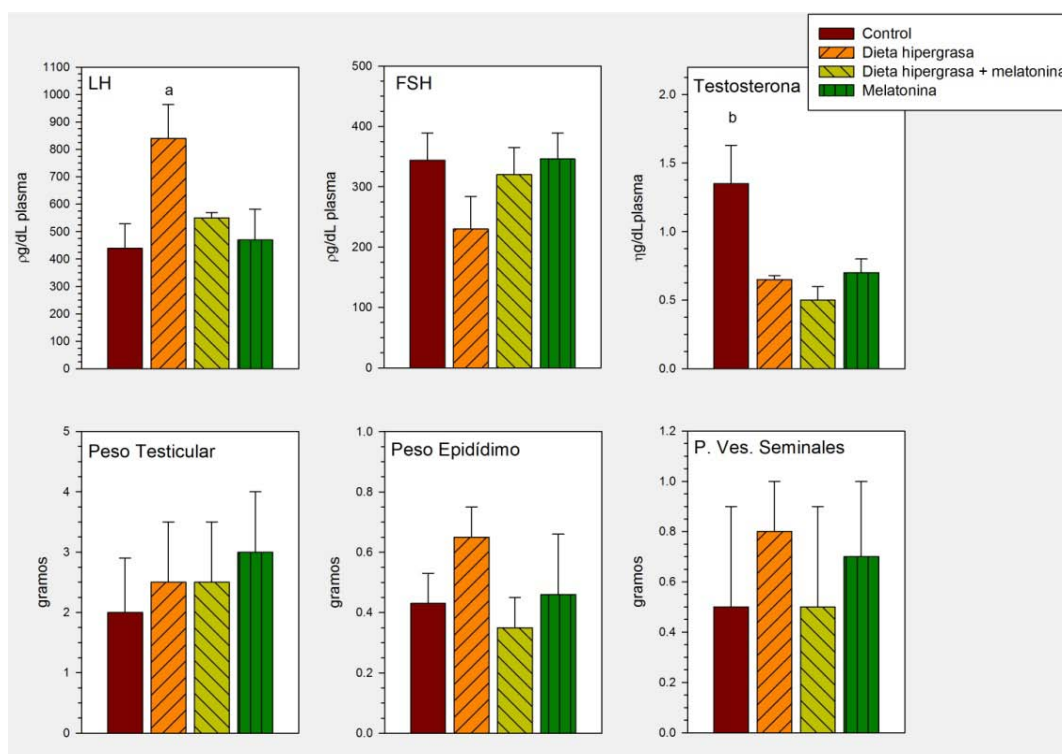


Fig. 3.20. Efecto de la melatonina sobre los cambios de la concentración plasmática de LH, FSH y testosterona y variaciones del peso testicular, del epidídimo y de las vesículas seminales producidos por una dieta rica en grasas. Media $\pm$ ES (n= 6-8 por grupo) ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.03$ vs. los otros grupos, ANOVA de una vía.

3.2.4. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LAS SECUELAS HIPÓFISO-GONADALES DEL SM ESTABLECIDO PRODUCIDO POR FRUCTOSA

En la Fig. 3.21 se muestra el efecto de la melatonina sobre las concentraciones plasmáticas de LH, FSH y testosterona, y el peso testicular, de epidídimo y de vesículas seminales en el SM producido por una sobrecarga de fructosa. Como en el caso del SM por dieta hipergrasa, la melatonina fue eficaz para revertir los cambios en LH, pero no los de testosterona que ocurren en el SM por administración de fructosa. La melatonina *per se* inhibió la secreción de testosterona ($P < 0.02$).

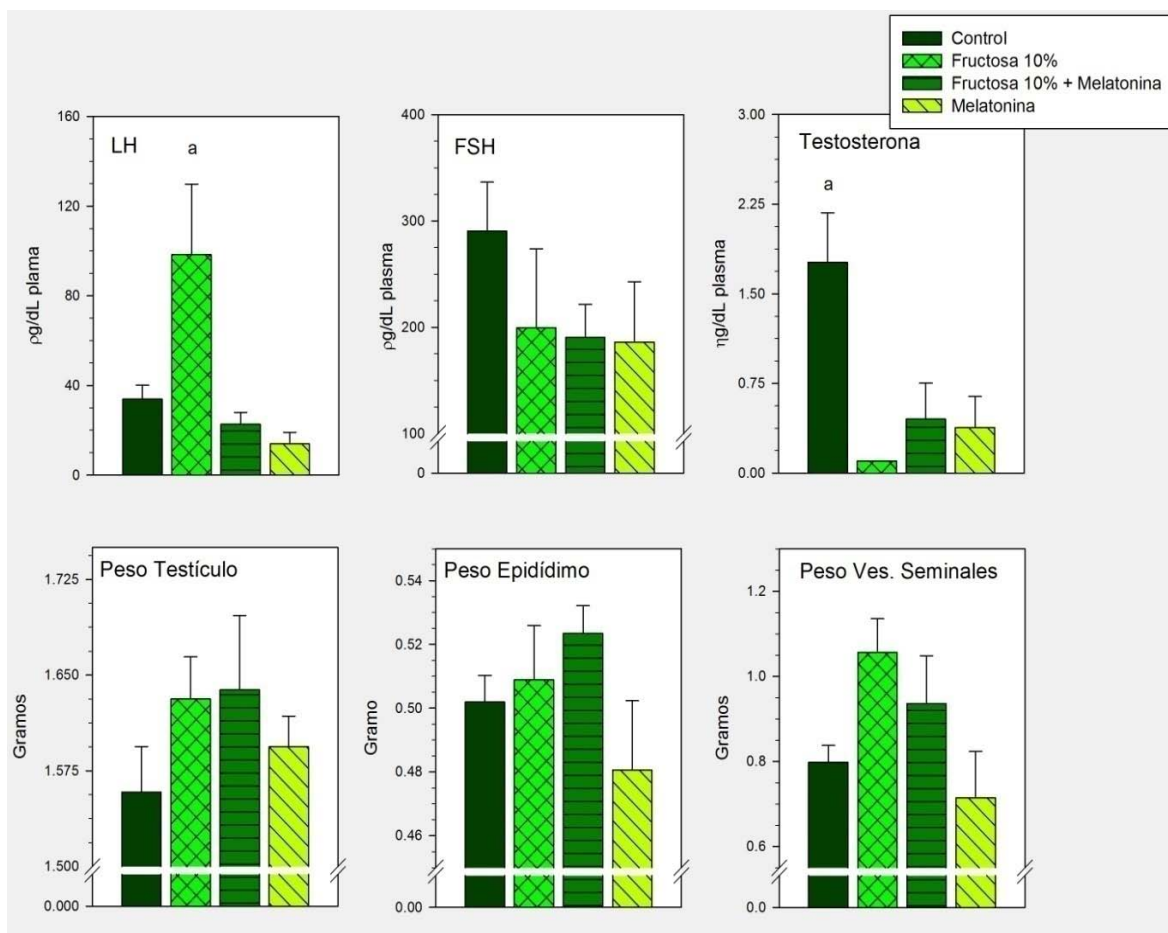


Fig. 3.21. Efecto de la melatonina sobre los cambios de la concentración plasmática de LH, FSH y testosterona y variaciones del peso testicular, del epidídimo y de las vesículas seminales producidos por una dieta rica en fructosa. Media $\pm$ ES (n= 6-8 por grupo) ^a $P < 0.02$ vs. los otros grupos, ANOVA de una vía.

3.3. OBJETIVO DE LA PARTE 3

Evaluar parámetros somáticos y bioquímicos en una fase incipiente del SM (administración de fructosa al 5%) vs. el SM constituido (administración de fructosa al 10%) y el efecto del tratamiento con melatonina en el SM incipiente.

3.3.1. COMPARACIÓN DE PARÁMETROS SOMÁTICOS Y BIOQUÍMICOS EN EL SM INCIPIENTE VS. SM CONSTITUIDO POR ADMINISTRACIÓN DE FRUCTOSA

En la Fig. 3.22 se resumen las modificaciones del peso corporal y de la PA sistólica en animales con SM incipiente y definido, producidos por una sobrecarga de fructosa al 5 y 10%, respectivamente, en el agua de bebida. El aumento del peso corporal sólo se vio en las ratas que recibieron la dosis mayor de fructosa ($P < 0.01$), mientras que la PA sistólica aumentó en ambos grupos (Fig. 3.22).

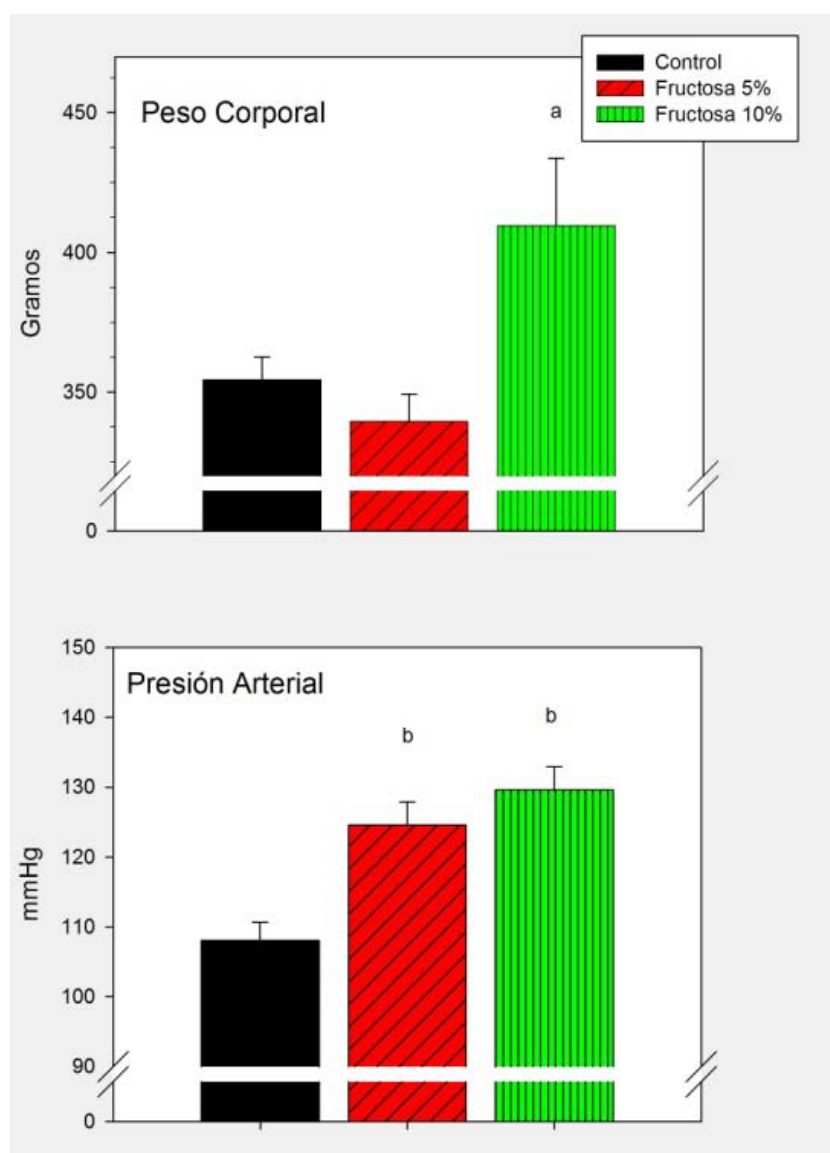


Fig. 3.22 Cambios en peso corporal y PA sistólica del SM en etapa incipiente (fructosa 5% y constituida (fructosa 10%). Media $\pm$ ES (n= 6-8 por grupo) ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$ vs. todos, ANOVA de una vía.

Como puede apreciarse en la Fig. 3.23, las ratas que recibieron 5% de fructosa mostraron una mayor tolerancia a la sobrecarga de glucosa, como se demuestra por un menor aumento de la glucemia en comparación con los controles.

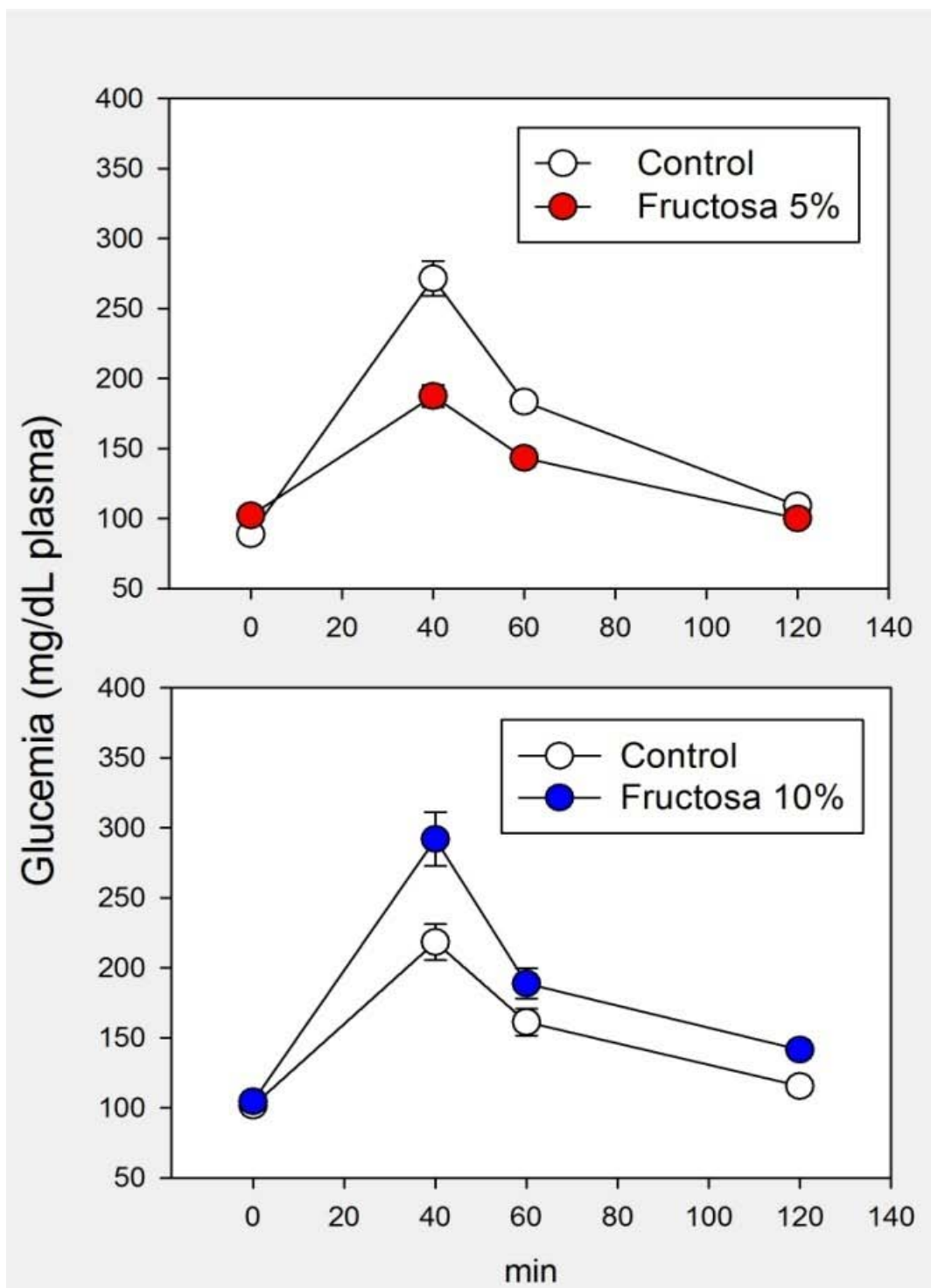


Fig. 3.23. Respuesta en glucemia ante una sobrecarga i.p. de glucosa en ratas con SM por dieta rica en fructosa en etapa incipiente o constituida. Media $\pm$ ES (n= 6-8 por grupo)

Por el contrario, las ratas con SM establecido por la administración de fructosa al 10% mostraron una menor tolerancia a la glucosa, como se demuestra por los niveles plasmáticos elevados de glucosa observados en comparación con los controles (Fig. 3.23).

La Figura 3.24 resume los cambios en varios analitos en plasma en ambas etapas del SM. La concentración de colesterol-LDL aumentó en forma significativa un 46% en ratas con SM constituido ($F= 5.067$, $P< 0.01$, ANOVA de una vía) pero no en el SM incipiente.

Los niveles de colesterol en sangre mostraron un aumento significativo de 21 y 27% de en comparación con los controles en ambas etapas del SM ($F= 8.52$, $P< 0.001$). Los niveles circulantes de triglicéridos en ambas etapas del SM están mostrados en la Fig. 3.25. Sólo en el SM establecido estos niveles aumentaron en un 74% ($F= 7.94$, $P< 0.003$, ANOVA de una vía).

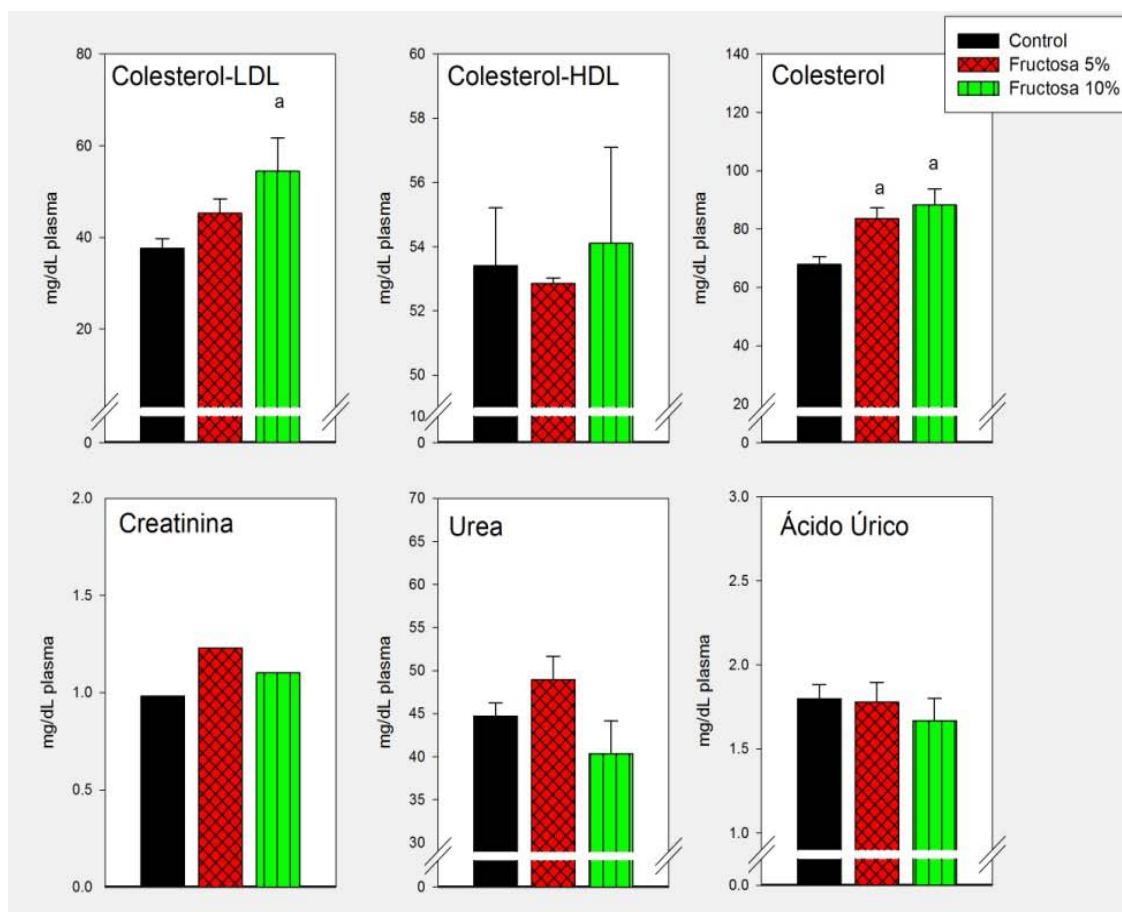


Fig. 3.24. Valores plasmáticos de varios analitos en plasma de ratas con SM por una dieta de fructosa en etapa incipiente y constituida. ^a $P< 0.01$ vs. control, ANOVA de una vía.

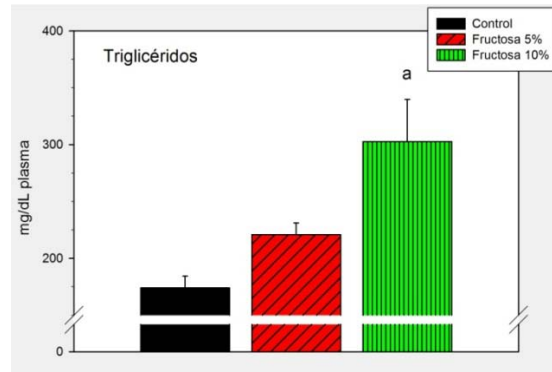


Fig. 3.25. Trigliceridemia en ratas con SM incipiente y constituido luego de la administración de una dieta rica en fructosa. Media $\pm$ ES (n= 6-8 por grupo) ^a P< 0.01 vs. control y melatonina, ANOVA de una vía.

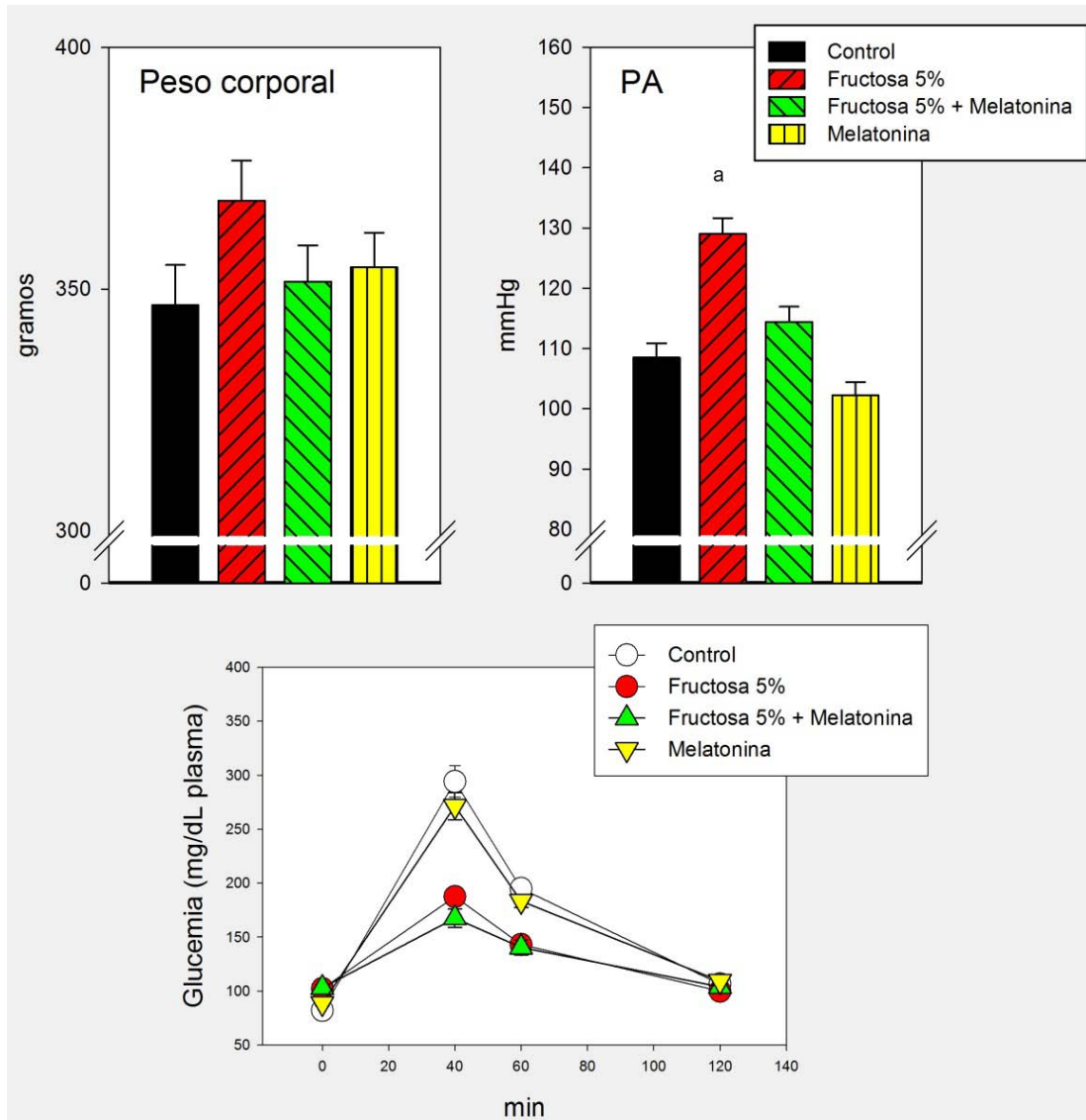


Fig. 3.26. Efecto de la administración de melatonina sobre los cambios en peso corporal y PA sistólica y en la glucemia ante una sobrecarga i.p. de glucosa en ratas con SM por dieta rica en fructosa en etapa incipiente. Media $\pm$ ES (n= 6-8 por grupo) ^a P< 0.01 vs. los restantes grupos, ANOVA de una vía.

3.3.2. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE PARÁMETROS SOMÁTICOS Y BIOQUÍMICOS EN EL SM INCIPIENTE POR ADMINISTRACIÓN DE FRUCTOSA

La eficacia de la administración de melatonina para contrarrestar los cambios somáticos y metabólicos observados en el SM incipiente por administración de una solución de fructosa al 5% se representan en las Fig. 3.26 a 3.28. La melatonina revierte significativamente los cambios en PA sistólica en ratas en la etapa temprana del SM. La melatonina también revirtió la tolerancia a la glucosa aumentada que ocurre en el SM incipiente (Fig. 3.26).

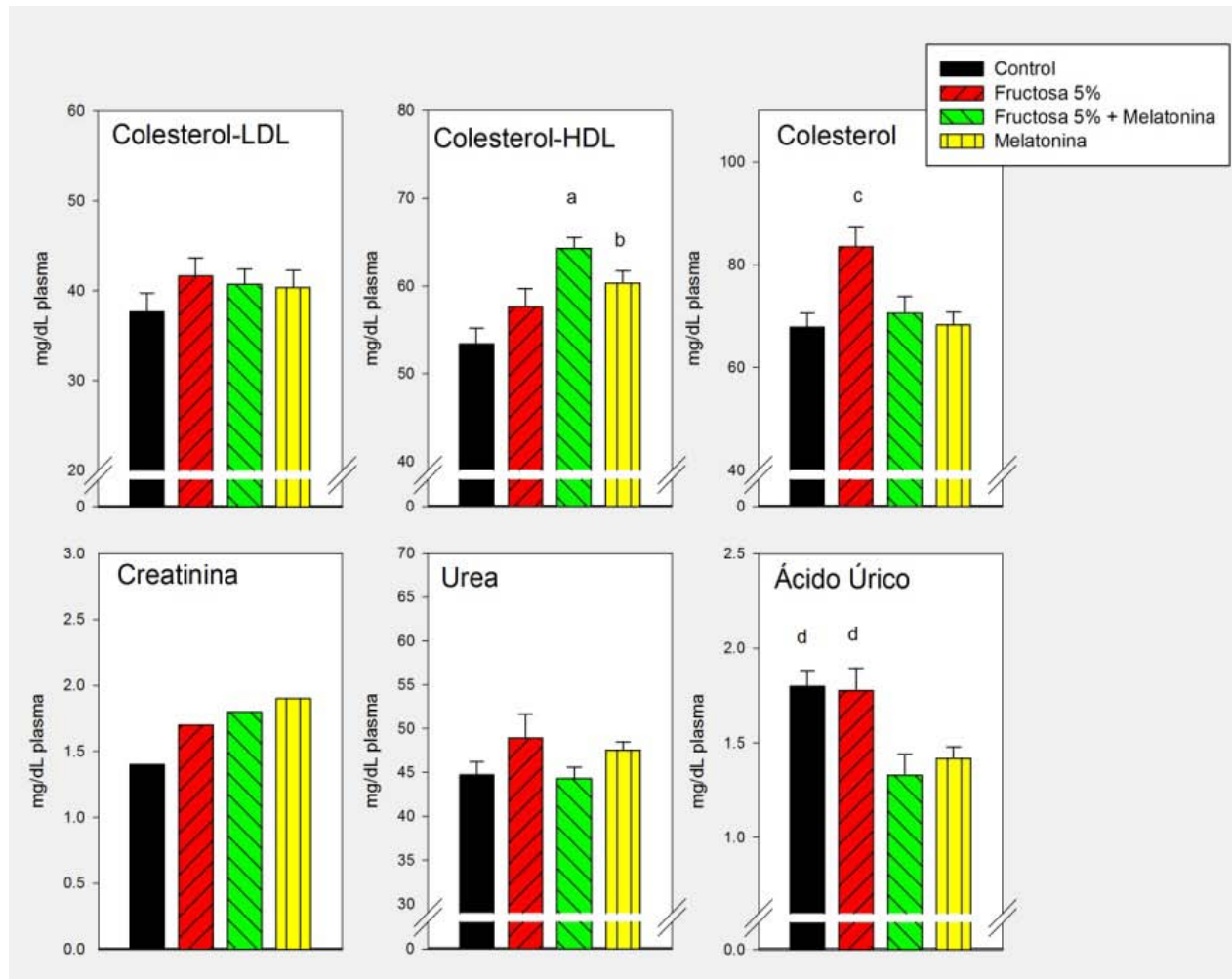


Fig. 3.27. Efecto de la melatonina sobre varios analitos en plasma de ratas con SM por una dieta de fructosa en etapa incipiente. Media $\pm$ ES (n= 6-8 por grupo) ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$ vs. control, ^c $P < 0.01$ vs. el resto de los grupos, ^d $P < 0.01$, vs. ratas tratadas con melatonina, ANOVA de una vía.

Como se muestra en la Fig. 3.27, la melatonina contrarresta los cambios en colesterol plasmático de ratas en la fase temprana del SM. Asimismo, la administración de melatonina en esta fase produjo un aumento significativo del colesterol-HDL y redujo los niveles plasmáticos de ácido úrico ($P < 0.01$) (Fig. 3.27).

Los cambios en el nivel de triglicéridos en plasma en los grupos estudiados se resumen en la Fig. 3.28. No se observaron cambios significativos en este parámetro en el SM incipiente.

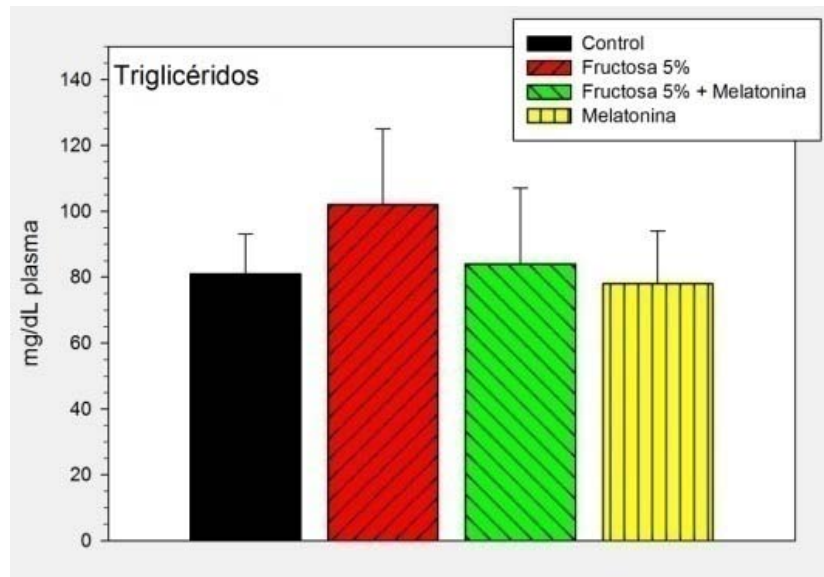


Fig. 3.28. Trigliceridemia en ratas con SM incipiente y tratadas o no con melatonina. Media $\pm$ ES (n= 6-8 por grupo)

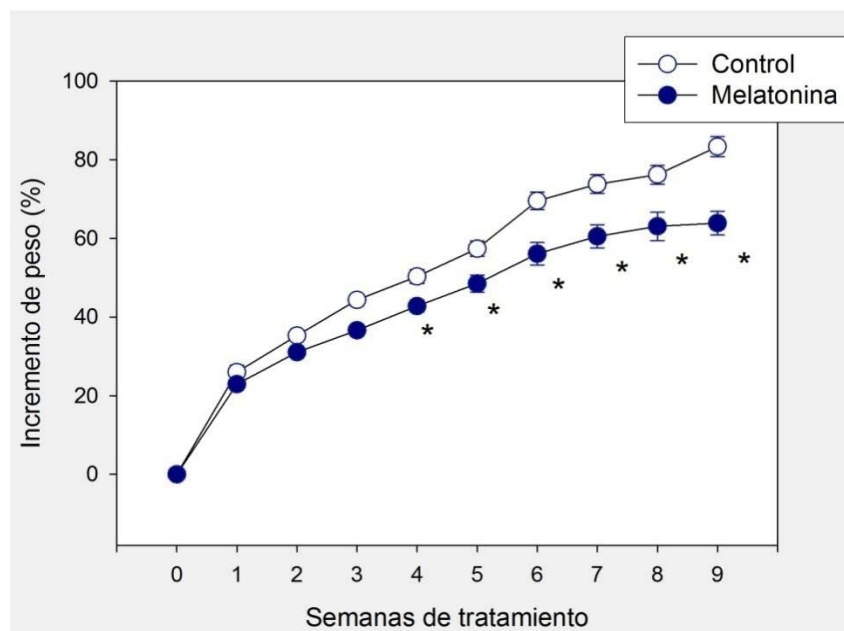


Fig. 3.29. Porcentaje de aumento en el peso corporal de ratas en dieta normal que recibieron melatonina o vehículo durante 9 semanas. Media $\pm$ ES (n= 6-8 por grupo) * P < 0.01 frente a control, prueba de la t de Student.

3.4. OBJETIVO DE LA PARTE 4

Evaluar el efecto de la melatonina sobre los ritmos circadianos de adiponectina, leptina, insulina, glucosa, triglicéridos y colesterol plasmáticos en ratas en el modelo de SM por dieta hipergrasa

3.4.1. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LOS RITMOS CIRCADIANOS DE ADIPONECTINA, LEPTINA, INSULINA, GLUCOSA, TRIGLICÉRIDOS Y COLESTEROL EN PLASMA DE RATAS NORMALES

Dado que como se observa en el Fig. 3.12, la melatonina *per se* fue eficaz para reducir el peso corporal, quisimos en esta última serie de experimentos determinar el curso temporal de los cambios en el peso corporal en ratas que recibieron una dieta normal y la melatonina o vehículo durante 9 semanas (Fig. 3.29).

El efecto inhibitor de la melatonina sobre el incremento del peso corporal fue ya significativo en la 3ª semana de tratamiento. El consumo individual de comida diaria, medida en las últimas dos semanas del experimento, fue de 18 ± 2 g (vehículo) y 19 ± 1 g (melatonina) ($t = 0.45$ N.S.). El porcentaje de la ingesta de alimentos por la noche fue del $75.4 \pm 7.9\%$ (vehículo) y $73.3 \pm 6.8\%$ (t de Student = 0.428, N.S.) (melatonina).

El consumo de agua nocturna no fue diferente entre ambos grupos experimentales. La Fig. 3.30 muestra el efecto de la melatonina sobre el ritmo de 24 horas en los niveles circulantes de adiponectina, leptina, insulina, glucosa, triglicéridos y colesterol.

La melatonina redujo significativamente los valores medios de insulinemia, de glucemia y de trigliceridemia ($F = 4.1, 8.5$ y 7.8 , $P < 0.01$, ANOVA factorial). También se interrumpió la ritmicidad circadiana normal de la adiponectina y leptina ($P < 0.02$, Fig. 3.30).

3.4.2. EFICACIA DE LA MELATONINA PARA NORMALIZAR LA ALTERACIÓN DE LOS RITMOS CIRCADIANOS DE ADIPONECTINA, LEPTINA, INSULINA, GLUCOSA, TRIGLICÉRIDOS Y COLESTEROL EN EL SM DE RATAS CON DIETA HIPERGRASA

Los resultados del último experimento de este Trabajo de Tesis se resumen en las Fig. 3.31 a 3.33. La Fig. 3.31 muestra el curso temporal de los cambios en el peso corporal en ratas que recibieron una dieta hipergrasa con o sin melatonina durante 11 semanas.

El consumo individual de comida diaria durante las dos últimas semanas del experimento fue de 17 ± 1 g (dieta normal), 19 ± 1 g (dieta alta en grasas) y 18 ± 1 g (dieta alta en grasas + melatonina) ($F = 0.99$; $P = 0.37$, ANOVA).

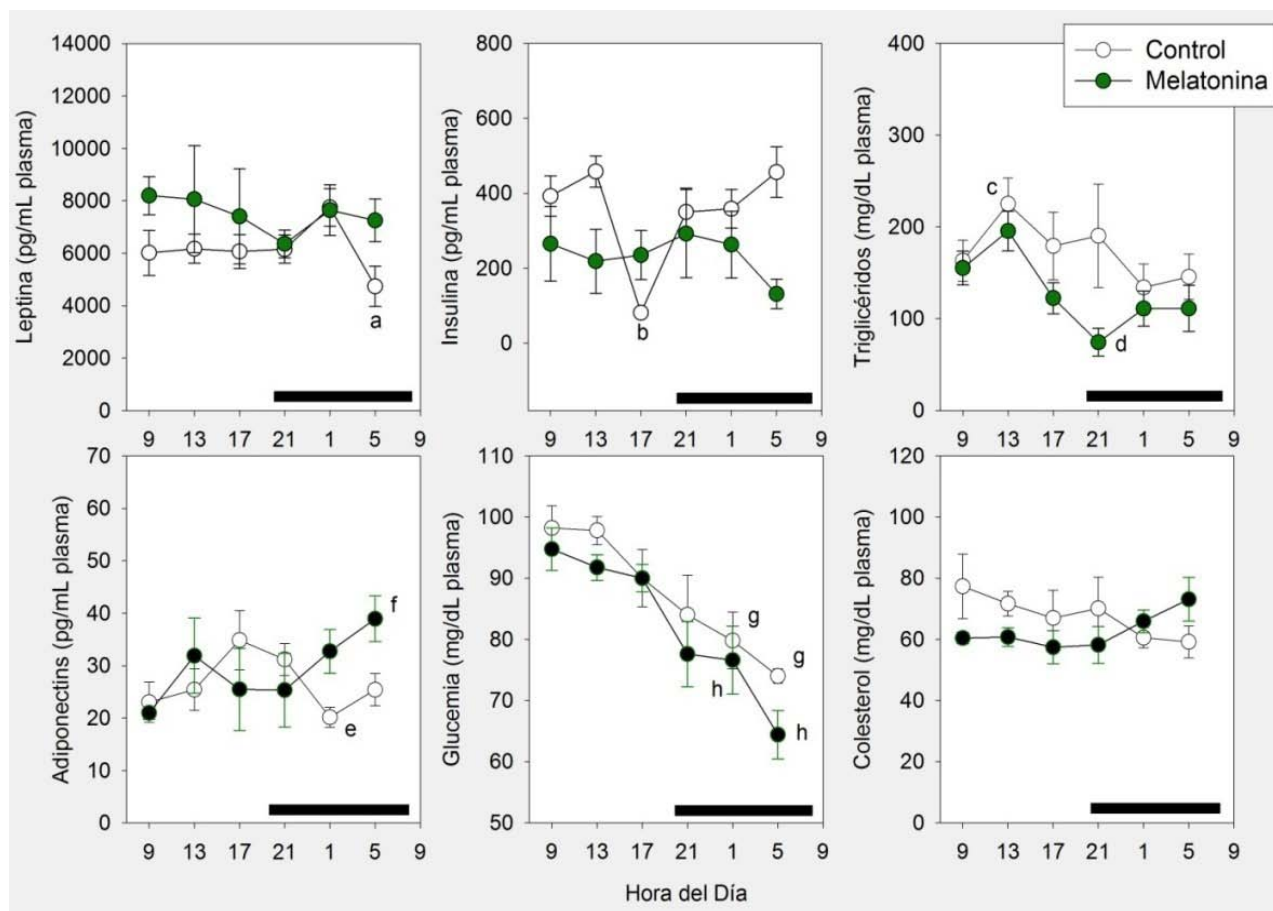


Fig. 3.30 .Ritmos diarios en adiponectina, leptina, insulina, glucosa, triglicéridos y colesterol en ratas que recibieron melatonina o vehiculo durante 9 semanas. Las barras indican la duración del periodo de oscuridad. Media $\pm$ ES (n= 6-8 por grupo) ^a P<0.05 vs 0900 h. ^b P <0.05 vs a 1700 h. ^c P <0.02 vs todos los grupos. ^d P <0.05 vs. 0900 y 1300 h. ^e P <0.05 vs 0100 h ^f P <0.01 vs 0900 y 1300 h. ^g P <0.02 vs 0900 h y 1300 h, P <0.05 vs. 1700 h, ANOVA de una vía.

El porcentaje de la ingesta de alimentos por la noche fue del $72.4 \pm 7.6\%$ (dieta normal), $69.9 \pm 9.1\%$ (dieta alta en grasas) y 71.3 ± 8.8 (dieta alta en grasas + melatonina) ($F = 0.02$, $P = 0.97$, ANOVA).

El consumo de agua nocturna no fue diferente entre grupos experimentales. Como se muestra en la Fig. 3.31 el peso corporal de ratas alimentadas con alto contenido en grasas alcanzó valores 55% mayores que los controles después de 77 días de tratamiento. La administración concomitante de melatonina atenuó el incremento de peso corporal significativamente.

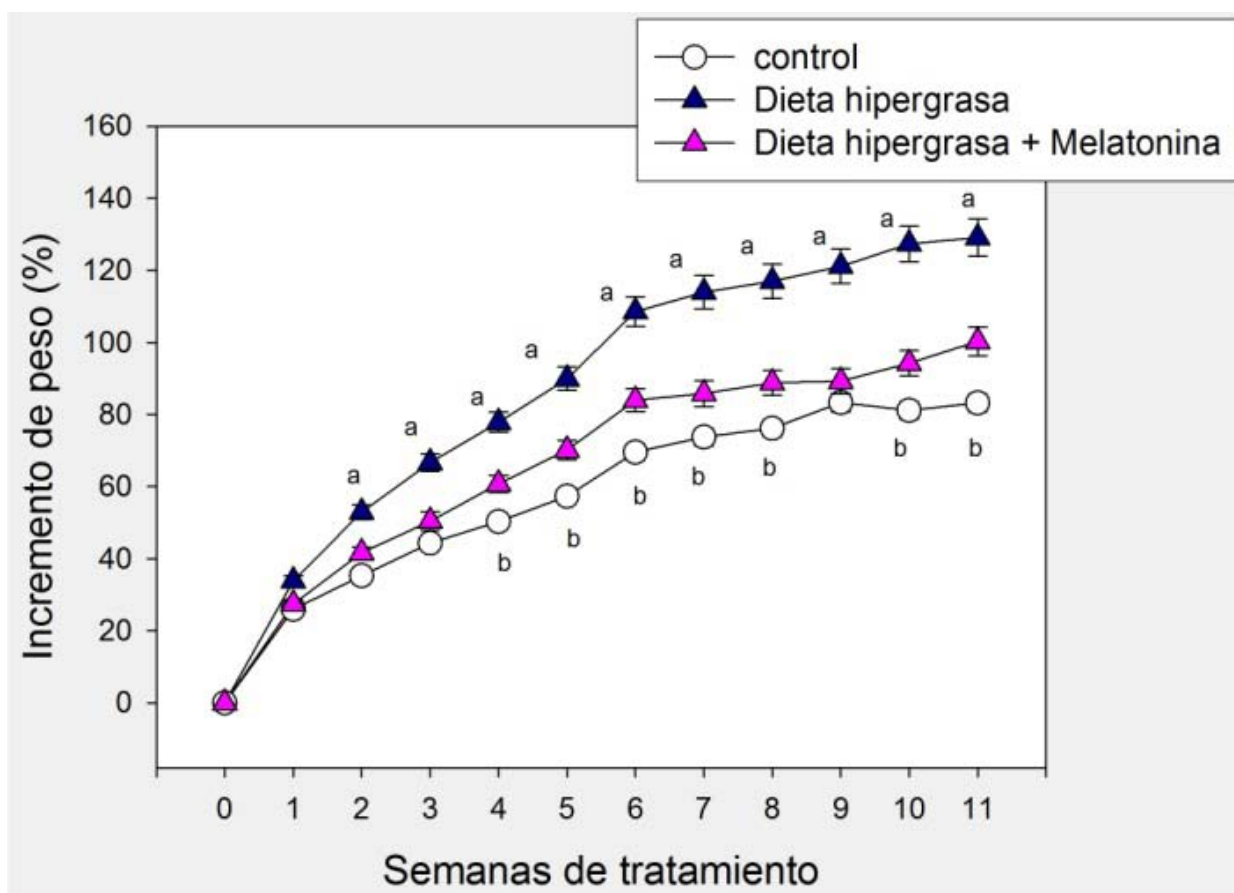


Fig. 3.31. Aumento en el peso corporal de ratas alimentadas con una dieta normal o alta en grasa con o sin melatonina durante 11 semanas. Media $\pm$ ES (n= 6-8 por grupo)^a P <0.01 vs los demás grupos. ^b P <0.01 vs ratas con dieta hipergrasa que recibieron melatonina.

El efecto de una dieta alta en grasa en ratas administradas con melatonina o vehículo sobre el ritmo de 24 horas de adiponectina, leptina, insulina, glucosa, triglicéridos y colesterol en plasma se representa en la Fig. 3.32.

El ANOVA factorial indicó un efecto significativo del grupo experimental analizado como factor principal para cada parámetro estudiado (F = 48.3, 54.7, 24.9, 92.4, 12.7 y 45.6. P <0.0001, respectivamente). Las pruebas post-hoc de Bonferroni indicaron que la dieta alta en grasa produce aumentos significativos de los niveles medios en plasma de cada parámetro analizado, mientras que la administración concomitante de melatonina bloqueó el incremento en la circulación de adiponectina, insulina y glucosa y contrarrestó parcialmente el de leptina, triglicéridos y colesterol (Fig. 3.33).

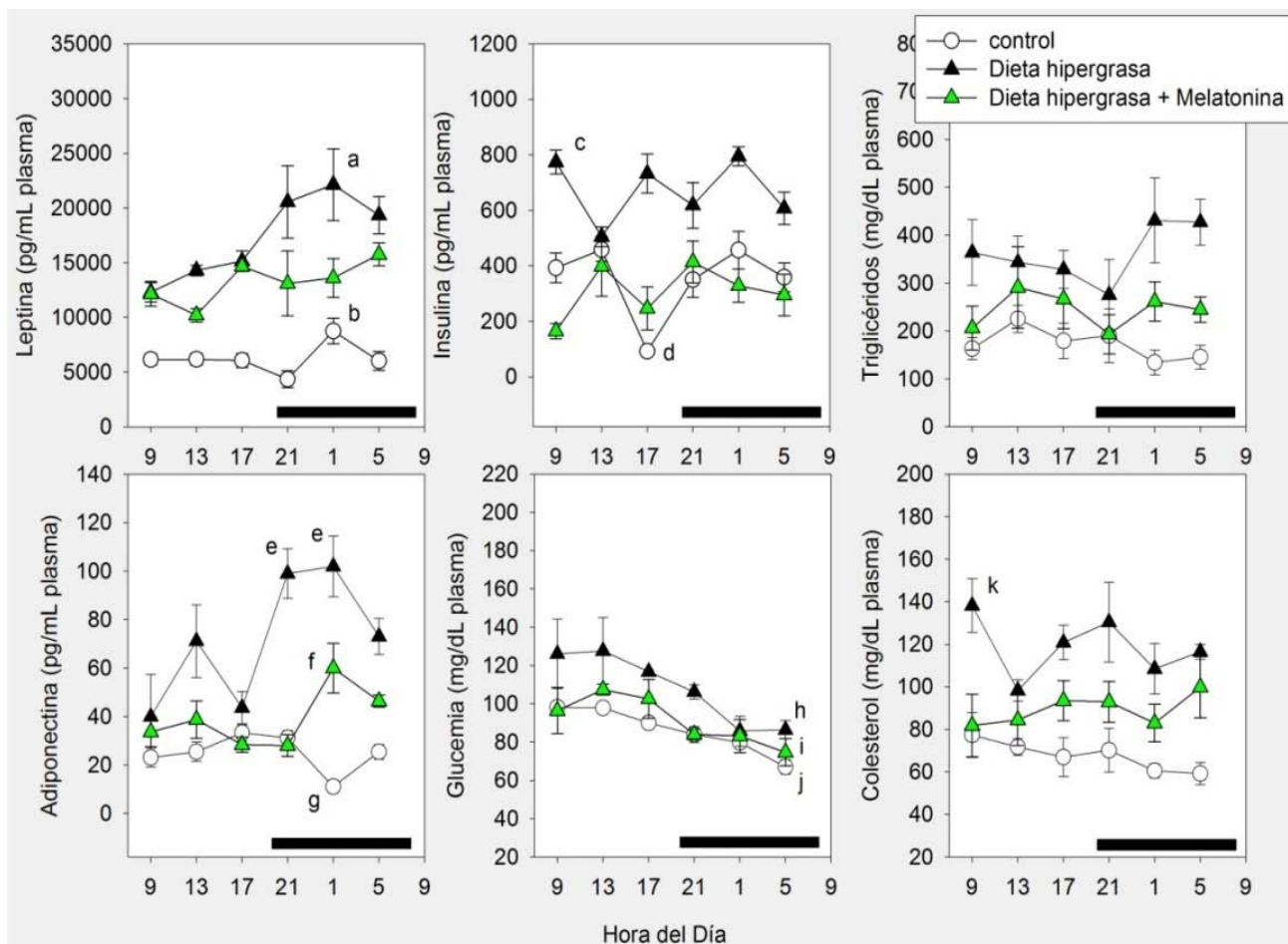


Fig. 3.32. Ritmos diarios en adiponectina, leptina, insulina, glucosa, triglicéridos y colesterol en ratas que recibieron una dieta hipergrasa con o sin melatonina durante 11 semanas. Las barras indican la duración del periodo de oscuridad. Media $\pm$ ES (n= 6-8 por grupo) ^a $P < 0.02$ vs. 0900 y 1700 h. ^b $P < 0.05$ vs 1700 y 2100 h. ^c $P < 0.02$ vs. 1700 y 2100 h, ^d $P < 0.02$ vs 1300 h. ^e $P < 0.05$ vs. 0900 h. ^f $P < 0.02$ vs 2100 h. ^g $P < 0.05$ vs 1300 h. ANOVA de una vía.

La dieta alta en grasas interrumpió el patrón normal de 24 h de adiponectina, insulina y colesterol en plasma, siendo los efectos sobre insulina y colesterol contrarrestados por la administración de melatonina (Fig. 3.32)

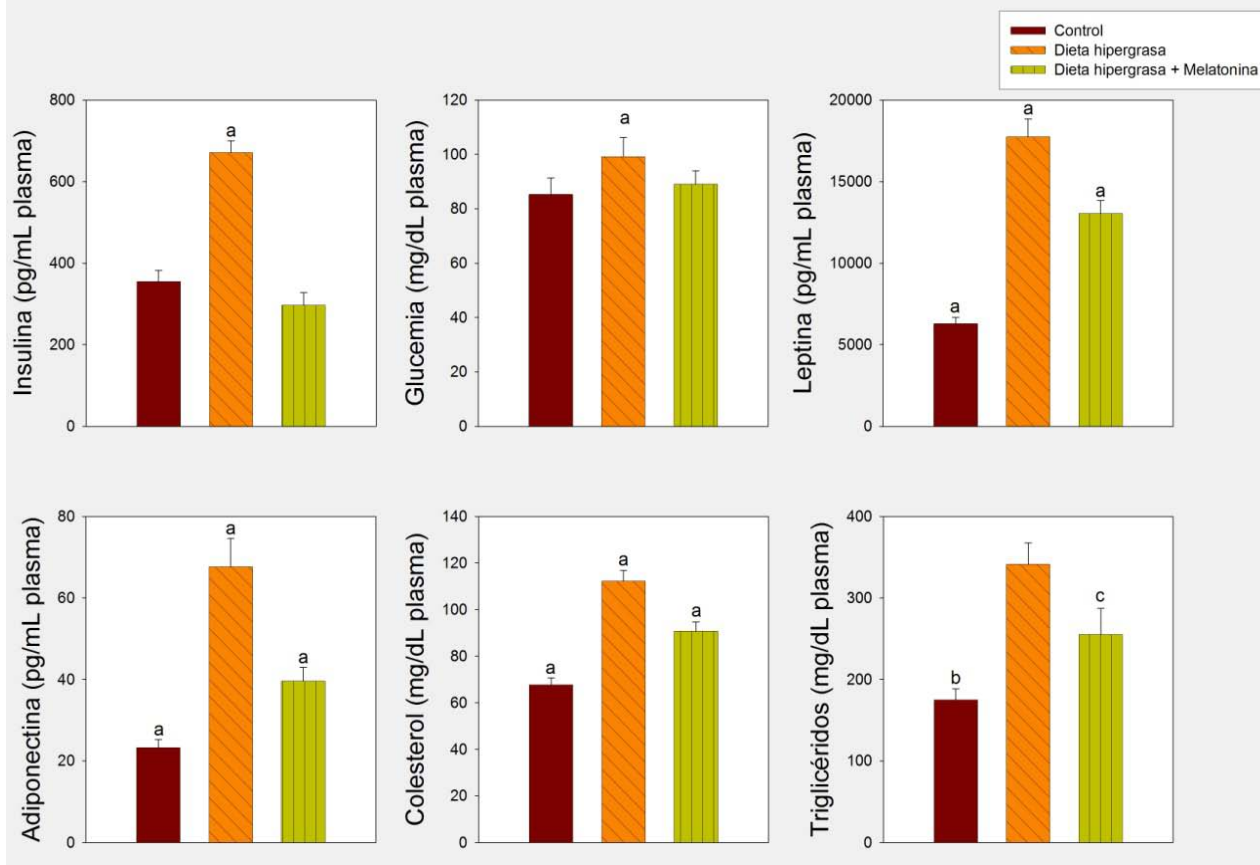


Fig. 3.33. Media de 24 h de los niveles circulantes de insulina, glucosa, colesterol, leptina, adiponectina y triglicéridos en las ratas alimentadas con dieta hipergrasa con o sin melatonina. Media $\pm$ ES (n= 6-8 por grupo) ^a P <0.01 vs el resto de grupos. ^b P <0.01 vs dieta hipergrasa y P <0.05 vs dieta hipergrasa + melatonina. ^c P <0.01 vs dieta hipergrasa y P <0.05 vs control.

4. DISCUSIÓN

En la primera parte de esta Tesis Doctoral se propuso comparar distintos parámetros del SM obtenido por dieta hipergrasa con el SM resultante de una sobrecarga de fructosa. Se estudió el SM desde varios puntos de vista: sus consecuencias sobre el peso corporal y la PA sistólica, los cambios en analitos usuales en clínica para el diagnóstico de SM y las consecuencias sobre el eje hipófiso-gonadal.

A diferencia de lo discutido en el punto 1.1.5 de la Introducción para modelos genéticos o de destrucción química de islotes pancreáticos del SM, el SM que se produce por cambios en la ingesta en ratas comparte gran cantidad de alteraciones con el SM humano (Tabla 1.1). Sobre todo los cambios somáticos son de importancia (obesidad, hipertensión arterial), ya que en general ellos no son reproducidos fácilmente por mutaciones de genes específicos o por agentes que destruyen células β pancreáticas, como la estreptozotocina o el aloxano [268].

Los datos del presente trabajo de tesis indican que hay gran similitud entre las secuelas detectadas en el SM por dieta hipergrasa con aquellas del SM por administración de fructosa en el agua de bebida. En ambos se detecta un aumento equivalente de peso corporal y de PA sistólica, reducción de la tolerancia a la sobrecarga de glucosa y niveles circulantes disminuidos de colesterol, colesterol-LDL y triglicéridos. Esto sugiere que los efectos pueden ser aditivos y plantea como continuación futura del presente Trabajo la combinación de ambos procedimientos para reproducir más acabadamente la "dieta chatarra" o "dieta de cafetería" muy común en la sociedad actual, que incluye tanto aumento de la oferta de grasas como de fructosa. Esta dieta combinada induce el SM en roedores y la sacarosa y el exceso de grasa en la dieta en combinación también causaron esteatosis hepática [268].

Una de las consecuencias del SM, la alteración de la función gonadal, fue también examinada en este Trabajo de Tesis. En los últimos años han surgido numerosas evidencias respecto a la relación entre el SM y una función testicular inhibida, con verificación de reducción de los niveles séricos de testosterona y de globulina transportadora de andrógenos, así como también de la espermatogénesis [269]. Por otra parte, es conocido que el hipogonadismo incrementa la insulinoresistencia, aspecto fisiopatológico principal del SM. En hombres obesos, los niveles totales de testosterona y los de globulina transportadora de andrógenos disminuyen [269].

Los presentes resultados en ratas indican una disminución significativa de los niveles totales de testosterona en plasma en ambos tipos de SM, el producido por dieta hipergrasa y por la administración de fructosa. Se detecta en ambos tipos de SM un aumento compensatorio de LH plasmática. Dado que el tratamiento con FFA disminuye la actividad de la adenilato ciclase estimulada por LH y los niveles de testosterona en testículo de rata, e induce la apoptosis de las células de Leydig [270], los presentes resultados son compatibles con un efecto deletéreo de la hiperlipemia sobre la función testicular [269]. Se necesitan más estudios para determinar si la testosterona libre también se reduce en ambos tipos de SM por dieta hipergrasa o por fructosa. En efecto, la estimación de la concentración de testosterona libre en suero es frecuentemente aconsejada para evaluar mejor el estado clínico del paciente obeso, y este parámetro se reduce en hombres con obesidad mórbida [269]. También en este aspecto de la fisiología hipófiso-gonadal existió similitud en las secuelas del SM por dieta hipergrasa o por administración de fructosa.

Otro de los objetivos del presente Trabajo de Tesis fue estudiar diferentes estadios de establecimiento del SM, desde una fase incipiente a la plenamente establecida. Para ello utilizamos la administración de fructosa en el agua de bebida por ser el procedimiento más simple y reproducible [271,272]. Es sabido que dietas que incorporan fructosa en agua potable en bajas concentraciones (5 % o menos) por tiempos prolongados, o concentraciones de

fructosa al 10 % por periodos cortos (hasta 2 semanas), producen hipertrigliceridemia e hígado graso sin modificar o incluso aumentar la tolerancia a una sobrecarga de glucosa [273,274].

En el presente Trabajo de Tesis definimos dos etapas del SM causado por fructosa: una incipiente administrando durante 8 semanas una solución al 5 % de fructosa, equivalente a una dieta que contiene 21-27 % de fructosa [275], y la establecida dada por la administración de 10 % de fructosa, equivalente a una dieta que contiene 48-57 % de fructosa [275]. Si bien en una fase incipiente del SM no existen cambios ponderales, se observó el aumento de la PA sistólica compatible con SM. Asimismo en ambas situaciones aumentaron los niveles circulantes de colesterol.

En comparación con la resistencia a la insulina aumentada detectada en ratas con el SM establecido, las ratas con SM incipiente (5 % de fructosa) exhibieron una mayor tolerancia a la sobrecarga de glucosa, demostrada por menor aumento de la glucemia. Es decir, estos animales mostraron un nivel de sensibilidad a la insulina por arriba de lo observado en la dieta normal, hecho verificado en otros estudios [273,274]. La concentración de triglicéridos y de colesterol-HDL sólo aumentó significativamente en las ratas con SM establecido.

Por lo tanto, pueden definirse dos fases diferentes del SM producido por la fructosa: una etapa inicial, en la que los cambios en PA y colesterolemia coexisten con una tolerancia a la glucosa aumentada, y una etapa establecida, donde la obesidad, hipertensión arterial, resistencia a la insulina y aumento de lípidos circulantes están completamente desarrolladas. Estos resultados nos llevan a postular el presente diseño como un modelo animal para estudiar los cambios somáticos y metabólicos del SM en etapas iniciales y establecidas, útil para el monitoreo de drogas en sus efectos terapéuticos sobre estas distintas fases.

Hemos analizado en la Introducción cómo la melatonina, originariamente descubierta como hormona de la glándula pineal, es producida por bacterias, protozoos, plantas, hongos, invertebrados, y en los vertebrados, en varios tejidos además de la pineal. Esta sorprendente conservación filogenética sugiere que sus funciones citoprotectoras son de relevancia para el funcionamiento celular. Hemos visto en detalle cómo las acciones de la melatonina son múltiples y están mediadas por la interacción con receptores de membrana (receptores MT₁ y MT₂) y nucleares (receptores RZR/ROR α y RZR β), por interacción con proteínas intracelulares y por interacciones químicas como las vinculadas con la actividad antioxidante del compuesto y sus metabolitos (Fig. 1.7 y 1.9). Más recientemente, se ha prestado atención a los efectos mitocondriales de la melatonina, incluida la salvaguarda del flujo de electrones en la cadena de oxidación intermedia, la reducción de la formación de ROS mediante la reducción de la fuga de electrones, y la inhibición de la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (Fig. 1.8) [276,277]. Una búsqueda en Medline de los trabajos que relacionan a la melatonina con actividad antioxidante y citoprotectora en los últimos 3 años indica la existencia de más de 1600 publicaciones.

También hemos analizado en la Introducción la potencialidad terapéutica de la melatonina como citoprotector en el SM (ver Tablas 1.2 y 1.3). Fue objetivo de este Trabajo de Tesis comparar tal posible función terapéutica en los dos modelos de SM por dieta utilizados, la dieta hipergrasa y la administración de fructosa. Para ello quisimos en primer término determinar qué nivel de concentración se alcanza en plasma con las cantidades administradas en este estudio (25 μ g/mL de agua de bebida). Los niveles de melatonina observados fueron unas 20 veces mayores que las concentraciones de melatonina endógena detectadas en el plasma de los animales controles. Considerando que en promedio las ratas tratadas reciben 2.5 mg/kg de melatonina/día, esta cantidad normalizada por superficie corporal [278] equivale a una dosis de 28 mg de melatonina para un adulto de 70 kg de peso.

Tales dosis de melatonina fueron efectivas para normalizar el peso corporal en ambos tipos de SM por dieta en ratas sin modificar significativamente la ingesta. No se conocen las razones

para esta disminución del peso corporal en ausencia de diferencias significativas en la ingesta de alimentos. Es posible que al desempeñar la melatonina un papel central en los cambios estacionales de adiposidad en animales en vida silvestre vía un aumento de la actividad del sistema nervioso simpático que inerva la grasa blanca y aumenta la lipólisis [279], este mecanismo sea también operativo en una especie no estacional como la rata de laboratorio. Alternativamente, el efecto de la melatonina puede atribuirse a un aumento en el gasto de energía a nivel del tejido adiposo pardo. Cabe señalar que existe una necesidad de estudios de acción de la melatonina en fenotipos de SM en primates, ya que todos los estudios llevados a cabo han sido en especies nocturnas donde el vínculo de melatonina con el sueño es menos claro.

La melatonina fue efectiva para normalizar la PA sistólica anormalmente elevada en todas las situaciones de SM examinadas en el presente Trabajo de Tesis. En particular es auspicioso que lo haga en las etapas tempranas del SM por fructosa al 5%, indicando su potencialidad terapéutica [280]. Como hemos ya mencionado, existe una demostrada reducción de los niveles circulantes de melatonina en pacientes severamente hipertensos y en pacientes hipertensos con ausencia del “dipping” nocturno en PA. También se ha reportado deficiencia en la producción de melatonina en pacientes con cardiopatía coronaria (Tabla 1.3).

Un reciente meta-análisis indica que la melatonina produce una reducción de la PA nocturna en una magnitud que se considera clínicamente relevante[281]. Se ha observado que la administración de melatonina durante la noche reduce la PA nocturna en hipertensos de ambos sexos [249-251] y en adolescentes con diabetes mellitus tipo 1 [252]. Debido a que la melatonina se metaboliza rápidamente, con una vida media de 40-50 min, tras la administración oral de melatonina de liberación rápida en las dosis habituales de 3-5 mg los niveles plasmáticos máximos son alcanzados a los 20-30 min de la ingesta, se mantienen durante 90 min y disminuyen rápidamente después. Es por ello que las dosis que debieran emplearse el metoxindol serían por lo menos las utilizadas en el presente Trabajo de Tesis, que corregidas para seres humanos alcanzan a unos 30 mg/día. Esta concentración garantiza niveles efectivos farmacológicamente hasta el amanecer [282].

La melatonina puede reducir la PA a través de varios mecanismos. Hemos mencionado en la Introducción la existencia de receptores vasculares melatoninérgicos con función tanto vasoconstrictora como vasodilatadora. Otro mecanismo por el cual podría actuar la melatonina es la inhibición de la actividad del sistema nervioso simpático como consecuencia de promover el sueño de ondas lentas y el estado parasimpático que conlleva [82]. Además de dilatar las arterias periféricas y así reducir la resistencia periférica, existe evidencia de que la melatonina estimula la liberación de factores tisulares inhibidores del endotelio vascular, con supresión de la trombosis arterial y de la re-estenosis (Tabla 3.1).

Debe notarse que se detecta una mayor rigidez aórtica en pacientes con hipertensión arterial nocturna. Mediante la determinación de la velocidad de la onda del pulso, una medida directa de la rigidez arterial, se ha verificado que el aumento de los niveles de melatonina durante la noche causa una disminución en la velocidad de la onda de pulso aórtico [283]. Asimismo, la administración de melatonina, en comparación con placebo, disminuye la velocidad de la onda de pulso y la presión arterial sistólica en jóvenes sanos.

En el presente Trabajo de Tesis observamos que la administración de melatonina fue eficaz para restablecer la tolerancia normal a una sobrecarga de glucosa en el SM establecido por dieta hipergrasa o por administración de fructosa. En este sentido las observaciones concuerdan con la información que mencionáramos en la Introducción acerca de que la melatonina en ratas tiene la capacidad de reducir la diabetes y la esteatosis hepática [179] y mejorar el metabolismo de lípidos en ratas diabéticas tipo 2 [233] y en ratones diabéticos con aumento de glucógeno hepático y reducción de la esteatosis [235].

La melatonina contrarrestó los cambios en la concentración plasmática de colesterol-LDL, triglicéridos y colesterol, aumentó los niveles de colesterol-HDL y disminuyó los niveles plasmáticos de ácido úrico. Este último efecto podría ser también de un valor terapéutico, ya que la hiperuricemia puede tener un papel patogénico en el SM, posiblemente debido a su capacidad para inhibir la función endotelial [284].

Existe considerable evidencia de que las alteraciones circadianas se asocian con un mayor riesgo de obesidad, diabetes y enfermedad cardiovascular [285]. Cambios de estilo de vida, tales como la nocturnidad y las dietas excesivamente ricas, son seguidos por la disrupción del ciclo sueño / vigilia y otros ritmos circadianos. Existe una verificable desorganización cronobiológica en la sociedad actual y en promedio dormimos 2 horas diarias menos que hace 40 años, lo que incide en forma negativa en infinidad de procesos fisiológicos y en el mantenimiento de la salud. Tal desorganización y su impacto en el sueño ha sido verificada en distintos estudios y en distintas regiones.

En un trabajo previo de nuestro grupo de investigación, y que constituyó la primera encuesta sobre prevalencia de alteraciones del sueño en poblaciones urbanas de América Latina, se entrevistaron individuos adultos de edad 18 a 77 años en Buenos Aires, San Pablo y Ciudad de México [286]. Dos tercios de los encuestados, independientemente de su edad o sexo, comunicaron haber padecido algún trastorno del sueño en los últimos 12 meses. Aunque los individuos entrevistados manifestaron como deseable 8.2 h de sueño diarias, el tiempo promedio declarado fue de 5.8 h de sueño diarias, independiente de la presencia o no de disturbios en el sueño [286]. Esta brecha diaria de unas 2 h entre el sueño deseado y el obtenido es coincidente con estudios longitudinales que comprenden las últimas décadas en otras regiones del mundo [287].

Tal restricción de las horas de sueño tiene un fuerte impacto en el SM. Un reciente estudio de cohortes basados en una población de 20.432 hombres y mujeres de 20-65 años, reveló que aquéllos que dormían 6 horas diarias o menos tenían un riesgo 63 % mayor de enfermedad cardiovascular y un riesgo 79 % mayor de enfermedad coronaria en comparación con individuos con sueño normal [288,289].

En vista que la melatonina combina propiedades cronobióticas y citoprotectoras que pueden ser de relevancia en la prevención y el tratamiento de las complicaciones cronobiológicas del SM analizamos en la parte final del presente Trabajo de Tesis, su efecto de sobre los ritmos circadianos de adiponectina, leptina, insulina, glucosa, triglicéridos y colesterol plasmáticos en ratas controles y en el modelo de SM por dieta hipergrasa. En el caso de la adiponectina, sólo hay un trabajo a partir de estudios in vitro que indica una influencia inhibitoria de la melatonina sobre la síntesis de adiponectina por adipocitos [290] y no existe información sobre los efectos de la melatonina in vivo.

Dado que habíamos observado en uno de los experimentos iniciales de este Trabajo de Tesis que la melatonina *per se* era capaz de reducir el peso corporal, quisimos en la última serie de experimentos determinar el curso temporal de tal efecto en ratas con dieta normal. La administración crónica del metoxindol durante 9 semanas a ratas de 45 días alimentadas con una dieta normal redujo el aumento progresivo de peso corporal con disminución de los valores medios de insulina, glucosa y triglicéridos circulantes, así como indujo una alteración del ritmo diario de secreción de adiponectina, leptina e insulina. Esto ocurrió en la ausencia de un efecto significativo de la melatonina sobre la ingesta.

La reducción de la secreción de insulina (y concomitantemente, en la glucosa circulante) vista en ratas normales en el presente Trabajo de Tesis es consistente con los datos que apoyan una regulación negativa de la liberación de insulina y la mejora en la sensibilidad a la insulina subsiguientes a la administración de melatonina [177]. La falta de efecto sobre los valores medios de leptina y la alteración en la ritmicidad de 24 h de la leptina pueden explicar los

resultados contradictorios sobre la acción de melatonina en los niveles de leptina ya publicados. Se ha descrito un aumento de liberación de leptina [291-297], una inhibición de la liberación de leptina [298-308] o ausencia de efectos de la melatonina sobre la liberación de leptina [309-311]. Estos resultados discordantes pueden depender en parte de la situación metabólica examinada.

En cuanto a la adiponectina, los resultados aquí observados son la primera evidencia sobre un efecto de la melatonina en los niveles circulantes de esta adipocitoquina e indican que el efecto del tratamiento con melatonina se ejerce principalmente sobre la ritmicidad de 24 h de la secreción de adiponectina en ratas controles. Por lo tanto, la expresión reducida de adiponectina reportada en preadipocitos en presencia de concentraciones milimolares de melatonina [290] parece no reflejarse en los cambios en los niveles circulantes de adiponectina.

Rasmussen y col. demostraron convincentemente que la administración diaria de cantidades fisiológicas de melatonina desde los 12 meses de edad suprime la deposición intraabdominal de grasa y reduce los niveles de leptina e insulina en plasma [305,308,312]. La administración de la misma dosis fisiológica de melatonina a partir de los 3 meses de edad no alteró significativamente ninguno de los parámetros analizados [307]. Esto contrasta con los cambios inducidos por la melatonina en los niveles de leptina e insulina registrados en ratas de 45 días de edad en este Trabajo de Tesis. Debe notarse que la administración de melatonina en nuestro caso fue en cantidades farmacológicas y produjo niveles mucho mayores del metoxindol que los determinados fisiológicamente, lo que podría explicar la discrepancia citada.

En trabajos previos de nuestro Laboratorio se reportó que después de 4 días de administración de melatonina a ratas alimentadas con una dieta normal, los niveles circulantes de colesterol libre disminuyen en ausencia de efectos significativos sobre los niveles de colesterol total, presumiblemente por aumento de la esterificación de colesterol mediada por lecitina-colesterol aciltransferasa [313]. De manera similar, la administración de melatonina durante 12 semanas a ratas de 6 meses de edad mantenidas bajo una dieta normal no afectó el colesterol total [314]. Los resultados de este Trabajo de Tesis indican que la administración crónica de melatonina durante 9 semanas a ratas en dieta normal tampoco afecta los niveles medios o el ritmo de 24 h del colesterol total ni de triglicéridos en plasma.

En el presente estudio la melatonina fue eficaz para revertir los cambios en LH como consecuencia del SM, pero no los de testosterona. Más aún, en ratas controles indujo una caída en la secreción testicular. Existe abundante bibliografía que señala este efecto en roedores, que no parece ser compartido por los seres humanos [315]. Por ejemplo en un estudio doble ciego aleatorizado incluyendo a 578 pacientes de edad ≥ 55 años y que recibieron 2 mg de melatonina diarios durante 29 semanas la mayoría de los eventos adversos fueron de intensidad leve, sin diferencias clínicamente relevantes con placebo en parámetros endocrinos tales como prolactina, ACTH, hormona tiroidea, TSH, LH, FSH, estradiol, testosterona libre y total y cortisol [316].

El tejido adiposo participa en la regulación de la homeostasis del peso corporal, de la glucosa y del metabolismo de los lípidos a través de numerosas proteínas secretadas (adipocitoquinas) que incluyen hormonas, citoquinas, factores de crecimiento, componentes del complemento y proteínas de la matriz (véase, por ref. [317]). En efecto, la oscilación circadiana de muchas hormonas implicadas en el metabolismo, como la insulina, corticosterona, glucagón, adiponectina, ghrelina, leptina y melatonina se altera en el desarrollo del SM y de la obesidad.

Recientemente se ha verificado en este Laboratorio que un alto nivel en grasas de la dieta aumenta en ratas los niveles circulantes de leptina y disminuye los de ghrelina, junto con signos de resistencia a la insulina [39]. La media de los niveles plasmáticos de adiponectina, IL-

1, IL-6, TNF- α y leptina aumentaron, y los de ghrelina disminuyeron, en ratas alimentadas con un alto contenido de grasa. Como el patrón normal diario de insulina, adiponectina, IL-1, IL-6, TNF- α , leptina, ghrelina y proteína quimiotáctica de monocitos-1 se altera en ratas alimentadas con dieta rica en grasas [39] examinamos en el presente Trabajo de Tesis si el tratamiento con melatonina podía contrarrestar algunos de los efectos observados.

Hemos resumido en la Tabla 1.2 los estudios publicados que tuvieron por objetivo evaluar si la melatonina podía reducir la adiposidad en ratas obesas. En uno de ellos [304] ratas alimentadas desde el destete con una dieta alta en grasa hasta que tenían sobrepeso se trataron durante 3 semanas con melatonina (30 mg / kg) 1 h antes de apagar las luces. El tratamiento disminuyó la ganancia de peso y la eficiencia alimenticia a la mitad. La melatonina no tuvo ningún efecto sobre los niveles de insulina pero disminuyó la glucemia, leptinemia y trigliceridemia [304].

Puchalski y col examinaron en ratas de mediana edad si la melatonina altera el consumo de una dieta con alto contenido en grasas [306]. A los 10 meses de edad, las ratas recibieron la dieta con alto contenido calórico que contenía melatonina (0.2 mg/ml) o vehículo. Los animales que recibieron la melatonina aumentaron 4 % del peso corporal durante las 2 primeras semanas y luego se estabilizaron, mientras que las ratas que recibieron vehículo continuaron ganando peso. En las ratas tratadas con melatonina, los niveles de leptina en plasma en la noche pero no durante el día y los niveles nocturnos de insulina, pero no los diurnos, disminuyeron. El tratamiento con melatonina no alteró el consumo de acumulativo de alimentos [306].

En un estudio realizado en un modelo murino de obesidad inducida por la dieta alta en grasas fueron evaluados los efectos de un tratamiento durante 8 semanas con melatonina sobre la insulina y la tolerancia a la glucosa [318]. En los ratones alimentados con dieta alta en grasas, pero no con alimento normal, la melatonina mejoró significativamente la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa [318]. Un efecto semejante fue observado en conejos alimentados con dieta alta en grasas [319].

Los resultados de la última serie de experimentos del presente Trabajo de Tesis indican que la administración concomitante de una dieta alta en grasas y de melatonina durante 11 semanas impide la hiperglucemia e hiperinsulinemia observables en ratas alimentadas sólo con la dieta alta en grasa. Asimismo, se redujo significativamente el incremento en los niveles medios plasmáticos de adiponectina, leptina, glucemia, triglicéridos y colesterol total dados por la dieta rica en grasa ratas. Estos cambios coexistieron con una reducción significativa del incremento de peso corporal en las ratas que recibieron la melatonina en ausencia de efecto significativo sobre la ingesta de alimentos.

La mayoría de los estudios muestran una disminución de la concentración plasmática de adiponectina en la obesidad (véase, por ref. [317,320]) con sólo unas pocas excepciones [321]. Nuestros resultados actuales y anteriores [39] indican un aumento en los niveles medios de adiponectina en ratas alimentadas con alto contenido de grasa así como una modificación significativa en su patrón diario en circulación. Se necesitan más estudios para explicar por qué, en determinadas circunstancias, la disminución de los niveles de ARNm de adiponectina reportados en la grasa de las ratas obesas no se traduce en una disminución paralela en la concentración plasmática de adiponectina [321].

Por último es de importancia discutir los aspectos vinculados con la dosis de melatonina, en particular en relación a los potenciales aspectos de aplicación clínica del presente trabajo de Tesis Doctoral. Los niveles de melatonina obtenidos con la dosis utilizada fueron unas 20 veces mayores que las concentraciones de melatonina endógena detectadas en el plasma de los animales controles y equivalen a una dosis de unos 30 mg de melatonina para un adulto de

peso normal. Estas dosis son unas 10 veces mayores que las usadas en clínica para la melatonina de liberación rápida.

Como la melatonina presenta tanto propiedades hipnóticas como de cronobiótico, se ha utilizado para el tratamiento del insomnio relacionado con la edad. Un reciente consenso de la Asociación Británica de Psicofarmacología llegó a la conclusión que la melatonina (2 mg en forma de liberación prolongada) es el tratamiento de elección para el tratamiento del insomnio en pacientes mayores de 55 años [322]. La melatonina también ha sido utilizado con éxito para el tratamiento de los trastornos del sueño relacionados con perturbaciones del sistema circadiano como las causadas por el desfase horario del trabajo en turnos o síndrome de fase retardada del sueño [323,324].

Tabla 4.1 Drogas melatoninérgicas de uso clínico o en fase de desarrollo

Drogas Melatoninérgicas de Uso Clínico Aprobadas o en Estudio			
Compuesto	Compañía	Indicación	Estado Regulatorio
Melatonina (Melatol®, comprimidos de 3mg)	Elisium	Tratamiento de los trastornos de conciliación del sueño en mayores de 45 años. Tratamiento del "jet-lag"	Aprobado por ANMAT (1995)
Melatonina (Circadin®) tabletas de 2 mg	Neurim	Como monoterapia del insomnio primario en mayores de 55 años.	Aprobado por EMEA (2007), TGA, Australia (2009), SwissMedic (2010)
Ramelteon (Rozerem®) tabletas de 8 mg	Takeda	Tratamiento del insomnio primario	Aprobado por FDA en 2005
Agomelatina (Valdoxan®, Vestin®, tabletas de 25 mg)	Servier, Gador, Novartis	Tratamiento de la depresión mayor en adultos	Aprobado por EMEA en 2009 y ANMAT en 2009
Tasimelteon 20 mg	Vanda	Depresión mayor. Alteraciones circadianas con ritmo diferente de 24 h en ciegos sin percepción de luz.	Fase III
TIK-301 20-100 mg	Tikvah	Insomnio. Alteraciones circadianas con ritmo diferente de 24 h en ciegos sin percepción de luz, Discinesia tardía	Fase II
Neu-P11 5-50 mg	Neurim	Insomnio	Fase II

Dado que la melatonina tiene una vida media corta (menos de 30 min) su eficacia en dosis bajas (3 – 5 mg) en la promoción y el mantenimiento del sueño no ha sido uniforme en todos los estudios realizados. Así, surgió la necesidad del desarrollo de preparaciones de liberación prolongada de melatonina o de agonistas de la melatonina con una mayor duración de acción. Las formas de liberación lenta de la melatonina (por ejemplo, Circadin®, 2 mg de preparación desarrollado por Neurim, Tel Aviv, Israel, y aprobado por la EMEA en 2007) y los análogos de la melatonina ramelteon, la agomelatina, tasimelteon, TK 301 y NEU-P11 son ejemplos de esta estrategia (Tabla 4.1).

El ramelteon es un análogo melatoninérgico hipnótico aprobado por la FDA para el tratamiento del insomnio en 2005 en dosis de 8 a 32 mg/día. Es un agonista selectivo de los receptores de MT₁/MT₂ sin una afinidad significativa por otros receptores. Estudios de unión in

vitro han demostrado que la afinidad del ramelteon para receptores MT₁ y MT₂ es 3-16 veces mayor que la de la melatonina [325].

La agomelatina es un antidepresivo recientemente introducido de tipo melatoninérgico con afinidad por ambos receptores MT₁ y MT₂ similar a la de la melatonina y que también actúa como un antagonista de receptores 5-HT_{2C} en una concentración 3 órdenes de magnitud mayor [326]. La agomelatina ha sido autorizada por la EMEA para el tratamiento del trastorno depresivo mayor en dosis de 25 - 50 mg/día.

El tasimelteon es un agonista MT₁/MT₂ que completó la fase III de ensayo en 2010. En estudios con animales, tasimelteon exhibió similar acción que la melatonina para producir cambios de fase de los ritmos circadianos. En estudios clínicos con sujetos humanos sanos, tasimelteon se administró a dosis de hasta 100 mg/día [327]. La FDA concedió al tasimelteon un estado de “fármaco huérfano” para el tratamiento de los trastornos circadianos en ciegos en 2010.

El TIK-301 ha estado en un ensayo clínico de fase II en los EE.UU. desde 2002. Es un derivado clorado de la melatonina con la actividad agonista MT₁/MT₂ y actividad antagonista de 5HT_{2C}. La farmacocinética, farmacodinamia y seguridad de TIK-301 han sido examinados en un estudio controlado con placebo utilizando 20 a 100 mg/día en voluntarios sanos [328]. La FDA concedió TIK-301 la designación de fármaco huérfano en 2004, para utilizar como tratamiento para el trastorno del ritmo circadiano del sueño en personas ciegas sin percepción de luz y en la disquinesia tardía. El NEU-P11 se encuentra en ensayo clínico fase II y su indicación es el insomnio.

Como se muestra por las potencias relativas de estos agonistas de melatonina (Tabla 4.2), es evidente que los estudios que utilizan melatonina en dosis de 2-5 mg / día son inadecuados para dar una comparación apropiada con el efecto de ramelteon, la agomelatina, tasimelteon, TIK 301 o NE-P11, que además de ser generalmente más potentes que la molécula natural se emplean en cantidades considerablemente más altas [282].

Tabla 4.2 Potencia relativa de agonistas melatonérgicos

	Melatonina	Ramelteon	Agomelatina	Tasimelteon	TIK-301	NEU-P11
MT1 (potencia relativa)	1	8	1	0,25	1	0.25
MT2 (potencia relativa)	1	3	1	1	5	1
Dosis	3 mg	8-32 mg	25-50 mg	50 mg	20-100 mg	50 mg

En este sentido la melatonina tiene un alto nivel de seguridad y su carencia de efectos tóxicos es notable. La melatonina es por lo general es muy bien tolerada y, en algunos estudios, se ha administrado a pacientes en dosis muy grandes. Por ejemplo, 300 mg/día durante 3 años redujo el estrés oxidativo en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica sin ningún efecto colateral de importancia [329]. En niños con distrofia muscular, 70 mg/día de melatonina redujo el nivel de citoquinas y la peroxidación lipídica [330]. Dosis de melatonina de 80 mg en hombres sanos no produjo efectos indeseables excepto somnolencia [331] y en mujeres sanas 300 mg de melatonina / día durante 4 meses no produjo efectos secundarios [332].

Un reciente ensayo clínico controlado doble ciego, aleatorizado en 50 pacientes referidos para cirugía hepática indicó que una única dosis preoperatoria enteral de 50 mg/kg melatonina fue segura y bien tolerada [333]. Otro punto importante a considerar cuando se trata de dosis de melatonina como las que se administraron en el presente estudio es que, además de su baja toxicidad, es un potente protector mitocondrial [207,334-336].

En conclusión, debido a sus efectos sobre el sistema circadiano y a sus potentes propiedades citoprotectoras la melatonina puede ser de utilidad terapéutica en el SM. En dosis adecuadas puede proteger contra varias comorbilidades del SM, incluyendo la diabetes y el daño concomitante mediada por ROS, inflamación, enfermedad microvascular y riesgo aterotrombótico [203]. Como la melatonina actúa específicamente a nivel mitocondrial para proteger la fuga de electrones y el fallo de la cadena de oxidación respiratoria, la melatonina puede ser útil como terapia coadyuvante en el SM para reducir la resistencia a la insulina, la dislipemia y el sobrepeso en personas obesas.

5. CONCLUSIONES

En base las hipótesis planteadas y a los resultados obtenidos en este Trabajo de Tesis Doctoral podemos concluir que:

- Tanto el SM por ingesta de una dieta rica en grasa como el producido por la administración de fructosa comparten secuelas somáticas y bioquímicas.
- Se detecta una inhibición del eje hipófiso-gonadal presumiblemente de origen testicular en ambos tipos de SM.
- En etapas sucesivas del desarrollo el SM producido por agregado de fructosa a la dieta se pasa por una etapa inicial de sensibilidad aumentada a la insulina que coexiste con un aumento de PA sistólica y un desarrollo parcial de secuelas dislipémicas.
- En el SM por dieta rica en grasas se producen alteraciones en los ritmos diarios de adipocitoquinas y señales metabólicas circulantes, compatibles con un relevante efecto de la dieta en la sincronización del sistema circadiano.
- La administración concomitante de melatonina en el agua de bebida fue eficaz para revertir los aumentos de peso y de PA sistólica, la anormal resistencia a la insulina y la dislipemia que se producen tanto en el SM por ingesta de una dieta rica en grasa como en el producido por la administración de fructosa.
- Este efecto correctivo de la melatonina es ya evidente en la etapa inicial de sensibilidad aumentada a la insulina que se observa en el SM incipiente por administración de 5% de fructosa.
- La melatonina no corrigió la inhibición del eje hipófiso-gonadal de origen testicular en el SM y mostró una actividad inhibitoria de la síntesis de testosterona cuando se administró a ratas con dieta normal.
- La melatonina fue eficaz para normalizar las alteraciones en los ritmos diarios de adipocitoquinas y señales metabólicas circulantes que se observan en el SM.

6. REFERENCIAS

1. Simmons RK, Alberti KG, Gale EA, Colagiuri S, Tuomilehto J, Qiao Q, Ramachandran A, Tajima N, Brajkovich M, I, Ben Nakhi A, Reaven G, Hama SB, Mendis S, Roglic G: The metabolic syndrome: useful concept or clinical tool? Report of a WHO Expert Consultation. *Diabetologia* 2010;53:600-605.
2. Bauduceau B, Vachey E, Mayaudon H, Burnat P, Dupuy O, Garcia C, Ceppa F, Bordier L: Should we have more definitions of metabolic syndrome or simply take waist measurement? *Diabetes Metab* 2007;33:333-339.
3. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, Taskinen MR, Groop L: Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2001;24:683-689.
4. Aschner P: Metabolic syndrome as a risk factor for diabetes. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2010;8:407-412.
5. Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, Salonen JT: The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* 2002;288:2709-2716.
6. Vanni E, Bugianesi E, Kotronen A, De Minicis S, Yki-Jarvinen H, Svegliati-Baroni G: From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? *Dig Liver Dis* 2010;42:320-330.
7. Palanisamy N, Viswanathan P, Ravichandran MK, Anuradha CV: Renoprotective and blood pressure-lowering effect of dietary soy protein via protein kinase C β II inhibition in a rat model of metabolic syndrome. *Can J Physiol Pharmacol* 2010;88:28-37.
8. Bjorge T, Lukanova A, Jonsson H, Tretli S, Ulmer H, Manjer J, Stocks T, Selmer R, Nagel G, Almquist M, Concin H, Hallmans G, Haggstrom C, Stattin P, Engeland A: Metabolic syndrome and breast cancer in the me-can (metabolic syndrome and cancer) project. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:1737-1745.
9. Johansen D, Stocks T, Jonsson H, Lindkvist B, Bjorge T, Concin H, Almquist M, Haggstrom C, Engeland A, Ulmer H, Hallmans G, Selmer R, Nagel G, Tretli S, Stattin P, Manjer J: Metabolic factors and the risk of pancreatic cancer: a prospective analysis of almost 580,000 men and women in the Metabolic Syndrome and Cancer Project. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:2307-2317.
10. Haggstrom C, Stocks T, Rapp K, Bjorge T, Lindkvist B, Concin H, Engeland A, Manjer J, Ulmer H, Selmer R, Tretli S, Hallmans G, Jonsson H, Stattin P: Metabolic syndrome and risk of bladder cancer: prospective cohort study in the metabolic syndrome and cancer project (Me-Can). *Int J Cancer* 2011;128:1890-1898.
11. Forti P, Pisacane N, Rietti E, Lucicesare A, Olivelli V, Mariani E, Mecocci P, Ravaglia G: Metabolic syndrome and risk of dementia in older adults. *J Am Geriatr Soc* 2010;58:487-492.
12. Esposito K, Ceriello A, Giugliano D: Diet and the metabolic syndrome. *Metab Syndr Relat Disord* 2007;5:291-296.
13. Zimmet P, Magliano D, Matsuzawa Y, Alberti G, Shaw J: The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition. *J Atheroscler Thromb* 2005;12:295-300.
14. Ford ES, Giles WH, Dietz WH: Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 2002;287:356-359.
15. Ford ES: Prevalence of the metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation among adults in the U.S. *Diabetes Care* 2005;28:2745-2749.

16. Ervin RB: Prevalence of metabolic syndrome among adults 20 years of age and over, by sex, age, race and ethnicity, and body mass index: United States, 2003-2006. *Natl Health Stat Report* 2009;1-7.
17. Termizy HM, Mafauzy M: Metabolic syndrome and its characteristics among obese patients attending an obesity clinic. *Singapore Med J* 2009;50:390-394.
18. Cameron AJ, Magliano DJ, Zimmet PZ, Welborn T, Shaw JE: The metabolic syndrome in Australia: prevalence using four definitions. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;77:471-478.
19. Sone H, Yamada N, Yamashita H, Katayama S, Akanuma Y: Prevalence and incidence of diabetic microangiopathy in Japan. *Nihon Rinsho* 2005;63 Suppl 6:18-22.
20. Ruger M, Scheer FA: Effects of circadian disruption on the cardiometabolic system. *Rev Endocr Metab Disord* 2009;10:245-260.
21. Ayas NT, White DP, Al Delaimy WK, Manson JE, Stampfer MJ, Speizer FE, Patel S, Hu FB: A prospective study of self-reported sleep duration and incident diabetes in women. *Diabetes Care* 2003;26:380-384.
22. Mallon L, Broman JE, Hetta J: High incidence of diabetes in men with sleep complaints or short sleep duration: a 12-year follow-up study of a middle-aged population. *Diabetes Care* 2005;28:2762-2767.
23. Yaggi HK, Araujo AB, McKinlay JB: Sleep duration as a risk factor for the development of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2006;29:657-661.
24. Foley D, Ancoli-Israel S, Britz P, Walsh J: Sleep disturbances and chronic disease in older adults: results of the 2003 National Sleep Foundation Sleep in America Survey. *J Psychosom Res* 2004;56:497-502.
25. Kreier F, Kalsbeek A, Sauerwein HP, Fliers E, Romijn JA, Buijs RM: "Diabetes of the elderly" and type 2 diabetes in younger patients: possible role of the biological clock. *Exp Gerontol* 2007;42:22-27.
26. Huneault L, Mathieu ME, Tremblay A: Globalization and modernization: an obesogenic combination. *Obes Rev* 2011;12:e64-e72.
27. Green CB, Takahashi JS, Bass J: The meter of metabolism. *Cell* 2008;134:728-742.
28. Buijs RM, Scheer FA, Kreier F, Yi C, Bos N, Goncharuk VD, Kalsbeek A: Chapter 20: Organization of circadian functions: interaction with the body. *Prog Brain Res* 2006;153:341-360.
29. Pattison DJ, Davies MJ: Reactions of myeloperoxidase-derived oxidants with biological substrates: gaining chemical insight into human inflammatory diseases. *Curr Med Chem* 2006;13:3271-3290.
30. Moschen AR, Molnar C, Geiger S, Graziadei I, Ebenbichler CF, Weiss H, Kaser S, Kaser A, Tilg H: Anti-inflammatory effects of excessive weight loss: potent suppression of adipose interleukin 6 and tumour necrosis factor alpha expression. *Gut* 2010;59:1259-1264.
31. Lumeng CN, Saltiel AR: Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest* 2011;121:2111-2117.
32. Bass J, Takahashi JS: Circadian integration of metabolism and energetics. *Science* 2010;330:1349-1354.
33. Knutson KL, Ryden AM, Mander BA, Van Cauter E: Role of sleep duration and quality in the risk and severity of type 2 diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 2006;166:1768-1774.
34. Sharma S, Kavuru M: Sleep and metabolism: an overview. *Int J Endocrinol* 2010;2010:
35. Yanagihara H, Ando H, Hayashi Y, Obi Y, Fujimura A: High-fat feeding exerts minimal effects on rhythmic mRNA expression of clock genes in mouse peripheral tissues. *Chronobiol Int* 2006;23:905-914.
36. Cano P, Jimenez-Ortega V, Larrad A, Reyes Toso CF, Cardinali DP, Esquifino AI: Effect of a high-fat diet on 24-hour pattern of circulating levels of prolactin, luteinizing hormone, testosterone, corticosterone, thyroid stimulating hormone and glucose, and pineal melatonin content, in rats. *Endocrine* 2008;33:118-125.

37. Cardinali DP, Cano P, Jimenez-Ortega V, Esquifino AI: Melatonin and the metabolic syndrome. Physiopathologic and therapeutical implications. *Neuroendocrinology* 2011;
38. Padilha HG, Crispim CA, Zimberg IZ, De Souza DA, Waterhouse J, Tufik S, de Mello MT: A link between sleep loss, glucose metabolism and adipokines. *Braz J Med Biol Res* 2011;
39. Cano P, Cardinali DP, Ríos-Lugo MP, Fernández-Mateos MP, Reyes MP, Esquifino AI: Effect of a high-fat diet on 24-hour pattern of circulating adipocytokines in rats. *Obesity* 2009;117:1866-1871.
40. Morin LP, Allen CN: The circadian visual system, 2005. *Brain Res Brain Res Rev* 2006;51:1-60.
41. Doggrell SA, Brown L: Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res* 1998;39:89-105.
42. Chen D, Wang MW: Development and application of rodent models for type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2005;7:307-317.
43. Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Krol E: Animal models of obesity. *Obes Rev* 2007;8 Suppl 1:55-61.
44. Ai J, Wang N, Yang M, Du ZM, Zhang YC, Yang BF: Development of Wistar rat model of insulin resistance. *World J Gastroenterol* 2005;11:3675-3679.
45. Mazen I, El Gammal M, Abdel-Hamid M, Amr K: A novel homozygous missense mutation of the leptin gene (N103K) in an obese Egyptian patient. *Mol Genet Metab* 2009;97:305-308.
46. Miyasaka K, Takiguchi S, Funakoshi A: Cholecystokinin 1A receptor polymorphisms. *Curr Top Med Chem* 2007;7:1205-1210.
47. Marchal-Victorion S, Vionnet N, Escricuet C, Dematos F, Dina C, Dufresne M, Vaysse N, Pradayrol L, Froguel P, Fourmy D: Genetic, pharmacological and functional analysis of cholecystokinin-1 and cholecystokinin-2 receptor polymorphism in type 2 diabetes and obese patients. *Pharmacogenetics* 2002;12:23-30.
48. Mark AL, Shaffer RA, Correia ML, Morgan DA, Sigmund CD, Haynes WG: Contrasting blood pressure effects of obesity in leptin-deficient ob/ob mice and agouti yellow obese mice. *J Hypertens* 1999;17:1949-1953.
49. Bruning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Horsch D, Accili D, Goodyear LJ, Kahn CR: A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell* 1998;2:559-569.
50. Juckerott M, Baudry A, Lamothe B, Bucchini D, Jami J, Joshi RL: Endocrine pancreas in insulin receptor-deficient mouse pups. *Diabetes* 2001;50 Suppl 1:S146-S149
51. Shirakami A, Toyonaga T, Tsuruzoe K, Shirotani T, Matsumoto K, Yoshizato K, Kawashima J, Hirashima Y, Miyamura N, Kahn CR, Araki E: Heterozygous knockout of the IRS-1 gene in mice enhances obesity-linked insulin resistance: a possible model for the development of type 2 diabetes. *J Endocrinol* 2002;174:309-319.
52. Valverde AM, Kahn CR, Benito M: Insulin signaling in insulin receptor substrate (IRS)-1-deficient brown adipocytes: requirement of IRS-1 for lipid synthesis. *Diabetes* 1999;48:2122-2131.
53. Stenbit AE, Tsao TS, Li J, Burcelin R, Geenen DL, Factor SM, Houseknecht K, Katz EB, Charron MJ: GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. *Nat Med* 1997;3:1096-1101.
54. Lenzen S: The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008;51:216-226.
55. Sinzato YK, Lima PH, Campos KE, Kiss AC, Rudge MV, Damasceno DC: Neonatally-induced diabetes: lipid profile outcomes and oxidative stress status in adult rats. *Rev Assoc Med Bras* 2009;55:384-388.
56. Sharma AK, Srinivasan BP: Triple versus glimepiride plus metformin therapy on cardiovascular risk biomarkers and diabetic cardiomyopathy in insulin resistance type 2 diabetes mellitus rats. *Eur J Pharm Sci* 2009;38:433-444.

57. Massiera F, Barbry P, Guesnet P, Joly A, Luquet S, Moreilhon-Brest C, Mohsen-Kanson T, Amri EZ, Ailhaud G: A Western-like fat diet is sufficient to induce a gradual enhancement in fat mass over generations. *J Lipid Res* 2010;51:2352-2361.
58. Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A, Schwarz JM, Lustig RH: The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:251-264.
59. Stanhope KL: Role of fructose-containing sugars in the epidemics of obesity and metabolic syndrome. *Annu Rev Med* 2012;63:329-343.
60. Patel J, Iyer A, Brown L: Evaluation of the chronic complications of diabetes in a high fructose diet in rats. *Indian J Biochem Biophys* 2009;46:66-72.
61. Chang KC, Liang JT, Tseng CD, Wu ET, Hsu KL, Wu MS, Lin YT, Tseng YZ: Aminoguanidine prevents fructose-induced deterioration in left ventricular-arterial coupling in Wistar rats. *Br J Pharmacol* 2007;151:341-346.
62. Kawasaki T, Igarashi K, Koeda T, Sugimoto K, Nakagawa K, Hayashi S, Yamaji R, Inui H, Fukusato T, Yamanouchi T: Rats fed fructose-enriched diets have characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis. *J Nutr* 2009;139:2067-2071.
63. Nakayama T, Kosugi T, Gersch M, Connor T, Sanchez-Lozada LG, Lanaspas MA, Roncal C, Perez-Pozo SE, Johnson RJ, Nakagawa T: Dietary fructose causes tubulointerstitial injury in the normal rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010;298:F712-F720.
64. Rutledge AC, Adeli K: Fructose and the metabolic syndrome: pathophysiology and molecular mechanisms. *Nutr Rev* 2007;65:S13-S23.
65. Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P: A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr* 2003;133:1081-1087.
66. Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA: Heart and blood pressure adaptations in Wistar rats fed with different high-fat diets for 18 months. *Nutrition* 2003;19:347-352.
67. Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Scholmerich J, Bollheimer LC: Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol* 2006;36:485-501.
68. Kobayashi R, Akamine EH, Davel AP, Rodrigues MA, Carvalho CR, Rossoni LV: Oxidative stress and inflammatory mediators contribute to endothelial dysfunction in high-fat diet-induced obesity in mice. *J Hypertens* 2010;28:2111-2119.
69. Sutherland LN, Capozzi LC, Turchinsky NJ, Bell RC, Wright DC: Time course of high-fat diet-induced reductions in adipose tissue mitochondrial proteins: potential mechanisms and the relationship to glucose intolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;295:E1076-E1083.
70. Sweazea KL, Lekic M, Walker BR: Comparison of mechanisms involved in impaired vascular reactivity between high sucrose and high fat diets in rats. *Nutr Metab (Lond)* 2010;7:48.
71. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori N: Isolation of melatonin, a pineal factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958;80:2587.
72. Armstrong SM, Cassone VM, Chesworth MJ, Redman JR, Short RV: Synchronization of mammalian circadian rhythms by melatonin. *J Neural Transm Suppl* 1986;21:375-394.
73. Hastings MH, Walker AP, Roberts AC, Herbert J: Intra-hypothalamic melatonin blocks photoperiodic responsiveness in the male Syrian hamster. *Neuroscience* 1988;24:987-991.
74. Pevet P, Bothorel B, Sloten H, Saboureau M: The chronobiotic properties of melatonin. *Cell Tissue Res* 2002;309:183-191.
75. Stehle JH, von Gall C, Korf HW: Melatonin: a clock-output, a clock-input. *J Neuroendocrinol* 2003;15:383-389.
76. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJM, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R: Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS Journal* 2006;273:2813-2838.

77. Dubbels R, Reiter RJ, Klenke E, Goebel A, Schnakenberg E, Ehlers C, Schiwara HW, Schloot W: Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Pineal Res* 1995;18:28-31.
78. Chen G, Huo Y, Tan DX, Liang Z, Zhang W, Zhang Y: Melatonin in Chinese medicinal herbs. *Life Sci* 2003;73:19-26.
79. Balzer I, Hardeland R: Photoperiodism and effects of indoleamines in a unicellular alga, *Gonyaulax polyedra*. *Science* 1991;253:795-797.
80. Dardente H: Melatonin-dependent timing of seasonal reproduction by the pars tuberalis: pivotal roles for long daylengths and thyroid hormones. *J Neuroendocrinol* 2012;24:249-266.
81. Carrillo-Vico A, Reiter RJ, Lardone PJ, Herrera JL, Fernandez-Montesinos R, Guerrero JM, Pozo D: The modulatory role of melatonin on immune responsiveness. *Curr Opin Investig Drugs* 2006;7:423-431.
82. Cardinali DP, Esquifino AI: Sleep and the immune system. *Current Immunology Reviews* 2012;8:50-62.
83. Radogna F, Diederich M, Ghibelli L: Melatonin: a pleiotropic molecule regulating inflammation. *Biochem Pharmacol* 2010;80:1844-1852.
84. Blask DE, Hill SM, Dauchy RT, Xiang S, Yuan L, Duplessis T, Mao L, Dauchy E, Sauer LA: Circadian regulation of molecular, dietary, and metabolic signaling mechanisms of human breast cancer growth by the nocturnal melatonin signal and the consequences of its disruption by light at night. *J Pineal Res* 2011;
85. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Jimenez-Sosa A, Avanzas P, Bosa-Ojeda F, Kaski JC: Usefulness of intraplatelet melatonin levels to predict angiographic no-reflow after primary percutaneous coronary intervention in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2010;106:1540-1544.
86. Guido ME, Garbarino-Pico E, Contin MA, Valdez DJ, Nieto PS, Verra DM, Acosta-Rodriguez VA, de Zavalía N, Rosenstein RE: Inner retinal circadian clocks and non-visual photoreceptors: novel players in the circadian system. *Prog Neurobiol* 2010;92:484-504.
87. Dawson D, Armstrong SM: Chronobiotics--drugs that shift rhythms. *Pharmacol Ther* 1996;69:15-36.
88. Brown GM, Pandi-Perumal SR, Trakht I, Cardinali DP: The role of melatonin in seasonal affective disorder, in: Partonen T, Pandi-Perumal SR (eds): *Seasonal Affective Disorder Practice and Research*. 2nd Ed. Oxford, Oxford University Press, 2010, pp 149-162.
89. Galano A: On the direct scavenging activity of melatonin towards hydroxyl and a series of peroxy radicals. *Phys Chem Chem Phys* 2011;13:7178-7188.
90. Klein DC: Arylalkylamine N-acetyltransferase: "the Timezyme". *J Biol Chem* 2007;282:4233-4237.
91. Cardinali DP, Golombek DA: The rhythmic gabaergic system. *Neurochem Res* 1998;23:607-614.
92. Claustrat B, Brun J, Chazot G: The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev* 2005;9:11-24.
93. Liu T, Borjigin J: N-acetyltransferase is not the rate-limiting enzyme of melatonin synthesis at night. *J Pineal Res* 2005;39:91-96.
94. Ribelayga C, Pevet P, Simonneaux V: HIOMT drives the photoperiodic changes in the amplitude of the melatonin peak of the Siberian hamster. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;278:R1339-R1345
95. Cardinali DP: Molecular mechanisms of neuroendocrine integration in the central nervous system: An approach through the study of the pineal gland and its innervating sympathetic pathway. *Psychoneuroendocrinology* 1983;8:3-30.
96. Cardinali DP, Pevet P: Basic aspects of melatonin action. *Sleep Med Rev* 1998;2:175-190.

97. Mukda S, Moller M, Ebadi M, Govitrapong P: The modulatory effect of substance P on rat pineal norepinephrine release and melatonin secretion. *Neurosci Lett* 2009;461:258-261.
98. Simonneaux V, Ribelayga C: Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 2003;55:325-395.
99. Cardinali DP, Vacas MI, Boyer EE: Specific binding of melatonin in bovine brain. *Endocrinology* 1979;105:437-441.
100. Vanecek J, Pavlik A, Illnerova H: Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res* 1987;435:359-362.
101. Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T: Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 1994;13:1177-1185.
102. Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella JF: Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel_{1b} melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:8734-8738.
103. Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJM, Zisapel N, Cardinali DP: Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Progress in Neurobiology* 2008;185:335-353.
104. Ishii H, Tanaka N, Kobayashi M, Kato M, Sakuma Y: Gene structures, biochemical characterization and distribution of rat melatonin receptors. *J Physiol Sci* 2009;59:37-47.
105. Dubocovich ML, Delagrange P, Krause DN, Sugden D, Cardinali DP, Olcese J: International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. Nomenclature, classification and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacological Reviews* 2010;62:343-380.
106. Flemstrom G, Sjoblom M, Jedstedt G, Akerman KE: Short fasting dramatically decreases rat duodenal secretory responsiveness to orexin A but not to VIP or melatonin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G1091-G1096.
107. Flemstrom G, Bengtsson MW, Makela K, Herzig KH: Effects of short-term food deprivation on orexin-A-induced intestinal bicarbonate secretion in comparison with related secretagogues. *Acta Physiol (Oxf)* 2010;198:373-380.
108. Poon AM, Mak AS, Luk HT: Melatonin and 2¹²⁵I-iodomelatonin binding sites in the human colon. *Endocr Res* 1996;22:77-94.
109. Poon AM, Chow PH, Mak AS, Pang SF: Autoradiographic localization of 2¹²⁵I-iodomelatonin binding sites in the gastrointestinal tract of mammals including humans and birds. *J Pineal Res* 1997;23:5-14.
110. Aust S, Jager W, Kischner H, Klimpfinger M, Thalhammer T: Pancreatic stellate/myofibroblast cells express G-protein-coupled melatonin receptor 1. *Wien Med Wochenschr* 2008;158:575-578.
111. Aras HC, Ekstrom J: Melatonin-evoked in vivo secretion of protein and amylase from the parotid gland of the anaesthetised rat. *J Pineal Res* 2008;45:413-421.
112. Muhlbauer E, Peschke E: Evidence for the expression of both the MT₁- and in addition, the MT₂-melatonin receptor, in the rat pancreas, islet and β -cell. *J Pineal Res* 2007;42:105-106.
113. Ramracheya RD, Muller DS, Squires PE, Brereton H, Sugden D, Huang GC, Amiel SA, Jones PM, Persaud SJ: Function and expression of melatonin receptors on human pancreatic islets. *J Pineal Res* 2008;44:273-279.
114. Mulder H, Nagorny CL, Lyssenko V, Groop L: Melatonin receptors in pancreatic islets: good morning to a novel type 2 diabetes gene. *Diabetologia* 2009;52:1240-1249.
115. Slominski A, Pisarchik A, Wortsman J: Expression of genes coding melatonin and serotonin receptors in rodent skin. *Biochim Biophys Acta* 2004;1680:67-70.

116. Dillon DC, Easley SE, Asch BB, Cheney RT, Brydon L, Jockers R, Winston JS, Brooks JS, Hurd T, Asch HL: Differential expression of high-affinity melatonin receptors (MT₁) in normal and malignant human breast tissue. *Am J Clin Pathol* 2002;118:451-458.
117. Sharkey JT, Cable C, Olcese J: Melatonin sensitizes human myometrial cells to oxytocin in a protein kinase C α /extracellular-signal regulated kinase-dependent manner. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:2902-2908.
118. Lanoix D, Ouellette R, Vaillancourt C: Expression of melatoninerger receptors in human placental choriocarcinoma cell lines. *Hum Reprod* 2006;21:1981-1989.
119. Williams LM, Drew JE, Bunnett NW, Grady E, Barrett P, Abramovich DR, Morris A, Slater D: Characterization of an antibody to the human melatonin MT₁ receptor. *J Neuroendocrinol* 2001;13:94-101.
120. Ekmekcioglu C, Thalhammer T, Humpeler S, Mehrabi MR, Glogar HD, Holzenbein T, Markovic O, Leibetseder VJ, Strauss-Blasche G, Marktl W: The melatonin receptor subtype MT₂ is present in the human cardiovascular system. *J Pineal Res* 2003;35:40-44.
121. Ekmekcioglu C: Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. *Biomed Pharmacother* 2006;60:97-108.
122. Cui P, Yu M, Luo Z, Dai M, Han J, Xiu R, Yang Z: Intracellular signaling pathways involved in cell growth inhibition of human umbilical vein endothelial cells by melatonin. *J Pineal Res* 2008;44:107-114.
123. Brydon L, Petit L, Delagrang P, Strosberg AD, Jockers R: Functional expression of MT₂ (Mel_{1b}) melatonin receptors in human PAZ6 adipocytes. *Endocrinology* 2001;142:4264-4271.
124. Vacas MI, Del Zar MM, Martinuzzo M, Cardinali DP: Binding sites for ³H-melatonin in human platelets. *Journal of Pineal Research* 1992;13:60-65.
125. Konakchieva R, Kyurkchiev S, Kehayov I, Taushanova P, Kanchev L: Selective effect of methoxyindoles on the lymphocyte proliferation and melatonin binding to activated human lymphoid cells. *J Neuroimmunol* 1995;63:125-132.
126. Lardone PJ, Carrillo-Vico A, Molinero P, Rubio A, Guerrero JM: A novel interplay between membrane and nuclear melatonin receptors in human lymphocytes: significance in IL-2 production. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:516-525.
127. Mailliet F, Ferry G, Vella F, Berger S, Coge F, Chomarat P, Mallet C, Guenin SP, Guillaumet G, Viaud-Massuard MC, Yous S, Delagrang P, Boutin JA: Characterization of the melatoninerger MT₃ binding site on the NRH:quinone oxidoreductase 2 enzyme. *Biochem Pharmacol* 2005;71:74-88.
128. Ferry G, Hecht S, Berger S, Moulharat N, Coge F, Guillaumet G, Leclerc V, Yous S, Delagrang P, Boutin JA: Old and new inhibitors of quinone reductase 2. *Chem Biol Interact* 2010;186:103-109.
129. Carlberg C: Gene regulation by melatonin. *Ann N Y Acad Sci* 2000;917:387-396.
130. Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ: A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* 2005;27:189-200.
131. Tomas-Zapico C, Antonio BJ, Caballero B, Vega-Naredo I, Sierra V, Alvarez-Garcia O, Tolivia D, Josefa Rodriguez-Colunga M, Coto-Montes A: Coexpression of MT₁ and ROR α 1 melatonin receptors in the Syrian hamster Harderian gland. *J Pineal Res* 2005;39:21-26.
132. Abdel-Wanis ME, Tsuchiya H: Melatonin deficiency and fibrous dysplasia: might a relation exist? *Med Hypotheses* 2002;59:552-554.
133. Fischer TW, Slominski A, Tobin DJ, Paus R: Melatonin and the hair follicle. *J Pineal Res* 2008;44:1-15.
134. Kim SH, Lee SM: Cytoprotective effects of melatonin against necrosis and apoptosis induced by ischemia/reperfusion injury in rat liver. *J Pineal Res* 2008;44:165-171.
135. Kobayashi H, Kromminga A, Dunlop TW, Tychsen B, Conrad F, Suzuki N, Memezawa A, Bettermann A, Aiba S, Carlberg C, Paus R: A role of melatonin in neuroectodermal-

- mesodermal interactions: the hair follicle synthesizes melatonin and expresses functional melatonin receptors. *FASEB J* 2005;19:1710-1712.
136. Roy D, Angelini NL, Fujieda H, Brown GM, Belsham DD: Cyclical regulation of GnRH gene expression in GT1-7 GnRH-secreting neurons by melatonin. *Endocrinology* 2001;142:4711-4720.
 137. Benitez-King G, Anton-Tay F: Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia* 1993;49:635-641.
 138. Macias M, Escames G, Leon J, Coto A, Sbihi Y, Osuna A, Acuna-Castroviejo D: Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *Eur J Biochem* 2003;270:832-840.
 139. Landau M, Zisapel N: The low affinity binding of melatonin to calmodulin: use of computational methods to explain its physiological relevance, in: Pandi-Perumal SR, Cardinali DP (eds): *Melatonin - From Molecules to Therapy*. New York, Nova Science, 2007, pp 69-79.
 140. Cardinali DP, Freire F: Melatonin effects on brain. Interaction with microtubule protein, inhibition of fast axoplasmic flow and induction of crystalloid and tubular formations in the hypothalamus. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1975;2:317-330.
 141. Cardinali DP, Ritta MN, Fuentes AM, Gimeno MF, Gimeno AL: Prostaglandin E release by rat medial basal hypothalamus in vitro. Inhibition by melatonin at submicromolar concentrations. *European Journal of Pharmacology* 1980;67:151-153.
 142. Benitez-King G: Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res* 2006;40:1-9.
 143. Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Iida T, Cho S, Honma K, Kondo T: Melatonin induces γ -glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 1999;27:838-847.
 144. Mathes AM, Wolf B, Rensing H: Melatonin receptor antagonist luzindole is a powerful radical scavenger in vitro. *J Pineal Res* 2008;45:337-338.
 145. Leston J, Harthe C, Brun J, Mottolese C, Mertens P, Sindou M, Claustrat B: Melatonin is released in the third ventricle in humans. A study in movement disorders. *Neurosci Lett* 2010;469:294-297.
 146. Tricoire H, Moller M, Chemineau P, Malpoux B: Origin of cerebrospinal fluid melatonin and possible function in the integration of photoperiod. *Reprod Suppl* 2003;61:311-321.
 147. Coge F, Guenin SP, Fery I, Migaud M, Devavry S, Slugocki C, Legros C, Ouvry C, Cohen W, Renault N, Nosjean O, Malpoux B, Delagrangue P, Boutin JA: The end of a myth: cloning and characterization of the ovine melatonin MT₂ receptor. *Br J Pharmacol* 2009;158:1248-1262.
 148. Wu YH, Zhou JN, Balesar R, Unmehopa U, Bao A, Jockers R, Van Heerikhuize J, Swaab DF: Distribution of MT₁ melatonin receptor immunoreactivity in the human hypothalamus and pituitary gland: colocalization of MT₁ with vasopressin, oxytocin, and corticotropin-releasing hormone. *J Comp Neurol* 2006;499:897-910.
 149. Hardeland R, Cardinali DP, Srinivasan V, Spence DW, Brown GM, Pandi-Perumal SR: Melatonin - a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Progress in Neurobiology* 2011;93:350-384.
 150. Vacas MI, Cardinali DP: Binding sites for melatonin in bovine pineal gland. *Hormone Research* 1980;13:121-131.
 151. Brunner P, Sozer-Topcular N, Jockers R, Ravid R, Angeloni D, Fraschini F, Eckert A, Muller-Spahn F, Savaskan E: Pineal and cortical melatonin receptors MT₁ and MT₂ are decreased in Alzheimer's disease. *Eur J Histochem* 2006;50:311-316.
 152. Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Poeggeler B, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM, Reiter RJ: Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical. *J Pineal Res* 2003;34:249-259.

153. Savaskan E, Jockers R, Ayoub M, Angeloni D, Fraschini F, Flammer J, Eckert A, Muller-Spahn F, Meyer P: The MT₂ melatonin receptor subtype is present in human retina and decreases in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2007;4:47-51.
154. Cardinali DP, Rosner JM: Retinal localization of hydroxyindole-O-methyl transferase (HIOMT) in the rat. *Endocrinology* 1971;89:301-303.
155. Cardinali DP, Rosner JM: Metabolism of serotonin by the rat retina "in vitro". *Journal of Neurochemistry* 1971;18:1769-1770.
156. Rosenstein RE, Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Spence DW, Brown GM, Cardinali DP: Melatonin as a therapeutic tool in ophthalmology: implication for glaucoma and uveitis. *Journal of Pineal Research* 2010;49:1-13.
157. Weaver DR, Liu C, Reppert SM: Nature's knockout: the Mel_{1b} receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. *Mol Endocrinol* 1996;10:1478-1487.
158. Wu YH, Zhou JN, Van Heerikhuize J, Jockers R, Swaab DF: Decreased MT₁ melatonin receptor expression in the suprachiasmatic nucleus in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2007;28:1239-1247.
159. Kalsbeek A, Perreau-Lenz S, Buijs RM: A network of (autonomic) clock outputs. *Chronobiol Int* 2006;23:201-215.
160. Kalsbeek A, Fliers E, Hofman MA, Swaab DF, Buijs RM: Vasopressin and the output of the hypothalamic biological clock. *J Neuroendocrinol* 2010;22:362-372.
161. Dubocovich ML: Melatonin receptors: Role on sleep and circadian rhythm regulation. *Sleep Med* 2007;8 Suppl 3:34-42.
162. Lewy AJ, Ahmed S, Jackson JM, Sack RL: Melatonin shifts human circadian rhythms according to a phase-response curve. *Chronobiol Int* 1992;9:380-392.
163. Burgess HJ, Revell VL, Eastman CI: A three pulse phase response curve to three milligrams of melatonin in humans. *J Physiol* 2008;586:639-647.
164. Nosjean O, Nicolas JP, Klupsch F, Delagrangé P, Canet E, Boutin JA: Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT₁, MT₂ and MT₃/QR2. Tissue distribution of MT₃/QR2. *Biochem Pharmacol* 2001;61:1369-1379.
165. Sumi Y, Yagita K, Yamaguchi S, Ishida Y, Kuroda Y, Okamura H: Rhythmic expression of ROR β mRNA in the mice suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett* 2002;320:13-16.
166. Masana MI, Sumaya IC, Becker-Andre M, Dubocovich ML: Behavioral characterization and modulation of circadian rhythms by light and melatonin in C3H/HeN mice homozygous for the ROR β Knockout. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;292:R2357-367.
167. Liu C, Weaver DR, Jin X, Shearman LP, Pieschl RL, Gribkoff VK, Reppert SM: Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 1997;19:91-102.
168. Dubocovich ML, Rivera-Bermudez MA, Gerdin MJ, Masana MI: Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci* 2003;8:d1093-d1108.
169. Fuller PM, Gooley JJ, Saper CB: Neurobiology of the sleep-wake cycle: sleep architecture, circadian regulation, and regulatory feedback. *J Biol Rhythms* 2006;21:482-493.
170. Golombek DA, Pevet P, Cardinali DP: Melatonin effect on behavior: Possible mediation by the central GABAergic system. *Neuroscience Biobehavioral Reviews* 1996;20:403-412.
171. Solmaz I, Gurkanlar D, Gokcil Z, Goksoy C, Ozkan M, Erdogan E: Antiepileptic activity of melatonin in guinea pigs with pentylenetetrazol-induced seizures. *Neurol Res* 2009;31:989-995.
172. Cardinali DP, Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Spence DW, Trakht I: Therapeutic potential of melatonin agonists. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism* 2008;3 (2):269-279.

173. Tanaka D, Furusawa K, Kameyama K, Okamoto H, Doi M: Melatonin signaling regulates locomotion behavior and homeostatic states through distinct receptor pathways in *Caenorhabditis elegans*. *Neuropharmacology* 2007;53(1):157-68
174. Bubenik GA: Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Dig Dis Sci* 2002;47:2336-2348.
175. Sjoblom M: The duodenal mucosal bicarbonate secretion. *Ups J Med Sci* 2005;110:115-149.
176. Bubenik GA: Thirty four years since the discovery of gastrointestinal melatonin. *J Physiol Pharmacol* 2008;59 Suppl 2:33-51.
177. Peschke E: Melatonin, endocrine pancreas and diabetes. *J Pineal Res* 2008;44:26-40.
178. Stumpf I, Muhlbauer E, Peschke E: Involvement of the cGMP pathway in mediating the insulin-inhibitory effect of melatonin in pancreatic β -cells. *J Pineal Res* 2008; 45(3):318-27.
179. Stumpf I, Bazwinsky I, Peschke E: Modulation of the cGMP signaling pathway by melatonin in pancreatic β -cells. *J Pineal Res* 2009;46:140-147.
180. Torres-Farfan C, Richter HG, Germain AM, Valenzuela GJ, Campino C, Rojas-Garcia P, Forcelledo ML, Torrealba F, Seron-Ferre M: Maternal melatonin selectively inhibits cortisol production in the primate fetal adrenal gland. *J Physiol* 2004;554:841-856.
181. Perras B, Ozcan S, Fehm HL, Born J: Melatonin does not inhibit hypothalamic-pituitary-adrenal activity in waking young men. *J Neuroendocrinol* 2005;17:811-816.
182. Woo MM, Tai CJ, Kang SK, Nathwani PS, Pang SF, Leung PC: Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4789-4797.
183. Dubocovich ML, Markowska M: Functional MT₁ and MT₂ melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 2005;27:101-110.
184. Regrigny O, Delagrangé P, Scalbert E, Atkinson J, Lartaud-Idjouadiene I: Melatonin improves cerebral circulation security margin in rats. *Am J Physiol* 1998;275:H139-H144
185. Dubocovich ML, Delagrangé P, Krause DN, Sugden D, Cardinali DP, Olcese J: International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev* 2010;62:343-380.
186. MacKenzie RS, Melan MA, Passey DK, Witt-Enderby PA: Dual coupling of MT₁ and MT₂ melatonin receptors to cyclic AMP and phosphoinositide signal transduction cascades and their regulation following melatonin exposure. *Biochem Pharmacol* 2002;63:587-595.
187. Peschke E, Bach AG, Muhlbauer E: Parallel signaling pathways of melatonin in the pancreatic β -cell. *J Pineal Res* 2006;40:184-191.
188. Steffens F, Zhou XB, Sausbier U, Sailer C, Motejlek K, Ruth P, Olcese J, Korth M, Wieland T: Melatonin receptor signaling in pregnant and nonpregnant rat uterine myocytes as probed by large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activity. *Mol Endocrinol* 2003;17:2103-2115.
189. Geary GG, Duckles SP, Krause DN: Effect of melatonin in the rat tail artery: role of K⁺ channels and endothelial factors. *Br J Pharmacol* 1998;123:1533-1540.
190. Hernandez-Pacheco A, Araiza-Saldana CI, Granados-Soto V, Mixcoatl-Zecuatl T: Possible participation of the nitric oxide-cyclic GMP-protein kinase G-K⁺ channels pathway in the peripheral antinociception of melatonin. *Eur J Pharmacol* 2008;596:70-76.
191. Tjong YW, Li MF, Hung MW, Fung ML: Melatonin ameliorates hippocampal nitric oxide production and large conductance calcium-activated potassium channel activity in chronic intermittent hypoxia. *J Pineal Res* 2008;44:234-243.
192. Zhao WJ, Zhang M, Miao Y, Yang XL, Wang Z: Melatonin potentiates glycine currents through a PLC/PKC signalling pathway in rat retinal ganglion cells. *J Physiol* 2010;588:2605-2619.

193. Hunt AE, Al Ghouli WM, Gillette MU, Dubocovich ML: Activation of MT₂ melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:C110-C118
194. Nelson CS, Marino JL, Allen CN: Melatonin receptors activate heteromeric G-protein coupled Kir3 channels. *Neuroreport* 1996;7:717-720.
195. Rosenstein RE, Golombek DA, Kanterewicz B, Cardinali DP: Time-dependency for the in vitro effect of melatonin on calcium uptake in rat hypothalamus. *Journal of Neural Transmission, Gen Sect* 1991;85:243-247.
196. Rosenstein RE, Cardinali DP: Central gabaergic mechanisms as target for melatonin activity. *Neurochemistry International* 1990;17:373-379.
197. Molina-Carballo A, Munoz-Hoyos A, Sanchez-Forte M, Uberos-Fernandez J, Moreno-Madrid F, Acuna-Castroviejo D: Melatonin increases following convulsive seizures may be related to its anticonvulsant properties at physiological concentrations. *Neuropediatrics* 2007;38:122-125.
198. Prada C, Udin SB, Wiechmann AF, Zhdanova IV: Stimulation of melatonin receptors decreases calcium levels in xenopus tectal cells by activating GABAC receptors. *J Neurophysiol* 2005;94:968-978.
199. Jimenez-Ortega V, Cano P, Cardinali DP, Esquifino AI: 24-Hour variation in gene expression of redox pathway enzymes in rat hypothalamus: effect of melatonin treatment. *Redox Report* 2009;14 (3):132-138.
200. Daulat AM, Maurice P, Froment C, Guillaume JL, Broussard C, Monsarrat B, Delagrangé P, Jockers R: Purification and identification of G protein-coupled receptor protein complexes under native conditions. *Mol Cell Proteomics* 2007; 6(5):835-44.
201. Jockers R, Maurice P, Boutin JA, Delagrangé P: Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol* 2008; 154(6):1182-95.
202. Rollins B, Martin MV, Sequeira PA, Moon EA, Morgan LZ, Watson SJ, Schatzberg A, Akil H, Myers RM, Jones EG, Wallace DC, Bunney WE, Vawter MP: Mitochondrial variants in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *PLoS One* 2009;4:e4913
203. Cardinali DP, Pagano ES, Scacchi PA, Reynoso R, Scacchi P: Melatonin and mitochondrial dysfunction in the central nervous system. *Hormones and Behavior*, 2012 en prensa
204. Lenaz G, Fato R, Genova ML, Bergamini C, Bianchi C, Biondi A: Mitochondrial Complex I: structural and functional aspects. *Biochim Biophys Acta* 2006;1757:1406-1420.
205. Galano A, Tan DX, Reiter RJ: Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J Pineal Res* 2011;51:1-16.
206. Esposito E, Paterniti I, Mazzon E, Bramanti P, Cuzzocrea S: Melatonin reduces hyperalgesia associated with inflammation. *J Pineal Res* 2010; 49(4):321-31.
207. Srinivasan V, Spence DW, Pandi-Perumal SR, Brown GM, Cardinali DP: Melatonin in mitochondrial dysfunction and related disorders. *International Journal of Alzheimer's Disease* 2011;2011:326320
208. Santucci R, Sinibaldi F, Patriarca A, Santucci D, Fiorucci L: Misfolded proteins and neurodegeneration: role of non-native cytochrome c in cell death. *Expert Rev Proteomics* 2010;7:507-517.
209. Sainz RM, Mayo JC, Rodriguez C, Tan DX, Lopez-Burillo S, Reiter RJ: Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:1407-1426.
210. Galano A, Tan DX, Reiter RJ: Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J Pineal Res* 2011;51:1-16.
211. Galano A, Tan DX, Reiter RJ: Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J Pineal Res* 2011;51:1-16.

212. Martin M, Macias M, Escames G, Leon J, Acuna-Castroviejo D: Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J* 2000;14:1677-1679.
213. Paradies G, Petrosillo G, Paradies V, Reiter RJ, Ruggiero FM: Melatonin, cardiolipin and mitochondrial bioenergetics in health and disease. *J Pineal Res* 2010;48:297-310.
214. Lombard DB, Alt FW, Cheng HL, Bunkenborg J, Streeper RS, Mostoslavsky R, Kim J, Yancopoulos G, Valenzuela D, Murphy A, Yang Y, Chen Y, Hirschey MD, Bronson RT, Haigis M, Guarente LP, Farese RV, Jr., Weissman S, Verdin E, Schwer B: Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol Cell Biol* 2007;27:8807-8814.
215. Guarente L: Mitochondria--a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? *Cell* 2008;132:171-176.
216. Gutierrez-Cuesta J, Tajés M, Jimenez A, Coto-Montes A, Camins A, Pallas M: Evaluation of potential pro-survival pathways regulated by melatonin in a murine senescence model. *J Pineal Res* 2008;45:497-505.
217. Tajés M, Gutierrez-Cuesta J, Ortuno-Sahagun D, Camins A, Pallas M: Anti-aging properties of melatonin in an in vitro murine senescence model: involvement of the sirtuin 1 pathway. *J Pineal Res* 2009; 47(3):228-37.
218. Cardinali DP, Furio AM, Reyes MP, Brusco LI: The use of chronobiotics in the resynchronization of the sleep-wake cycle. *Cancer Causes Control* 2006;17:601-609.
219. Skene DJ, Arendt J: Human circadian rhythms: physiological and therapeutic relevance of light and melatonin. *Ann Clin Biochem* 2006;43:344-353.
220. Hardeland R, Cardinali DP, Srinivasan V, Spence DW, Brown GM, Pandi-Perumal SR: Melatonin--a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol* 2011;93:350-384.
221. Galano A, Tan DX, Reiter RJ: Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J Pineal Res* 2011;51:1-16.
222. Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Spence DW, Kato H, Cardinali DP: Melatonin in septic shock: Some recent concepts. *Journal of Critical Care* 2010;25:656.e1-656.e6
223. Costantino G, Cuzzocrea S, Mazzon E, Caputi AP: Protective effects of melatonin in zymosan-activated plasma-induced paw inflammation. *Eur J Pharmacol* 1998;363:57-63.
224. Cardinali DP, Ritta MN, Fuentes AM, Gimeno MF, Gimeno AL: Prostaglandin E release by rat medial basal hypothalamus in vitro. Inhibition by melatonin at submicromolar concentrations. *Eur J Pharmacol* 1980;67:151-153.
225. Cuzzocrea S, Costantino G, Mazzon E, Caputi AP: Regulation of prostaglandin production in carrageenan-induced pleurisy by melatonin. *J Pineal Res* 1999;27:9-14.
226. Mohan N, Sadeghi K, Reiter RJ, Meltz ML: The neurohormone melatonin inhibits cytokine, mitogen and ionizing radiation induced NF-kappa B. *Biochem Mol Biol Int* 1995;37:1063-1070.
227. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Gilad E, Hake P, Salzman AL, Szabo C: Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation: relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity. *J Pineal Res* 1997;23:106-116.
228. Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Hardeland R, Leon J, Rodriguez C, Reiter RJ: Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N₁-acetyl-N₂-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N₁-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J Neuroimmunol* 2005;165:139-149.
229. Deng WG, Tang ST, Tseng HP, Wu KK: Melatonin suppresses macrophage cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting p52 acetylation and binding. *Blood* 2006;108:518-524.
230. Galijasevic S, Abdulhamid I, Abu-Soud HM: Melatonin is a potent inhibitor for myeloperoxidase. *Biochemistry* 2008;47:2668-2677.

231. Kanter M, Uysal H, Karaca T, Sagmanligil HO: Depression of glucose levels and partial restoration of pancreatic β -cell damage by melatonin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch Toxicol* 2006;80:362-369.
232. Nishida S, Sato R, Murai I, Nakagawa S: Effect of pinealectomy on plasma levels of insulin and leptin and on hepatic lipids in type 2 diabetic rats. *J Pineal Res* 2003;35:251-256.
233. Nishida S, Segawa T, Murai I, Nakagawa S: Long-term melatonin administration reduces hyperinsulinemia and improves the altered fatty-acid compositions in type 2 diabetic rats via the restoration of Delta-5 desaturase activity. *J Pineal Res* 2002;32:26-33.
234. Mazepa RC, Cuevas MJ, Collado PS, Gonzalez-Gallego J: Melatonin increases muscle and liver glycogen content in nonexercised and exercised rats. *Life Sci* 2000;66:153-160.
235. Shieh JM, Wu HT, Cheng KC, Cheng JT: Melatonin ameliorates high fat diet-induced diabetes and stimulates glycogen synthesis via a PKC ζ -Akt-GSK3 β pathway in hepatic cells. *J Pineal Res* 2009;47:339-344.
236. Reyes Toso C, Rosón MI, Albornoz LE, Damiano PF, Linares LM, Cardinali DP: Vascular reactivity in diabetic rats: effect of melatonin. *Journal of Pineal Research* 2002;33:81-86.
237. Reyes Toso C, Linares LM, Ricci C, Arán M, Pinto JM, Rodríguez RR, Cardinali DP: Effect of melatonin on vascular reactivity in pancreatectomized rats. *Life Sciences* 2004;74:3085-3092.
238. Reyes Toso C, Ricci C, de Mignone IR, Reyes P, Linares LM, Albornoz LE, Cardinali DP, Zaninovich AA: In vitro effect of melatonin on oxygen consumption in liver mitochondria of rats. *Neuroendocrinology Letters* 2003;24:341-344.
239. Reyes-Toso CF, Rebagliati IR, Ricci CR, Linares LM, Albornoz LE, Cardinali DP, Zaninovich A: Effect of melatonin treatment on oxygen consumption by rat liver mitochondria. *Amino Acids* 2006; 31(3):299-302.
240. Tutuncu NB, Batur MK, Yildirim A, Tutuncu T, Deger A, Koray Z, Erbas B, Kabakci G, Aksoyek S, Erbas T: Melatonin levels decrease in type 2 diabetic patients with cardiac autonomic neuropathy. *J Pineal Res* 2005;39:43-49.
241. Peschke E, Stumpf I, Bazwinsky I, Litvak L, Dralle H, Muhlbauer E: Melatonin and type 2 diabetes - a possible link? *J Pineal Res* 2007;42:350-358.
242. Prokopenko I, Langenberg C, Florez JC, Saxena R, Soranzo N, Thorleifsson G, Loos RJ, Manning AK, Jackson AU, Aulchenko Y, Potter SC, Erdos MR, Sanna S, Hottenga JJ, Wheeler E, Kaakinen M, Lyssenko V, Chen WM, Ahmadi K, Beckmann JS, Bergman RN, Bochud M, Bonnycastle LL, Buchanan TA, Cao A, Cervino A, Coin L, Collins FS, Crisponi L, de Geus EJ, Dehghan A, Deloukas P, Doney AS, Elliott P, Freimer N, Gateva V, Herder C, Hofman A, Hughes TE, Hunt S, Illig T, Inouye M, Isomaa B, Johnson T, Kong A, Krestyaninova M, Kuusisto J, Laakso M, Lim N, Lindblad U, Lindgren CM, McCann OT, Mohlke KL, Morris AD, Naitza S, Orru M, Palmer CN, Pouta A, Randall J, Rathmann W, Saramies J, Scheet P, Scott LJ, Scuteri A, Sharp S, Sijbrands E, Smit JH, Song K, Steinthorsdottir V, Stringham HM, Tuomi T, Tuomilehto J, Uitterlinden AG, Voight BF, Waterworth D, Wichmann HE, Willemssen G, Witteman JC, Yuan X, Zhao JH, Zeggini E, Schlessinger D, Sandhu M, Boomsma DI, Uda M, Spector TD, Penninx BW, Altshuler D, Vollenweider P, Jarvelin MR, Lakatta E, Waeber G, Fox CS, Peltonen L, Groop LC, Mooser V, Cupples LA, Thorsteinsdottir U, Boehnke M, Barroso I, Van Duijn C, Dupuis J, Watanabe RM, Stefansson K, McCarthy MI, Wareham NJ, Meigs JB, Abecasis GR: Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels. *Nat Genet* 2009;41:77-81.
243. Dietrich K, Birkmeier S, Schleinitz D, Breitfeld J, Enigk B, Muller I, Bottcher Y, Lindner T, Stumvoll M, Tonjes A, Kovacs P: Association and evolutionary studies of the melatonin receptor 1B gene (MTNR1B) in the self-contained population of Sorbs from Germany. *Diabet Med* 2011; 28(11):1373-80.
244. Kim JY, Cheong HS, Park BL, Baik SH, Park S, Lee SW, Kim MH, Chung JH, Choi JS, Kim MY, Yang JH, Cho DH, Shin HD, Kim SH: Melatonin receptor 1 B polymorphisms associated with the risk of gestational diabetes mellitus. *BMC Med Genet* 2011;12:82

245. Sakotnik A, Liebmann PM, Stoschitzky K, Lercher P, Schauenstein K, Klein W, Eber B: Decreased melatonin synthesis in patients with coronary artery disease. *Eur Heart J* 1999;20:1314-1317.
246. Yaprak M, Altun A, Vardar A, Aktoz M, Ciftci S, Ozbay G: Decreased nocturnal synthesis of melatonin in patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol* 2003;89:103-107.
247. Girotti L, Lago M, Ianovsky O, Carbajales J, Elizari MV, Brusco LI, Cardinali DP: Low urinary 6-sulphatoxymelatonin levels in patients with coronary artery disease. *J Pineal Res* 2000;29:138-142.
248. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Garcia MJ, Sanchez J, Marrero F, Armas-Trujillo D: Decreased nocturnal melatonin levels during acute myocardial infarction. *J Pineal Res* 2002;33:248-252.
249. Scheer FA, Van Montfrans GA, Van Someren EJ, Mairuhu G, Buijs RM: Daily nighttime melatonin reduces blood pressure in male patients with essential hypertension. *Hypertension* 2004;43:192-197.
250. Cagnacci A, Cannoletta M, Renzi A, Baldassari F, Arangino S, Volpe A: Prolonged melatonin administration decreases nocturnal blood pressure in women. *Am J Hypertens* 2005;18:1614-1618.
251. Grossman E, Laudon M, Yalcin R, Zengil H, Peleg E, Sharabi Y, Kamari Y, Shen-Orr Z, Zisapel N: Melatonin reduces night blood pressure in patients with nocturnal hypertension. *Am J Med* 2006;119:898-902.
252. Cavallo A, Daniels SR, Dolan LM, Bean JA, Khoury JC: Blood pressure-lowering effect of melatonin in type 1 diabetes. *J Pineal Res* 2004;36:262-266.
253. Kozirog M, Poliwczak AR, Duchnowicz P, Koter-Michalak M, Sikora J, Broncel M: Melatonin treatment improves blood pressure, lipid profile, and parameters of oxidative stress in patients with metabolic syndrome. *J Pineal Res* 2011; 50(3):261-6.
254. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC: Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974;20:470-475.
255. Meiattini F, Prencipe L, Bardelli F, Giannini G, Tarli P: The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone chromogenic system used in the enzymic determination of serum cholesterol. *Clin Chem* 1978;24:2161-2165.
256. Grove TH: Effect of reagent pH on determination of high-density lipoprotein cholesterol by precipitation with sodium phosphotungstate-magnesium. *Clin Chem* 1979;25:560-564.
257. Burstein M, Scholnick HR, Morfin R: Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. *J Lipid Res* 1970;11:583-595.
258. Assmann G, Jabs HU, Kohnert U, Nolte W, Schriewer H: LDL-cholesterol determination in blood serum following precipitation of LDL with polyvinylsulfate. *Clin Chim Acta* 1984;140:77-83.
259. Bucolo G, David H: Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem* 1973;19:476-482.
260. Fossati P, Prencipe L: Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem* 1982;28:2077-2080.
261. Bartels H, Böhmer M: Micro-determination of creatinine. *Clin Chim Acta* 1971;32:81-85.
262. Fabiny DL, Ertingshausen G: Automated reaction-rate method for determination of serum creatinine with the CentrifiChem. *Clin Chem* 1971;17:696-700.
263. Fossati P, Prencipe L, Berti G: Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. *Clin Chem* 1980;26:227-231.
264. Chaney AL, Marbach EP: Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin Chem* 1962;8:130-132.
265. Searcy RL, Reardon JE, Foreman JA: A new photometric method for serum urea nitrogen determination. *Am J Med Technol* 1967;33:15-20.

266. Holownia P, Conway GS, Shrivastava U, Round J, Honour JW: A clinical evaluation of a direct radioimmunoassay of testosterone. *Clin Chim Acta* 1993;214:31-43.
267. Rios-Lugo MJ, Cano P, Jimenez-Ortega V, Fernández-Mateos MP, Scacchi PA, Cardinali DP, Esquifino AI: Melatonin effect on plasma adiponectin, leptin, insulin, glucose, triglycerides and cholesterol in normal and high fat-fed rats. *Journal of Pineal Research* 2010;49:342-348.
268. Panchal SK, Brown L: Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:351982
269. Michalakis K, Mintziori G, Kaprara A, Tarlatzis BC, Goulis DG: The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: A narrative review. *Metabolism* 2012 en prensa
270. Brown GC, Bal-Price A: Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Mol Neurobiol* 2003;27:325-355.
271. Tappy L, Le KA, Tran C, Paquot N: Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions. *Nutrition* 2010;26:1044-1049.
272. Tran LT, Yuen VG, McNeill JH: The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Mol Cell Biochem* 2009;332:145-159.
273. Roglans N, Sanguino E, Peris C, Alegret M, Vazquez M, Adzet T, Diaz C, Hernandez G, Laguna JC, Sanchez RM: Atorvastatin treatment induced peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression and decreased plasma nonesterified fatty acids and liver triglyceride in fructose-fed rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302:232-239.
274. Park J, Lemieux S, Lewis GF, Kuksis A, Steiner G: Chronic exogenous insulin and chronic carbohydrate supplementation increase de novo VLDL triglyceride fatty acid production in rats. *J Lipid Res* 1997;38:2529-2536.
275. Dai S, McNeill JH: Fructose-induced hypertension in rats is concentration- and duration-dependent. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1995;33:101-107.
276. Acuna CD, Lopez LC, Escames G, Lopez A, Garcia JA, Reiter RJ: Melatonin-mitochondria interplay in health and disease. *Curr Top Med Chem* 2011;11:221-240.
277. Srinivasan V, Spence DW, Pandi-Perumal SR, Brown GM, Cardinali DP: Melatonin in mitochondrial dysfunction and related disorders. *Int J Alzheimers Dis* 2011;2011:326320
278. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N: Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 2008;22:659-661.
279. Tan DX, Manchester LC, Fuentes-Broto L, Paredes SD, Reiter RJ: Significance and application of melatonin in the regulation of brown adipose tissue metabolism: relation to human obesity. *Obes Rev* 2011;12:167-188.
280. Leibowitz A, Peleg E, Sharabi Y, Shabtai Z, Shamiss A, Grossman E: The role of melatonin in the pathogenesis of hypertension in rats with metabolic syndrome. *Am J Hypertens* 2008;21:348-351.
281. Lemoine P, Wade AG, Katz A, Nir T, Zisapel N: Efficacy and safety of prolonged-release melatonin for insomnia in middle-aged and elderly patients with hypertension: a combined analysis of controlled clinical trials. *Integr Blood Press Control* 2012;5:9-17.
282. Cardinali DP, Srinivasan V, Brzezinski A, Brown GM: Melatonin and its analogs in insomnia and depression. *Journal of Pineal Research* 2012;52:365-375.
283. Yildiz M, Akdemir O: Assessment of the effects of physiological release of melatonin on arterial distensibility and blood pressure. *Cardiol Young* 2009;19:198-203.
284. Jin M, Yang F, Yang I, Yin Y, Luo JJ, Wang H, Yang XF: Uric acid, hyperuricemia and vascular diseases. *Front Biosci* 2012;17:656-669.
285. Scheer FA, Hilton MF, Mantzoros CS, Shea SA: Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:4453-4458.
286. Blanco M, Kriber N, Cardinali DP: Encuesta sobre dificultades del sueño en una población urbana latinoamericana. *Revista de Neurología* 2004;39:115-119.

287. National Sleep Foundation: Sleep in America Poll 2003. , Washington, DC, USA, National Sleep Foundation, 2003.
288. Hoevenaar-Blom MP, Spijkerman AM, Kromhout D, van den Berg JF, Verschuren WM: Sleep duration and sleep quality in relation to 12-year cardiovascular disease incidence: the MORGEN study. *Sleep* 2011;34:1487-1492.
289. Hoevenaar-Blom MP, Wendel-Vos GC, Spijkerman AM, Kromhout D, Verschuren WM: Cycling and sports, but not walking, are associated with 10-year cardiovascular disease incidence: the MORGEN Study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2011;18:41-47.
290. Alonso-Vale MI, Peres SB, Vernochet C, Farmer SR, Lima FB: Adipocyte differentiation is inhibited by melatonin through the regulation of C/EBP β transcriptional activity. *J Pineal Res* 2009;47:221-227.
291. Alonso-Vale MI, Andreotti S, Peres SB, Anhe GF, das NB-S, Neto JC, Lima FB: Melatonin enhances leptin expression by rat adipocytes in the presence of insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;288:E805-E812
292. Alonso-Vale MI, Andreotti S, Mukai PY, Borges-Silva CN, Peres SB, Cipolla-Neto J, Lima FB: Melatonin and the circadian entrainment of metabolic and hormonal activities in primary isolated adipocytes. *J Pineal Res* 2008;45:422-429.
293. Baltaci AK, Mogulkoc R: Pinealectomy and melatonin administration in rats: their effects on plasma leptin levels and relationship with zinc. *Acta Biol Hung* 2007;58:335-343.
294. Celinski K, Konturek PC, Slomka M, Cichoz-Lach H, Gonciarz M, Bielanski W, Reiter RJ, Konturek SJ: Altered basal and postprandial plasma melatonin, gastrin, ghrelin, leptin and insulin in patients with liver cirrhosis and portal hypertension without and with oral administration of melatonin or tryptophan. *J Pineal Res* 2009;46:408-414.
295. Mustonen AM, Nieminen P, Hyvarinen H, Asikainen J: Exogenous melatonin elevates the plasma leptin and thyroxine concentrations of the mink (*Mustela vison*). *Z Naturforsch C* 2000;55:806-813.
296. Mustonen AM, Nieminen P, Hyvarinen H: Preliminary evidence that pharmacologic melatonin treatment decreases rat ghrelin levels. *Endocrine* 2001;16:43-46.
297. Song YM, Chen MD: Effects of melatonin administration on plasma leptin concentration and adipose tissue leptin secretion in mice. *Acta Biol Hung* 2009;60:399-407.
298. Baydas G, Gursu F, Canpolat S, Konar V, Yasar A, Canatan H, Kelestimur H: Effects of pinealectomy on the circadian release pattern of leptin in male rat. *Neuro Endocrinol Lett* 2001;22:449-452.
299. Canpolat S, Sandal S, Yilmaz B, Yasar A, Kutlu S, Baydas G, Kelestimur H: Effects of pinealectomy and exogenous melatonin on serum leptin levels in male rat. *Eur J Pharmacol* 2001;428:145-148.
300. Kus I, Sarsilmaz M, Colakoglu N, Kukne A, Ozen OA, Yilmaz B, Kelestimur H: Pinealectomy increases and exogenous melatonin decreases leptin production in rat anterior pituitary cells: an immunohistochemical study. *Physiol Res* 2004;53:403-408.
301. Korhonen T, Mustonen AM, Nieminen P, Saarela S: Effects of cold exposure, exogenous melatonin and short-day treatment on the weight-regulation and body temperature of the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Regul Pept* 2008;149:60-66.
302. Nishida S, Segawa T, Murai I, Nakagawa S: Long-term melatonin administration reduces hyperinsulinemia and improves the altered fatty-acid compositions in type 2 diabetic rats via the restoration of Delta-5 desaturase activity. *J Pineal Res* 2002;32:26-33.
303. Nishida S, Sato R, Murai I, Nakagawa S: Effect of pinealectomy on plasma levels of insulin and leptin and on hepatic lipids in type 2 diabetic rats. *J Pineal Res* 2003;35:251-256.
304. Prunet-Marcassus B, Desbazeille M, Bros A, Louche K, Delagrangé P, Renard P, Casteilla L, Penicaud L: Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity. *Endocrinology* 2003;144:5347-5352.
305. Puchalski SS, Green JN, Rasmussen DD: Melatonin effects on metabolism independent of gonad function. *Endocrine* 2003;21:169-173.

306. Puchalski SS, Green JN, Rasmussen DD: Melatonin effect on rat body weight regulation in response to high-fat diet at middle age. *Endocrine* 2003;21:163-167.
307. Rasmussen DD, Mitton DR, Larsen SA, Yellon SM: Aging-dependent changes in the effect of daily melatonin supplementation on rat metabolic and behavioral responses. *J Pineal Res* 2001;31:89-94.
308. Wolden-Hanson T, Mitton DR, McCants RL, Yellon SM, Wilkinson CW, Matsumoto AM, Rasmussen DD: Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. *Endocrinology* 2000;141:487-497.
309. Buff PR, Morrison CD, Ganjam VK, Keisler DH: Effects of short-term feed deprivation and melatonin implants on circadian patterns of leptin in the horse. *J Anim Sci* 2005;83:1023-1032.
310. Cagnacci A, Malmusi S, Zanni A, Arangino S, Cagnacci P, Volpe A: Acute modifications in the levels of daytime melatonin do not influence leptin in postmenopausal women. *J Pineal Res* 2002;33:57-60.
311. Sanchez-Mateos S, Alonso-Gonzalez C, Gonzalez A, Martinez-Campa CM, Mediavilla MD, Cos S, Sanchez-Barcelo EJ: Melatonin and estradiol effects on food intake, body weight, and leptin in ovariectomized rats. *Maturitas* 2007;58:91-101.
312. Rasmussen DD, Boldt BM, Wilkinson CW, Yellon SM, Matsumoto AM: Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. *Endocrinology* 1999;140:1009-1012.
313. Esquifino A, Agrasal C, Velazquez E, Villanua MA, Cardinali DP: Effect of melatonin on serum cholesterol and phospholipid levels, and on prolactin, thyroid-stimulating hormone and thyroid hormone levels, in hyperprolactinemic rats. *Life Sci* 1997;61:1051-1058.
314. Bojkova B, Orendas P, Friedmanova L, Kassayova M, Datelinka I, Ahlersova E, Ahlers I: Prolonged melatonin administration in 6-month-old Sprague-Dawley rats: metabolic alterations. *Acta Physiol Hung* 2008;95:65-76.
315. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Paredes SD, Mayo JC, Sainz RM: Melatonin and Reproduction revisited. *Biol Reprod* 2009; 81(3):445-56.
316. Wade AG, Ford I, Crawford G, McConnachie A, Nir T, Laudon M, Zisapel N: Nightly treatment of primary insomnia with prolonged release melatonin for 6 months: a randomized placebo controlled trial on age and endogenous melatonin as predictors of efficacy and safety. *BMC Med* 2010;8:51
317. Athyros VG, Tziomalos K, Karagiannis A, Anagnostis P, Mikhailidis DP: Should adipokines be considered in the choice of the treatment of obesity-related health problems? *Curr Drug Targets* 2010;11:122-135.
318. Sartori C, Dessen P, Mathieu C, Monney A, Bloch J, Nicod P, Scherrer U, Duplain H: Melatonin improves glucose homeostasis and endothelial vascular function in high-fat diet-fed insulin-resistant mice. *Endocrinology* 2009;150:5311-5317.
319. Hussein MR, Ahmed OG, Hassan AF, Ahmed MA: Intake of melatonin is associated with amelioration of physiological changes, both metabolic and morphological pathologies associated with obesity: an animal model. *Int J Exp Pathol* 2007;88:19-29.
320. Gnacinska M, Malgorzewicz S, Stojek M, Lysiak-Szydlowska W, Sworczak K: Role of adipokines in complications related to obesity: a review. *Adv Med Sci* 2009;54:150-157.
321. Naderali EK, Estadella D, Rocha M, Pickavance LC, Fatani S, Denis RG, Williams G: A fat-enriched, glucose-enriched diet markedly attenuates adiponectin mRNA levels in rat epididymal adipose tissue. *Clin Sci (Lond)* 2003;105:403-408.
322. Wilson SJ, Nutt DJ, Alford C, Argyropoulos SV, Baldwin DS, Bateson AN, Britton TC, Crowe C, Dijk DJ, Espie CA, Gringras P, Hajak G, Idzikowski C, Krystal AD, Nash JR, Selsick H, Sharples AL, Wade AG: British Association for Psychopharmacology consensus

- statement on evidence-based treatment of insomnia, parasomnias and circadian rhythm disorders. *J Psychopharmacol* 2010;24:1577-1601.
323. Srinivasan V, Singh J, Pandi-Perumal SR, Brown GM, Cardinali DP: Jet lag, circadian rhythm sleep disturbances and depression: the role of melatonin and its analogs. *Advances in Therapy* 2010;27:798-813.
 324. Arendt J, Deacon S: Treatment of circadian rhythm disorders--melatonin. *Chronobiol Int* 1997;14:185-204.
 325. Miyamoto M: Pharmacology of ramelteon, a selective MT₁/MT₂ receptor agonist: a novel therapeutic drug for sleep disorders. *CNS Neurosci Ther* 2009;15:32-51.
 326. Cardinali DP, Pandi-Perumal SR, Brown GM: Sleep and circadian dysregulation in depressive illness. Pharmacological implications. *Clinical Neuropsychiatry* 2011;8:321-338.
 327. Rajaratnam SM, Polymeropoulos MH, Fisher DM, Roth T, Scott C, Birznieks G, Klerman EB: Melatonin agonist tasimelteon (VEC-162) for transient insomnia after sleep-time shift: two randomised controlled multicentre trials. *Lancet* 2009;373:482-491.
 328. Mulchahey JJ, Goldwater DR, Zemlan FP: A single blind, placebo controlled, across groups dose escalation study of the safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of the melatonin analog β -methyl-6-chloromelatonin. *Life Sci* 2004;75:1843-1856.
 329. Weishaupt JH, Bartels C, Polking E, Dietrich J, Rohde G, Poeggeler B, Mertens N, Sperling S, Bohn M, Huther G, Schneider A, Bach A, Siren AL, Hardeland R, Bahr M, Nave KA, Ehrenreich H: Reduced oxidative damage in ALS by high-dose enteral melatonin treatment. *J Pineal Res* 2006;41:313-323.
 330. Chahbouni M, Escames G, Venegas C, Sevilla B, Garcia JA, Lopez LC, Munoz-Hoyos A, Molina-Carballo A, Acuna-Castroviejo D: Melatonin treatment normalizes plasma pro-inflammatory cytokines and nitrosative/oxidative stress in patients suffering from Duchenne muscular dystrophy. *J Pineal Res* 2010;48:282-289.
 331. Lieberman HR, Waldhauser F, Garfield G, Lynch HJ, Wurtman RJ: Effects of melatonin on human mood and performance. *Brain Res* 1984;323:201-207.
 332. Voordouw BC, Euser R, Verdonk RE, Alberda BT, de Jong FH, Drogendijk AC, Fauser BC, Cohen M: Melatonin and melatonin-progestin combinations alter pituitary-ovarian function in women and can inhibit ovulation. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:108-117.
 333. Nickkholgh A, Schneider H, Sobirey M, Venetz WP, Hinz U, Pelzl IH, Gotthardt DN, Cekauskas A, Manikas M, Mikalauskas S, Mikalauskene L, Bruns H, Zorn M, Weigand MA, Buchler MW, Schemmer P: The use of high-dose melatonin in liver resection is safe: first clinical experience. *J Pineal Res* 2011;50:381-388.
 334. Jou MJ, Peng TI, Hsu LF, Jou SB, Reiter RJ, Yang CM, Chiao CC, Lin YF, Chen CC: Visualization of melatonin's multiple mitochondrial levels of protection against mitochondrial Ca²⁺-mediated permeability transition and beyond in rat brain astrocytes. *J Pineal Res* 2010;48:20-38.
 335. Jou MJ: Melatonin preserves the transient mitochondrial permeability transition for protection during mitochondrial Ca²⁺ stress in astrocyte. *J Pineal Res* 2011;50:427-435.
 336. Peng TI, Hsiao CW, Reiter RJ, Tanaka M, Lai YK, Jou MJ: mtDNA T8993G mutation-induced mitochondrial complex V inhibition augments cardiolipin-dependent alterations in mitochondrial dynamics during oxidative, Ca²⁺, and lipid insults in NARP cybrids: a potential therapeutic target for melatonin. *J Pineal Res* 2012;52:93-106.