





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**Efecto de la melatonina sobre el daño miocárdico en ratones  
tratados con isoproterenol**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIOL. BETZABÉ NIETO LIMA**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. AGUSTINA CANO MARTÍNEZ  
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: DRA. GERTRUDIS HORTENSIA GONZÁLEZ GÓMEZ  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DR. MANUEL MIRANDA ANAYA  
FACULTAD DE CIENCIAS

MÉXICO, D.F. MAYO, 2013



**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted, que el Subcomité de (Biología Experimental y Biomedicina), en su sesión ordinaria del día 11 de marzo de 2013, aprobó el jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **NIETO LIMA BETZABÉ** con número de cuenta **404025218**, con la tesis titulada **"EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE EL DAÑO MIOCÁRDICO EN RATONES TRATADOS CON ISOPROTERENOL"**, bajo la dirección de la DRA. **AGUSTINA CANO MARTÍNEZ**:

Presidente: DRA. GLORIA ACACIA BENITEZ KING  
Vocal: DRA. GERTRUDIS HORTENSIA GONZÁLEZ GÓMEZ  
Secretario: DRA. KARLA GUADALUPE CARVAJAL AGUILERA  
Suplente: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI  
Suplente: DR. MANUEL MIRANDA ANAYA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 02 de mayo de 2013

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA**

# Agradecimientos

## INSTITUCIONES

- ✘ Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por brindarme la oportunidad de continuar con mi formación académica.
- ✘ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero para realizar este trabajo (255108 a BNL; 169736 a CMA).
- ✘ Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por la beca otorgada para asistir al congreso internacional 17th WORLD CONGRESS ON HEART DISEASE
- ✘ Al Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez”, lugar donde realicé mi tesis de maestría, la cual es parte de los proyectos “Daño miocárdico con isoproterenol y efecto dosis-respuesta sobre frecuencia de micronúcleos y lipoperoxidación en ratones” (Clave Institucional INCICH: 10-695) y “potencial cardiogénico de las células hematopoyéticas murinas cultivadas con cardioesferas provenientes de corazón de ratón pre-, post-natal y adulto.” (Clave Institucional INCICH: 12-756, clave CONACyT: 169736).

## MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

- ✘ A mi tutora, la Dra. Agustina Cano Martínez, por todo su apoyo, comprensión y tolerancia, así como por sus comentarios y ánimos que me han permitido crecer tanto personal como profesionalmente.
- ✘ A la Dra. Gertrudis Hortensia González Gómez y al Dr. Manuel Miranda Anaya por el tiempo y apoyo que me han brindado, pero principalmente por sus comentarios que ayudaron a complementar el presente trabajo.

A mis padres, quienes me dieron la vida, me apoyaron y me proporcionaron las herramientas necesarias para continuar por mi misma en esta vida. Por su tolerancia y su sabiduría. Gracias por estar siempre a mi lado y alentarme a no darme por vencida, sin importar que tan difícil fueran las circunstancias.

A mis amigos y a todos mis compañeros de los institutos en los que he trabajado, por su apoyo durante este tiempo y por todos aquellos momentos agradables que me proporcionaron.

A mi hermana, quien toleró mis momentos de locura, porque sin ti, mi vida y mis actitudes hubieran sido totalmente diferente.

# ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

## 1. ANTECEDENTES TEÓRICOS.

1.1. Daño Miocárdico. ....	1
<u>1.1.1. Inducción de daño miocárdico con Isoproterenol.</u> .....	4
<u>1.1.2. Mecanismos de acción del isoproterenol.</u> .....	5
1.2. Melatonina: Características y metabolismo. ....	8
<u>1.2.1. Mecanismos de acción y función de la melatonina.</u> ....	11
<u>1.2.2. Melatonina y el sistema cardiovascular.</u> .....	13

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. .... 15

## 3. HIPÓTESIS. .... 15

## 4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general.....	16
4.2. Objetivos particulares. ....	16

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 Animales. ....	16
5.2. Inducción de daño miocárdico. ....	16
5.3. Tratamientos con melatonina, N-acetilcisteína o aspirina. ....	17
5.4. Evaluación de hipertrofia ventricular. ....	17
5.5. Procesamiento del tejido. ....	18
5.6. Evaluación tisular de daño miocárdico. ....	19
<u>5.6.1. Fibras de colágena.</u> ....	20
<u>5.6.2 Infiltrados celulares.</u> ....	21
5.7. Evaluación de estrés oxidante por nitrotirosina. ....	23
5.8. Estadística. ....	25

## 6. RESULTADOS.

6.1. Daño miocárdico: Efecto de la melatonina.	
<u>6.1.1. Melatonina e hipertrofia ventricular.</u> ....	26
<u>6.1.2. Melatonina y fibras de colágena.</u> ....	27
<u>6.1.3. Melatonina e infiltrados celulares.</u> ....	30
<u>6.1.4. Melatonina y nitrotirosina.</u> ....	31
6.2. Daño miocárdico: Efecto de la N-acetilcisteína y la aspirina. ....	34
<u>6.2.1. N-acetilcisteína, aspirina e hipertrofia ventricular.</u> ....	34
<u>6.2.2. N-acetilcisteína, aspirina y fibras de colágena.</u> ....	35
<u>6.2.3. N-acetilcisteína, aspirina e infiltrados celulares.</u> ....	36

**6.2.4. N-acetilcisteina, aspirina y nitrotirosina..... 37**

**7. DISCUSIÓN.**

**7.1. Daño miocárdico: Efecto de la melatonina..... 38**

**7.1.1 Melatonina e hipertrofia ventricular. .... 38**

**7.1.2. Melatonina y fibras de colágeno..... 39**

**7.1.3. Melatonina e infiltrados celulares. .... 41**

**7.1.4. Melatonina y estrés oxidante. .... 42**

**7.2. Daño miocárdico: Efecto de la N-acetilcisteina y la aspirina ..... 43**

**7.2.1. N-acetilcisteina, aspirina e hipertrofia ventricular ..... 43**

**7.2.2. N-acetilcisteina, aspirina y fibras de colágeno..... 45**

**7.2.3. N-acetilcisteina, aspirina, estrés oxidante e infiltrados celulares ..... 46**

**8. CONCLUSIÓN ..... 51**

**9. REFERENCIAS..... 51**

## FIGURAS Y TABLAS

Fig. 1. Daño y remodelación cardiaca .....	2
Fig. 2. Inducción de daño miocárdico con isoproterenol vía receptores $\beta$ -AR. ....	6
Fig. 3. Síntesis de la melatonina a partir del aminoácido triptófano. ....	9
Fig. 4. Mecanismos de acción y principales acciones de la melatonina. ....	11
Fig.5. Cortes longitudinales de corazón .....	19
Fig. 6. Cuantificación de las fibras de colágena en los cortes longitudinales de corazón de ratón. ....	21
Fig. 7. Localización de los infiltrados celulares en los cortes longitudinales de corazón de ratón. ....	22
Fig. 8. Nitrotirosina como indicador de estrés oxidante. ....	23
Fig. 9. Cuantificación del área positiva a nitrotirosina (3-NT) en cortes longitudinales de corazón de ratón. ....	25
Fig. 10. Efecto de la melatonina sobre la relación peso ventricular/peso corporal. ....	26
Fig. 11. Distribución de las fibras de colágena a lo largo del corazón. ....	27
Fig. 12. Efecto de la melatonina sobre el porcentaje de fibras de colágena. ....	30
Fig. 13. Efecto de la melatonina sobre los infiltrados celulares. ....	31
Fig. 14. Efecto de la melatonina sobre la proporción de área positiva a nitrotirosina. ....	32
Fig. 15. Panel comparativo entre los grupos control, SS/ISO, MEL/SS y MEL/ISO. ....	33
Fig. 16. Efecto de un antioxidante y un antiinflamatorio en comparación con la melatonina sobre la relación peso ventricular/peso corporal. ....	34
Fig. 17. Efecto de un antioxidante y un antiinflamatorio en comparación con la melatonina sobre las fibras de colágena. ....	35

<b>Fig. 18. Efecto de un antioxidante y un antiinflamatorio en comparación con la melatonina sobre los infiltrados celulares. ....</b>	<b>36</b>
<b>Fig. 19. Efecto de un antioxidante y un antiinflamatorio en comparación con la melatonina sobre el porcentaje de área positiva a 3-NT. ....</b>	<b>37</b>
<b>Fig. 20. Efecto de la melatonina sobre el daño miocárdico inducido con administraciones repetidas de isoproterenol.....</b>	<b>48</b>
<b>Tabla 1. Detalles de los tratamientos. ....</b>	<b>18</b>

## **Efecto de la melatonina sobre el daño miocárdico en ratones tratados con isoproterenol**

**Resumen.** Posterior al daño miocárdico, se inicia la remodelación cardiaca, que junto con eventos posteriores de daño, puede ocasionar insuficiencia cardiaca y la muerte. La melatonina (MEL) es una indolamina considerada como hormona, vitamina, antioxidante, inmunomodulador y como potencial cardioprotector. El propósito del presente trabajo fue conocer el efecto del pre-co-tratamiento con MEL sobre los cambios estructurales, la respuesta inflamatoria general y el estrés oxidante asociados al daño miocárdico inducido con administraciones repetidas de isoproterenol (ISO) en ratón. Así como del pre-co-tratamiento con N-acetilcisteína (NAC), un precursor del glutatión en su forma reducida (GSH), y aspirina (ASA), un antiinflamatorio. Se administró MEL (5  $\mu\text{g/g/día}$ ), NAC (150  $\mu\text{g/g/día}$ ) o ASA (50  $\mu\text{g/g/día}$ ) durante 3 días, seguido de su coadministración con ISO (5  $\mu\text{g/g/día}$ , 7 días). Se evaluó hipertrofia ventricular (HV), fibras de colágena (FC), infiltrados celulares (IC) y nitrotirosina (3-NT). El pre-co-tratamiento con MEL no modificó el efecto del ISO sobre la HV, mientras que la proporción de FC ( $75.50 \pm 0.47\%$ ), IC ( $61.87 \pm 2.45\%$ ) y 3-NT ( $75.50 \pm 0.70\%$ ) resultó menor a las del grupo tratado solo con ISO, respectivamente. Al igual que la MEL, ninguno de los pre-co-tratamientos con NAC o ASA revirtió la HV. Los demás parámetros presentaron niveles equiparables a los obtenidos con el pre-co-tratamiento con MEL, excepto en la proporción de FC, que fue más alta con la ASA respecto a MEL y NAC. Nuestros resultados indican que la MEL tiene un efecto cardioprotector ante las administraciones repetidas de ISO en ratón al intervenir en tres procesos asociados al daño miocárdico: fibrosis, inflamación y el daño a proteínas por el estrés oxidante/nitrosante. Los resultados con MEL y NAC sugieren que el mecanismo responsable de la cardioprotección está relacionado con sus propiedades antioxidantes, probablemente al aumentar la síntesis de GSH.

## Effect of melatonin on the heart damage of mice treated with isoproterenol

**Abstract.** When cardiac muscle is damaged, a process of cardiac remodeling begins, which, along with following events of damage, can lead to a heart failure and the death. Melatonin (MEL) is an indolamine considered as a hormone, a vitamine, an immunomodulator, and is proposed as a cardioprotector. The aim of this study was to evaluate the effect of the pre-co-treatment with MEL on structural changes, general inflammatory response and oxidative stress associated to heart damage induced by repetitive administration of isoproterenol (ISO) in mice. As well as the effects of pre-co-treatment with N-acetylcysteine (NAC), a glutathione (GSH) precursor, and aspirin (ASA), an antiinflammatory. MEL (5 µg/g/day), NAC (150 µg/g/day) or ASA (50 µg/g/day) were given for 3 days, followed by its coadministration with ISO (5 µg/g/day, 7 days). Ventricular hypertrophy (VH), collagen fibers (CF), cell infiltrates (CI) and nitrotyrosine (3-NT) were evaluated. Pre-co-treatment with MEL did not modify the effect of ISO on VH, meanwhile CF (75.50±0.47%), CI (61.87±2.45%) and 3-NT (75.50±0.70%) were lower to those of the group treated only with ISO, respectively. As MEL, none of the pre-co-treatments with NAC or ASA reversed HV. Except for the CF, the other parameters showed similar values to those observed with the pre-co-treatment with the MEL. The proportion of CF was higher with ASA, than with MEL or NAC. Our results show that MEL behaves as a cardioprotector against the repetitive administrations of ISO in mice. It modifies at least three processes associated to heart damage: fibrosis, inflammation and damage to proteins due to oxidative/nitrosative stress. Our results with MEL and NAC suggest that the mechanism responsible of the cardioprotection with MEL is related to its antioxidant properties, probably by increasing GSH synthesis.

# **Efecto de la melatonina sobre el daño miocárdico en ratones tratados con isoproterenol**

## **1. ANTECEDENTES TEÓRICOS.**

### **1.1. Daño Miocárdico.**

El sistema cardiovascular realiza sus funciones de manera controlada mediante la regulación local y sistémica (nerviosa y endócrina) de dos componentes generales: el corazón y los vasos sanguíneos. El corazón tiene la función de bombear la sangre con la fuerza y la frecuencia necesaria para irrigar de manera adecuada a los órganos y los tejidos acorde a sus demandas metabólicas. En tanto que, a través de la red de vasos se provee a los tejidos y las células, incluidas las del propio corazón, niveles apropiados de nutrientes, gases respiratorios (p. ej. oxígeno), hormonas y metabolitos (Klaassen y Watkins, 2005). Sin embargo, cuando el flujo sanguíneo hacia el corazón disminuye o el aporte de oxígeno no corresponde con la demanda por parte de las células miocárdicas, entonces se induce un daño progresivo; el cual puede ir desde una isquemia hasta un infarto (de Micheli y Chávez, 2003). Como consecuencia del daño se producen alteraciones estructurales, metabólicas, y eléctricas relacionadas con el proceso de remodelación cardíaca (Frangogiannis, 2008; Heineke y Molkentin, 2006; Zornoff y cols., 2007), las cuales eventualmente pueden llevar a una insuficiencia cardíaca y a la falla de otros órganos (Fig. 1).

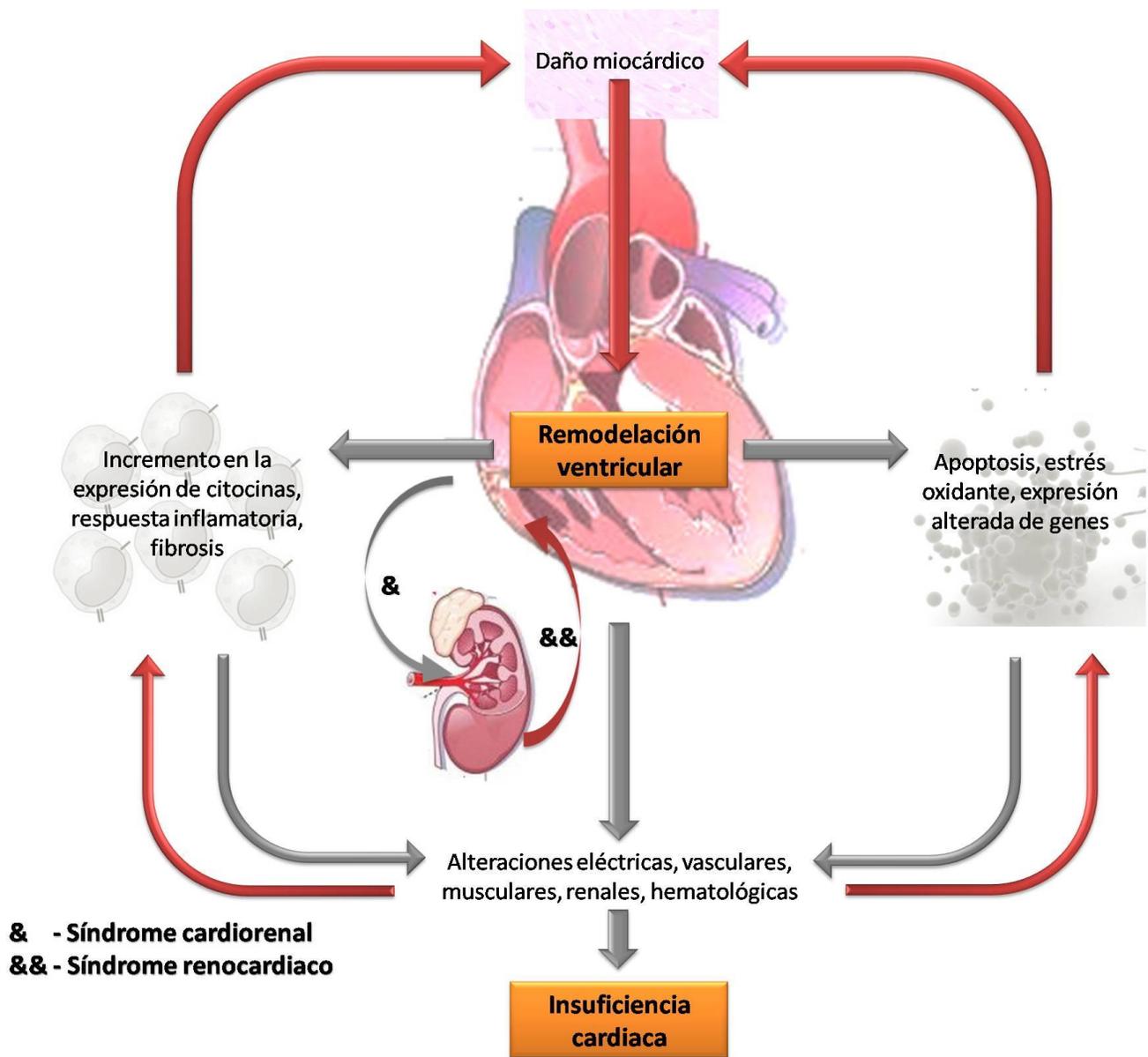


Fig. 1. Daño y remodelación cardíaca. Como consecuencia del daño al tejido cardíaco se presenta un proceso de remodelación cardíaca, caracterizado por cambios en la estructura, función y metabolismo del corazón. Estos cambios, a largo plazo, generan alteraciones en otros órganos, lo que genera más estrés y daño al corazón. Eventualmente se termina con una insuficiencia cardíaca y, potencialmente, la muerte del organismo.

Respecto a las alteraciones estructurales, se presentan cambios en la geometría del ventrículo, como son desarrollo de hipertrofia ventricular (Ennis y col., 2003; Rosa y col., 2005; Zhang y col., 2008), deterioro de la contractilidad del tejido, y llenado inadecuado de las

cámaras. De la misma manera, hay cambios en su composición, ya que hay una acumulación de las fibras de colágena en el tejido producto de la estimulación de fibroblastos, el aumento de la síntesis de colágena y la disminución de su degradación (Diez y cols., 2001). Adicionalmente se presentan células de la respuesta inmune, debido a la activación de una respuesta inflamatoria local de fase aguda que tiende a generalizarse con la acumulación de células polimorfonucleares y macrófagos en el lugar de la lesión miocárdica, junto con la activación de citocinas pro y antiinflamatorias (Bodi y cols., 2008; Frangogiannis, 2008; Ren y cols., 2003).

Además de esta respuesta inflamatoria, se genera un estado de estrés oxidante que daña tanto a las proteínas celulares como a la membrana, lo que altera la función cardíaca, y eventualmente provoca la muerte del tejido. El estrés oxidante también puede influir sobre el remodelado de la matriz extracelular. Todos estos efectos dependen de las concentraciones de especies reactivas de oxígeno, de su ubicación y, en general, del balance pro-/anti-oxidante de la célula (Byrne y cols., 2003).

La búsqueda de los cambios asociados al daño miocárdico, se ha facilitado con el uso de modelos animales. Entre los mecanismos empleados para generar las lesiones miocárdicas se encuentran principalmente los quirúrgicos (Fabritz y cols., 2004; Sakaguchi y cols., 2003; Wang y cols., 2006), y los farmacológicos (Buermans y cols., 2006; Díaz-Muñoz y cols., 2006; Zhu y cols., 2008), y con menor frecuencia las criolesiones (Jensen y cols., 1987). Otra opción para estudiar el daño miocárdico es el empleo de animales modificados genéticamente o los que presentan alteraciones cardiovasculares de manera natural (Babu y Periasamy, 2005; Dillmann, 1999; Gallegos y cols., 2004; Shiomi y cols., 2003; Van Vleet y Ferrans, 1986). Entre los métodos quirúrgicos y los farmacológicos, los primeros tienen la desventaja de ser invasivos, lo que aumenta el índice de mortalidad como producto de la cirugía y no del tratamiento, además de que su empleo en especies pequeñas requiere de equipamiento más especializado y son poco útiles para las evaluaciones de daño crónico (Klocke y cols., 2007; Muders y Elsner, 2000). Por el contrario, el uso de métodos farmacológicos en el animal

íntegro disminuye el índice de mortalidad (Balazs y Ferrans, 1978; Klaassen y Watkins, 2005). Algunos de los agentes cardiotoxicos que se han empleado son la doxorubicina (DOX) (Astra y cols., 2003; Delgado y cols., 2004; Dodd y cols., 1993; Zhu y cols., 2008), la monocrotalina (Buermans y cols., 2006; Dalla y cols., 2005), el carazolol (Petzold y cols., 1999), el veneno de abeja africanizada (Ferreira y cols., 1995) y el isoproterenol (ISO) (Benjamin y cols., 1989; Díaz-Muñoz y cols., 2006; Kahn y cols., 1969; Kung y Blau, 1978; Noronha-Dutra y cols., 1984; Pinelli y cols., 2004; Rona y cols., 1949; Rona y cols., 1959; Saroff y Wexler, 1970; Wexler y Kittinger, 1963).

### **1.1.1. Inducción de daño miocárdico con Isoproterenol.**

El isoproterenol o isoprenalina es una catecolamina simpaticomimética que presenta una estructura química similar a la adrenalina, la cual actúa casi exclusivamente en los receptores  $\beta$ -adrenérgicos del corazón, del músculo bronquial, del músculo esquelético y del tracto alimentario (SAOB, 2006), y genera lesiones semejantes a las producidas por un infarto al miocardio o un proceso isquémico.

Los primeros reportes que dan a conocer la inducción de necrosis en miocardio con el isoproterenol son los de Rona y cols. (1959) y Kahn y cols. (1969). Estudios posteriores pusieron en evidencia los efectos del isoproterenol relacionados al daño miocárdico. Díaz-Muñoz y cols. (2006) clasificaron en 3 etapas la lesión generada por la administración de isoproterenol (67 mg/kg, s.c., 1 administración) en ratas: el preinfarto (las primeras 12 horas después de la administración de isoproterenol), el infarto (12-24 horas posteriores a la administración), y el postinfarto (24 horas en adelante). Algunos de los efectos observados con la administración de este fármaco incluyen cambios en la frecuencia cardiaca (Rona y cols., 1959), la presión arterial (Rona y cols., 1959), el suplemento de oxígeno en el tejido y disnea. A nivel histológico, se observan alteraciones en el arreglo de las fibras miocárdicas (Kahn y cols., 1969; Pinelli y cols., 2004), necrosis focal (Benjamin y cols., 1989; Kahn y cols.,

1969; Kung y Blau, 1978, Kahn y cols., 1969; Pinelli y cols., 2004; Saroff y Wexler, 1970), proliferación de fibroblastos (Kahn y cols., 1969), acumulación de tejido conectivo (Benjamin y cols., 1989), inflamación extensiva e infiltración de leucocitos polimorfonucleares (Kahn y cols., 1969; Noronha-Dutra y cols., 1984). A nivel bioquímico se ha demostrado la presencia de enzimas marcadoras de un infarto como la lactato deshidrogenasa (Wexler y Kittinger, 1963), la mioglobina (Pinelli y cols., 2004) y la troponina cardíaca I (Pinelli y cols., 2004).

### **1.1.2. Mecanismos de acción del isoproterenol.**

Los mecanismos sugeridos mediante los cuales el isoproterenol genera una lesión cardíaca incluyen la activación de receptores beta adrenérgicos, principalmente los  $\beta_1$  y los  $\beta_2$  (Balazs y Ferrans, 1978; Brum y cols., 2006; Cano-Martínez, y cols., 2004; El-Demerdash y cols., 2005; Xiao y cols., 2004) o la vía del estrés oxidante (Díaz-Muñoz y cols., 2006; Eisenhofer y cols., 2004; El-Demerdash y cols., 2005; Gauthaman y cols., 2006; Persoon-Rothert y cols., 1989; Rathore y cols., 1998; Zhang y cols., 2005), sin descartar la posibilidad de que no sean mutuamente excluyentes.

Los receptores  $\beta$ -adrenérgicos son receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y se han localizado principalmente en el corazón, pero también se pueden encontrar en menor medida en el pulmón y en el tejido adiposo (Sanz-Rosa, 2011). Se conocen diferentes subtipos de receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta$ -AR):  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ . Los  $\beta_1$  y los  $\beta_2$  son los mejor caracterizados y se encuentran en una relación 3:1 en el corazón de los mamíferos (Dent y cols., 2008; Xiao y cols., 2006). Dentro del corazón, los  $\beta_2$  se localizan principalmente en las células endoteliales, los fibroblastos y las células del músculo liso (Dent y cols., 2008). Su estimulación activa la vía de señalización de la adenilciclase, en la cual se forma AMPc a partir de ATP. El incremento en AMPc activa a la PKA, lo que lleva a la fosforilación de los canales de calcio en la membrana celular permitiendo la entrada de calcio a la célula. Esto a su vez activa la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico al citoplasma, incrementando la contracción celular (Fig. 2).

Igualmente se conoce que la activación de proteínas Gs usualmente incrementa la frecuencia cardiaca (Xiao y cols., 2006). Este aumento implica una mayor demanda de oxígeno, la cual eventualmente no puede ser aportada, lo que provoca hipoxia, que a la vez puede conducir al daño del tejido.

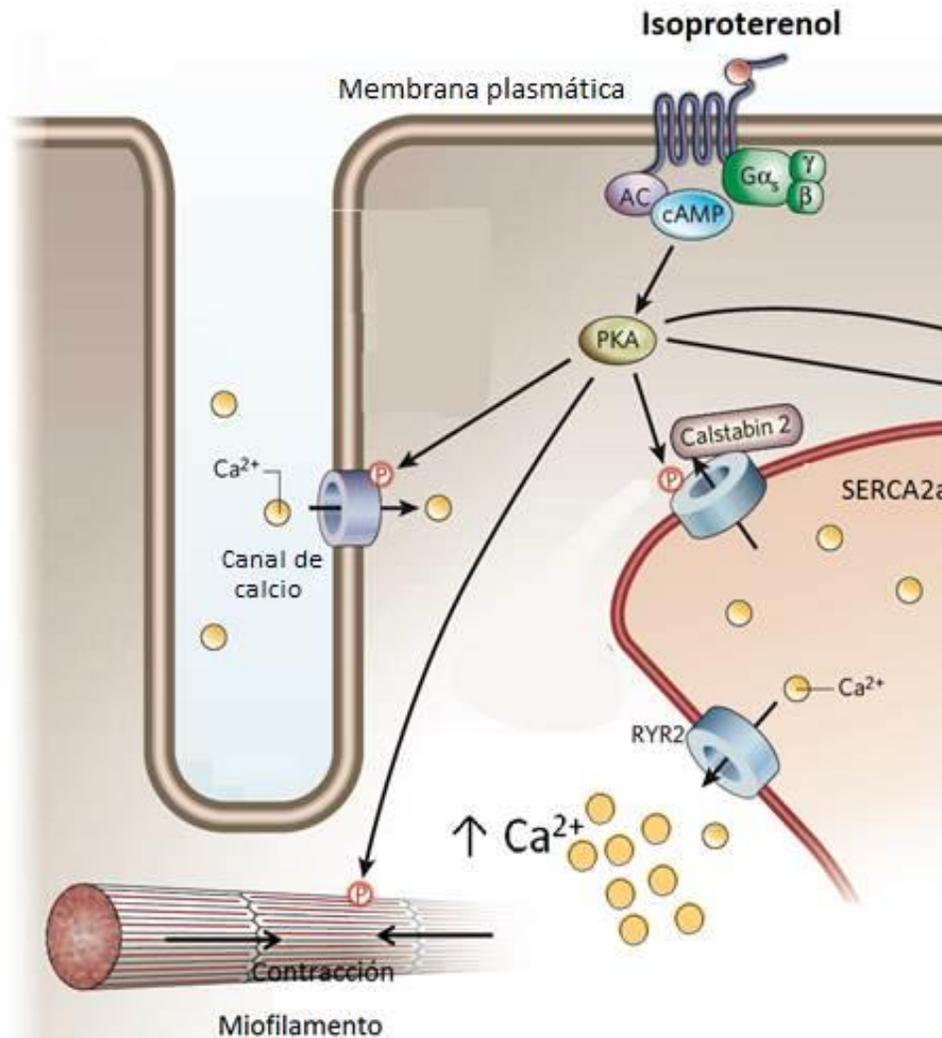


Fig. 2. Inducción de daño miocárdico con isoproterenol vía receptores β-AR. El isoproterenol estimula la activación de los receptores β-AR, lo que activa la vía de señalización de la adenilciclasa, en la cual se forma AMPc a partir de ATP. El incremento en AMPc activa a la PKA, lo que lleva a la fosforilación de los canales de calcio en la membrana celular permitiendo la entrada de calcio a la célula. Esto a su vez activa la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico al citoplasmas, incrementando la contracción celular. Modificado de Shenoy y Rockman, 2011.

El receptor  $\beta_3$  es el menos caracterizado y está expresado altamente en tejido adiposo. Es inductor de la lipólisis o termogénesis por acoplamiento, principalmente, a la proteína Gs, aunque también se ha localizado en el corazón. Presentan menor afinidad por las catecolaminas comparado con los otros  $\beta$ -AR, y una relativa resistencia a la desensibilización y a la regulación negativa, por lo que se propone que una de las funciones de los  $\beta_3$  es mantener la señalización durante períodos de estimulación sostenida con catecolaminas (Gauthier y Rozec, 2006).

El daño miocárdico inducido vía estrés oxidante está relacionado con el aumento en la producción de moléculas oxidantes y la disminución de mecanismos de defensa antioxidantes, ya sean enzimas o metabolitos, siendo el más importante el glutatión en su forma reducida (Elahi y cols., 2009). En la actualidad se reconocen 2 grupos de moléculas oxidantes, las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas nitrosantes (RNS). Algunas ROS son el anión superóxido, el radical hidroxilo, el peróxido de hidrógeno y el ozono. Éstos se producen tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, aunque en este último caso, las ROS están aumentadas. En el corazón, las fuentes de ROS son la mitocondria, las xantinas oxidasas y las NADPH oxidasas (Giraldo, 2010). Ejemplos de la RNS son el óxido nítrico, el dióxido de nitrógeno, el peroxinitrito y el alquilperoxinitrito, siendo de los más importantes el peroxinitrito por la extrema reactividad que presenta; y el óxido nítrico, ya que a partir de éste se generan reacciones en cadena con producción de especies reactivas secundarias. La principal fuente de RNS es el desacoplamiento de la sintasa de óxido nítrico (NOS). En ambos casos, tanto las ROS como las RNS se pueden unir a toda clase de moléculas biológicas, incluyendo lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, afectando la estructura y la viabilidad celular (Elahi y cols., 2009; Ogino y Wang, 2007; Pacher y cols., 2005). Además, las especies reactivas pueden interferir en distintas vías de señalización, que pueden favorecer, como es en el caso del corazón, la hipertrofia ventricular (Maulik y Kumar, 2012), la fibrosis (Aragno y cols., 2008; Zhao y cols., 2008), la muerte celular (Guan y cols, 2004; Inserte y cols., 2000; Kajstura y cols., 1996) y la inflamación (Sun y cols., 2002). En el caso de isoproterenol, se sabe que su

autooxidación produce quinonas, las cuales pueden reaccionar con el oxígeno generando dos especies reactivas: anión superóxido y peróxido de hidrógeno. Además, durante las reacciones de oxidación se generan distintas ROS (Aman y cols., 2011).

El funcionamiento adecuado del sistema cardiovascular es necesario para mantener la homeostasis de otros sistemas. Por consecuencia, cuando se presenta una anomalía extensa en el sistema cardiovascular, es probable que, a largo plazo, otros órganos comiencen a fallar, incrementando las posibilidades de deceso de dicho organismo. El que estos efectos secundarios lleguen a ser deletéreos, ha fomentado la búsqueda de agentes que amortigüen el daño miocárdico o que lo reviertan. Una de las terapias frecuentemente empleadas corresponde al uso de antiinflamatorios, como la aspirina (Massie, 2005). Sin embargo, en los últimos años han adquirido mayor atención aquellas con un potencial efecto antioxidante; entre las cuales están las vitaminas, los  $\beta$ -carotenos, los compuestos polifenólicos, los extractos de plantas, la N-acetilcisteína (Das y cols., 2005; Gross y cols., 2005; Potenza y cols., 2007; Gupta y cols., 2004) y la melatonina (Chen y cols., 2003).

## **1.2. Melatonina: Características y metabolismo.**

La melatonina es una indolamina sintetizada a partir del aminoácido triptófano. Este aminoácido es inicialmente hidroxilado y posteriormente descarboxilado produciendo la serotonina (vía N-acetil transferasa). Las metilaciones subsecuentes de la serotonina (vía hidroxindol-O-metiltransferasa, HIOMT) llevan a la formación de melatonina (Fig. 3). Los factores limitantes en su síntesis son la biodisponibilidad del triptófano, ya que ésta disminuye al presentarse una depleción aguda de triptófano (Zimmermann y cols., 1993); la ausencia de factores nutricionales como folatos (Fournier y cols., 2002) y vitamina B6 (Luboshitzky y cols., 2002); así como la actividad de la enzima HIOMT.

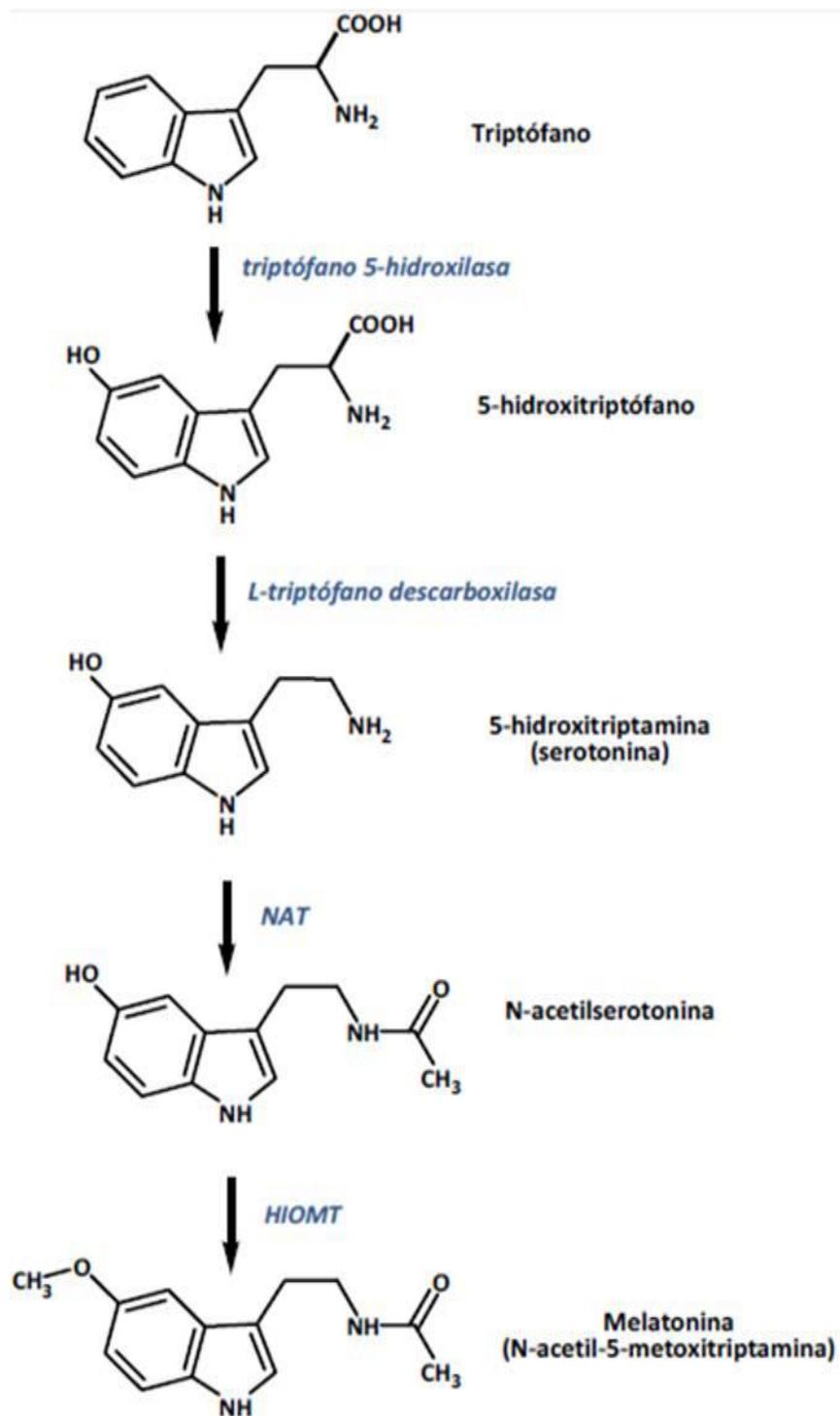


Fig. 3. Síntesis de la melatonina a partir del aminoácido triptófano. NAT: N-acetil transferasa; HIOMT: hidroxiindol-O-metiltransferasa. Modificado de Fernández-Mara y cols., 2012.

Una vez sintetizada, la melatonina es secretada primordialmente por la glándula pineal y liberada a la circulación, donde tiene acceso a varios fluidos, tejidos y compartimentos celulares (Chattoraj y cols., 2009). La melatonina presenta una vida media de aproximadamente 20-30 min en plasma. Se metaboliza rápidamente en el hígado por acción del citocromo P450; produciendo 6-hidroximelatonina que, a su vez, es conjugada a derivados sulfatados y glucuronizados. Estos conjugados se eliminan en forma de 6-sulfatoximelatonina (Chattoraj y cols., 2009). Aunque recientemente se ha demostrado que una parte de la 6-sulfatoximelatonina se produce en órganos extrahepáticos, como intestino, líquido cefalorraquídeo y piel. Otros metabolitos de la melatonina son la 6-hidroximelatonina, 3-hidroximelatonina cíclica, N1-acetil-N2-formil-5-metoxicinuramina (AFMK) y N-acetil-5-metoxicinuramina (AMK), todos con actividad antioxidante (Tan y cols., 2007).

Recientemente se ha observado que existen otros tejidos y órganos con la capacidad de sintetizar melatonina, entre los que se encuentran la retina, el cerebro, el timo, la médula ósea, el intestino, los ovarios, el testículo, la piel y los linfocitos (Carrillo-Vico y cols., 2004; Conti y cols., 2000; Jimenez-Jorge y cols., 2007; Iuvone y cols., 1999; Naranjo y cols., 2007). Sin embargo, esta melatonina extrapineal no parece contribuir a la concentración de la melatonina pineal en la circulación, ya que la pinealectomía reduce de manera significativa los niveles de melatonina circulante (Tan y cols., 2003). Una posible explicación es que la melatonina producida localmente por otros órganos podría ayudarles a enfrentar situaciones de alto estrés (Tan y cols., 2003). Además, se sugiere que, por lo menos en rata, parte de esta melatonina extrapineal puede estar unida a proteínas de unión a melatonina como un mecanismo de almacenamiento (Lahiri y cols., 1999).

### 1.2.1. Mecanismos de acción y función de la melatonina.

La melatonina se caracteriza por ser altamente lipofílica, lo que le permite penetrar a la célula y actuar dentro de ésta como un agente antioxidante al secuestrar radicales libres (Chattoraj y cols., 2009). Adicionalmente puede unirse a receptores de membrana o nucleares para ejercer su función (Claustra y cols., 2005), o a proteínas como la PKC (Anton-Tay y cols., 1998) y la calmodulina (Benítez-King y cols., 1993). Además se han propuesto sitios de unión en la mitocondria (Hardeland y Poeggeler, 2007) (Fig. 4).

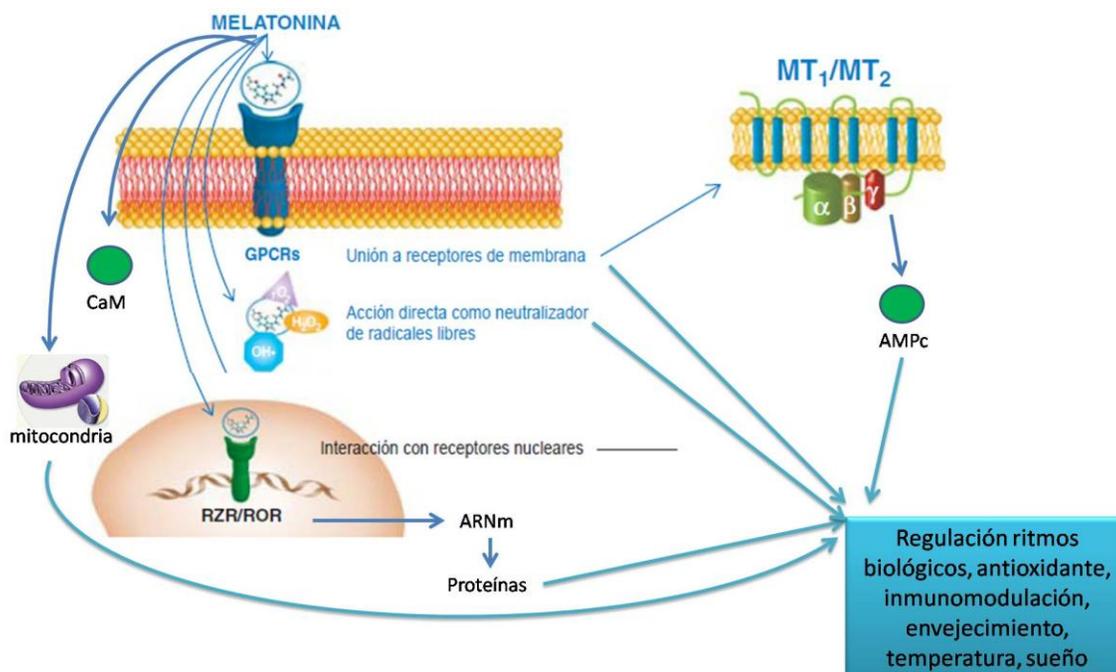


Fig. 4. Mecanismos de acción y principales acciones de la melatonina.

De manera general, los mecanismos de acción de la melatonina pueden dividirse en dos: los que están mediados por su unión a receptores, ya sean de membrana o nucleares, y los independientes del receptor, como es su actividad antioxidante.

Los receptores de membrana más ampliamente descritos son los MT1 y los MT2, los cuales forman parte de los receptores de membrana acoplados a proteínas G (GPCR) (Dubocovich, 1995; Reppert y cols., 1994; Von Gall y cols., 2002). Los receptores MT1 se han evaluado en diferentes regiones del cerebro (pituitaria, núcleo supraquiasmático) (Morgan y cols., 1994;

Liu y cols., 1997) y en tejidos periféricos como el hígado, el riñón, el pulmón, el corazón, las arterias coronarias y la aorta (Ekmekcioglu y cols., 2003; Naji y cols., 2004; Pang y cols., 1993); y se han asociado a segundos mensajeros como el AMPc (decremento) (Capsoni y cols., 1994; Reppert y cols., 1996), la fosfolipasa C (activación) (Brydon y cols., 1999) y los canales Kir (activación) (Nelson y cols., 1996). Los receptores MT2 están altamente expresados en la retina (Wiechmann y cols., 1999), el tejido adiposo (Brydon y cols., 2001), el cerebro, el corazón y el pulmón (Naji y cols., 2004).

En cuanto a los receptores nucleares, éstos pertenecen a la subfamilia de receptores huérfanos RZR/ROR, y se han encontrado en tejido periférico, especialmente en hígado y músculo (Forman y cols., 1994; Jetten y cols., 2001; Becker-Andre y cols., 1993).

Esta amplia gama en cuanto a vías de señalización, hace que a la melatonina se le asocie con muchas funciones de diferentes tipos y en distinto órganos. Su principal función es la de coordinar los ritmos circadianos, así como los cambios estacionales asociados a la fisiología de los vertebrados, como es la reproducción (Reiter, 1991). Igualmente, se le asocia con procesos del sueño (Kalonja y Kumar, 2007), regulación de la temperatura corporal (Guerrero y Reiter, 2002), envejecimiento (Bubenik, 2011), respuesta inmune (Raghavendra y cols., 2000) y desarrollo del sistema óseo (Bubenik, 2011; Reiter y cols., 2007).

Asimismo se sabe que la melatonina, al igual que sus metabolitos, es un potente agente antioxidante. Esto se relaciona con: a) su capacidad para remover directamente especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, así como para actuar de manera sinérgica con otros antioxidantes, como son las vitaminas A y C (Gitto y cols., 2001; López-Burillo, 2003); b) su capacidad de regular de manera indirecta, probablemente vía receptores, a enzimas antioxidantes (alta) como la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, catalasa; y a enzimas prooxidantes (baja) (Tan y cols., 2007).

### **1.2.2. Melatonina y el sistema cardiovascular.**

Respecto a la melatonina y el sistema cardiovascular, estudios epidemiológicos muestran una relación entre la concentración sérica de melatonina y los procesos fisiológicos o patológicos cardiovasculares. Más aún, la ciclicidad en la secreción de melatonina parece participar en procesos asociados a patofisiologías cardíacas como la inflamación, la hipertensión y el estrés oxidante (Domínguez-Rodríguez y cols., 2010). Algunos de los estudios que se han realizado para analizar el comportamiento de la melatonina son los de Brugger y cols. (1995), quienes evaluaron los niveles de melatonina nocturnos de pacientes con enfermedades coronarias del corazón, y encontraron que los niveles de melatonina eran menores en los pacientes que en los individuos sanos. Resultados similares fueron encontrados por Domínguez-Rodríguez y cols. (2002, 2005), quienes evaluaron los niveles de melatonina nocturna en pacientes con infarto agudo al miocardio, o por Sakotnik y cols. (1999) y Yaprak y cols. (2003), quienes trabajaron con pacientes con enfermedades coronarias arteriales. Igualmente se conoce que los niveles de melatonina suelen disminuir con la edad, sin embargo, esta disminución es aún más marcada cuando las personas presentan enfermedades relacionadas con el envejecimiento, incluidas las cardiovasculares (Sakotnik y cols., 1999; Domínguez-Rodríguez y cols., 2002).

De manera similar, en diversos modelos animales de daño miocárdico, se ha encontrado que la melatonina, por lo general, atenúa el daño a diferentes niveles. Acikel y cols. (2003) encontraron que la melatonina (10 mg/Kg/día, i.p, 2 días) reduce significativamente los valores de troponinas cardíacas así como cambios histológicos (degeneración de miofibrillas) inducidos con isoproterenol en rata. En tanto, Patel y cols. (2010), al evaluar la histología, así como marcadores asociados a lesión cardíaca y elevación del segmento ST en rata hallaron que la melatonina (10 mg/Kg/día, i.p, 7 días) atenuó la mayoría de los cambios inducidos por el isoproterenol.

En ratas con daño cardíaco inducido por isquemia/reperfusión, Chen y cols. (2009) encontraron que la melatonina (tratamiento agudo, 150 mg/kg 30 min previo daño, 1 administración) disminuye los niveles de la enzima lactato deshidrogenasa y del área de la zona infartada. En ese mismo año, Petrosillo y cols. (2009) asociaron la administración de la melatonina *in vitro* (tratamiento agudo, 50  $\mu$ M perfundido por 15 min previo daño) con una disminución de lactato deshidrogenasa, una mayor resistencia de las mitocondrias al calcio y la prevención de la salida de citocromo c mitocondrial. Todos estos estudios sugieren que el efecto cardioprotector de la melatonina se debe a sus propiedades antioxidantes. Sin embargo, trabajos como el de Ozturk y cols. (2011), quienes encontraron que la reducción del daño miocárdico inducido con DOX es similar sin importar que se emplee como protector a un potente eliminador de peroxinitritos, un inhibidor selectivo de la sintasa de óxido nítrico (iNOS) o a la melatonina, indican que las propiedades antioxidantes de la melatonina no son necesariamente las que proporcionan sus potenciales efectos protectores.

Por otra parte, cuando un infarto al miocardio ocurre, se activan mecanismos compensatorios que promueven la supervivencia del organismo, aún si es a corto plazo. Sin embargo, estos mecanismos pueden ser muy variables, lo que puede exacerbar el daño o modificar la respuesta esperada. Esta complejidad hace importante y necesario el estudio de los mecanismos de acción de cualquier compuesto que se proponga emplear con un ser vivo, tal y como ocurre con cualquier potencial cardioprotector, como podría ser la melatonina.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Se conoce que la administración de isoproterenol origina cambios en la estructura, la composición y el metabolismo del tejido cardíaco muy similares a los observados durante un infarto al miocardio; así como que la melatonina tiene un efecto cardioprotector principalmente asociado a sus propiedades antioxidantes cuando el daño miocárdico es inducido por eventos agudos. Sin embargo, no existe información relacionada con el efecto protector de la melatonina cuando el daño miocárdico es inducido con administraciones repetidas de isoproterenol en ratón, ni sobre la vía mediante la cual la melatonina podría ejercer su efecto cardioprotector en tales condiciones. Por lo que es necesario continuar estudiando este proceso, especialmente cuando en la actualidad existen muchos compuestos, entre ellos la melatonina, que, por el simple hecho de ser considerados como antioxidantes, se están proponiendo como cardioprotectores, sin tomar en cuenta la condición fisiológica del organismo o el factor desencadenante de tal enfermedad, o en nuestro caso, del daño cardíaco.

## **3. HIPÓTESIS.**

Si el daño miocárdico inducido con administraciones repetidas de isoproterenol en ratones involucra la participación de radicales libres y la melatonina tiene efectos antioxidantes asociados a la cardioprotección, entonces al inducir daño miocárdico con isoproterenol en presencia de melatonina se evitará o atenuará el daño estructural tanto como el estrés oxidante. Así mismo, si el efecto de la melatonina es consecuencia principalmente de sus propiedades antioxidantes, entonces sus efectos serán semejantes a los producidos por la N-acetilcisteína, un precursor endógeno de una de las enzimas antioxidantes más importante (GSH), y distintos a los de la aspirina, considerada como un antiinflamatorio.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general.**

Evaluar el efecto de la melatonina sobre el daño miocárdico inducido con administraciones repetidas de isoproterenol en ratón.

### **4.2. Objetivos particulares.**

a) Evaluar los cambios estructurales (índice de hipertrofia ventricular y proporción de fibras de colágena), la respuesta inflamatoria general (niveles de infiltrados celulares) y el estrés oxidante (niveles de nitrotirosina) asociados al daño en tejido miocárdico inducido con la administración de isoproterenol en ratones con y sin el pre-co-tratamiento con melatonina.

b) Evaluar los cambios estructurales (índice de hipertrofia ventricular y proporción de fibras de colágena), la respuesta inflamatoria general (niveles de infiltrados celulares) y el estrés oxidante (niveles de nitrotirosina) asociados al daño en tejido miocárdico inducido con la administración de isoproterenol en ratones con y sin el pre-co-tratamiento con N-acetilcisteína o aspirina.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **5.1 Animales.**

Se emplearon ratones Balb/c macho de 2 meses de edad (n=5 por grupo). Los animales se mantuvieron con un periodo luz:oscuridad de 12:12, con alimento y agua *ad libitum*.

### **5.2. Inducción de daño miocárdico.**

El grupo experimental con daño (SS/ISO) consistió en animales tratados con solución salina (SS) por 3 días, seguido de 7 administraciones de isoproterenol (5.0 µg/g/día). Cada

administración se realizó vía subcutánea con un volumen total por administración de 100 µl/25 g de ratón. El grupo control recibió un volumen equivalente de SS. Los ratones se sacrificaron veinticuatro hrs. después de la última administración de ISO o SS. La dosis elegida para inducir el daño se seleccionó en base a experimentos hechos previamente en el laboratorio, donde se determinó que esta dosis es suficiente para generar daño miocárdico.

### **5.3. Tratamientos con melatonina, N-acetilcisteína o aspirina.**

Los ratones recibieron un pre-tratamiento durante 3 días con melatonina (MEL) (Aydemir y cols., 2010; Lee y cols., 2002), N-acetilcisteína (NAC) (pH 7) (Mei y cols., 2009) o aspirina (ASA) (pH 7) (Jun-Yun y cols., 2010), seguido de la co-administración de ISO (5.0 µg/g/día), por 7 días para cada caso (grupos MEL/ISO, NAC/ISO o ASA/ISO respectivamente). Las administraciones se realizaron a la misma hora (9:00-10:00 am), vía subcutánea y aplicando un volumen total de 100 µl de cada solución por cada 25 g de ratón. También se incluyeron ratones tratados únicamente con la indolamina, el antioxidante o el antiinflamatorio. En la tabla 1 se muestran los detalles de cada uno de los tratamientos.

### **5.4. Evaluación de hipertrofia ventricular.**

Veinticuatro horas después de la última inyección, los ratones fueron pesados y sacrificados. Se removió el corazón, se lavó con PBS (pH 7.4 con glucosa al 0.1%), se removieron las aurículas y se obtuvo el peso ventricular. Con el peso corporal y el ventricular se calculó la proporción del segundo respecto al primero como un criterio general de hipertrofia ventricular (Ennis y col., 2003; Rosa y col., 2005; Zhang y col., 2008).

Tabla 1. Detalles de los tratamientos. SS=solución salina, MEL=melatonina, NAC=n-acetilcisteina, ISO=isoproterenol

Grupo experimental	Agente químico	Dosis	Duración
Grupo I (Control)	SS	-----	Día 1-10
Grupo II (MEL)	MEL	5.0 µg/g/día	Día 1-10
Grupo III (NAC)	NAC	150 µg/g/día	Día 1-10
Grupo IV (ASA)	ASA	50 µg/g/día	Día 1-10
Grupo V (ISO)	ISO	5 µg/g/día	SS: día 1-3 ISO: día 4-10
Grupo VI (MEL/ISO)	MEL/ISO	MEL: 5.0 µg/g/día ISO: 5.0 µg/g/día	ME: día 1-3 ME+ISO: día 4-10
Grupo VII (NAC/ISO)	NAC/ISO	NAC: 150 µg/g/día ISO: 5.0 µg/g/día	NAC: día 1-3 NAC+ISO: día 4-10
Grupo VIII (ASA/ISO)	ASA/ISO	ASA: 50 µg/g/día ISO: 5.0 µg/g/día	ASA: día 1-3 ASA+ISO: día 4-10

### 5.5. Procesamiento del tejido.

Una vez que el ventrículo se pesó, se procedió a fijarlo con paraformaldehido (PFA) al 4% por 24 horas a 4°C. Transcurrido este tiempo, se lavaron los tejidos con PBS y se conservaron en PBS con azida sódica al 0.02% a 4°C hasta su uso. Veinticuatro horas previas a realizar el corte del ventrículo, el tejido se depositó en solución de sacarosa al 30% a 4°C. Cada corazón se embebió en resina "Tissue-tek" para realizar cortes longitudinales de por congelación (10 µm, 17 a -20°C). Los cortes longitudinales obtenidos fueron representativos de todo el corazón (plano ventral-dorsal) y se montaron sobre laminillas gelatinizadas. Por cada corazón se

obtuvieron 4 series de laminillas. Cada serie constó de 15 laminillas, sobre las cuales se colocaron 6-8 cortes seriados. Las laminillas se conservaron a 4°C hasta el momento de su uso (Fig. 5).

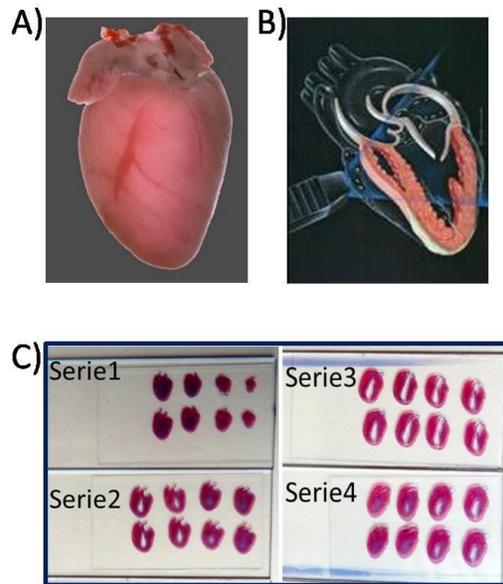


Fig.5. Cortes longitudinales de corazón. A) Corazón de ratón orientado longitudinalmente. B) Imagen representativa de un corte longitudinal. C) Laminillas representativas de cada una de las series obtenidas, donde en la primera serie se observan cortes a partir de de la pared ventral del corazón principalmente, en la serie 2 y 3 se observan las cavidades del corazón y en la serie 4 se presenta la pared dorsal.

### 5.6. Evaluación tisular de daño miocárdico.

La evaluación del daño miocárdico se realizó mediante la tinción Tricrómica de Massón en laminillas con cortes seriados representativos de todo el corazón. Este tipo de tinción permite diferenciar las fibras musculares, de las fibras de colágena, así como detectar núcleos celulares en un mismo corte, en función de los tres colorantes utilizados en esta técnica. La fucsina ácida-escarlata de Beibrich tiñe las fibras musculares (color rojo); el azul de anilina las fibras de colágena (color azul); y la hematoxilina férrica de Weigert los núcleos (color negro).

Además esta tinción puede ser empleada en cortes embebidos en parafina o hechos por congelación, como en este estudio.

El protocolo se describe a continuación:

1. Secar las laminillas a temperatura ambiente (TA) por un mínimo de 30 min.
2. Hidratar el tejido en PBS 0.01 M, pH 7.4, a TA por 5 min.
3. Incubar el tejido en solución Bouin precalentada a 56° C por 15 minutos.
4. Enjuagar el tejido en agua destilada.
5. Teñir con hematoxilina férrica de Weigert por 5 minutos.
6. Lavar con agua destilada y virar con solución de Scott.
7. Lavar el tejido con agua desionizada.
8. Teñir con escarlata de Biebrich y Fucsina ácida por 5 minutos.
9. Lavar en agua desionizada.
10. Colocar los cortes en una mezcla de ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico, por 5 minutos, lo que origina que las fibras de colágena presenten un color rosa claro.
11. Teñir con azul de anilina por 20 minutos para obtener fibras de colágeno de color azul.
12. Lavar por inmersión el tejido con ácido acético al 0.1%.
13. Lavar los cortes con agua destilada.
14. Deshidratar rápidamente con etanol al 95% y con etanol absoluto.
15. Aclarar con xileno rápidamente y montar.

Dependiendo del número de laminillas a teñir, se ocuparon cajas Coplin con un máximo de 18 laminillas por caja o se aplicaron los reactivos directamente sobre éstas con agitación constante (75-100 rpm). En aquellos casos donde se ocuparon cajas Coplin, los reactivos se reutilizaron para un máximo de 10 corridas en un periodo no mayor a 7 días.

### 5.6.1. Fibras de colágena.

La presencia de fibras de colágena se emplea como un índice de fibrosis intersticial. En este caso, se fotografiaron bajo el microscopio estereoscópico un mínimo de 16 cortes seriados representativos de todo el corazón con la cámara Motic 2500. Las imágenes se transfirieron y se analizaron con el procesador de imágenes Motic. Para cuantificar el área con fibras de colágena, se delimitó el área total del corte correspondiente, así como el área en color azul, descartando el área circundante a vasos y la unión ventrículo-aurícula (Fig. 6).

Con el propósito de conocer la distribución de las fibras de colágena a lo largo de todo el corazón, se realizó la cuantificación de las fibras de colágena de cada uno de los cortes de por lo menos una laminilla de cada serie mediante la relación  $(\text{área azul}/\text{área total}) \times 100$ . Para realizar los análisis estadísticos, primero se calculó el porcentaje de área de colágena  $((\text{área azul}/\text{área total}) \times 100)$  de cada uno de los cortes presentes en una laminilla representativa de las series 2 y 3, y posteriormente se realizó el promedio de éstos valores para obtener el porcentaje de fibras de colágena por corazón.

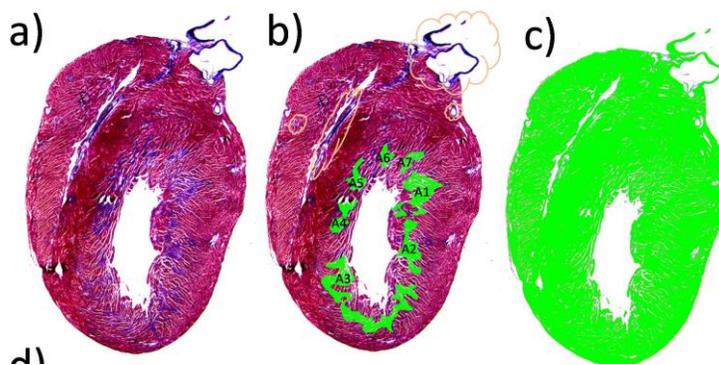


Fig. 6. Cuantificación de las fibras de colágena en los cortes longitudinales de corazón de ratón. Una vez fotografiados los cortes (a), con ayuda del programa MOTIC se marcaron las áreas ocupadas por las fibras de colágena (color azul) (b), excluyendo toda aquella marca presente alrededor de cualquier vaso. De la misma manera se delimitó el área total del tejido para cada corte (c). Tomando en cuenta el área total del corte y el área ocupada por las fibras de colágena, se calculó el porcentaje de fibras de colágena por corte. Posteriormente se calculó el porcentaje de fibras de colágena por corazón. Dependiendo del tamaño del corazón, se evaluaron en total un mínimo de 16 cortes representativos de todo el órgano.

### 5.6.2 Infiltrados celulares.

La tinción tricrómica de Masón también permite la detección de infiltrados celulares. En este caso, la valoración se realizó bajo el microscopio a un aumento de 400x (Microscopio Olympus BX51), y se cuantificaron todos aquellos grupos de infiltrados que estaban integrados por un mínimo de 5 células independientes (color negro, excluyendo a los núcleos de fibras musculares y de fibroblastos). Cada grupo de 5 células corresponde a una unidad de infiltrado celular (Fig. 7). Estas unidades fueron cuantificadas a lo largo de todo el corte en diferentes cortes de cada uno de los tratamientos. Se evaluaron un mínimo de 8 cortes/corazón/ratón.

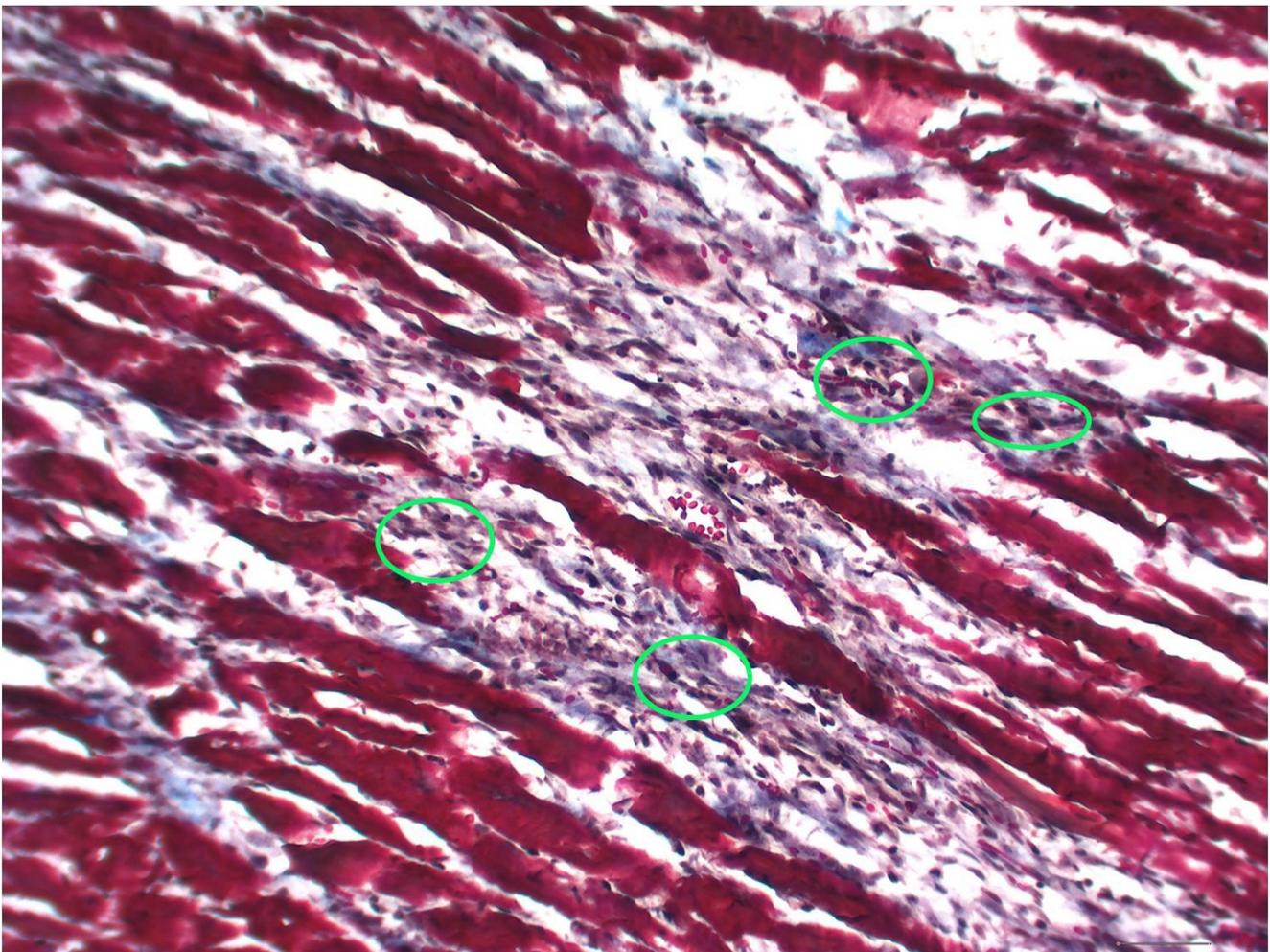


Fig. 7. Localización de los infiltrados celulares en los cortes longitudinales de corazón de ratón. En círculo se señalan algunos grupos de infiltrados celulares.

### 5.7. Evaluación de estrés oxidante por nitrotirosina.

El daño miocárdico también se evaluó mediante la inmunodetección de nitrotirosina (3-NT). Este compuesto es considerado como un indicador de estrés oxidante, en específico, de daño a las proteínas debido al estrés oxidante (Fig. 8).

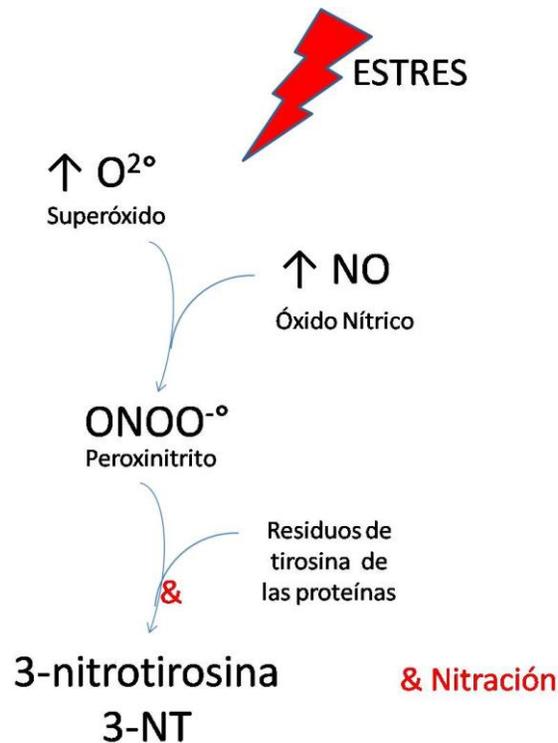


Fig. 8. Nitrotirosina como indicador de estrés oxidante. La nitrotirosina es un producto estable de la nitración de los residuos de tirosina de las proteínas mediada por especies reactivas de nitrógeno. Éstas se generan cuando el óxido nítrico se combina con los radicales superóxido, debido a una alta producción de ambos, usualmente durante estados de estrés oxidante alto (Ogino y Wang, 2007).

El protocolo para la detección de 3-NT es el siguiente:

1. Secar las laminillas a temperatura ambiente (TA) por un mínimo de 30 min.
2. Hidratar el tejido en PBS 0.01 M, pH 7.4, a TA por 5 min.
3. Delimitar los cortes con lápiz hidrofóbico.
4. Bloquear con peroxidasa 1%, por 10 min.
5. Lavar con PBS.

6. Bloquear la unión inespecífica con suero, a TA por 60 min.
7. Lavar con PBS.
8. Incubar con el anticuerpo 1°, a TA por 60 min.
9. Lavar con PBS.
10. Incubar con el anticuerpo 2°, a TA por 30 min.
11. Lavar con PBS.
12. Incubar con reactivo A-B (Abidina-Biotina), a TA por 30 min.
13. Lavar con PBS.
14. Incubar con sustrato de peroxidasa y diaminobenzimida, a TA por 10 min.
15. Lavar con agua desionizada.
16. Enjuagar el tejido en agua destilada.
17. Teñir con hematoxilina férrica de Weigert por 5 minutos. Lavar con agua destilada y virar con solución de Scott.
18. Lavar con agua destilada.
19. Montar laminillas.

Para evaluar la proporción de 3-NT como criterio de estrés oxidante, se fotografiaron bajo el microscopio estereoscópico un mínimo de 16 cortes seriados representativos de todo el corazón con una cámara Motic 2500. Las imágenes fueron transferidas y analizadas con el procesador de imágenes Motic. La cuantificación del área positiva a 3-NT consistió en delimitar el área total del corte correspondiente, así como el área en color café, y, en base a estos datos, calcular el porcentaje de 3-NT por corte. Los porcentajes de cada corte se promediaron para obtener el porcentaje del área positiva a nitrotirosina por corazón. (Fig. 9).

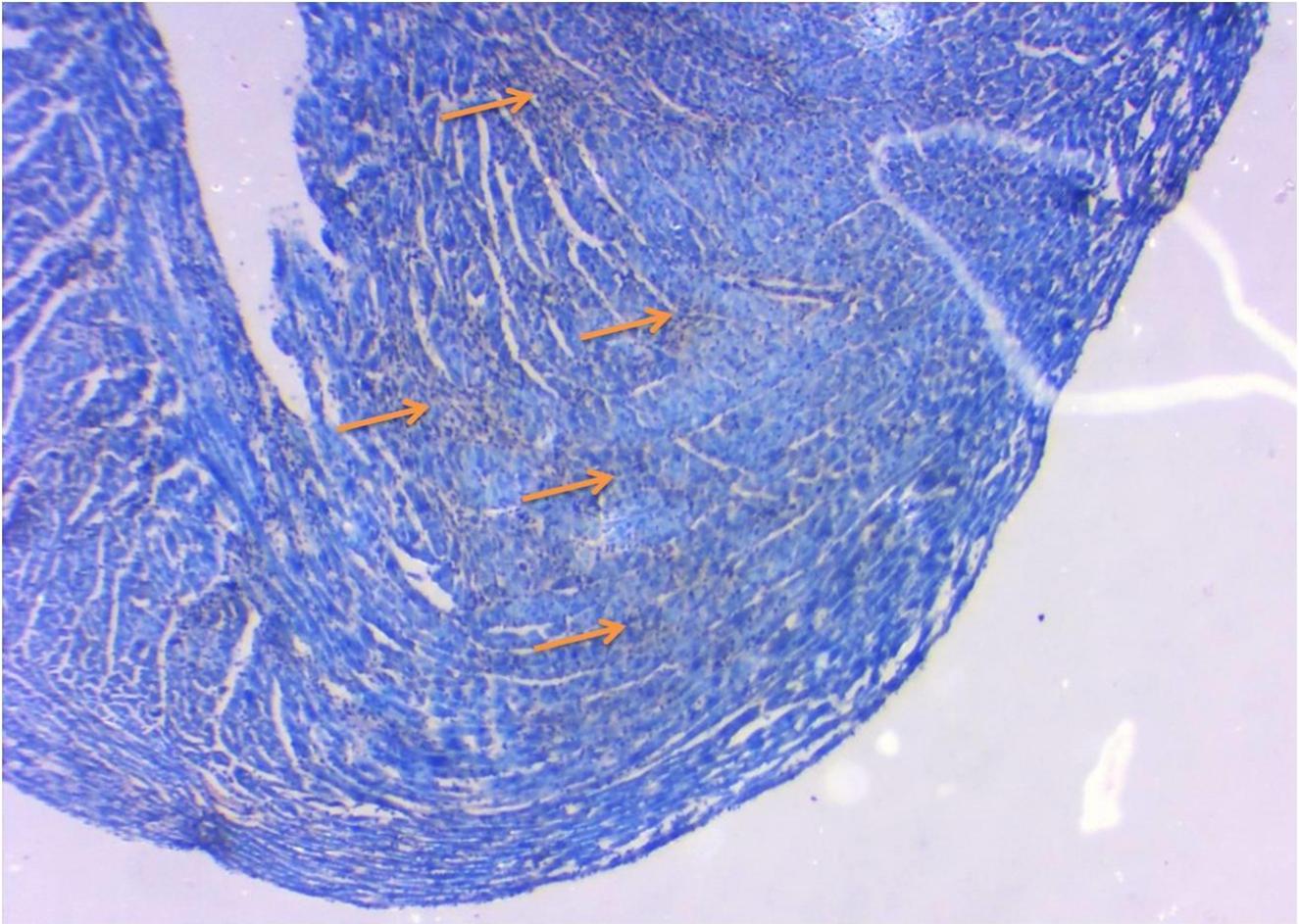


Fig. 9. Cuantificación del área positiva a nitrotirosina (3-NT) en cortes longitudinales de corazón de ratón. Una vez fotografiados los cortes, con ayuda del programa MOTIC se delimitó el área total del tejido para cada corte y se marcaron las áreas positivas a 3-NT (color café), excluyendo toda aquella marca presente alrededor de cualquier vaso. En base al área positiva a 3-NT, se calculó el porcentaje de 3-NT presente en cada corte, en un mínimo de 8 cortes/corazón/ratón. Los porcentajes de cada corte fueron promediados para obtener el porcentaje de nitrotirosina por corazón. La marca de 3-NT se señala con una flecha.

### 5.8. Estadística.

Los valores fueron analizados mediante el análisis de varianza de una sola vía (ANOVA), seguido de la prueba posthoc de Bonferroni utilizando el software prism de GraphPad. Los datos se expresan en media  $\pm$  EE.

## 6. RESULTADOS.

### 6.1. Daño miocárdico: Efecto de la melatonina.

#### 6.1.1. Melatonina e hipertrofia ventricular.

Una de las maneras más usada para calcular la hipertrofia ventricular (HV) es mediante la relación entre el peso ventricular y el peso corporal (Ennis y col., 2003; Rosa y col., 2005; Zhang y col., 2008). El grupo tratado únicamente con ISO presentó un índice de HV mayor al del grupo control en 15.12% ( $p < 0.001$  vs. control). El pre-co-tratamiento con MEL no revirtió el efecto del ISO. Los ratones tratados sólo con la indolamina no presentaron cambios significativos respecto al grupo control (Fig. 10).

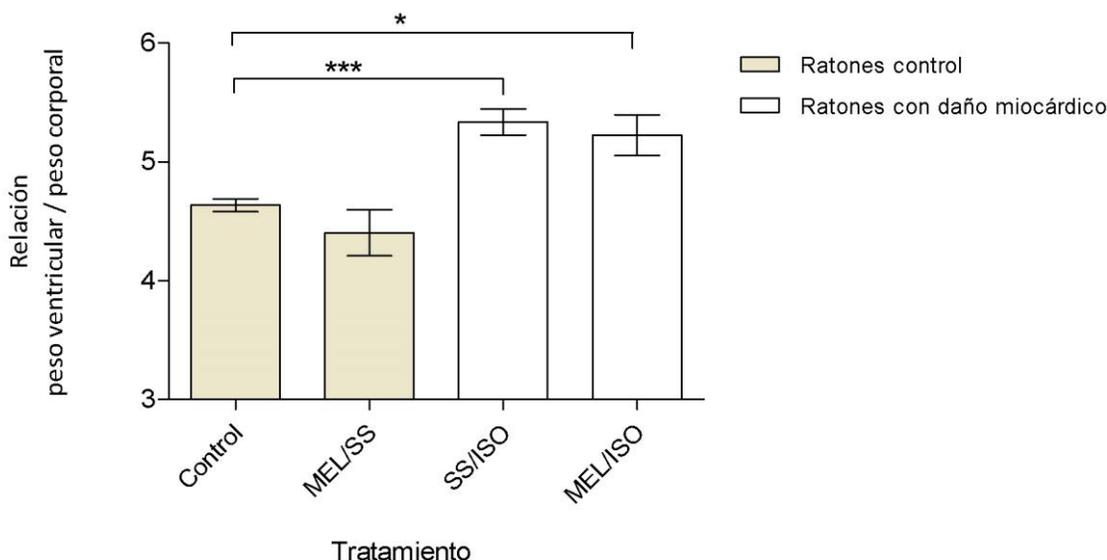
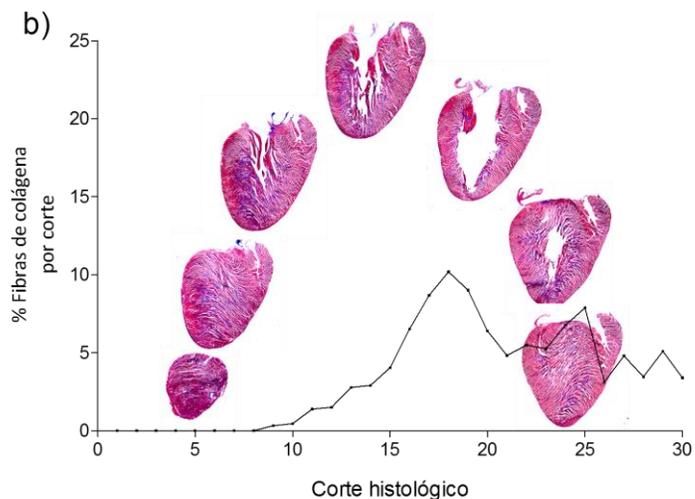
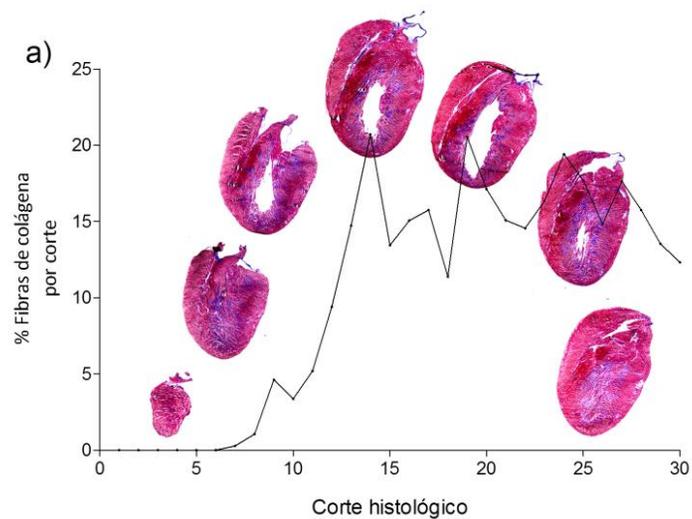
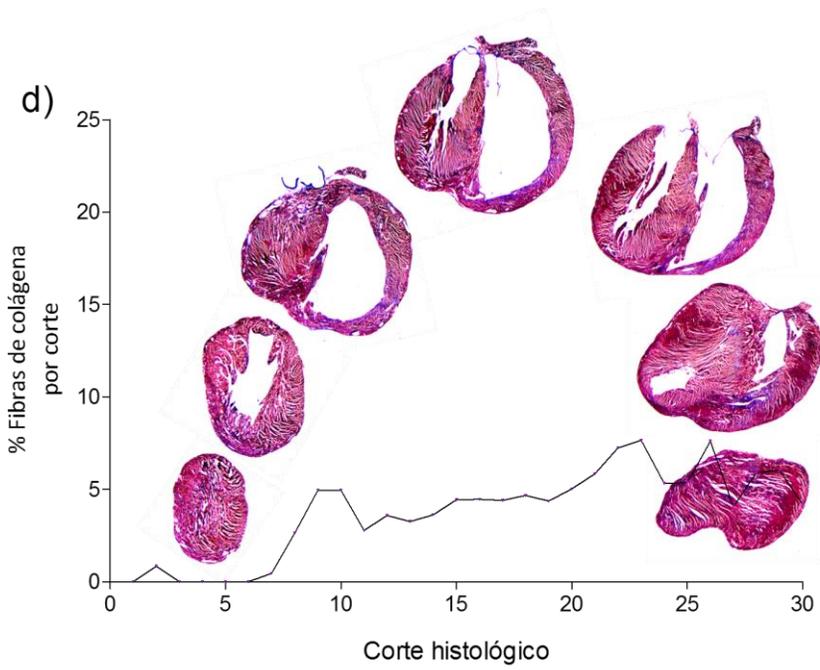
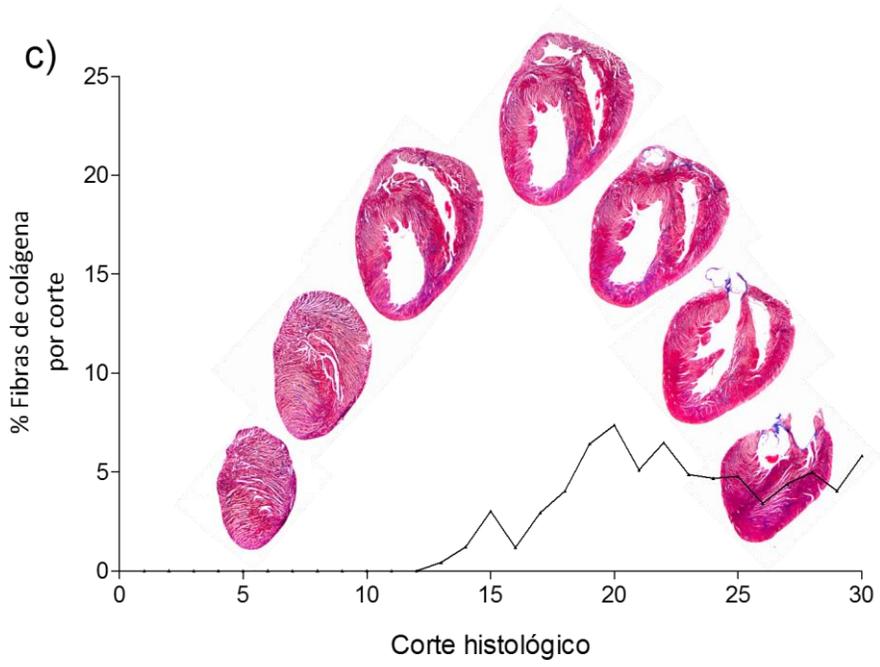


Fig. 10. Efecto de la melatonina sobre la relación peso ventricular/peso corporal. El daño miocárdico se indujo mediante la administración de isoproterenol (ISO, 5  $\mu\text{g/g/día}$ , 7 días, s.c.) (Grupo SS/ISO). La melatonina (MEL) se administró durante 10 días (5  $\mu\text{g/g/día}$ , s.c.) (Grupo MEL/SS). El grupo MEL/ISO se trató con melatonina durante 3 días seguido de la coadministración de MEL e ISO a las dosis y tiempos ya mencionados. Cada grupo se integró de 5 animales. Datos en media  $\pm$  EE. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*  $p < 0.05$ .

### 6.1.2. Melatonina y fibras de colágena.

En un primer grupo de corazones correspondientes a cada uno de los tratamientos se cuantificó el porcentaje de área ocupada por fibras de colágena (FC) a lo largo de todo el corazón (Fig. 11). Se encontró que aproximadamente de los cortes 15 al 25, correspondientes a la serie 3 y a aquellos donde se observó claramente la cavidad del ventrículo, presentaron un promedio de fibras de colágena equivalentes a los que se obtuvieron cuando se cuantificó todo el corazón y se realizó la comparación entre grupos. Tomando en cuenta estos resultados, se decidió emplear los cortes 15-25 para realizar las evaluaciones posteriores, así como sus réplicas.





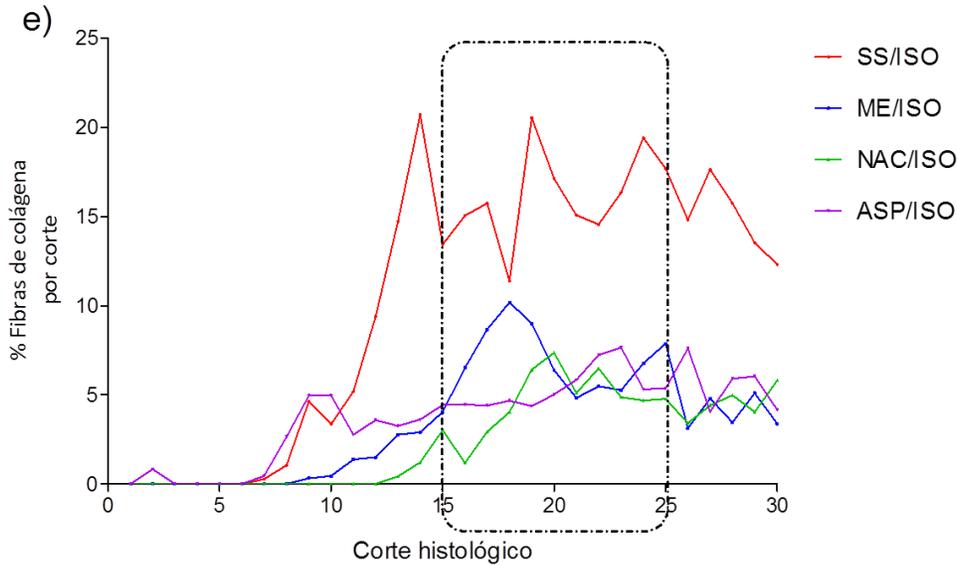


Fig. 11. Distribución de las fibras de colágena a lo largo del corazón. Cortes secuenciales representativos de un corazón de ratón tratado con SS/ISO (a), MEL/ISO (b) NAC/ISO (c) o ASA/ISO (d). Los cortes se tiñeron con la técnica tricrómica de Massón. Las fibras de colágena se observan en color azul. Simultáneamente se muestra los cambios en el porcentaje de fibras de colágena a lo largo de todo el corazón según el tratamiento (a-e). En (e) se señalan los cortes seleccionados para realizar los análisis subsecuentes. SS=solución salina, ISO=isoproterenol (5  $\mu\text{g/g/día}$ , s.c.), MEL= melatonina (5  $\mu\text{g/g/día}$ , s.c.), NAC=N-acetilcisteína (150  $\mu\text{g/g/día}$ , s.c.), ASA=aspirina (50  $\mu\text{g/g/día}$ , s.c.).

En la Fig. 12 se observa que el porcentaje más elevado de FC se presentó en el grupo SS/ISO ( $p < 0.001$  vs control). Mientras que con el pre-co-tratamiento con MEL fueron  $75.50 \pm 0.47\%$  menores en relación con el grupo SS/ISO ( $p < 0.001$ ), sin alcanzar niveles basales. No se encontraron diferencias entre los grupos control y MEL/SS.

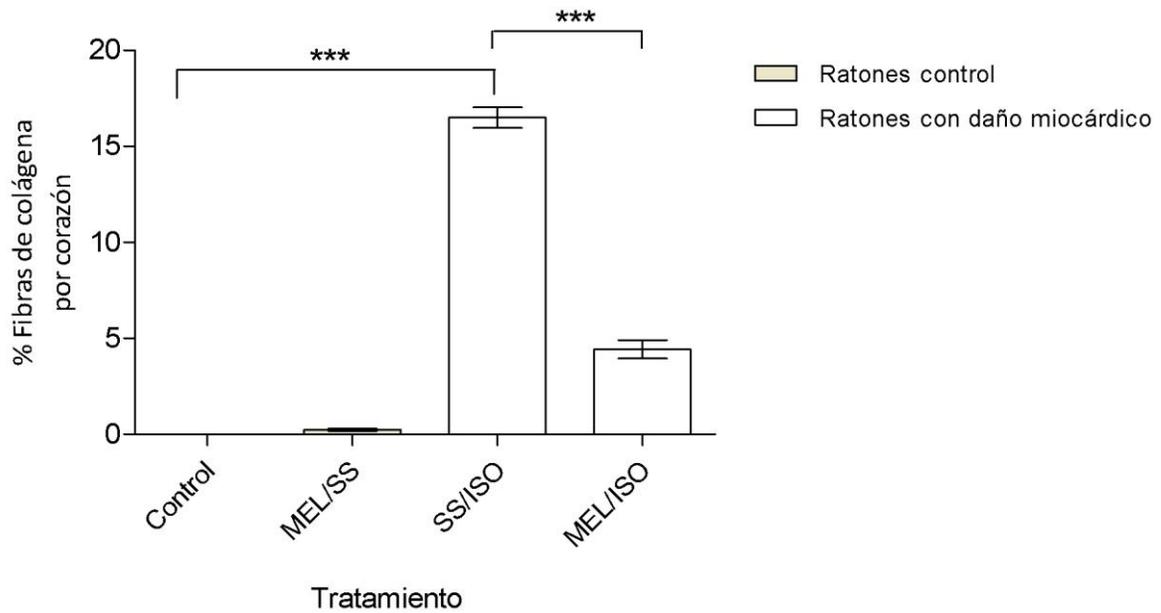


Fig. 12. Efecto de la melatonina sobre el porcentaje de fibras de colágena. El daño miocárdico se indujo mediante la administración de isoproterenol (ISO, 5  $\mu\text{g/g/día}$ , 7 días, s.c.) (Grupo SS/ISO). La melatonina (MEL) se administró durante 10 días (5  $\mu\text{g/g/día}$ , s.c.) (Grupo MEL/SS). El grupo MEL/ISO se trató con melatonina durante 3 días seguido de la coadministración de MEL e ISO a las dosis y tiempos ya mencionados. Cada grupo se integró de 5 animales. Datos en media  $\pm$  EE. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*  $p < 0.05$ .

### **6.1.3. Melatonina e infiltrados celulares.**

Uno de los procesos que están relacionados con el daño miocárdico y su remodelación es la inflamación asociada a la presencia de infiltrados celulares (IC). En el presente estudio, éstos se observaron en todas las condiciones estudiadas, aunque en porcentajes distintos. Al igual que la 3-NT, los niveles más altos de IC se cuantificaron en el grupo SS/ISO ( $p < 0.001$  vs control). En tanto que con el pre-co-tratamiento con melatonina, los IC fueron  $61.87 \pm 2.45\%$  menores que los del grupo SS/ISO, sin alcanzar niveles basales (Fig. 13). La MEL sola no causó cambios significativos en los niveles basales de IC.

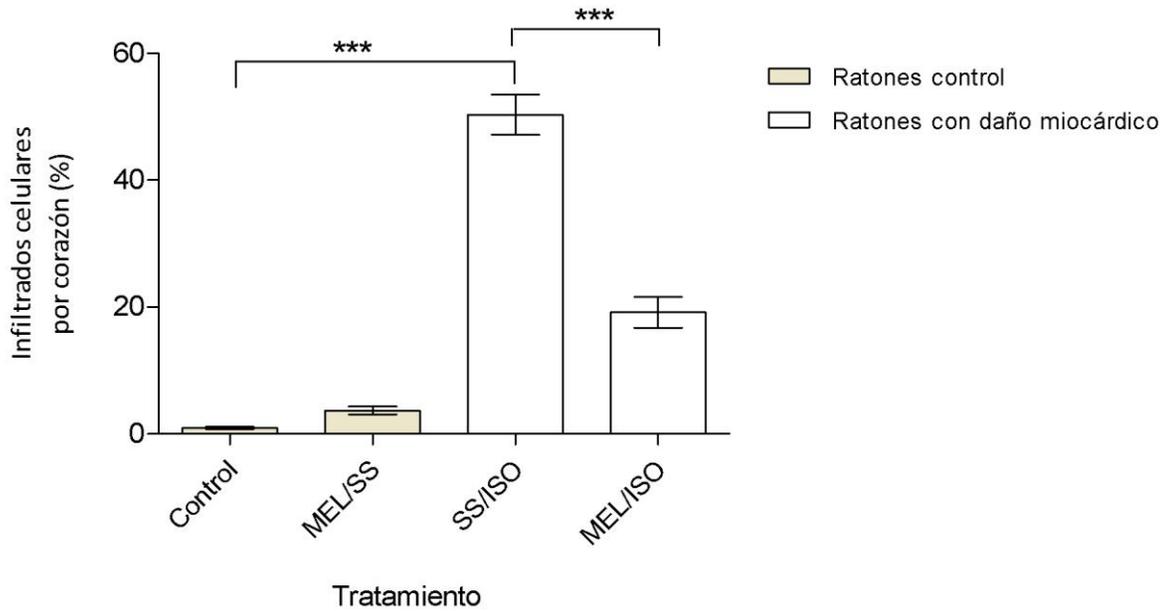


Fig. 13. Efecto de la melatonina sobre los infiltrados celulares. El daño miocárdico se indujo mediante la administración de isoproterenol (ISO, 5 µg/g/día, 7 días, s.c.) (Grupo SS/ISO). La melatonina (MEL) se administró durante 10 días (5 µg/g/día, s.c.) (Grupo MEL/SS). El grupo MEL/ISO se trató con melatonina durante 3 días seguido de la coadministración de MEL e ISO a las dosis y tiempos ya mencionados. Cada grupo se integró de 5 animales. Datos en media ± EE. \*\*\* p<0.001; \* p<0.05.

#### **6.1.4. Melatonina y nitrotirosina.**

Del mismo modo que las FC y los IC, el mayor porcentaje de área positiva a 3-NT se encontró en el grupo SS/ISO (p<0.001 vs control). Mientras que el pre-co-tratamiento con MEL lo disminuyó en 75.50±0.70% (p<0.001 vs SS/ISO), sin alcanzar niveles basales. El tratamiento únicamente con MEL no mostró diferencias significativas respecto al control (Fig. 14).

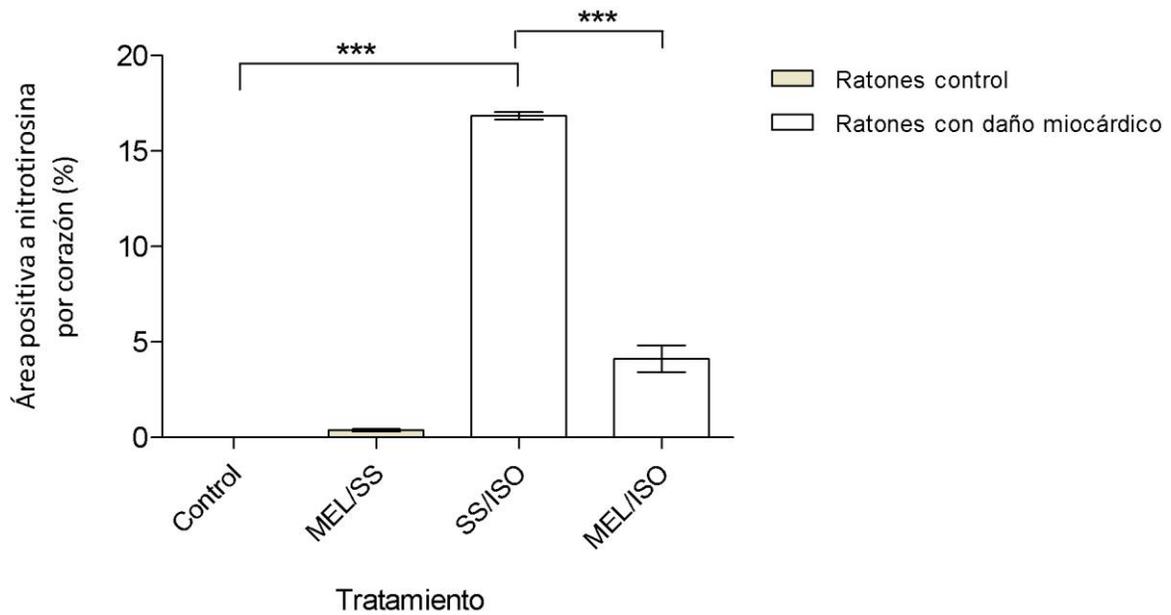


Fig. 14. Efecto de la melatonina sobre la proporción de área positiva a nitrotirosina. El daño miocárdico se indujo mediante la administración de isoproterenol (ISO, 5  $\mu\text{g/g/día}$ , 7 días, s.c.) (Grupo SS/ISO). La melatonina (MEL) se administró durante 10 días (5  $\mu\text{g/g/día}$ , s.c.) (Grupo MEL/SS). El grupo MEL/ISO se trató con melatonina durante 3 días seguido de la coadministración de MEL e ISO a las dosis y tiempos ya mencionados. Cada grupo se integró de 5 animales. Datos en media  $\pm$  EE. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*  $p < 0.05$ .

En la Fig. 15 se muestra un panel comparativo entre los diferentes tratamientos y los parámetros evaluados

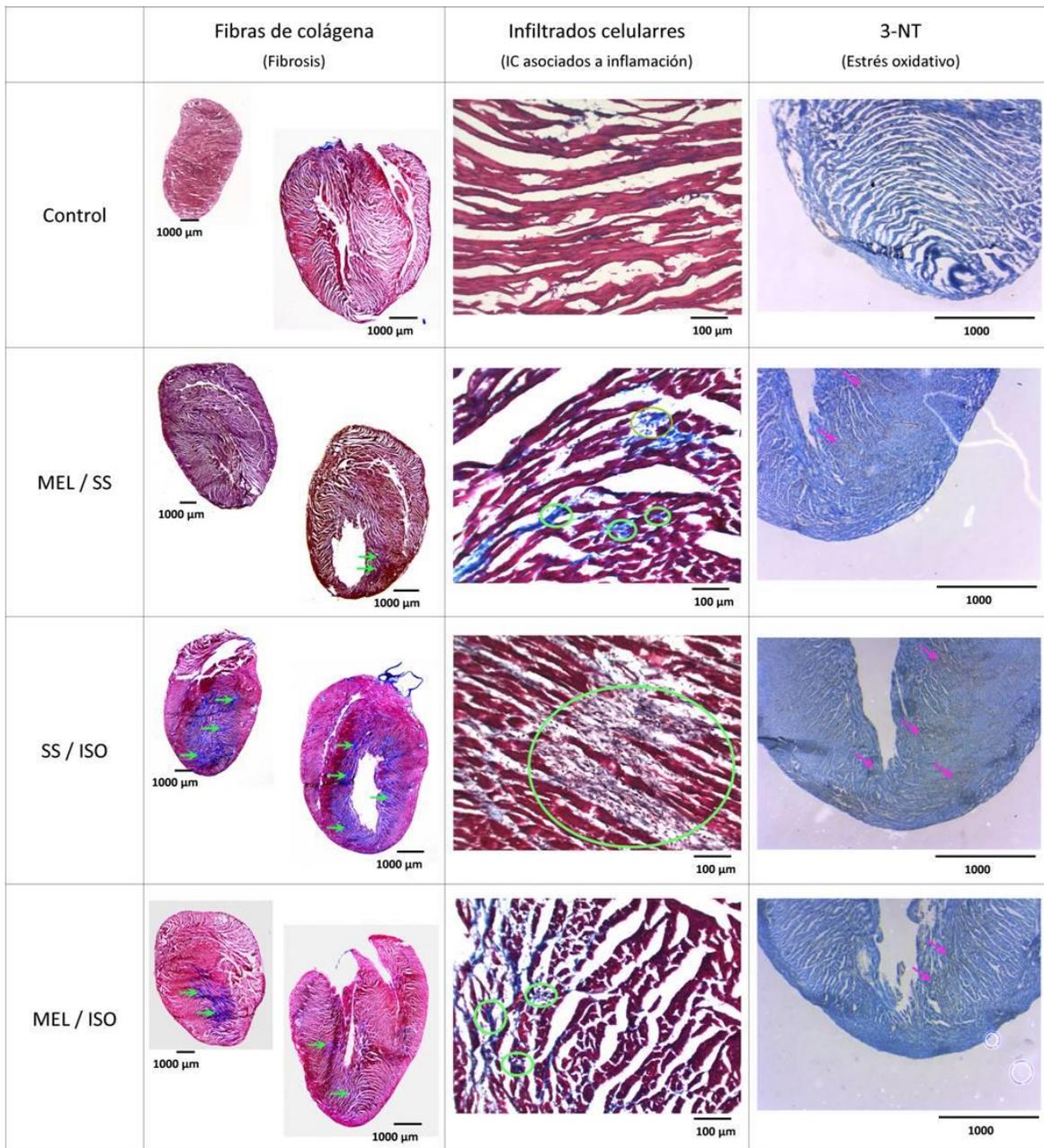


Fig. 15. Panel comparativo entre los grupos control, SS/ISO, MEL/SS y MEL/ISO. El daño miocárdico se indujo mediante la administración de isoproterenol (ISO, 5 µg/g/día, 7 días, s.c.) (Grupo SS/ISO). La melatonina (MEL) se administró durante 10 días (5 µg/g/día, s.c.) (Grupo MEL/SS). El grupo MEL/ISO se trató con melatonina durante 3 días seguido de la coadministración de MEL e ISO a las dosis y tiempos ya mencionados. Cada grupo se integró de 5 animales. Se evaluaron las fibras de colágeno (Tricrómica de Massón) (flecha verde) y los infiltrados celulares (Tricrómica de Massón) (circulo verde) y nitrotirosina (Inmunohistoquímica) (flecha rosa).

## 6.2. Daño miocárdico: Efecto de la N-acetilcisteína y la aspirina.

### 6.2.1. N-acetilcisteína, aspirina e hipertrofia ventricular.

Al igual que el pre-co-tratamiento con la MEL, ni el antioxidante ni el antiinflamatorio revirtieron el efecto del ISO sobre el índice de hipertrofia ventricular (Fig. 16). No se encontraron diferencias significativas entre los ratones tratados únicamente con la NAC o ASA y los controles.

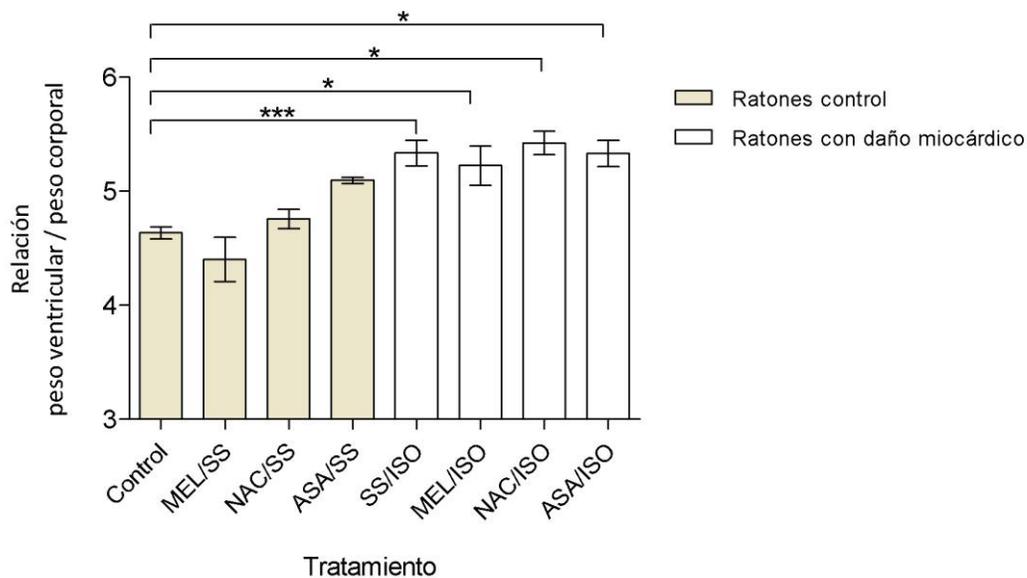


Fig. 16. Efecto de un antioxidante y un antiinflamatorio en comparación con la melatonina sobre la relación peso ventricular/peso corporal. El daño miocárdico se indujo mediante la administración de isoproterenol (ISO, 5  $\mu\text{g/g/día}$ , 7 días, s.c.) (Grupo SS/ISO). La melatonina (MEL) se administró durante 10 días (5  $\mu\text{g/g/día}$ , s.c.) (Grupo MEL/SS). El grupo MEL/ISO se trató con melatonina durante 3 días seguido de la coadministración por 7 días de MEL e ISO a las dosis y tiempos ya mencionados. El esquema de tratamiento con el antioxidante (N-acetilcisteína=NAC, 150  $\mu\text{g/g/día}$ , s.c) y el antiinflamatorio (aspirina=ASA, 50  $\mu\text{g/g/día}$ , s.c) fue igual al de la MEL. Cada grupo se integró de 5 animales. Datos en media  $\pm$  EE. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*  $p < 0.05$ .

### 6.2.2. N-acetilcisteína, aspirina y fibras de colágena.

El porcentaje de fibras de colágena de los ratones pre-co-tratados con el antioxidante o el anti-inflamatorio fue  $75.94 \pm 0.38\%$  y  $58.94 \pm 0.38\%$  menor que en los ratones que no se pre-co-trataron al momento de inducir el daño miocárdico, respectivamente ( $p < 0.001$  vs SS/ISO). Respecto a la MEL, la disminución en las FC con el antiinflamatorio fue  $14.22\%$  significativamente menor a la conseguida con la indolamina ( $p < 0.001$ ); en tanto que no se encontraron diferencias entre la disminución obtenida con la indolamina y el antioxidante. Finalmente, la presencia de FC también fue observada en los ratones tratados solo con ASA ( $p < 0.001$ ) (Fig. 17)

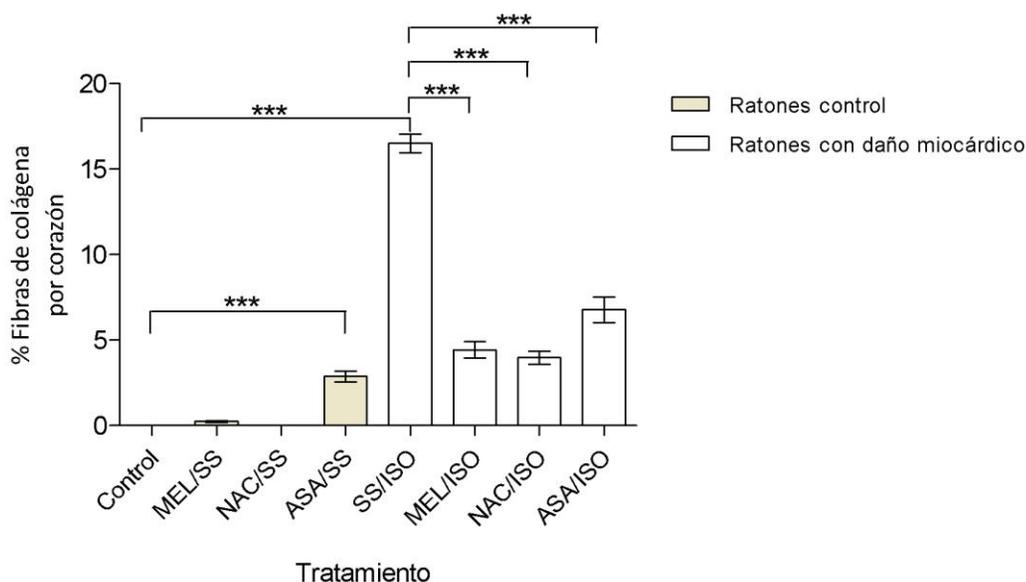


Fig. 17. Efecto de un antioxidante y un antiinflamatorio en comparación con la melatonina sobre las fibras de colágena. El daño miocárdico se indujo mediante la administración de isoproterenol (ISO,  $5 \mu\text{g/g/día}$ , 7 días, s.c.) (Grupo SS/ISO). La melatonina (MEL) se administró durante 10 días ( $5 \mu\text{g/g/día}$ , s.c.) (Grupo MEL/SS). El grupo MEL/ISO se trató con melatonina durante 3 días seguido de la coadministración por 7 días de MEL e ISO a las dosis y tiempos ya mencionados. El esquema de tratamiento con el antioxidante (N-acetilcistina=NAC,  $150 \mu\text{g/g/día}$ , s.c) y el antiinflamatorio (aspirina=ASA,  $50 \mu\text{g/g/día}$ , s.c) fue igual al de la MEL. Cada grupo se integró de 5 animales. Datos en media  $\pm$  EE. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*  $p < 0.05$ .

### 6.2.3. N-acetilcisteina, aspirina e infiltrados celulares.

La presencia de infiltrados celulares fue evidente en cualquiera de las condiciones estudiadas, incluido el control. Como se observa en la Fig. 18, los IC fueron  $67.97 \pm 0.18\%$  y  $74.11 \pm 1.07\%$  menores en los grupos NAC/ISO y ASA/ISO que en el grupo SS/ISO, respectivamente ( $p < 0.001$ ). El pre-co-tratamiento con la indolamina resultó en una reducción similar a la obtenida en estos grupos. Mientras que el porcentaje de infiltrados celulares del grupo ASA/SS fue de  $24.60 \pm 1.35\%$  ( $p < 0.001$  vs control).

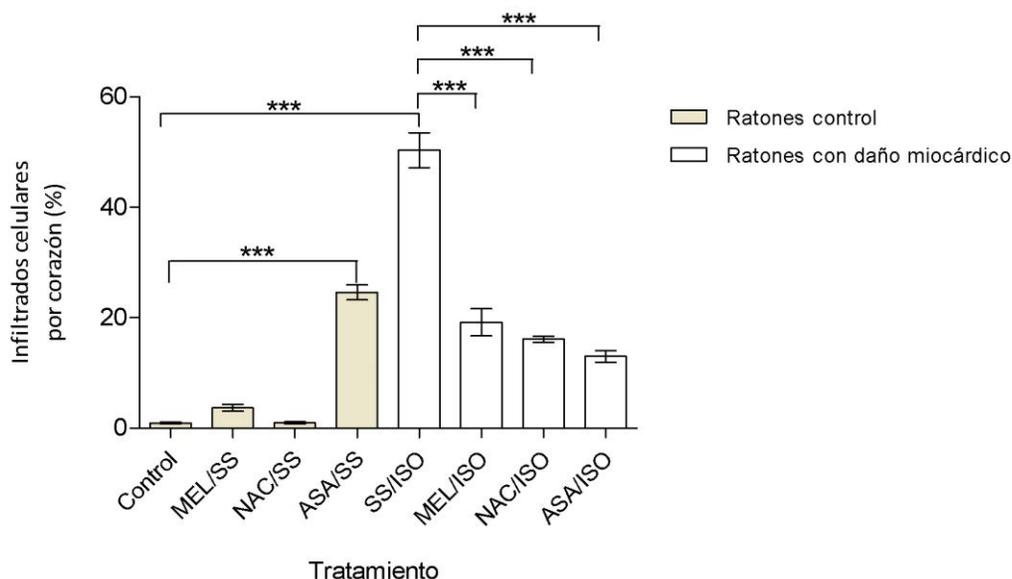


Fig. 18. Efecto de un antioxidante y un antiinflamatorio en comparación con la melatonina sobre los infiltrados celulares. El daño miocárdico se indujo mediante la administración de isoproterenol (ISO,  $5 \mu\text{g/g/día}$ , 7 días, s.c.) (Grupo SS/ISO). La melatonina (MEL) se administró durante 10 días ( $5 \mu\text{g/g/día}$ , s.c.) (Grupo MEL/SS). El grupo MEL/ISO se trató con melatonina durante 3 días seguido de la coadministración por 7 días de MEL e ISO a las dosis y tiempos ya mencionados. El esquema de tratamiento con el antioxidante (N-acetilcisteina=NAC,  $150 \mu\text{g/g/día}$ , s.c) y el antiinflamatorio (aspirina=ASA,  $50 \mu\text{g/g/día}$ , s.c) fue igual al de la MEL. Cada grupo se integró de 5 animales. Datos en media  $\pm$  EE. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*  $p < 0.05$ .

#### 6.2.4. N-acetilcisteína, aspirina y nitrotirosina.

El porcentaje de área positiva a 3-NT en los ratones pre-co-tratados con el antioxidante y el antiinflamatorio fue  $84.46 \pm 0.51\%$  y  $74.95 \pm 0.24\%$  menor que en los animales tratados únicamente con ISO, respectivamente ( $p < 0.001$ ). Esta disminución no fue estadísticamente diferente a la obtenida con el pre-co-tratamiento con la MEL. No se encontraron diferencias significativas entre los ratones tratados únicamente con la NAC o ASA y los controles (Fig. 19).

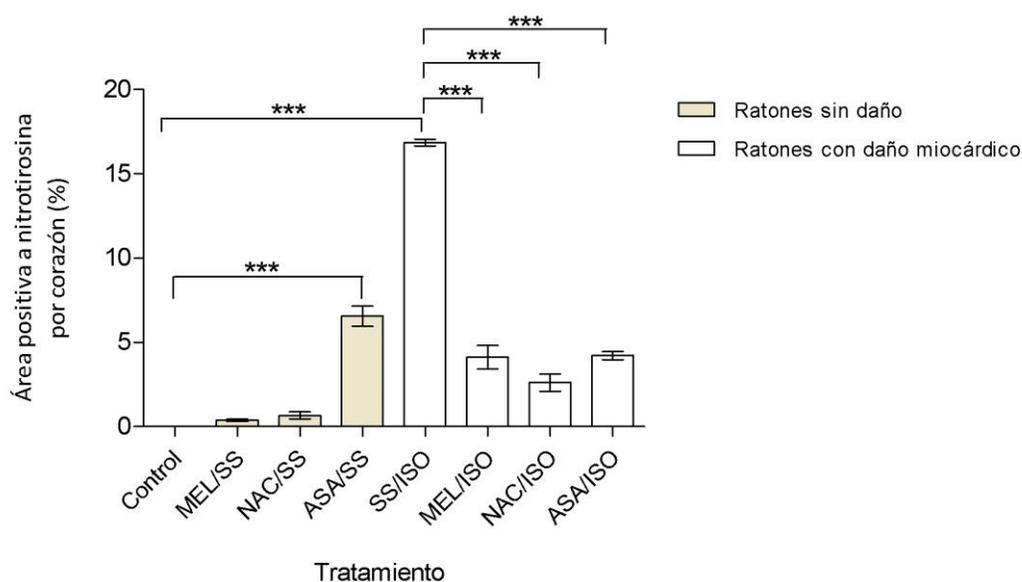


Fig. 19. Efecto de un antioxidante y un antiinflamatorio en comparación con la melatonina sobre el porcentaje de área positiva a 3-NT. El daño miocárdico se indujo mediante la administración de isoproterenol (ISO, 5  $\mu\text{g/g/día}$ , 7 días, s.c.) (Grupo SS/ISO). La melatonina (MEL) se administró durante 10 días (5  $\mu\text{g/g/día}$ , s.c.) (Grupo MEL/SS). El grupo MEL/ISO se trató con melatonina durante 3 días seguido de la coadministración por 7 días de MEL e ISO a las dosis y tiempos ya mencionados. El esquema de tratamiento con el antioxidante (N-acetilcisteína=NAC, 150  $\mu\text{g/g/día}$ , s.c) y el antiinflamatorio (aspirina=ASA, 50  $\mu\text{g/g/día}$ , s.c) fue igual al de la MEL. Cada grupo se integró de 5 animales. Datos en media  $\pm$  EE. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*

## **7. DISCUSIÓN.**

### **7.1. Daño miocárdico: Efecto de la melatonina.**

El uso de antioxidantes como potenciales protectores ante diversas situaciones de daño y/o estrés es una teoría que ha tenido un gran auge en los últimos años. Entre estos antioxidantes, uno que ha ganado fuerza como probable cardioprotector es la melatonina. Sin embargo, en la mayoría de los estudios se han empleado esquemas de inducción de daño de tipo agudo, lo cual no necesariamente refleja el daño inducido por la exposición repetida a situaciones de estrés que pueden desencadenar un infarto miocárdico y, a largo plazo, una insuficiencia cardiaca.

En el presente trabajo se encontró que, cuando el daño miocárdico es inducido con la administración repetida de isoproterenol, la melatonina puede atenuar algunos de los procesos asociados al mismo y a la remodelación miocárdica, tales como la fibrosis, la inflamación y el estrés oxidante, lo que corrobora estudios previos donde se propone a la melatonina como un cardioprotector. Uno de los principales parámetros descritos como evidencia de daño miocárdico es la hipertrofia ventricular (HV).

#### **7.1.1 Melatonina e hipertrofia ventricular.**

En nuestro estudio, y al igual que Paulis y cols. (2009) y Flood y cols. (2006), se encontró que la melatonina no previene el efecto del isoproterenol sobre la hipertrofia cardiaca. Se conoce que la estimulación adrenérgica con el isoproterenol incrementa la presión sistólica, hecho que se ha asociado con la incidencia de la hipertrofia ventricular (Verdecchia y cols., 2004). Sin embargo, diversos estudios han demostrado que la melatonina no previene o reduce tal incremento (Paulis y cols., 2009; Simko y cols., 2010), lo que podría explicar la falta de efecto de la indolamina sobre la HV, encontrado en el presente estudio.

Por otra parte, el que la melatonina no haya revertido la hipertrofia ventricular, no implica que otros marcadores de daño a diferentes niveles de organización celular no se vean modificados por la melatonina, tal y como se observó en nuestro estudio con los cambios en las fibras de colágeno. Uno de estos marcadores es la fibrosis, que a largo plazo modifica la función contráctil del tejido, alterando el bombeo y la irrigación sanguínea de otros tejidos y órganos (Diez y cols., 2001).

### **7.1.2. Melatonina y fibras de colágeno.**

Uno de los trabajos que demuestran las propiedades antifibrosas de la MEL es el de Paulis y cols. (2009). En este sentido, en nuestro trabajo se demostró que la melatonina disminuye las fibras de colágeno inducidas con el daño miocárdico.

Evidencias adicionales sobre el efecto antifibroso de la melatonina son los trabajos de Simko y col. (2010), quienes encontraron que, en un modelo de hipertensión arterial inducido por la combinación de la exposición continua de la luz y el L-NAME, la melatonina exógena revierte las concentraciones de hidroxiprolina cardiaca (marcador de fibrosis) producida por la hipertensión. Éstos autores también evaluaron los niveles miocárdicos del ARNm de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) y encontraron que el tratamiento con melatonina reduce los niveles del ARNm en relación a las ratas hipertensas, por lo que proponen que el mecanismo responsable del efecto antifibrótico de la melatonina podría estar relacionado con la ACE.

Otra posibilidad que explicaría el efecto antifibroso de la melatonina se relaciona con la inhibición de la proliferación de miofibroblastos, que son células estrechamente asociadas con la presencia de fibrosis y las responsables de la producción de colágena. Sin embargo, Drobnik y cols. (2008) demostraron que la melatonina no modifica la proliferación ni la muerte de los miofibroblastos cardiacos, aunque reduce la producción de la colágena y los glucosaminoglicanos. Lo anterior es importante ya que una de las alteraciones presentes

después de un infarto es la síntesis continua de colágena, así como su menor degradación, lo que conlleva a la formación de un tejido fibroso permanente y a algunas de las posteriores disfunciones funcionales del corazón (Dobaczewski y cols., 2010; Klingberg y cols., 2013; Wight y Potter-Perigo, 2011).

Otra explicación para sus efectos antifibrosos podría estar directamente relacionada con sus propiedades antioxidantes. Se ha reportado que los niveles elevados de las ROS y las RNS inducen la apoptosis y promueven la actividad de las metaloproteasas, las cuales pueden dirigir hacia un fenotipo fibroso (Maulik y cols., 1999; Siwik y Colucci, 2004), por lo que al reducir los niveles de las ROS y las RNS, se inhibiría la fibrosis.

Por otra parte, se conoce que la melatonina puede actuar sobre el sistema adrenérgico. Evidencias a favor de esta teoría son expuestas por Arvola y cols. (2006) quienes demostraron que la melatonina reduce el incremento en la fuerza de contracción de las papilas musculares del conejillo de Indias en respuesta al isoproterenol (agonista  $\beta$ -adrenérgico), y que tanto la inhibición de los receptores de melatonina como de la sintasa de oxido nítrico (NOS) revierte su efecto protector. Así como por Girouard y cols. (2003), quienes encontraron que en ratas hipertensas, la melatonina reduce la frecuencia cardiaca y la presión arterial en respuesta al isoproterenol, restablece las concentraciones en el plasma de la noradrenalina, así como la proporción de los receptores adrenérgicos  $\beta_1$  y  $\beta_2$  del corazón. Por lo que la administración de la melatonina podría estar atenuando el daño producto de la estimulación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos con el isoproterenol, lo que conllevaría a una menor presencia de fibrosis y/u otros marcadores de daño, como es la inflamación, la cual a su vez está relacionada con la producción de especies reactivas.

### **7.1.3. Melatonina e infiltrados celulares.**

Evidencias recientes que indican que la melatonina no solo es un antioxidante, sino que también puede modular los procesos inflamatorios (Drazen y cols., 2001; Mayo y cols., 2005; Reiter y cols., 2000; Veneroso y cols., 2009). En el presente estudio se encontró que en el ratón la melatonina disminuye los infiltrados celulares inducidos con la administración repetida del isoproterenol. Resultados similares han sido reportados por Sener y col. (2005) y Patel y cols. (2010); donde el primero encontró que la melatonina (10 mg/kg, i.p., administración pre (30 min) y post-operatoria (6 h)) disminuye la proporción de los infiltrados celulares (neutrófilos) en un modelo de daño miocárdico por sepsis en la rata. En tanto que el segundo reportó que la melatonina (10 mg/kg/día, i.p., 7 días) reduce la inflamación en un modelo de inducción de daño miocárdico con isoproterenol (150 mg/kg/día, 2 días, s.c.) en la rata.

Respecto a los probables mecanismos asociados a esta respuesta, Venoroso y cols. (2009) demostraron que en la rata, la melatonina reduce la inflamación inducida por el ejercicio al mediar la activación de distintas moléculas que tienen una participación clave en el proceso inflamatorio, tales como el NFkB, la COX-2, y citosinas como la TNF, la IL-1 y la IL-6. Aunque también existen reportes que indican que su efecto antiinflamatorio también está mediado por sus receptores de membrana, en especial el MT2 (Drazen y cols., 2001). Otra alternativa es que el efecto antiinflamatorio de esta indolamina sea consecuencia de sus propiedades antioxidantes, ya que se conoce que ciertas especies reactivas asociadas a la inflamación, como el radical hidroxil, el anión peroxinitrito y el ácido hipocloroso, pueden ser neutralizadas por la melatonina.

#### **7.1.4. Melatonina y estrés oxidante.**

En el presente estudio se demostró que el estrés oxidante, evidenciado por el incremento en 3-NT, en ratones con daño cardíaco inducido con 7 administraciones repetidas de isoproterenol se abate en presencia de la melatonina. Esto confirma las propiedades antioxidantes de la indolamina. Nuestros resultados corroboran estudios hechos en la rata tratadas con 2 administraciones de isoproterenol, donde la melatonina previene el daño miocárdico al aumentar los niveles de enzimas antioxidantes (GSH, SOD y catalasa) y disminuir la peroxidación lipídica, así como a su metabolito final, el MDA (Mukherjee y cols., 2010 y 2012; Patel y cols., 2010). De la misma manera, nuestros resultados concuerdan con los estudios hechos en el ratón por Chen y cols. (2003), quienes demuestran el papel cardioprotector de la melatonina al encontrar que ésta (una única administración de alguna de las siguientes dosis 33, 75, 150, 300 µg/kg i.p. (mejor dosis: 150 µg/Kg) disminuye el tamaño de la zona infartada y los niveles de malondialdehído (MDA), en tanto que aumenta los de GSH. Además de probar que este efecto se debe a sus propiedades antioxidantes y que es independiente del receptor MT1.

Con nuestro estudio también se puede inferir que la melatonina puede evitar la nitración de los residuos de tirosina de las proteínas. La importancia de este punto radica en que actualmente se conoce que la nitración no ocurre en todas las proteínas con residuos de tirosina y que también depende de la localización de la proteína (Greenacre & Ischiropoulos, 2001). Se ha reportado que en el corazón existe aproximadamente el 4% de las proteínas con residuos de tirosina, y solo un pequeño porcentaje de éstas sufren nitración (Kanski y cols., 2005). Entre las proteínas del tejido cardíaco que potencialmente pueden sufrir nitración están las relacionadas con la producción de energía por glucólisis u oxidación de ácidos grasos; las proteínas mitocondriales, como las porinas, relacionadas con la eficiencia metabólica y la integridad de la membrana; y las citosólicas, como la desmina, esencial para el mantenimiento de la integridad funcional y estructural del cardiomiocito. Resulta importante hacer notar que todas estas proteínas se han reportado como proteínas disfuncionales en

procesos patológicos, incluido el infarto al miocardio y el envejecimiento (Kanski y cols., 2005). Por lo que evitar la nitración de estas proteínas, también explica el carácter protector de la melatonina.

Por otro lado se conoce que la melatonina reduce el estrés oxidante al igual que la inflamación, y que un efecto podría ser consecuencia del otro, o que por el contrario podrían ser efectos sinérgicos.

## **7.2. Daño miocárdico: Efecto de la N-acetilcisteína y la aspirina**

Con el propósito de conocer si el potencial efecto “cardioprotector” de la melatonina podría estar regulando parte del proceso pro-/anti-oxidante, o bien se relaciona con un proceso inflamatorio, ambos ligados al daño cardiaco; en este trabajo se evaluó el efecto del pre-tratamiento con un antioxidante (N-acetilcisteína) así como con un antiinflamatorio (aspirina o ácido acetilsalicílico),

### **7.2.1. N-acetilcisteína, aspirina e hipertrofia ventricular**

Al igual que la melatonina, ni la N-acetilcisteína ni la aspirina disminuyó el efecto del isoproterenol sobre la hipertrofia ventricular. En contraste con nuestros resultados, previamente se ha demostrado que la NAC aminora la HV inducida con diferentes modelos de daño miocárdico, como son el bandeo aórtico en rata (NAC; 250 mg/kg, administración postoperatoria, p.o.) (Chiu y cols., 2012) y la ligación coronaria en rata (NAC; 1 g/kg, administración preoperatoria, p.o.) (Foltz y cols., 2012). En tanto que para la ASA se ha reportado que ésta puede revertir la HV inducida con angiotensina II (Muller y cols., 2001).

Una de las razones por la cual en nuestro estudio no se observó cambios en la HV pudiera estar relacionada con la dosis empleada. Se conoce que las especies reactivas participan en la vía de señalización de la hipertrofia, por lo que una dosis óptima revertiría la HV. En los

estudios mencionados en el párrafo anterior se emplearon dosis mayores y tiempos de administración más largos a lo utilizado en el presente estudio, lo que se podría ver reflejado en una mayor inactivación de especies reactivas y, por lo tanto, en la disminución del índice de hipertrofia.

Por otra parte, aún cuando se aumentara la dosis, se ha propuesto que la disminución en la presión es necesaria para revertir en mayor magnitud a la hipertrofia (Verdecchia y cols., 2004). Disminución que ni la melatonina (Paulis y cols., 2009; Simko y cols., 2010) ni la N-acetilcisteína (Foltz y cols., 2012) inducen, lo que contribuye a explicar la respuesta observada en nuestro estudio. En el caso de la aspirina, se ha reportado que su efecto sobre la presión es cronobiológico, donde la administración de noche genera una disminución, en tanto que de día, como fue en nuestro estudio, no se reportan diferencias de presión o, en algunos casos se reportan incrementos en ésta (Hermida y cols., 2003, 2005). Esto último explicaría el comportamiento del grupo tratado sólo con aspirina, el cual presentó índices de HV mayores al control, aunque no fueron diferentes estadísticamente.

Nuestros resultados sugieren que otros mecanismos no asociados al estrés oxidante y a la inflamación también son importantes durante y después del daño miocárdico, y que éstos deben de seguir siendo estudiados con el propósito de tener un mejor entendimiento de este tipo de alteraciones, lo que podría contribuir al diseño de tratamientos óptimos para prevenir o disminuir los efectos asociados al daño miocárdico.

### **7.2.2. N-acetilcisteína, aspirina y fibras de colágeno**

A diferencia de la HV, nuestros resultados mostraron que tanto la NAC como la ASA disminuyeron la fibrosis inducida con ISO, según lo cuantificado con la proporción de fibras de colágena. Esta disminución presentó mayor similitud entre los pre-co-tratamientos con MEL y NAC que entre MEL y ASA o NAC y ASA.

La disminución de fibrosis con el pretratamiento con NAC ha sido demostrada por Marian y cols. (2006) en un modelo animal (ratón) de una mutación relacionada a la cardiomiopatía hipertrófica humana. En tanto, el mismo efecto por parte de la aspirina se ha reportado por Muller y cols. (2001), quienes emplearon una dosis de 600 mg/Kg/día para reducir los niveles de la colágena tipo I en un modelo de daño cardíaco inducido con angiotensina II (ratas). Una objeción para emplear estas dosis, es que, podría ocasionar toxicidad gastrointestinal, insuficiencia renal y shock hemorrágico.

El efecto antifibroso de la NAC puede ser explicado en función de sus propiedades antioxidantes. Aunque también se ha demostrado que la NAC reduce la expresión de la colágena I y de TGF $\beta$  (Sugiura y cols., 2009), factores que se relacionan directamente con la fibrosis.

Mientras que en el caso de la aspirina, una estipulación es que la reducción de fibrosis sea una consecuencia de la disminución en la inflamación, ya que se produciría una menor cantidad de especies reactivas por parte de las mismas células inflamatorias y del mismo proceso de inflamación y por tanto habría una disminución de estímulos fibrosos. Otra opción es que se ha reportado que el tratamiento con esteroides y agentes anti-inflamatorios no esteroideos, como es la aspirina, retarda el depósito de fibras de colágena (Hammerman y cols., 1983; Mannisi y cols., 1987), lo que explicaría porque se cuantificó una menor proporción de fibrosis.

Considerando que el perfil de respuesta en este parámetro presentó mayor similitud entre los pre-co-tratamientos con MEL o NAC, entonces es probable que el efecto cardioprotector de la

melatonina esté dado principalmente por sus propiedades antioxidantes, asociadas a diferentes vías de señalización.

### **7.2.3. N-acetilcisteína, aspirina, estrés oxidante e infiltrados celulares**

Por último, la presencia de 3-NT y de infiltrados celulares fue atenuada con la administración de la N-acetilcisteína y de la aspirina, mostrando un patrón similar al de la melatonina. A diferencia de las FC, la disminución fue equiparable entre la ME, la NAC y la ASA.

Tanto la 3-NT como los infiltrados celulares son considerados como marcadores generales del estrés oxidante y de la inflamación presente, en nuestro caso, en el corazón, donde son importantes al participar durante y después del daño tal y como se menciona a continuación.

Se conoce que el daño miocárdico es seguido de un proceso de saneamiento, el cual es dividido por algunos autores en dos etapas: inflamación y reparación. En la primera fase hay degradación de la matriz extracelular, así como liberación de mediadores inflamatorios, como citocinas, TNF, MCP-1. En tanto, en la segunda hay incremento de la síntesis de la matriz extracelular, proliferación de fibroblastos y de células inflamatorias y liberación de citocinas asociadas al proceso de fibrosis. Como consecuencia de este proceso inflamatorio, se presenta un incremento de especies reactivas, generado principalmente por las células inflamatorias. De forma complementaria, las especies reactivas pueden estimular la activación de células del sistema inmune y del proceso inflamatorio mediante la activación de distintas proteínas como son NFkB (Gloire y cols., 2006) y AP-1 (proteína activadora 1) (Wu y cols., 2005). Lo que resulta en un ciclo donde la activación de un sistema, ya sea el de estrés oxidante o el inflamatorio, puede conllevar a la activación del otro; en tanto que al disminuir uno traería la consecuente disminución del otro.

Es este ciclo el que explica el comportamiento de la NAC y la ASA sobre el estrés oxidante y los infiltrados celulares asociados a la inflamación observados en el presente estudio. Por un lado, se conoce que la NAC es un precursor de la GSH y actúa como un antioxidante. Esto

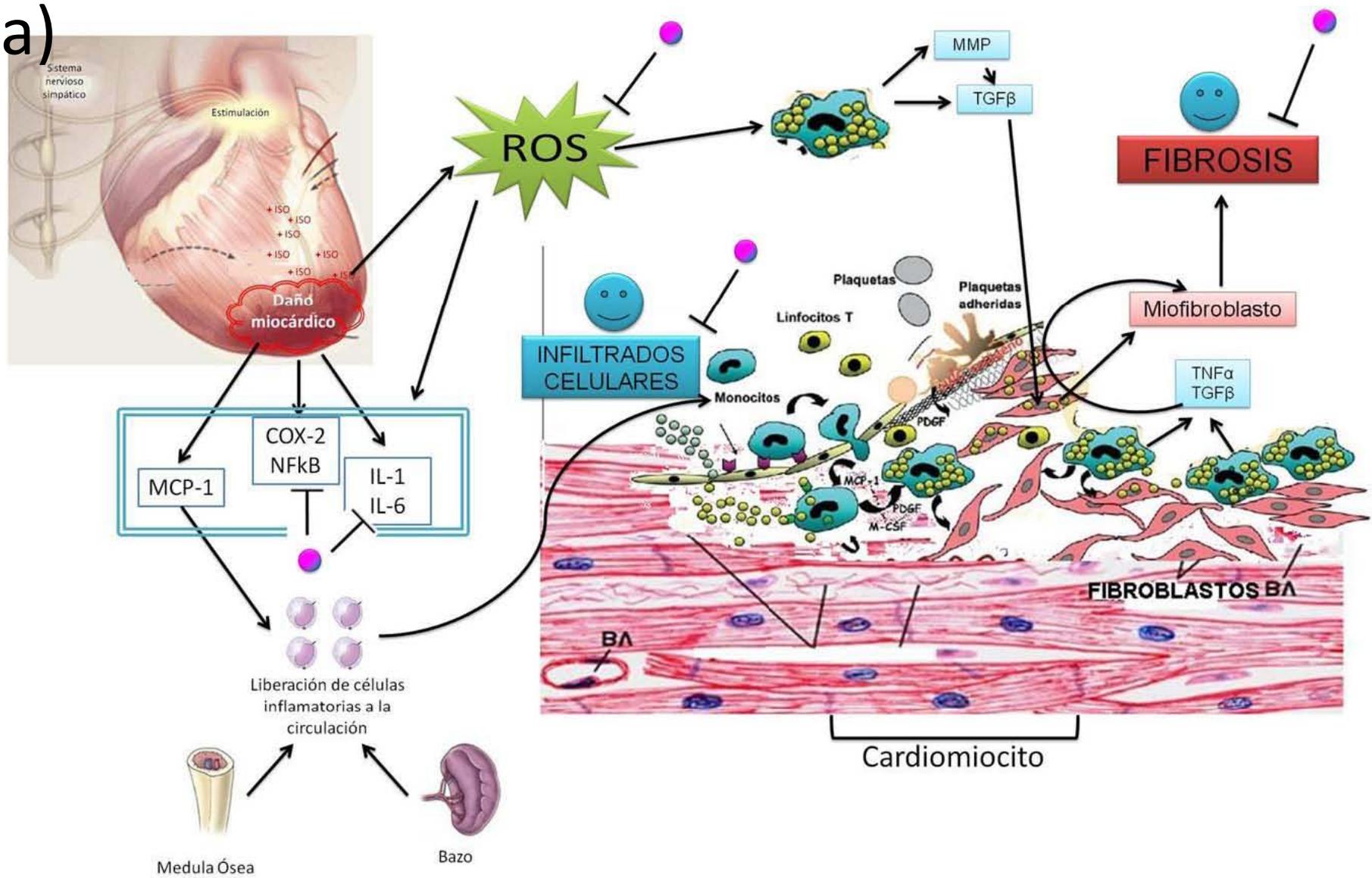
último se corroboró en nuestro estudio mediante la disminución en los niveles de 3-NT inducidos con ISO. Esta disminución implicaría una menor activación de células asociadas al sistema inmune, lo que se vería reflejado en una menor proporción de infiltrados celulares, tal y como se observó en el presente trabajo.

En el caso de la ASA, al ser un antiinflamatorio, podría atenuar la activación de células del sistema inmune ante el daño, lo que se vería reflejado en una menor liberación de especies reactivas por estas células, y, por lo tanto, los niveles de estrés oxidante disminuirían, lo que explicaría por qué la ASA disminuye tanto los niveles de infiltrados celulares como de estrés oxidante.

Un efecto no esperado de la administración sólo de aspirina, es que los niveles de estrés oxidante como los infiltrados celulares fueron mayores a los basales. En este sentido se ha reportado que la activación de citocinas pro- y anti-inflamatorias *in vitro* es dependiente de la concentración de aspirina empleada (Hartel y cols., 2004), además de que ésta tiene un efecto pro-oxidante inmediato a su administración intraperitoneal en cerebro de ratas envejecidas, lo que sugiere que el efecto de la aspirina podría estar asociado a la condición fisiológica y/o patológica de organismo (Calderón-Guzmán y cols., 2011).

En la Fig. 20 se muestra un esquema que integra la forma como podría darse la participación de la melatonina en la regulación de la inflamación y la fibrosis en asociación al estrés oxidativo, según los resultados obtenidos en la presente investigación.

a)



b)

# CARDIOMIOCITO:

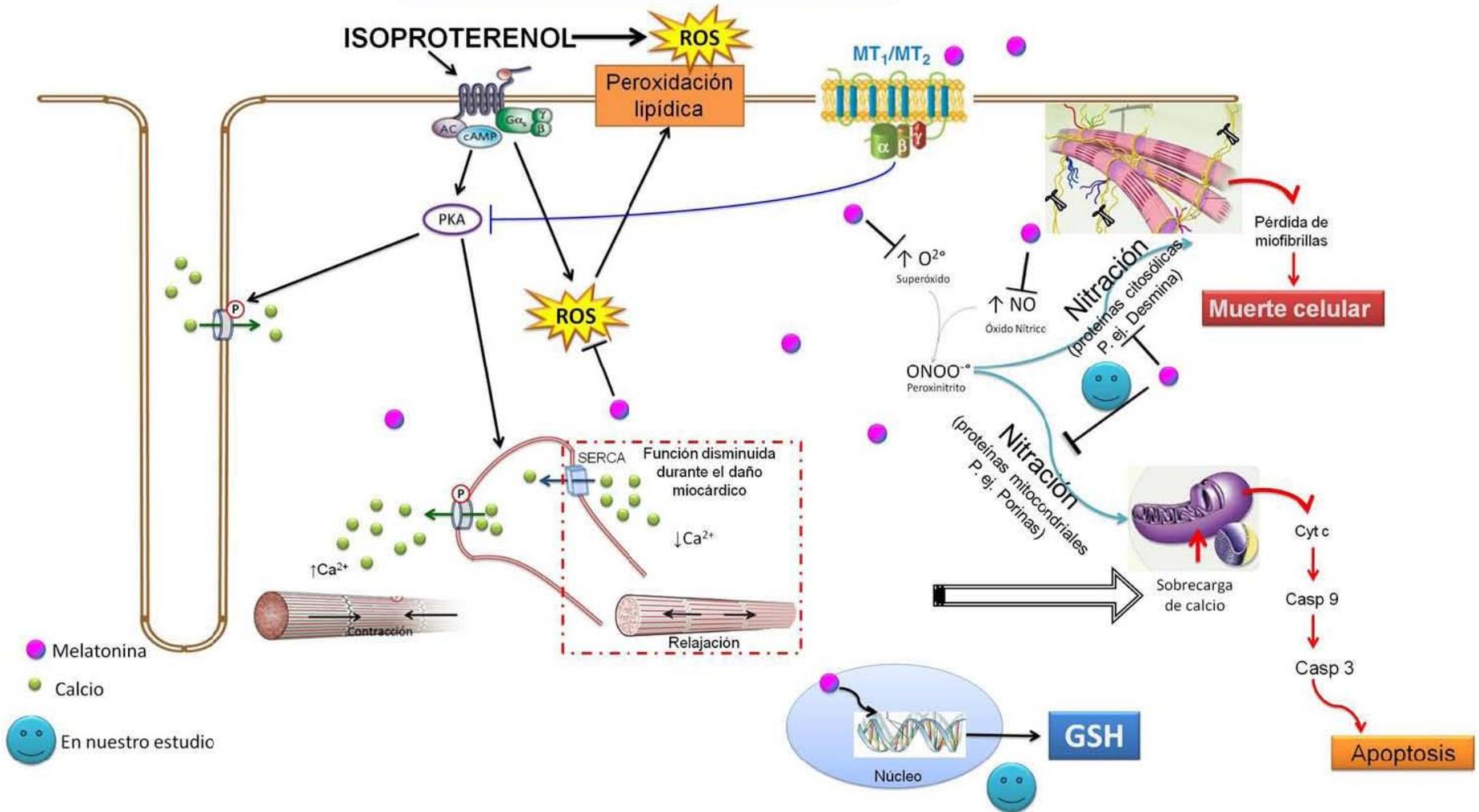


Fig. 20. Efecto de la melatonina sobre el daño miocárdico inducido con administraciones repetidas de isoproterenol. Una vez administrado el isoproterenol (ISO), se induce una respuesta inflamatoria en el tejido, así como la generación de especies reactivas (ROS), ya sea producto del daño o del metabolismo del ISO. En cualquier caso, se liberan factores que favorecen la conversión del fibroblasto a miofibroblasto, que es la célula responsable del proceso de fibrosis. Nuestros resultados 😊 indican que, con el esquema de daño empleado, la melatonina atenúa tanto la inflamación (infiltrados celulares) como el estrés oxidante. Dos procesos que se estimulan/abaten mutuamente. Como consecuencia, se observaría el incremento/disminución de la fibrosis (a). A nivel del cardiomiocito (b), el ISO activa a los receptores  $\beta$ -AR, lo que activa a la PKA y genera una sobrecarga de calcio. Esto altera la función mitocondrial, se libera el citocromo c (cyt c) y se puede inducir la apoptosis. Además el ISO genera ROS que pueden dañar a las proteínas, lípidos, y cualquier biomolécula. En nuestro estudio, la MEL abate las ROS y en específico se comprobó que abate las ROS. Lo anterior mantendría la integridad de las membranas mitocondriales y plasmáticas, con lo que se evitarían los procesos de muerte celular. Nuestros resultados con MEL y NAC sugieren que el mecanismo responsable de la cardioprotección está relacionado con sus propiedades antioxidantes, probablemente al aumentar la síntesis de la GSH. Al disminuir las especies reactivas o al mantener la integridad del cardiomiocito, se reduce o se evita que se desencadene la respuesta inflamatoria previamente mencionada, así como la fibrosis.

## 8. CONCLUSIÓN

Nuestros resultados indican que la MEL tiene un efecto cardioprotector ante las administraciones repetidas de ISO en ratón, al intervenir en por lo menos tres procesos asociados al daño miocárdico: el estrés oxidante, la inflamación y el daño a las proteínas por el estrés oxidante/nitrosante. En tanto que los resultados con MEL y NAC sugieren que el mecanismo responsable de la cardioprotección está relacionado con sus propiedades antioxidantes, probablemente al aumentar la síntesis de la GSH.

Por otra parte, nuestros resultados demuestran que existen otros mecanismos no asociados al estrés oxidante y a la inflamación que también son importantes durante el daño miocárdico, y que deben de seguir siendo estudiados con el propósito de tener un mejor entendimiento de este tipo de alteraciones, lo que podría contribuir al diseño de tratamientos óptimos para la prevención o disminución de los efectos asociados al daño miocárdico.

Finalmente, es fundamental continuar realizando estudios *in vivo*, ya que las respuestas observadas podrían ser modificadas dependiendo del estado fisiológico del organismo, como fue en el caso de la aspirina, cuya administración indujo daño miocárdico, pero durante una condición patológica, ésta tuvo un efecto protector parcial.

## 9. REFERENCIAS

Acikel M, Buyukokuroglu ME, Aksoy H, Erdogan F, Erol MK. *Protective effects of melatonin against myocardial injury induced by isoproterenol in rats*. J Pineal Res. 2003; 35:75-79.

Aman U, Hardik G, Balaraman R. Isoproterenol Induced Myocardial infarction: Protective role of natural products. J Pharmacol Toxicol. 2011; 6: 1-17.

Amore A, Formica M, Giacchino F, Gigliola G, Bonello F, Conti G, Camilla R, Coppo R. *N-Acetylcysteine in hemodialysis diabetic patients resets the activation of NF- $\kappa$ B in lymphomonocytes to normal values*. J Nephrol. [Article in press]

- Antón-Tay F, Ramírez G, Martínez I, Benítez-King G. In vitro stimulation of protein kinase C by melatonin. *Neurochem Res.* 1998; 23:601-606.
- Aragno M, Mastrocola R, Alloatti G, Vercellinatto I, Bardini P, Geuna S, Catalano MG, Danni O, Boccuzzi G. *Oxidative stress triggers cardiac fibrosis in the heart of diabetic rats.* *Endocrinology.* 2008; 149:380-388.
- Arvola L, Bertelsen E, Lochner A, Ytrehus K. *Sustained anti-beta-adrenergic effect of melatonin in guinea pig heart papillary muscle.* *Scand Cardiovasc J.* 2006; 40:37-42.
- Astra LI, Hammond R, Tarakji K, Stephenson LW. *Doxorubicin-induced canine CHF: advantages and disadvantages.* *J Card Surg.* 2003; 18:301-306.
- Aydemir S, Ozdemir I, Kart A. Role of exogenous melatonin on adriamycin-induced changes in the rat heart. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2010; 14:435-441.
- Babu GJ, Periasamy M. *Transgenic mouse models for cardiac dysfunction by a specific gene manipulation.* *Methods Mol Med.* 2005; 112:365-377.
- Balazs T, Ferrans VJ. *Cardiac lesions induced by chemicals.* *Environ Health Perspect.* 1978; 26:181-191.
- Becker-André M, André E, DeLamarter JF. *Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences.* *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 194:1371-1379.
- Benítez-King G, Huerto-Delgadillo L, Antón-Tay F. Binding of 3H-melatonin to calmodulin. *Life Sci.* 1993; 53:201-207.
- Benjamin IJ, Jalil JE, Tan LB, Cho K, Weber KT, Clark WA. *Isoproterenol-induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis.* *Circ Res.* 1989; 65:657-670.
- Bodi V, Sanchis J, Nunez J, Mainar L, Minana G, Benet I, Solano C, Chorro FJ, Llacer A. *Uncontrolled immune response in acute myocardial infarction: unraveling the thread.* *Am Heart J.* 2008; 156:1065-1073.
- Brugger P, Marktl W, Herold M. *Impaired nocturnal secretion of melatonin in coronary heart disease.* *Lancet.* 1995; 345:1408.
- Brum PC, Rolim NP, Bacurau AV, Medeiros A. *Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors.* *An Acad Bras Cienc.* 2006; 78:485-503.
- Brydon L, Petit L, Delagrangé P, Strosberg AD, Jockers R. *Functional expression of MT2 (Mel1b) melatonin receptors in human PAZ6 adipocytes.* *Endocrinology.* 2001; 142:4264-4271.

- Brydon L, Roka F, Petit L, de Coppet P, Tissot M, Barrett P, Morgan PJ, Nanoff C, Strosberg AD, Jockers R. *Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins*. Mol Endocrinol. 1999; 13:2025-2038.
- Bubenik GA, Konturek SJ. *Melatonin and aging: prospects for human treatment*. J Physiol Pharmacol. 2011; 62:13-19.
- Buermans HP, Redout EM, Schiel AE, Musters RJ, Zuidwijk M, Eijk PP, van Hardeveld C, Kasanmoentalib S, Visser FC, Ylstra B, Simonides WS. *Microarray analysis reveals pivotal divergent mRNA expression profiles early in the development of either compensated ventricular hypertrophy or heart failure*. Physiol Genomics. 2006; 27:156-170.
- Byrne JA, Grieve DJ, Cave AC, Shah AM. *Oxidative stress and heart failure*. Arch Mal Coeur. 2003; 96:214–221.
- Calderón-Guzmán D, Hernández-García E, Barragán-Mejía G, Santamaría ÁD, Juárez-Jacobo EA, Segura-Abarca ML. *Aspirin and taurine are pro-oxidants in brains of adult rats*. Arch Neurocienc 2011; 16:14-19.
- Cano-Martínez A, Vargas-González A, Guarner-Lans V, Prado-Zayago E. *Isoproterenol-produced damage in amphibian heart could be mediated by adrenergic receptors located in the heart muscle*. Proc West Pharmacol Soc. 2004; 47:63-66.
- Capsoni S, Viswanathan M, De Oliveira AM, Saavedra JM. *Characterization of melatonin receptors and signal transduction system in rat arteries forming the circle of Willis*. Endocrinology. 1994; 135:373-378.
- Carrillo-Vico A, Calvo JR, Abreu P, Lardone PJ, García-Mauriño S, Reiter RJ, Guerrero JM. *Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance*. FASEB J. 2004; 18:537-539.
- Chattoraj A, Liu T, Zhang LS, Huang Z, Borjigin J. *Melatonin formation in mammals: in vivo perspectives*. Rev Endocr Metab Disord. 2009; 10:237-243.
- Chen Z, Chua CC, Gao J, Chua KW, Ho YS, Hamdy RC, Chua BH. *Prevention of ischemia/reperfusion-induced cardiac apoptosis and injury by melatonin is independent of glutathione peroxidase 1*. J Pineal Res. 2009; 46:235-241.
- Chen Z, Chua CC, Gao J, Hamdy RC, Chua BH. *Protective effect of melatonin on myocardial infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003; 284:H1618–H1624.
- Chiung-Zuan C, Bao-Wei W, Kou-Gi S. *Atorvastatin, valsartan, and N-acetylcysteine prevent cardiac hypertrophy and overexpression of myocardin in pressure-overloaded rat heart*. Acta. Cardiol. Sin. 2012; 28:286-296.

Claustrat B, Brun J, Chazot G. *The basic physiology and pathophysiology of melatonin*. Sleep Med Rev. 2005; 9:11-24.

Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni JM. *Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells*. J Pineal Res. 2000; 28:193-202.

Cu A, Ye Q, Sarria R, Nakamura S, Guzman J, Costabel U. *N-acetylcysteine inhibits TNF-alpha, sTNFR, and TGF-beta1 release by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis in vitro*. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis. 2009; 26:147-154.

Cuesta E, Boada J, Perales JC, Roig T, Bermudez J. *Aspirin inhibits NF-kappaB activation in a glycolysis-depleted lung epithelial cell line*. Eur J Pharmacol. 2005; 517:158-164.

Dalla Libera L, Ravara B, Gobbo V, Danieli Betto D, Germinario E, Angelini A, Vescovo G. *Skeletal muscle myofibrillar protein oxidation in heart failure and the protective effect of Carvedilol*. J Mol Cell Cardiol. 2005; 38:803-807.

Das S, Powell SR, Wang P, Divald A, Nesaretnam K, Tosaki A, Cordis GA, Maulik N, Das DK. *Cardioprotection with palm tocotrienol: antioxidant activity of tocotrienol is linked with its ability to stabilize proteasomes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005; 289:H361-H367.

de Micheli A y Chávez E. *Consideraciones sobre el daño miocárdico por isquemia y reperfusión*. Arch Cardiol Mex. 2003; 73:284-290.

Delgado RM 3rd, Nawar MA, Zewail AM, Kar B, Vaughn WK, Wu KK, Aleksic N, Sivasubramanian N, McKay K, Mann DL, Willerson JT. *Cyclooxygenase-2 inhibitor treatment improves left ventricular function and mortality in a murine model of doxorubicin-induced heart failure*. Circulation. 2004; 109:1428-1433.

Dent MR, Singal T, Tappia PS, Sethi R, Dhalla NS. *β-Adrenoceptor-Linked Signal Transduction Mechanisms in Congestive Heart Failure* in Advances in Biochemistry in Health and Disease. Springer US. 2008.

Díaz-Muñoz M, Alvarez-Pérez MA, Yáñez L, Vidrio S, Martínez L, Rosas G, Yáñez M, Ramírez S, de Sánchez VC. *Correlation between oxidative stress and alteration of intracellular calcium handling in isoproterenol-induced myocardial infarction*. Mol Cell Biochem. 2006; 289:125-136.

Diez J, López B, González A, Ardanaz N, Fortuno MA. *Respuestas del miocardio al estrés biomecánico*. Rev Esp Cardiol 2001; 54: 507-515.

Dillmann WH. *Calcium regulatory proteins and their alteration by transgenic approaches*. Am J Cardiol. 1999; 83:H89-H91.

Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. *The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol. 2010; 48(3):504-511.

Dodd DA, Atkinson JB, Olson RD, Buck S, Cusack BJ, Fleischer S, Boucek RJ Jr. *Doxorubicin cardiomyopathy is associated with a decrease in calcium release channel of the sarcoplasmic reticulum in a chronic rabbit model*. J Clin Invest. 1993; 91:1697–1705.

Domínguez-Rodríguez A, Abreu-González P, García MJ, Sanchez J, Marrero F, de Armas-Trujillo D. *Decreased nocturnal melatonin levels during acute myocardial infarction*. J Pineal Res. 2002; 33:248–252.

Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Garcia-Gonzalez M, Ferrer-Hita J, Vargas M, Reiter RJ. *Elevated levels of oxidized low-density lipoprotein and impaired nocturnal synthesis of melatonin in patients with myocardial infarction*. Atherosclerosis. 2005; 180:101-105.

Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Sanchez-Sanchez JJ, Kaski JC, Reiter RJ. *Melatonin and circadian biology in human cardiovascular disease*. J Pineal Res. 2010; 49:14–22.

Drazen DL, Nelson RJ. *Melatonin receptor subtype MT2 (Mel 1b) and not mt1 (Mel 1a) is associated with melatonin-induced enhancement of cell-mediated and humoral immunity*. Neuroendocrinology. 2001; 74:178-184.

Drobnik J, Karbownik-Lewińska M, Szczepanowska A, Słotwińska D, Olczak S, Jakubowski L, Dabrowski R. *Regulatory influence of melatonin on collagen accumulation in the infarcted heart scar*. J Pineal Res. 2008; 45:285-290.

Dubocovich ML. *Melatonin receptors: are there multiple subtypes?* Trends Pharmacol Sci. 1995; 16:50-56.

Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS. *Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine*. Pharmacol Rev. 2004; 56:331-349.

Ekmekcioglu C, Thalhammer T, Humpeler S, Mehrabi MR, Glogar HD, Hölzenbein 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.

Elahi MM, Kong YX, Matata BM. *Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease*. Oxid Med Cell Longev. 2009; 2:259-269.

El-Demerdash E, Awad AS, Taha RM, El-Hady AM, Sayed-Ahmed MM. *Probucol attenuates oxidative stress and energy decline in isoproterenol-induced heart failure in rat*. Pharmacol Res. 2005; 51:311-318.

Ennis IL, Escudero EM, Console GM, Camihort G, Dumm CG, Seidler RW, Camili3n de Hurtado MC, Cingolani HE. *Regression of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger inhibition*. Hypertension. 2003; 41:1324-1329.

Fabritz L, Kirchhof P, Fortm3ller L, Auchampach JA, Baba HA, Breithardt G, Neumann J, Boknik P, Schmitz W. *Gene dose-dependent atrial arrhythmias, heart block, and brady-cardiomyopathy in mice overexpressing A(3) adenosine receptors*. Cardiovasc Res. 2004; 62:500-508.

Felton VM, Borok Z, Willis BC. *N-acetylcysteine inhibits alveolar epithelial-mesenchymal transition*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2009; 297:L805-L812.

Fern3ndez-Mara MI, Mateosb R, Garc3a-Parrillac MC, Puertasa B, Cantos-Villar E. *Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review*. Food Chemistry. 2012; 130:797–813.

Ferreira DB, Costa RS, De Oliveira JA, Muccillo G. *An infarct-like myocardial lesion experimentally induced in wistar rats with Africanized bee venom*. J Pathol. 1995; 177:95-102.

Flood EM, Kumar RS, Shah R, Amos Q, Wren JD, Shohet RV, Garner HR. *Melatonin administration does not affect isoproterenol-induced LVH*. IEEE Eng Med Biol Mag. 2006; 25:84-87.

Foltz WU, Wagner M, Rudakova E, Volk T. *N-acetylcysteine prevents electrical remodeling and attenuates cellular hypertrophy in epicardial myocytes of rats with ascending aortic stenosis*. Basic. Res. Cardiol. 2012; 107:290.

Forman BM, Chen J, Blumberg B, Kliewer SA, Henshaw R, Ong ES, Evans RM. *Cross-talk among ROR alpha 1 and the Rev-erb family of orphan nuclear receptors*. Mol Endocrinol. 1994; 8:1253-1261.

Fournier I, Ploye F, Cottet-Emard JM, Brun J, Claustrat B. *Folate deficiency alters melatonin secretion in rats*. J Nutr. 2002; 132:2781–2784.

Frangogiannis NG. *The immune system and cardiac repair*. Pharmacol Res. 2008; 58:88-111.

Gallegos RP, Rivard AL, Bianco RW. *Animal Models for Cardiac Research in Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology and Devices*. Humana Press, New Jersey. 2004.

Gauthaman KK, Saleem MT, Thanislas PT, Prabhu VV, Krishnamoorthy KK, Devaraj NS, Somasundaram JS. *Cardioprotective effect of the Hibiscus rosa sinensis flowers in an oxidative stress model of myocardial ischemic reperfusion injury in rat*. BMC Complement Altern Med. 2006; 20:6-32.

Giraldo A, Medell3n. *Role of oxidative and nitrosative stress in cardiac hypertrophy and ventricular remodeling*. Acta M3dica Colombiana. 2010; 35:82-95.

Girouard H, Chulak C, LeJossec M, Lamontagne D, de Champlain J. *Chronic antioxidant treatment improves sympathetic functions and beta-adrenergic pathway in the spontaneously hypertensive rats*. J Hypertens. 2003; 21:179-188.

Gitto E, Tan DX, Reiter RJ, Karbowsnik M, Manchester LC, Cuzzocrea S, Fulia F, Barberi I. *Individual and synergistic actions of melatonin: studies with vitamin E, vitamin C, glutathione and desferoxamine in liver homogenates*. J Pharm Pharmacol, 2001; 53:1393-1401.

Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. *NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later*. Biochem Pharmacol. 2006; 72:1493-1505.

Greenacre SA, Ischiropoulos H. *Tyrosine nitration: localization, quantification, consequences for protein function and signal transduction*. Free. Rad. Res. 2001; 34: 541-581.

Gross GJ, Lockwood SF. *Acute and chronic administration of disodium disuccinate astaxanthin (Cardax) produces marked cardioprotection in dog hearts*. Mol Cell Biochem. 2005; 272:221-227.

Guan Z, Lui CY, Morkin E, Bahl JJ. *Oxidative stress and apoptosis in cardiomyocyte induced by high-dose alcohol*. J Cardiovasc Pharmacol. 2004; 44(6):696-702.

Guerrero JM, Reiter RJ. *Melatonin-immune system relationships*. Curr Top Med Chem. 2002; 2:167–179.

Guo Z, Xia Z, Jiang J, McNeill JH. *Downregulation of NADPH oxidase, antioxidant enzymes, and inflammatory markers in the heart of streptozotocin-induced diabetic rats by N-acetyl-L-cysteine*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007; 292:H1728-H1736.

Gupta SK, Mohanty I, Talwar KK, Dinda A, Joshi S, Bansal P, Saxena A, Arya DS. *Cardioprotection from ischemia and reperfusion injury by Withania somnifera: a hemodynamic, biochemical and histopathological assessment*. Mol Cell Biochem. 2004; 260:39-47.

Hardeland R, Poeggeler B. *Actions of melatonin, its structural and functional analogs in the central nervous system and the significance of metabolism*. Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem. 2007; 7:289–303.

Härtel C, von Puttkamer J, Gallner F, Strunk T, Schultz C. *Dose-dependent immunomodulatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in human whole blood: potential role of cyclooxygenase-2 inhibition*. Scand J Immunol. 2004; 60:412-420.

Heineke J, Molkenkin JD. *Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006; 7:589-600.

Hermida RC, Ayala DE, Calvo C, López JE, Fernández JR, Mojón A, Domínguez MJ, Covelo M. *Administration time-dependent effects of aspirin on blood pressure in untreated hypertensive patients*. Hypertension. 2003; 41:1259-1267.

Hermida RC, Ayala DE, Calvo C, López JE, Mojón A, Rodríguez M, Fernández JR. *Differing administration time-dependent effects of aspirin on blood pressure in dipper and non-dipper hypertensives*. Hypertension. 2005; 46:1060-1068.

Inserte J, Taimor G, Hofstaetter B, Garcia-Dorado D, Piper HM. *Influence of simulated ischemia on apoptosis induction by oxidative stress in adult cardiomyocytes of rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000; 278:H94-H99.

Iuvone PM, Chong NW, Bernard M, Brown AD, Thomas KB, Klein DC. *Melatonin biosynthesis in chicken retina. Regulation of tryptophan hydroxylase and arylalkylamine N-acetyltransferase*. Adv Exp Med Biol. 1999; 460:31-41.

Jensen JA, Kosek JC, Hunt TK, Goodson WH 3rd, Miller DC. *Cardiac cryolesions as an experimental model of myocardial wound healing*. Ann Surg. 1987; 206:798-803.

Jetten AM, Kurebayashi S, Ueda E. *The ROR nuclear orphan receptor subfamily: critical regulators of multiple biological processes*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 2001; 69:205-247.

Jimenez-Jorge S, Guerrero JM, Jimenez-Caliani AJ, Naranjo MC, Lardone PJ, Carrillo-Vico A, Osuna C, Molinero P. *Evidence for melatonin synthesis in the rat brain during development*. J Pineal Res. 2007; 42:240-246.

Kahn DS, Rona G, Chappel CI. *Isoproterenol-induced cardiac necrosis*. Ann N Y Acad Sci. 1969; 156:285-293.

Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P. *Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats*. Lab Invest. 1996; 74:86-107.

Kalonia H, Kumar A. *Protective effect of melatonin on certain behavioral and biochemical alterations induced by sleep-deprivation in mice*. Indian J Pharmacol. 2007; 39:48-51.

Kanski J, Behring A, Pelling J, Schöneich C. *Proteomic identification of 3-nitrotyrosine-containing rat cardiac proteins: effects of biological aging*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005; 288:H371-H381.

Klaassen y Watkins. *Casarett and Doull's Essentials of Toxicology*. McGraw-Hill Interamericana. 2005.

Klingberg F, Hinz B, White ES. *The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis*. J Pathol. 2013; 229:298-309.

Klocke R, Tian W, Kuhlmann MT, Nikol S. *Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease*. Cardiovasc Res. 2007; 74:29-38.

Kopp E, Ghosh S. *Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin*. Science. 1994; 265:956-959.

Kung HF, Blau M. *Subcutaneous isoproterenol: a convenient rat model for early detection of myocardial necrosis*. J Nucl Med. 1978; 19:948-951.

Lahiri DK, Davis D, Nurnberger JI, Jr. *Detection of specific protein bands with melatonin-like immunoreactivity in different cell lines and human brain regions*. IUBMB Life. 1999; 48:127-132.

Lee YM, Chen HR, Hsiao G, Sheu JR, Wang JJ, Yen MH. *Protective effects of melatonin on myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo*. J Pineal Res. 2002; 33:72-80.

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.

Lombardi R, Rodriguez G, Chen SN, Ripplinger CM, Li W, Chen J, Willerson JT, Betocchi S, Wickline SA, Efimov IR, Marian AJ. *Resolution of established cardiac hypertrophy and fibrosis and prevention of systolic dysfunction in a transgenic rabbit model of human cardiomyopathy through thiol-sensitive mechanisms*. Circulation. 2009; 119:1398-1407.

Lopez-Burillo S, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Manchester LC, Reiter RJ. *Melatonin, xanthurenic acid, resveratrol, EGCG, vitamin C and alpha-lipoic acid differentially reduce oxidative DNA damage induced by Fenton reagents: a study of their individual and synergistic actions*. J Pineal Res. 2003; 34:269-277.

Luboshitzky R, Ophir U, Nave R, Epstein R, Shen-Orr Z, Herer P. *The effect of pyridoxine administration on melatonin secretion in normal men*. Neuroendocrinol Lett. 2002; 23:213-217.

Marian AJ, Senthil V, Chen SN, Lombardi R. *Antifibrotic effects of antioxidant N-acetylcysteine in a mouse model of human hypertrophic cardiomyopathy mutation*. J Am Coll Cardiol. 2006; 47:827-834.

Massie BM. *Aspirin use in chronic heart failure: what should we recommend to the practitioner?* J Am Coll Cardiol. 2005; 46:963-966.

Maulik N, Engelman RM, Rousou JA, Flack JE 3rd, Deaton D, Das DK. *Ischemic preconditioning reduces apoptosis by upregulating anti-death gene Bcl-2*. Circulation. 1999; 100:II369-II375.

Maulik SK, Kumar S. *Oxidative stress and cardiac hypertrophy: a review*. Toxicol Mech Methods. 2012; 22:359-366.

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.

Mei J, Zhu J, Ding F, Bao C, Wu S. *N-acetylcysteine improves early cardiac isograft function in a rat heterotopic transplantation model.* Transplant Proc. 2009; 41:3632-3636.

Morgan PJ, Barrett P, Howell HE, Helliwell R. *Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance.* Neurochem Int. 1994; 24:101-146.

Muders F, Elsner D. *Animal models of chronic heart failure.* Pharmacol Res. 2000; 41:605-612.

Mukherjee D, Ghosh AK, Bandyopadhyay A, Basu A, Datta S, Pattari SK, Reiter RJ, Bandyopadhyay D. *Melatonin protects against isoproterenol-induced alterations in cardiac mitochondrial energy-metabolizing enzymes, apoptotic proteins, and assists in complete recovery from myocardial injury in rats.* J Pineal Res. 2012; 53:166-179.

Mukherjee D, Roy SG, Bandyopadhyay A, Chattopadhyay A, Basu A, Mitra E, Ghosh AK, Reiter RJ, Bandyopadhyay D. *Melatonin protects against isoproterenol-induced myocardial injury in the rat: antioxidative mechanisms.* J Pineal Res. 2010; 48:251-262.

Muller DN, Heissmeyer V, Dechend R, Hampich F, Park JK, Fiebeler A, Shagdarsuren E, Theuer J, Elger M, Pilz B, Breu V, Schroer K, Ganten D, Dietz R, Haller H, Scheidereit C, Luft FC. *Aspirin inhibits NF-kappaB and protects from angiotensin II-induced organ damage.* FASEB J. 2001; 15:1822-1824.

Naji L, Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Calvo JR. *Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs.* Life Sci. 2004; 74:2227-2236.

Naranjo MC, Guerrero JM, Rubio A, Lardone PJ, Carrillo-Vico A, Carrascosa-Salmoral MP, Jiménez-Jorge S, Arellano MV, Leal-Noval SR, Leal M, Lissen E, Molinero P. *Melatonin biosynthesis in the thymus of humans and rats.* Cell Mol Life Sci. 2007; 64:781-790.

Nelson CS, Marino JL, Allen CN. *Melatonin receptors activate heteromeric G-protein coupled Kir3 channels.* Neuroreport. 1996; 7:717-720.

Noronha-Dutra AA, Steen EM, Woolf N. *The early changes induced by isoproterenol in the endocardium and adjacent myocardium.* Am J Pathol. 1984; 114:231-239.

Ogino K, Wang DH. *Biomarkers of oxidative/nitrosative stress: an approach to disease prevention.* Acta Med Okayama. 2007; 61:181-189.

Ozturk M, Ozler M, Kurt YG, Ozturk B, Uysal B, Ersoz N, Yasar M, Demirbas S, Kurt B, Acikel C, Oztas Y, Arpaci F, Topal T, Ozet A, Ataergin S, Kuzhan O, Oter S, Korkmaz A. *Efficacy of melatonin, mercaptoethylguanidine and 1400W in doxorubicin- and trastuzumab-induced cardiotoxicity.* J Pineal Res. 2011; 50:89-96.

Pacher P, Schulz R, Liaudet L, Szabó C. *Nitrosative stress and pharmacological modulation of heart failure.* Trends Pharmacol Sci. 2005; 26:302-310.

Pang CS, Brown GM, Tang PL, Cheng KM, Pang SF. *2-[125I]iodomelatonin binding sites in the lung and heart: a link between the photoperiodic signal, melatonin, and the cardiopulmonary system.* Biol Signals. 1993; 2:228-236.

Patel V, Upaganlawar A, Zalawadia R, Balaraman R. *Cardioprotective effect of melatonin against isoproterenol induced myocardial infarction in rats: A biochemical, electrocardiographic and histoarchitectural evaluation.* Eur J Pharmacol. 2010; 644:160-168.

Paterson JR, Lawrence JR. *Salicylic acid: a link between aspirin, diet and the prevention of colorectal cancer.* QJM. 2001; 94:445-448.

Paulis L, Pechanova O, Zicha J, Krajcirovicova K, Barta A, Pelouch V, Adamcova M, Simko F. *Melatonin prevents fibrosis but not hypertrophy development in the left ventricle of NG-nitro-L-arginine-methyl ester hypertensive rats.* J Hypertens Suppl. 2009; 27:S11-S16.

Peng YW, Buller CL, Charpie JR. *Impact of N-acetylcysteine on neonatal cardiomyocyte ischemia-reperfusion injury.* Pediatr Res. 2011; 70:61-66.

Persoon-Rothert M, van der Valk-Kokshoorn EJ, Egas-Kenniphaas JM, Mauve I, van der Laarse A. *Isoproterenol-induced cytotoxicity in neonatal rat heart cell cultures is mediated by free radical formation.* J Mol Cell Cardiol. 1989; 21:1285-1291.

Petrosillo G, Colantuono G, Moro N, Ruggiero FM, Tiravanti E, Di Venosa N, Fiore T, Paradies G. *Melatonin protects against heart ischemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009; 297:H1487-H1493.

Petzold T, Feindt P, Menger MD, Gams E. *Beta-adrenoceptor inhibition for induction of acute cardiac failure in pigs.* Lab Anim. 1999; 33:366-371.

Pinelli A, Trivulzio S, Tomasoni L, Brenna S, Bonacina E, Accinni R. *Isoproterenol-induced myocardial infarction in rabbits. Protection by propranolol or labetalol: a proposed non-invasive procedure.* Eur J Pharm Sci. 2004; 23:277-285.

Potenza MA, Marasciulo FL, Tarquinio M, Tiravanti E, Colantuono G, Federici A, Kim JA, Quon MJ, Montagnani M. *EGCG, a green tea polyphenol, improves endothelial function and insulin sensitivity, reduces blood pressure, and protects against myocardial I/R injury in SHR*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007; 292:E1378–E1387.

Raghavendra V, Agrewala JN, Kulkarni SK. *Melatonin reversal of lipopolysaccharides-induced thermal and behavioral hyperalgesia in mice*. *Eur J Pharmacol*. 2000; 395:15-21.

Rathore N, John S, Kale M, Bhatnagar D. *Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in isoproterenol induced oxidative stress in rat tissues*. *Pharmacol Res*. 1998; 38:297-303.

Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX. *Melatonin and its relation to the immune system and inflammation*. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 917:376-86.

Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Pilar Terron M, Flores LJ, Koppisepi S. *Medical implications of melatonin: receptor-mediated and receptor-independent actions*. *Adv Med Sci*. 2007; 52:11-28.

Reiter RJ. *Neuroendocrine effects of light*. *Int J Biometeorol*. 1991; 35:169-175.

Ren G, Dewald O, Frangogiannis NG. *Inflammatory mechanisms in myocardial infarction*. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2003; 2:242-256.

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.

Reppert SM, Weaver DR, Godson C. *Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes*. *Trends Pharmacol Sci*. 1996; 17:100-102.

Ribelayga C, Pevet P, Simonneaux V. *HIOMT drives the photoperiodic change in the amplitude of the melatonin peak in the Siberian hamster*. *Am J Physiol* 2000; 278:R1339-R1345.

Rona G, Chappel CI, Balazs T, Gaudry R. *An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat*. *AMA Arch Pathol*. 1949; 67:443-455.

Rona G, Zsoter T, Chappel C, Gaudry R. *Myocardial lesions, circulatory and electrocardiographic changes produced by isoproterenol in the dog*. *Rev Can Biol*. 1959; 18:83-94.

Rosa EF, Silva AC, Ihara SS, Mora OA, Aboulafia J, Nouailhetas VL. *Habitual exercise program protects murine intestinal, skeletal, and cardiac muscles against aging*. *J Appl Physiol*. 2005; 99:1569-1575.

Rozec B, Gauthier C.  *$\beta$ 3-Adrenoceptors in the cardiovascular system: Putative roles in human pathologies*. *Pharmacology & Therapeutics*. 2006; 111:652-673.

Sakaguchi G, Sakakibara Y, Tambara K, Lu F, Premaratne G, Nishimura K, Komeda M. *A pig model of chronic heart failure by intracoronary embolization with gelatin sponge*. Ann Thorac Surg. 2003; 75:1942-1947.

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.

Sanz-Rosa D. *Los receptores  $\beta$  adrenérgicos en la enfermedad cardiovascular*. Hipertens riesgo vasc. 2011; 28:55-62.

SAOB: Sociedad de Anestesiología del Oeste Bonaerense. 2006.  
<http://www.saob.org.ar/index.php?operation=view&node=208>

Saroff J, Wexler BC. *Isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. Distribution of corticosterone*. Circ Res. 1970; 27:1101-1109.

Sato N, Ueno T, Kubo K, Suzuki T, Tsukimura N, Att W, Yamada M, Hori N, Maeda H, Ogawa T. *N-Acetyl cysteine (NAC) inhibits proliferation, collagen gene transcription, and redox stress in rat palatal mucosal cells*. Dent Mater. 2009; 25:1532-1540.

Sener G, Toklu H, Kapucu C, Ercan F, Erkanli G, Kaçmaz A, Tilki M, Yeğen BC. *Melatonin protects against oxidative organ injury in a rat model of sepsis*. Surg Today. 2005; 35:52-59.

Shang F, Wang J, Liu X, Li J, Zheng Q, Xue Y, Zhao L. *Involvement of reactive oxygen species and JNK in increased expression of MCP-1 and infiltration of inflammatory cells in pressure-overloaded rat hearts*. Mol Med Report. 2012; 5:1491-1496.

Shenoy SK, Rockman HA. *Cardiovascular biology: heart fails without pump partner*. Nature. 2011; 477:546-547.

Shiomi M, Ito T, Yamada S, Kawashima S, Fan J. *Development of an animal model for spontaneous myocardial infarction (WHHLMI rabbit)*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003; 23:1239-1244.

Simko F, Pechanova O, Pelouch V, Krajcirovicova K, Celec P, Palffy R, Bednarova K, Vrankova S, Adamcova M, Paulis L. *Continuous light and L-NAME-induced left ventricular remodelling: different protection with melatonin and captopril*. J Hypertens. 2010; 28:S13-S18.

Siwik DA, Colucci WS. *Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium*. Heart Fail Rev. 2004; 9:43-51.

Sochman J. *N-acetylcysteine in acute cardiology: 10 years later: what do we know and what would we like to know?* J Am Coll Cardiol. 2002; 39:1422-1428.

Sugiura H, Ichikawa T, Liu X, Kobayashi T, Wang XQ, Kawasaki S, Togo S, Kamio K, Mao L, Ann Y, Ichinose M, Rennard SI. *N-acetyl-L-cysteine inhibits TGF-beta1-induced profibrotic responses in fibroblasts*. Pulm Pharmacol Ther. 2009; 22:487-491.

Sun Y, Zhang J, Lu L, Chen SS, Quinn MT, Weber KT. *Aldosterone-induced inflammation in the rat heart : role of oxidative stress*. Am J Pathol. 2002; 161:1773-1781.

Tan DX, Manchester LC, Hardeland R, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM, Reiter RJ. *Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin*. J Pineal Res 2003; 34:75–78.

Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. *One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species?* J Pineal Res. 2007; 42:28-42.

Van Vleet JF, Ferrans VJ. *Myocardial diseases of animals*. Am J Pathol. 1986; 124:98-178

Veneroso C, Tuñón MJ, González-Gallego J, Collado PS. *Melatonin reduces cardiac inflammatory injury induced by acute exercise*. J Pineal Res. 2009; 47:184-191.

Verdecchia P, Angeli F, Gattobigio R, Guerrieri M, Benemio G, Porcellati C. *Does the reduction in systolic blood pressure alone explain the regression of left ventricular hypertrophy?* J Hum Hypertens. 2004; 18:S23-S28.

Von Gall C, Stehle JH, Weaver DR. *Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction*. Cell Tissue Res. 2002; 309:151-162.

Wang J, Bo H, Meng X, Wu Y, Bao Y, Li Y. *A simple and fast experimental model of myocardial infarction in the mouse*. Tex Heart Inst J. 2006; 33:290-293.

Wexler, BC, y Kittinger, GW. *Myocardial necrosis in rats: serum enzymes, adrenal steroid and histopathological alterations*. Circ Res. 1963; 13:159-171.

Wiechmann AF, Campbell LD, Defoe DM. *Melatonin receptor RNA expression in Xenopus retina*. Brain Res Mol Brain Res. 1999; 63:297-303.

Wight TN, Potter-Perigo S. *The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis?* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2011; 301:G950-G955.

Wu S, Gao J, Ohlemeyer C, Roos D, Niessen H, Köttgen E, Gessner R. *Activation of AP-1 through reactive oxygen species by angiotensin II in rat cardiomyocytes*. Free Radic Biol Med. 2005; 39:1601-1610.

Xia Z, Kuo KH, Nagareddy PR, Wang F, Guo Z, Guo T, Jiang J, McNeill JH. *N-acetylcysteine attenuates PKCbeta2 overexpression and myocardial hypertrophy in streptozotocin-induced diabetic rats*. Cardiovasc Res. 2007; 73:770-782.

- Xiao RP, Zhu W, Zheng M, Cao C, Zhang Y, Lakatta EG, Han Q. *Subtype-specific alpha1- and beta-adrenoceptor signaling in the heart*. Trends Pharmacol Sci. 2006; 27:330-337.
- Xiao RP, Zhu W, Zheng M, Chakir K, Bond R, Lakatta EG, Cheng H. *Subtype-specific beta-adrenoreceptor signaling pathways in the heart and their potential clinical implications*. Trends Pharmacol Sci. 2004; 25:358-365.
- 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.
- Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB. *The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta*. Nature. 1998; 396:77-80.
- Yoshida K, Kim-Mitsuyama S, Wake R, Izumiya Y, Izumi Y, Yukimura T, Ueda M, Yoshiyama M, Iwao H. *Excess aldosterone under normal salt diet induces cardiac hypertrophy and infiltration via oxidative stress*. Hypertens Res. 2005; 28:447-455.
- Zhang GX, Kimura S, Nishiyama A, Shokoji T, Rahman M, Yao L, Nagai Y, Fujisawa Y, Miyatake A, Abe Y. *Cardiac oxidative stress in acute and chronic isoproterenol-infused rats*. Cardiovasc Res. 2005; 65:230-238.
- Zhang J, Fang NY, Gao PJ, Wu LY, Han WQ, Guo SJ, Shen WL, Zhu DL. *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists attenuate angiotensin II-induced collagen type I expression in adventitial fibroblasts*. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2008; 35:72-77.
- Zhao W, Zhao T, Chen Y, Ahokas RA, Sun Y. *Oxidative stress mediates cardiac fibrosis by enhancing transforming growth factor-beta1 in hypertensive rats*. Mol Cell Biochem. 2008; 317:43-50.
- Zhu W, Shou W, Payne RM, Caldwell R, Field LJ. *A mouse model for juvenile doxorubicin-induced cardiac dysfunction*. Pediatr Res. 2008; 64:488-494.
- Zimmermann RC, McDougle CJ, Schumacher M, Olcese J, Mason JW, Heninger GR, Price LH. *Effects of acute tryptophan depletion on nocturnal melatonin secretion in humans*. J Clin Endocrinol Metab. 1993; 76:1160-1164.
- Zornoff LAM, Paiva SAR, Duarte DR, Spadaro J. *Remodelación Ventricular Postinfarto de Miocardio: Conceptos e Implicaciones Clínicas*. Arq Bras Cardiol. 2007; 88:134-143.