



UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO

TESIS DE DOCTORADO

**PROTECCIÓN CARDIOVASCULAR AGUDA Y CRÓNICA CON
MELATONINA EN MODELOS EXPERIMENTALES MURINOS**

Tesista: **Med. Natalia Jorgelina Prado**

Director: Dr. Roberto Miguel Miatello

Codirector: Dr. Emiliano Raúl Diez

Mendoza, 22 de Julio de 2019



UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

TESIS DE DOCTORADO

**PROTECCIÓN CARDIOVASCULAR AGUDA Y CRÓNICA CON
MELATONINA EN MODELOS EXPERIMENTALES MURINOS**

DOCTORADO EN MEDICINA

Tesista: **Med. Natalia Jorgelina Prado**

Director: Dr. Roberto Miguel Miatello

Codirector: Dr. Emiliano Raúl Diez

Mendoza, 22 de Julio de 2019

Agradecimientos

A todas aquellas personas que con su pequeño o gran aporte han contribuido para que esta tesis pudiera concluirse.

A mi familia y amigas.

A los Doctores Roberto Miatello y Emiliano Diez por dirigirme en el camino hacia mi doctorado.

A la Dra Amira Ponce Zumino por crear y mantener un espacio de investigación en Electrofisiología Cardíaca.

A la Lic Adriana Carrión por su amistad, colaboración y consejos.

A las compañeras y compañeros de trabajo, por los intercambios y el optimismo

A los becarios y estudiantes que nos acompañan día a día en el Laboratorio.

A los distintos Laboratorios con los que colaboramos, en especial, los dirigidos por Dra. Narcisa Tribulova, de Eslovaquia; Dra Ksenia Sedova, de Rusia y el Dr. Walter Manucha, de FCM de UNCuyo.

A la querida Facultad de Ciencias Médicas y a la Universidad Nacional de Cuyo, que me acunan desde el preuniversitario.

Al IMBECU y a la comunidad científica, por permitirme ser parte de Ustedes.

Al CONICET por la beca que financió mi trabajo de tesis doctoral.

Índice de contenidos

Agradecimientos	3
Índice de contenidos	4
Resumen de la tesis	6
Capítulo I - Estado actual del conocimiento sobre el tema	7
De las enfermedades cardiovasculares a las arritmias.....	8
Las arritmias de reperfusión.	9
Los mecanismos de las arritmias por isquemia/reperfusión.....	10
Cambios electrofisiológicos durante la isquemia	10
Cambios electrofisiológicos durante la reperfusión	12
Papel del estrés oxidativo en la isquemia/reperfusión	15
La melatonina como agente protector.....	17
Un antioxidante especial	19
Potencial antiarrítmico atípico	22
La respuesta la melatonina crónica en modelos con mayor arritmogénesis.....	23
Capítulo II - Hipótesis y Objetivos	25
Hipótesis	27
Objetivos	27
Generales	27
Específicos	27
Capítulo III - Materiales y Métodos Generales	28
Animales.....	30
Modelos experimentales murinos	30
Arritmias en corazones aislados de rata.....	30
Electrocardiograma y ecocardiograma.	30
Variables electrofisiológicas en corazones aislados.....	31
Peso, parámetros bioquímicos.....	31
Inmunofluorescencia y westernblot de conexina 43, NFκB y vCAM.....	31
Cambios estructurales cardiovasculares	31
Determinaciones de Estrés Oxidativo	32
Análisis estadístico.....	32
Capítulo IV - CARDIOPROTECCIÓN AGUDA	33
Generación exógena de radicales libres	34
Hipocalemia, comunicación intercelular y repolarización	40
Mecanismos antiarrítmicos durante la reperfusión en corazones aislados.....	62
Mecanismos antiarrítmicos durante la reperfusión en corazones in situ de ratas hembras.	71
CAPÍTULO V - CARDIOPROTECCIÓN CRÓNICA	85
Ganglionectomía cervical superior	86
Cardioprotección en ratas SHR.....	90
Cardioprotección en ratas con nefropatía	92
Capítulo VI Conclusión general	107

Referencias bibliográficas 109

Resumen de la tesis

Las arritmias ventriculares son complicaciones frecuentes durante la reperfusión de los síndromes coronarios agudos y pueden ser letales. El objetivo general de esta tesis fue demostrar los efectos cardioprotectores agudos y crónicos de la melatonina frente a la injuria por isquemia/reperfusión en modelos murinos. Se evaluó su efectividad frente a tres componentes de la injuria miocárdica aguda: el estrés oxidativo, la hipocalcemia y la isquemia/reperfusión; y frente a tres condiciones crónicas que agravan dicha injuria: déficit de secreción circadiana de melatonina, animales con hipertensión y otros con daño renal. Se analizaron los cambios eletrofisiológicos, con especial atención en la ocurrencia de arritmias y se evaluaron posibles mecanismos involucrados en la cardioprotección.

La melatonina previno la fibrilación ventricular inducida por radicales libres administrados exógenamente. La protección antiarrítmica fue comparable a la obtenida con la enzima superóxido dismutasa. Ambas protegieron frente a los cambios por estrés oxidativo y mantuvieron el potencial de reposo y la amplitud. La melatonina, además evitó la prolongación de la duración del potencial.

La melatonina redujo las arritmias inducidas por hipocalcemia. Se evidenció la participación de los receptores de melatonina en el acortamiento de la duración del potencial de acción y en los efectos en la conducción de los impulsos eléctricos medidos por la preservación de la conexina 43 en los discos intercalares de los cardiomiocitos.

La melatonina administrada durante la reperfusión redujo las taquiarritmias ventriculares. El efecto antiarrítmico requirió la activación de los receptores de melatonina, de la proteína quinasa C, de los canales de K^+ regulados por ATP y de la preservación de la conexina 43.

La reducción de la producción endógena de melatonina provocada por la exéresis del ganglio cervical superior bilateral provocó un aumento en la arritmogénesis en corazones sometidos a isquemia/reperfusión.

La melatonina vía oral crónica previno el incremento de la arritmogénesis en ratas con hipertensión y en animales con nefropatía obstructiva. En ambos modelos, la melatonina provocó hiperpolarización, aumentó la amplitud y duración de los potenciales de acción.

Confirmamos la hipótesis que la melatonina protege contra las enfermedades cardiovasculares, en particular contra las arritmias por reperfusión. La protección aguda la ejerce, en parte, mediante la activación de receptores de membrana, vías de señalización y a la preservación de la comunicación intercelular mediada por uniones en hendidura de los miocitos. Sus efectos crónicos se ejercen tanto a concentraciones fisiológicas como farmacológicas. La cardioprotección se logró mantener aún en modelos animales con factores de riesgo que aumentan la arritmogénesis y no sólo en animales sanos. Todas estas propiedades y la ausencia de dosis tóxica, hacen de la melatonina un agente cardioprotector notable, capaz de actuar en forma aguda y crónica, y con gran potencialidad traslacional.

Capítulo I - Estado actual del conocimiento sobre el tema

De las enfermedades cardiovasculares a las arritmias

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo (Pk et al., 2017). La mayoría de las muertes ocurren de manera súbitas (Steinberg, Laksman, & Krahn, 2016). Lo repentino y catastrófico de los eventos nos motiva a la búsqueda de las causas y posibles soluciones (Ibanez et al., 2018). Este es un gran desafío científico y socio-sanitario. Los abordajes de los últimos años lograron reducir la carga de enfermedad cardiovascular pero aún queda mucho por mejorar (Roth et al., 2015). Un caso particular se da con las arritmias. Los trastornos del ritmo motivaron intervenciones de urgencia, sobre todo durante la primera hora de la manifestación de la enfermedad coronaria. La reanimación cardiopulmonar, las ambulancias (drones) y la cardiodesfibrilación fueron estrategias de respuesta a eventos inesperados. Lamentablemente aún persisten inesperados por la limitada comprensión de las causas a un nivel que nos permitiera predecir, evitar o controlar la ocurrencia de un evento (Ambale-Venkatesh et al., 2017). En ese sentido crecieron las estrategias que intentan determinar riesgos a fin de establecer un direccionamiento de las estrategias de un modo más eficiente (Adabag, Luepker, Roger, & Gersh, 2010). Hoy nos permiten esperar mayor número de eventos letales en personas severamente enfermas. Sin embargo, los factores de riesgos aún distan mucho de ser efectivos y mucho menos eficientes. Los cambios que ocurren en la fisiología a consecuencia de la exposición a los distintos factores de riesgo sería un de las explicaciones (Tang, Shenasa, & Boyle, 2017).

Las arritmias ventriculares que se producen en relacionadas a los síndromes coronarios agudos son una de las principales causas de muerte en Argentina y en varios países del mundo (Mehta et al., 2012; Steinberg et al., 2016). Algunos reportes indica que casi el 70% de las muertes, en el marco de los síndromes coronarios, ocurren repentinamente antes de alcanzar el hospital (Ibanez et al., 2018). Desde hace más de tres décadas se sabe de la ausencia de una oclusión coronaria completa en muchos de los pacientes que mueren súbitamente, dirigiendo la atención sobre la génesis de las letales arritmias ventriculares a episodios transitorios de isquemia y la subsecuente reperfusión (Issa, Miller, & Zipes, 2012; McElwee, Velasco, & Doppalapudi, 2016; Pogwizd & Corr, 1987). El tratamiento de elección para el miocardio isquémico es la reperfusión, pero tiene como efecto secundario la denominada injuria por isquemia/reperfusión. Este tipo de injuria comprende la muerte de parte del tejido que se pretende salvar (necrosis y apoptosis), la disfunción contráctil y el desencadenamiento de arritmias.

Las arritmias de reperfusión.

Las arritmias de reperfusión son los trastornos de la actividad eléctrica miocárdica que se provocan al restituir el flujo a un tejido previamente isquémico. Por lo general, se desencadenan en los ventrículos. Estos trastornos incluyen un amplio espectro de manifestaciones que van desde algunos latidos anticipados hasta arritmias que impiden la función de bomba del corazón. La clasificación para uso experimental fue descrita en al Convención de Lambeth en 1988 y actualizada en 2013 (Curtis et al., 2013; Walker et al., 1988). En esta tesis se sigue los criterios para el estudio de las arritmias enunciados en la edición 2013 de mencionada convención.

La incidencia de varios tipos de arritmias como efecto secundario al tratamiento de reperfusión, confirmó la asociación entre la restitución del flujo y los trastornos del ritmo cardíaco (Curtis et al., 2013; Walker et al., 1988). La mayoría de las arritmias son de origen ventricular y abarcan a los complejos ventriculares prematuros, el ritmo idioventricular acelerado, la taquicardia ventricular y la fibrilación ventricular. También se han descrito arritmias supraventriculares, en particular la fibrilación auricular y diferentes tipos de bradiarritmias. Los complejos ventriculares prematuros y el ritmo idioventricular son episodios autolimitados que se presentan en la mayoría de los pacientes al momento de la reperfusión. Si bien no incrementan el riesgo de mortalidad eventualmente requieren tratamiento (Krumholz & Goldberger, 1991). La taquicardia ventricular no sostenida (<30 segundos, sin compromiso hemodinámico) se observa con mucha frecuencia y pueden anteceder episodios más prolongados o que causen descompensación del paciente. La taquicardia ventricular sostenida y la fibrilación ventricular son consideradas severas porque ponen en riesgo la vida del paciente y requieren cardioversión eléctrica inmediata.

Los reportes sobre la incidencia de arritmias de reperfusión severas indican que afecta entre 4 a 8% de los pacientes con síndromes coronarios agudos (Hackett et al., 1990; Mehta et al., 2009, 2012). Si bien la cardioversión eléctrica es efectiva para restituir el ritmo sinusal, la mortalidad a 30 y 90 días está sustancialmente elevada en aquellos pacientes que sufrieron esta complicación (Demidova et al., 2012; Mehta et al., 2009). Actualmente no existe un tratamiento farmacológico probado para prevenir estas complicaciones.

Los mecanismos de las arritmias por isquemia/reperfusión

Dentro de los eventos fisiopatológicos que se producen al restituir el flujo a un tejido isquémico se destacan el exagerado incremento en el estrés oxidativo, alteraciones en la homeostasis hidroelectrolítica, la disfunción mitocondrial, el desarrollo de una respuesta inflamatoria aséptica y la generación de múltiples factores humorales (García-Dorado, Ruiz-Meana, & Piper, 2009; González-Montero, Brito, Gajardo, & Rodrigo, 2018; Ibanez, Fuster, Jiménez-Borreguero, & Badimon, 2011). Estas modificaciones son responsables de varios tipos de muerte celular y alteraciones potencialmente reversibles en las propiedades contráctiles, en el flujo coronario y en las variables electrofisiológicas. La muerte celular se produce por necrosis, apoptosis y autofagia (Eltzschig & Eckle, 2011). En esta sección analizaremos con mayor profundidad los cambios relacionados con las propiedades electrofisiológicas por ser de gran relevancia en esta tesis doctoral, en especial, los cambios implicados en la génesis y mantenimiento de las arritmias.

Cambios electrofisiológicos durante la isquemia

La isquemia es un tipo de estrés celular causado por un aporte insuficiente de oxígeno y nutrientes para el adecuado funcionamiento de un tejido biológico. Esto puede deberse a una disminución del riego sanguíneo y/o a un incremento de la demanda por parte del tejido. Si la interrupción del flujo es total, el daño se agrava por la falta de eliminación de los productos del metabolismo. La disminución del oxígeno interfiere con la producción de ATP por parte de la mitocondria, y es reemplazada, durante un corto período, por reservas de fosfocreatina y por la glucólisis anaeróbica (Carmeliet, 1999). La depresión de la función mitocondrial provoca acumulación de metabolitos intermedios. El piruvato se reduce a lactato, y termina saliendo al intersticio. Esto contribuye a la generación de acidosis, junto con la acumulación de CO₂ y la liberación de H⁺ a partir de la degradación de dinucleótido de adenín-nicotinamida (NADH). La falta de energía compromete la homeostasis hidroelectrolítica. Se produce una acumulación intracelular de Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ y H₂O. Se pierde K⁺, Mg²⁺ y fosfato inorgánico, que se acumula en el espacio extracelular (Carmeliet, 1999).

Los cambios metabólicos y en la homeostasis hidroelectrolítica se manifiestan a nivel electrofisiológico en forma de despolarización del potencial de membrana en reposo, variaciones en la excitabilidad tisular, alargamiento seguido de un acortamiento del potencial y enlentecimiento de la propagación de los impulsos (Carmeliet, 1999). El potencial de la membrana en reposo se ve rápidamente afectado, y pasa de valores cercanos a -85 mV a valores de -60 mV en el transcurso de los 2-3 primeros minutos. Esto se debe al incremento de la concentración extracelular de K⁺ y la aparición de corrientes despolarizantes. El K⁺

umenta debido a una mayor salida de la célula, un menor ingreso y, en parte, a la contracción del espacio extracelular (Roberts & Christini, 2012).

La despolarización inicial se acompaña de un ligero incremento en la excitabilidad. Esto se explicaría porque la despolarización inicial aproxima el potencial de reposo al umbral de activación, y por lo tanto es necesaria menos corriente para iniciar un potencial de acción. A medida que progresa la despolarización y se incrementan los niveles de K^+ extracelular, la amplitud del potencial y la tasa máxima de despolarización ($+\delta V/\delta t_{\max}$) disminuyen y en consecuencia se reduce la excitabilidad. Esto se debería en gran medida a una reducción en la conductancia al Na^+ por varios mecanismos. Los principales son la inactivación sensible al potencial transmembrana, y las modificaciones de los canales por sustancias anfipáticas como la lisofosfatidilcolina o acilcarnitina de cadena larga, por los cambios de pH, y el incremento de radicales libres (Carmeliet 1999). También disminuye el gradiente químico a expensas de un aumento del Na^+ intracelular, por el ingreso pasivo y la disminución del transporte activo. Esto provoca que la fase 0 se vea enlentecida o incluso fraccionada por la aparición de corrientes de cortocircuito. Dentro de estas últimas, se destacan las corrientes de K^+ activadas por el incremento del Na^+ intracelular y las corrientes activadas por el aumento de ácidos grasos, en particular el ácido araquidónico (Kim et al., 1989). Los canales de K^+ de dos poros son los responsables de estas corrientes de base que aumentan significativamente la conductancia ante los cambios provocados por la isquemia (Pun, Goldstein, Gallis, Middleton, & Svetkey, 2017). Con el paso de los minutos se refuerza el efecto de cortocircuito por el aumento de la $I_{K_{ATP}}$ (Craig, Ashcroft, & Proks, 2008).

Los cambios en la duración del potencial de acción durante la isquemia tienen un comportamiento bifásico, que se caracteriza por una prolongación inicial y luego un progresivo acortamiento. El incremento de la duración en el primer par de minutos podría deberse a una reducción en la actividad de las bombas electrogénicas, una reducción de I_{K1} como consecuencia de la acidosis intracelular, y una inhibición aguda de I_{to} (Verkerk, Veldkamp, van Ginneken, & Bouman, 1996). Un alargamiento inicial también se produce frente a situaciones que simulan componentes de la isquemia como ser el desacoplamiento de la función mitocondrial con dinitrofenol, la exposición a soluciones hipotónicas o ante la inhibición de la NaK-ATPasa con ouabaína (Carmeliet, 1999).

El progresivo acortamiento del potencial se debe principalmente al incremento de corrientes repolarizantes y en mucha menor medida, a una disminución de las corrientes despolarizantes. Tanto la salida de K^+ como la entrada de Cl^- participan de la repolarización durante la isquemia, siendo la primera la que más contribuye. Las corrientes de K^+ responsables del acortamiento son la $I_{K_{ATP}}$, la $I_{K_{Na}}$ y la $I_{K_{AA}}$. Las tres son capaces de permitir el pasaje de gran cantidad de corriente independientemente del tiempo y con rectificación

externa. Esta última propiedad hace que su aporte sea más importante con valores de potencial más positivos y poco relevante en los valores del potencial de reposo. La activación de estas corrientes contrarresta el efecto de la inhibición que sufren las corrientes responsables de la repolarización en condiciones fisiológicas, en especial de la I_{to} y la I_{K1} (Carmeliet, 1999; Clarkson & Ten Eick, 1983; Hibino et al., 2010). En cuanto al aporte de las corrientes de Cl^- , se ha descrito que participan del acortamiento y de la despolarización de la membrana en reposo (Duan, 2009; Ruiz Petrich, Ponce Zumino, & Schanne, 1996). La estimulación β adrenérgica, el edema celular, el estiramiento mecánico y el incremento del Ca^{2+} intracelular pueden activar varias corrientes de Cl^- , que debido a que este ion tiene un potencial de equilibrio cercano a los -30 mV, promueven tanto un ingreso de cargas negativas que contribuye al acortamiento y una salida que aporta a la despolarización de la fase 4. La disminución de las corrientes de Na^+ arriba mencionadas y de corrientes de Ca^{2+} tendrían un papel menos destacado en el acortamiento del potencial.

La velocidad de conducción está determinada por las propiedades activas (amplitud del potencial de acción y $+dV/dt_{max}$) y pasivas del tejido miocárdico. Los cambios que sufre la fase 0 durante la isquemia ya fueron comentados previamente en esta sección y son los que más comprometen la propagación del impulso. Por otro lado, varios parámetros que determinan las propiedades pasivas se ven afectados por la isquemia. El colapso del espacio vascular aumenta la resistencia extracelular desde el inicio y con el tiempo se le añade el incremento de la resistencia intercelular. Este último es atribuible a la acumulación intracelular de H^+ y de Ca^{2+} , que junto con el descenso de ATP modifican las conexinas e inducen el cierre de los canales intercelulares (De Bakker & Van Rijen, 2006; Iyyathurai, Himpens, Bultynck, & D'hondt, 2016).

La despolarización que ocurre durante los primeros minutos se manifiesta como una depresión del intervalo TQ del ECG en humanos (Cinca et al., 1997; Coronel et al., 1992). Debido a la corrección automática del valor de referencia en los ECG convencionales, ésta se manifiesta como un supradesnivel del segmento ST. En el caso de la rata, este fenómeno es menos evidente ya que por la corta duración del potencial de acción ventricular, no se aprecia un segmento ST definido sino que a continuación del QRS se inicia la onda T (Kii et al., 2008).

Cambios electrofisiológicos durante la reperfusión

La reperfusión provoca cambios metabólicos que impiden la correcta utilización del oxígeno y los sustratos para la producción de energía. Esto se debe a múltiples alteraciones enzimáticas y a un defecto en la cadena de transporte de electrones de la mitocondria, en parte exacerbado por la generación exagerada de especies reactivas derivadas del oxígeno

y del nitrógeno y el consecuente daño de las membranas (Carmeliet, 1999). Al restablecerse el flujo, se favorece la utilización mitocondrial de ácidos grasos de cadena larga en detrimento de la utilización de glucosa, la cual sigue la vía glucolítica lo que incrementa el lactato y contribuye al mantenimiento de la acidosis (García-Dorado, Rodríguez-Sinovas, Ruiz-Meana, & Inserte, 2014). La recuperación de la producción de ATP, se acompaña de un importante riesgo de daño celular, ya que si el citosol presenta altos niveles de Ca^{2+} se puede precipitar un estado de hipercontractura de los cardiomiocitos, y generar necrosis en banda por ruptura del sarcolema (García-Dorado, Andrés-Villarreal, Ruiz-Meana, Inserte, & Barba, 2012).

La recuperación del flujo en las células que se encuentran en situación de riesgo puede precipitar un empeoramiento abrupto del control catiónico, principalmente por la puesta en marcha de mecanismos dirigidos a corregir la acidosis intracelular que acaban por empeorar aún más la sobrecarga citosólica de Na^+ que se inició durante la isquemia (Williams, Xiao, Ju, & Allen, 2007; Xie, Liao, Grandi, Shiferaw, & Bers, 2015). La rápida remoción de los catabolitos del medio extracelular genera un gradiente de pH entre las células y su entorno, y estimula los mecanismos de corrección de la acidosis intracelular (principalmente a través del intercambiador Na^+/H^+ de la membrana plasmática y del cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$) (Roberts & Christini, 2012). Esta respuesta de corrección de la acidosis intracelular empeora aún más la sobrecarga citosólica de Na^+ , lo que a su vez favorece la actividad en modo inverso del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Théroux et al., 2000). Esta cadena de eventos puede ser deletérea en la reperfusión ya que contribuye a que se acumule una gran cantidad de Ca^{2+} en el interior celular, y puede llegar a comprometer seriamente la supervivencia del cardiomiocito. De hecho, la inhibición farmacológica del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ con KB-R7943 reduce la sobrecarga citosólica de Ca^{2+} en cardiomiocitos aislados y el tamaño del infarto en un modelo de oclusión coronaria transitoria *in situ* (Kraft, 2007; MacDonald & Howlett, 2008).

Tras la reperfusión, la concentración diastólica de Ca^{2+} puede seguir tres vías diferentes: 1) una rápida disminución al valor normal (Marban, Koretsune, & Kusuoka, 1994), 2) una caída inicial a un valor intermedio seguido de un período de inestabilidad que puede terminar con un retorno a la normalidad o ser seguido por un incremento secundario (Piper, Siegmund, Ladilov, & Schlüter, 1993), y presentar oscilaciones capaces de gatillar arritmias (Harada et al., 2014), 3) no recuperación, caracterizada por una elevación inmediata a valores hasta el rango micromolar, lo que provoca contractura irreversible (García-Dorado et al., 2009). La irreversibilidad ocurre cuando el nivel citoplasmático de Ca^{2+} aumenta por encima de $1 \mu\text{M}$, lo que es más probable cuando el período de isquemia se extiende más de 20-30 min, en especial en los modelos murinos.

Parte del aporte de Ca^{2+} al citosol proviene desde el retículo sarcoplásmico, sobre todo en el primer minuto de la reperfusión (Valverde et al., 2010). Vale la pena destacar que, a pesar de

registrarse mayores niveles citoplasmático de este ion en diástole, la magnitud de Ca^{2+} liberado por Ca^{2+} en cada ciclo se ve sustancialmente atenuada. Mediante técnicas colorimétricas que permiten determinar los cambios del Ca^{2+} en el tejido, se ha demostrado que la recaptación de este ion por el retículo sarcoplásmico se restablece en los primeros minutos de la reperfusión. El fenómeno inicial de sobrecarga puede inducir la liberación espontánea oscilatoria y la generación de pospotenciales de la membrana durante la fase 4, que de alcanzar el umbral de activación de los canales de Na^+ , puede gatillar un nuevo potencial (Chen & Yaari, 2008).

Los pospotenciales que se manifiestan en la membrana como consecuencia del desequilibrio en el manejo del Ca^{2+} son uno de los principales mecanismos implicados en la génesis de las arritmias de reperfusión. La corriente iónica que genera los pospotenciales se denomina I_{TI} (del inglés *Transient Inward*) y está determinada por tres componentes: la I_{NaCa} , una corriente catiónica no selectiva inducida por estiramiento o Ca^{2+} y una corriente de Cl^- activada por Ca^{2+} (Sakamoto et al., 1999). Estas corrientes se activan por los incrementos de Ca^{2+} intracelular y, debido a que poseen potenciales de equilibrio alrededor de -30 mV y 0 mV, generan una despolarización de la membrana. Una de las características de las I_{TI} es que la probabilidad de que se manifiesten y su magnitud son mayores cuando los intervalos diastólicos se acortan. Esto lleva a que un latido anticipado pueda precipitar y potenciar la I_{TI} y generar un pospotencial que alcance el umbral y repita el fenómeno, dando origen a una fuente de potenciales que tiene la capacidad de autoregenerarse (Bernikova & Azarov, 2018). Esto también explicaría cómo una sobrecarga de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico, por sobreestimulación, tiende a perpetuar un fenómeno proarrítmico (Mazzocchi et al., 2016).

A los mecanismos de arritmogénesis por automatismo anormal favorecido por la sobrecarga de Ca^{2+} recién mencionados, se debe agregar el mayor riesgo para desarrollar circuitos de reentrada (Lou, Li, & Efimov, 2012). El acortamiento del potencial de acción y el enlentecimiento en la propagación de los impulsos son dos factores fundamentales del tejido reperfundido que pueden llevar al desarrollo de múltiples ondas de reentrada funcional (Kléber & Rudy, 2004). Éstas reentradas se caracterizan por presentar un circuito que no está determinado por obstáculos anatómicos, sino que lo definen las heterogeneidades dinámicas de las propiedades electrofisiológicas del tejido involucrado, en especial el período refractario y la conducción anisotrópica, que puede dar lugar a un bloqueo de los impulsos y una conducción lenta que permite la reentrada, incluso en circuitos anatómicos pequeños (Antzelevitch, 2004).

El acortamiento del potencial ha sido correlacionado con el lavado rápido de K^+ extracelular (Coronel et al., 1992). De hecho, en corazones de cerdo la hipocalemia transitoria durante la reperfusión produce hiperpolarización, acortamiento del potencial de acción y arritmias. Más

aún, las intervenciones que atenúan o retrasan la hipocalemia, protegen contra las arritmias (Coronel, Wilms-Schopman, Dekker, & Janse, 1995). El transitorio acortamiento del potencial de acción y hiperpolarización se pueden explicar por la exagerada y temprana estimulación de la NaK-ATPasa secundaria a la carga intracelular de Na^+ que se generó durante la isquemia y que, como ya se describió, empeora al inicio de la reperfusión. La NaK-ATPasa produce un incremento en la corriente hacia el exterior y una caída de la concentración extracelular de K^+ (Gonano et al., 2011). La hiperpolarización por la activación de la NaK-ATPasa está acompañada de la corriente que genera el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ trabajando en modo reverso. A los mecanismos antes mencionados se le agrega la activación de corrientes de K^+ como la $I_{\text{KAch/Ado}}$ y I_{KATP} (Shryock & Belardinelli, 1997). La primera se ve fuertemente estimulada por la liberación de adenosina que acompaña la restitución del flujo, pero su contribución es muy transitoria, no superando el primer minuto (Müller & Jacobson, 2011). La corriente I_{KATP} también es estimulada por la adenosina, pero su apertura se ve facilitada por las especies reactivas del oxígeno y por el edema celular, por lo que su contribución al acortamiento, suele ser más intensa y durar unos segundos más (Tokube, Kiyosue, & Arita, 1996). Todo esto conduce a una situación paradójica en la que se combina un potencial de acción corto con una concentración extracelular de K^+ baja, ya que en condiciones fisiológicas la hipocalemia tiende a prolongar el potencial de acción en la rata (Vandenberg, 1987).

El enlentecimiento en la propagación de los impulsos provoca zonas de conducción lenta que crean un retraso en el frente de onda circulante suficiente para permitir la recuperación del tejido refractario proximal (Kléber & Rudy, 2004). El incremento del Ca^{2+} y la acidosis reducen la propagación a través de las conexinas. Estas proteínas también sufren modificaciones en su estado de fosforilación que reducen su conductancia, en especial por acción de la proteína quinasa C, proteína quinasa activada por mitógenos y por Src (Ek-Vitorín et al., 2018). El incremento de las corriente repolarizantes genera un efecto de cortocircuito, ya que las cargas que ingresan a los cardiomiocitos se pierden con mayor celeridad y disminuye la constante de espacio (Kucera, Rohr, & Kleber, 2017; Nerbonne & Kass, 2005). Todos estos cambios son importantes facilitadores del mantenimiento de los circuitos de reentrada involucrados en las arritmias ventriculares sostenidas.

Papel del estrés oxidativo en la isquemia/reperfusión

Desde que Manning y col. mostraron en 1984 que el tratamiento con allopurinol reduce la incidencia de arritmias de reperfusión en las ratas, se ha propuesto que las especies reactivas del oxígeno participan en la génesis de las mismas, ya que esta droga inhibe la actividad de la xantina oxidasa (importante enzima en la producción de los radicales libres *in vivo*) (Manning, Coltart, & Hearse, 1984). Las especies reactivas del oxígeno se generan

normalmente durante el metabolismo aeróbico celular y son neutralizadas por diversos mecanismos antioxidantes. Al restaurar el flujo sanguíneo en corazones isquémicos se produce una excesiva cantidad de agentes oxidantes, tales como el anión superóxido (O_2^-), los radicales hidroxilos ($\cdot OH$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que superan las defensas antioxidantes y pueden dañar las células (Penna, Mancardi, Rastaldo, & Pagliaro, 2009). Existen dos vías mediante las cuales los radicales O_2^- pueden generar radicales $\cdot OH$. Una de ellas involucra la participación del óxido nítrico (NO) por la formación de un compuesto denominado peroxinitrito, el cual por sí mismo es tóxico, inestable y altamente reactivo. Esto destaca que no sólo las especies reactivas del oxígeno, sino también las del nitrógeno son las responsables del daño oxidativo. Los principales mecanismos fisiopatológicos provocados por estos compuestos son: la peroxidación de lípidos, la oxidación de las proteínas y la rotura del ADN. La peroxidación lipídica de las membranas produce daño estructural y funcional, que condiciona un aumento en la permeabilidad de la membrana al calcio, lo cual contribuye al incremento del Ca^{2+} intracelular arriba descrito. Si bien varias proteínas pueden sufrir oxidación, destacaremos los cambios de aquellas que constituyen los sistemas de transporte iónico.

Varias corrientes iónicas se ven afectadas por las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (Jeong et al., 2012; Tomaselli & Barth, 2010; K.-C. Yang, Kyle, Makielski, & Dudley, 2015). Entre ellas se destacan el efecto sobre la homeostasis del Ca^{2+} , la reducción de las corrientes I_{Na} , I_{K1} , I_{Ca} y el aumento de I_{KATP} (Tokube et al., 1996). Como ya se mencionó, estas últimas dos corrientes, pueden inducir un acortamiento del potencial. Por su parte, la I_{Na} sufre una facilitación para pasar al estado inactivo, que es atribuida a la peroxidación lipídica, y atenúa la propagación de los impulsos eléctricos (Fukuda et al., 2005). Los cambios en el manejo del Ca^{2+} se deben a la depresión de las Ca-ATPasas del sarcolema y del retículo sarcoplásmico, una estimulación del intercambiador Na^+/Ca^{2+} , un incremento de la apertura de los canales de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico y el aumento del ingreso de Ca^{2+} por vías aún no completamente identificadas (ter Keurs & Boyden, 2007).

A pesar de lo antes descrito, existe cierta contradicción respecto a la interpretación del efecto de los radicales libres. Durante la reperfusión se ha documentado la formación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en forma directa e indirecta. Ellas han sido relacionadas con el daño generado, ya que los antioxidantes atenúan el mismo. Sin embargo, la falta de datos precisos sobre los procesos patológicos que provocan estas sustancias reactivas, ha generado cierta incertidumbre e interrogantes, los cuales se iniciaron al encontrar resultados negativos en los ensayos clínicos que testeaban la cardioprotección con diferentes estrategias antioxidantes (Dirksen, Laarman, Simoons, & Duncker, 2007). Se atribuyó parte del fracaso a limitaciones farmacocinéticas, ya que algunos compuestos no alcanzaban los

cardiomiocitos con la suficiente velocidad como para lograr la protección. Esto es de especial interés en relación a la melatonina, ya que como se describirá a continuación, su capacidad de alcanzar todos los compartimentos celulares con celeridad es una cualidad difícil de encontrar en los agentes antioxidantes. Otros han postulado que los mecanismos de generación y de defensa contra las especies reactivas están alterados en los pacientes que sufren síndromes coronarios y que estos cambios no fueron adecuadamente reproducidos a nivel pre-clínico, a fin de confirmar si mantenían la efectividad (Ferdinandy, Hausenloy, Heusch, Baxter, & Schulz, 2014). También se ha planteado que las especies reactivas son parte de procesos de señalización rápida y que ciertas estrategias protectoras requieren de ellas (Tsutsumi, Yokoyama, Horikawa, Roth, & Patel, 2007).

La melatonina como agente protector

La melatonina es una molécula ubicua y ampliamente distribuida en la naturaleza, con actividad funcional que ocurre en organismos unicelulares, plantas, hongos y animales (Jiki, Lecour, & Nduhirabandi, 2018). Durante la evolución, la melatonina ha sido adoptada por organismos multicelulares para realizar muchas otras funciones biológicas. Estas funciones probablemente incluyen la expresión química de la oscuridad en los vertebrados, la tolerancia ambiental en hongos y plantas, la señalización sexual en aves y peces, la regulación reproductiva estacional en mamíferos fotoperiódicos, y la inmunomodulación y la actividad antiinflamatoria en todos los vertebrados analizados (Masters, Pandi-Perumal, Seixas, Girardin, & McFarlane, 2014; S.R. Pandi-Perumal, 2018). En la mayoría de los mamíferos, la melatonina es una molécula endocrina producida en la glándula pineal con un ritmo circadiano (Hardeland et al., 2011; Markwald et al., 2013; Ríos-Lugo et al., 2010). De hecho, fue la primera en ser reconocido como un factor responsable del control de los ritmos circadianos. La melatonina se forma predominantemente durante la noche. La luz tiene un efecto inhibitorio de la secreción de melatonina pineal. La liberación de melatonina está sincronizada con el ciclo de la luz/oscuridad a través de una vía multisináptica existente entre los ojos y la glándula pineal. La luz estimula la retina para modular la actividad del núcleo supraquiasmático. Este regula la síntesis de melatonina pineal a través del sistema nervioso simpático periférico, en el que participan las sinapsis de la columna de células intermediolaterales del cordón torácico y su proyección hacia los ganglios cervicales superiores (Savastano et al., 2010). Las fibras simpáticas posganglionares simpáticas terminan en los pinealocitos situados en el interior de la glándula pineal (Castro et al., 2015). La enzima del paso limitante en la síntesis de la melatonina está regulada por la noradrenalina y se libera por las terminaciones nerviosas simpáticas a los receptores adrenérgicos β_1 y α_1 de los pinealocitos (Kennaway, Voultios, Varcoe, & Moyer, 2015). Las concentraciones de melatonina en el suero de los individuos

sanos alcanzan valores de 10^{-10} a 10^{-9} mol/l durante la noche, mientras que durante el día los valores son muy inferiores (De Farias et al., 2015).

René Descartes en el período del Renacimiento describió la glándula pineal como el "tercer ojo". Las acciones protectoras de melatonina en muchos órganos contribuyen al llamado poder curativo del sueño. Este producto mítico del "tercer ojo" protege activamente el sistema cardiovascular (Dubocovich et al., 2010; Seithikurippu R. Pandi-Perumal et al., 2017). La melatonina está implicada en diversos procesos fisiopatológicos cardiovasculares por sus funciones antiinflamatorias, antioxidantes, antihipertensivas y posiblemente antilipémicas (Domínguez-Rodríguez, Samimi-Fard, Abreu-González, & Carlos Kaski, 2009). La melatonina participa también en diversas respuestas fisiológicas a través de receptores de membrana y nucleares (Dubocovich et al., 2010). Se han identificado receptores de membrana MT1 y MT2 en los miocardiocitos diversas especies incluido el corazón humano (He et al., 2016; Sallinen, Saarela, Ilves, Vakkuri, & Leppäluoto, 2005; Sánchez-Hidalgo et al., 2009). El papel de la melatonina en la función cardiovascular humana se encuentra en intenso proceso de investigación (Dominguez-Rodriguez et al., 2015; Lavi & Lavi, 2011; Natalia Jorgelina Prado, Ferder, Manucha, & Diez, 2018; Sharafati-Chaleshtori, Shirzad, Rafieian-Kopaei, & Soltani, 2017). En el músculo papilar de rata aislado tiene efectos antiadrenérgicos y causa una reducción de la fuerza de las contracciones. De igual manera, los receptores MT1 y MT2 están presentes en las arterias coronarias humanas de muestras patológicas y también de controles sanos. Los estudios realizados en animales indican que la melatonina tiene unos efectos dobles en los vasos sanguíneos, en función del tipo específico de receptor activado, de tal manera que se produce una vasoconstricción tras la activación de los receptores MT1 y una vasorrelajación tras la activación de los MT2 (Ekmekcioglu, 2006).

Amplia evidencia respalda que la melatonina es un promisorio agente cardioprotector (Favero et al., 2017; Nduhirabandi, Maarman, Nduhirabandi, & Maarman, 2018; Seithikurippu R. Pandi-Perumal et al., 2017; N.J. Prado, Ferder, Manucha, & Diez, 2018; Reiter, Tan, Paredes, & Fuentes-Broto, 2010). En modelos murinos, protege contra la lesión por isquemia/reperfusión, incluso si se la administra al momento de la reperfusión (E. R. Diez, Prados, Carrión, Ponce, & Miatello, 2009; E. R. Diez et al., 2013; Reiter & Tan, 2003; Y. Yang et al., 2014; Yu et al., 2017, 2015). La melatonina disminuye las arritmias de reperfusión y acorta la duración del potencial de acción en corazones aislados de ratas alimentadas con fructosa y de ratas espontáneamente hipertensas, pero los mecanismos implicados en estos efectos siguen sin dilucidar (E. R. Diez et al., 2013)¹³. El mecanismo mayormente asociado a la protección de la melatonina contra la lesión por isquemia/reperfusión es su efecto antioxidante.

Por otro lado, sólo encontramos un artículo que reportó el incremento de las arritmias por reperfusión en animales pinealectomizados (Sahna, Olmez, & Acet, 2002). Si bien ésta es una cirugía sencilla, el modelo propuesto en este proyecto fueron menos invasivos y, de confirmar el incremento en la arritmogénesis, facilitarían el estudio de los mecanismos de protección de la melatonina endógena (Savastano et al., 2010).

Un antioxidante especial

La melatonina fue reconocida inicialmente por sus funciones reguladoras en los ritmos circadianos y estacionales. Sin embargo, la función biológica primaria de la melatonina en organismos unicelulares primitivos es la defensa antioxidante contra el daño de los radicales libres (Reiter et al., 2017b). La melatonina tiene una capacidad antioxidante bien caracterizada y extensamente documentada (Galano, 2011; Galano & Reiter, 2018; Galano, Tan, & Reiter, 2011, 2013; Manchester et al., 2015; Reiter et al., 2017a; Reiter, Tan, & Galano, 2014). De hecho, se ha sugerido que una de las funciones principales de la melatonina en todos los organismos vivos es protegerlos del estrés oxidativo. La melatonina es un poderoso antioxidante, con una potencia de hasta diez veces mayor que la vitamina E.

Existen oxidantes de diferente naturaleza química. Pueden ser radicales libres o especies reactivas no radicales. Los radicales libres, al tener un electrón desapareado, son inestables, altamente reactivos y suelen desencadenar reacciones en cadena, que propagan modificaciones a moleculares cercanas. La clasificación más utilizada de los radicales libres se deriva del tipo particular de átomo que contiene el centro radical. En consecuencia, se clasifican como especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS) y especies reactivas de azufre. Lógicamente, la reactividad de cada radical libre depende de sus características químicas particulares. En condiciones fisiológicas, los ROS/RNS actúan como segundos mensajeros intracelulares modulando vías de transducción de señales (Dröge, 2002; Forman, 2016). Los radicales libres, cuando están presentes por encima de cantidades saludables, representan un riesgo grave para la integridad molecular de los lípidos, las proteínas y el ADN (Reiter et al., 2016). Por lo tanto, la captura de radicales es una forma química de contrarrestar el estrés oxidativo y sus consecuencias perjudiciales.

La principal especie reactiva implicada en daño oxidativo es el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), pero también pueden participar el agua oxigenada (H_2O_2), el radical hidroxilo (HO^{\cdot}), el óxido nítrico (NO), el peroxinitrito ($ONOO^-$) y el nitroxilo (HNO). Las especies oxidantes se producen constantemente en la mitocondria durante la fosforilación oxidativa, pero son también el producto de la activación de sistemas enzimáticos no mitocondriales como el de la NADPH oxidasa (NOX), la xantina oxidasa (XO) y el óxido nítrico sintasa (NOS). La célula cuenta

además con sistemas buffers que previenen el daño oxidativo: atrapadores no enzimáticos como el glutatión reducido (GSH), vitaminas y flavonoides, enzimas tales como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, tiorredoxina y glutatión peroxidasa (Forman, 2016).

El estrés oxidativo en el tejido se mide mediante la determinación de los niveles de marcadores de peroxidación lipídica que incluyen sustancias ácidas reactivas al tiobarbitúrico (TBARS), malondialdehído (MDA), hidroperóxidos de lípidos (PEROX), F2-isoprostanos (8-epiPGF2 α) y dienos conjugados (CD).

Como se mencionó en las secciones anteriores, distintos tipos de las proteínas, incluidos los canales iónicos, pueden alterarse por el estrés oxidativo. Aquellas que contienen mayor cantidad de cisteínas son más sensibles a los cambios porque los grupos tiol (-SH), que existen como tiolatos (-S) a pH fisiológico, tienden a reaccionar más rápidamente con ROS/RNS (Poole, 2015). Este hecho otorga a las cisteínas y a las proteínas que las contienen, un rol especial en la biología rédox. Muchas de estas proteínas están implicadas en reacciones biológicas importantes tales como fosforilación oxidativa, regulación metabólica, transducción de señales (Chouchani et al., 2017; Smith & Marletta, 2012).

La producción endógena de óxido nítrico por la NOS tiene un papel importante en la homeostasis vascular, la neurotransmisión y los mecanismos de defensa del huésped (Kundu et al., 2009). Muchas de estas acciones están mediadas por estimulación de guanilato ciclasa soluble y la formación del segundo mensajero, guanosina 3', 5'-monofosfato cíclico, después de lo cual el NO se elimina en forma inactiva como nitritos y nitratos. Sin embargo, el NO también puede activar o modular la señalización celular mediante la interacción con tioles y metales. De esas vías, la más conocida es el concepto de nitrosilación de tiol, a menudo denominada "S-nitrosilación". Esta modificación proteica postraduccional podría desempeñar un papel fundamental en la salud y la enfermedad (Bryan et al., 2004). Las especies S-nitroso están implicadas en el control del suministro de oxígeno a los tejidos, la modulación de la función o actividad de los factores de transcripción, enzimas, receptores de membrana y canales iónicos, y la participación en reacciones de transnitilización. Se cree que la S-nitrosilación se realiza predominantemente por medio de la producción de NO₂, una reacción de segundo orden del NO, seguida de una reacción adicional con NO para generar la especie N₂O₃ (Espey, Miranda, Thomas, & Wink, 2001). Siguiendo esta secuencia, la S-nitrosilación es una reacción de tercer orden del NO. Se han propuesto vías alternativas para inducir nitrosilación por medio de peroxinitrito (ONOO⁻), interacciones NO-tiol en presencia de aceptores de electrones y mecanismos de transnitrosilación (Bryan et al., 2004; Moro et al., 1994).

De relevancia para esta tesis, descamos la formación de nitrotirosina por ser un producto relativamente estable formado por varias vías de reacción nitrooxidativas (Beckman & Koppenol, 1996; Kundu et al., 2009; R. Radi, 2004). Quizás lo más notable sea la reacción de la tirosina con el peroxinitrito, formado por la interacción de radicales superóxido y óxido nítrico. Al ser un fuerte agente oxidante y nitrante, el peroxinitrito media las reacciones de nitración de la tirosina en las proteínas, lo que resulta en la inactivación de ciertas enzimas de mantenimiento (por ejemplo, alfa1-antiproteinasa), enzimas antioxidantes endógenas como la catalasa y la superóxido dismutasa y también inactiva canales iónicos (Li, Gutterman, Rusch, Bubolz, & Liu, 2004; R. Radi, 2004; Rafael Radi, 2018; M. Yang et al., 2012). La nitrotirosina ha sido identificada como un indicador de daño celular e inflamación. Se cree que la medición de la concentración de nitrotirosina sirve como un marcador para el daño causado por la interacción de ROS y RNS en las células.

Antioxidante es cualquier sustancia que, cuando se presenta en concentraciones bajas en comparación con la de un sustrato oxidable, demore o evite significativamente la oxidación de ese sustrato (Forman, 2016). En esta definición, el sustrato se refiere a cualquier molécula de relevancia biológica que se pretende proteger con el antioxidante, por ejemplo, lípidos, proteínas o ADN. Sin embargo, los lípidos se usan frecuentemente como moléculas diana porque (como se mencionó anteriormente) son más reactivos a los oxidantes que a las proteínas o al ADN. Por lo tanto, si una molécula particular es capaz de proteger los lípidos del sistema, también protegería las biomoléculas menos reactivas.

La melatonina tiene la capacidad de comportarse como un "antioxidante químico". Se refiere a su capacidad de prevenir el estrés oxidativo por rutas no enzimáticas, aunque también module enzimas antioxidantes. La melatonina es capaz de neutralizar una cantidad de reactivos tóxicos, incluidas las ROS, las RNS y otros radicales libres (Reiter et al., 2000; Reiter et al., 2008). Al ser un compuesto altamente lipofílico e hidrofílico, la melatonina es capaz de cruzar todas las barreras morfológicas y actuar no solo en cada célula, sino también dentro de cada compartimento subcelular. Por lo tanto, la eliminación de radicales libres la puede ejercer por interacciones intracelulares independientes de cualquier receptor, mientras que otras están mediadas por receptores nucleares (Manchester et al., 2015; Petrosillo et al., 2009; Reiter et al., 2004).

También se ha demostrado que estimula las enzimas antioxidantes y que aumentar la eficacia de los antioxidantes clásicos vitamina E, vitamina C y glutatión (GSH) (Dominguez-Rodriguez et al., 2015; Galano & Reiter, 2018). Además, se ha observado que varios metabolitos que se forman cuando la melatonina neutraliza los reactivos dañinos, son también capaces de neutralizar otros radicales libres lo que sugiere que una cascada de reacciones aumenta la eficacia de la melatonina cuando se usa en condiciones patológicas asociadas con un

aumento del estrés oxidativo (S.R. Pandi-Perumal, 2018; Tan, Manchester, Terron, Flores, & Reiter, 2007; Tengattini et al., 2008).

Potencial antiarrítmico atípico

En 1998, Tan y col. describieron por primera vez el efecto antiarrítmico de la melatonina (Tan et al., 1998). En ese estudio se demostró que reducía las arritmias ventriculares con mayor eficacia que la vitamina C. Numerosos estudios confirmaron la protección antiarrítmica, y lo relacionaron a sus notables propiedades antioxidantes (Bertuglia & Reiter, 2007; Lagneux, Joyeux, Demenge, Ribuoit, & Godin-Ribuoit, 1999; Lee et al., 2002; Sahna et al., 2002; Szárszoi, Asemu, Vaněček, Ošťádal, & Kolář, 2001). Nuestro grupo de investigación corroboró el efecto antiarrítmico de la melatonina en corazones aislados de ratas hembras, al ser administrada en forma continua desde la etapa previa al inicio de la isquemia miocárdica (E. R. Diez et al., 2009). Llamativamente, la protección antiarrítmica tuvo una respuesta dosis dependiente, mientras que la capacidad antioxidante fue igual para todas las dosis estudiadas. El efecto preventivo sobre el acortamiento del potencial de acción que ocurre entre el 7^{mo} y 10^{mo} minuto de la isquemia fue otra variable dosis dependiente encontrada en nuestro estudio. Esto nos llevó a pensar que el mecanismo antiarrítmico podría deberse a una menor heterogeneidad en la repolarización del tejido miocárdico que disminuyera la posibilidad de que se formen y mantengan circuitos de reentrada.

En un estudio reciente, demostramos que la melatonina reduce las arritmias cuando se la administra durante la reperfusión, ya que, en el contexto clínico de los síndromes coronarios agudos, la mayoría de las terapias se administran en el momento de la reperfusión (E. R. Diez et al., 2013). La melatonina protegió al ser administrada a corazones aislados de ratas alimentadas con fructosa y de ratas espontáneamente hipertensas. Estos animales presentaron mayor actividad de la enzima NADPH oxidasa, que es uno de los principales de sistemas generadores de radicales libres y, por ende, mayores niveles de estrés oxidativo. El efecto antiarrítmico no se vio afectado en los modelos con mayor estrés oxidativo y en todos los grupos se acompañó de un acortamiento transitorio de la duración del potencial de acción durante los primeros 3-5 minutos. Este resultado fue interpretado como una reducción de la

capacidad de generar posdespolarizaciones tempranas y tardías. Llamativamente los eventos arrítmicos autolimitados, como las extrasístoles ventriculares, las duplas, las salvas e incluso las taquicardias ventriculares no sostenidas ocurrieron en todos los grupos experimentales. Una gran diferencia fue que los corazones tratados con melatonina no presentaron formas sostenidas de arritmias, ya sea taquicardia ventricular sostenida o fibrilación ventricular. Estos resultados (acortamiento del potencial y ausencia de arritmia sostenidas) son difíciles de reconciliar con los mecanismos postulados para los circuitos de reentrada.

El mismo año de nuestra publicación de la protección antiarrítmica de la melatonina administrada en la reperfusión otro grupo publicó que la melatonina protege contra las arritmias, al aumentar el umbral para inducir eléctricamente la fibrilación ventricular sostenida, a través de aumentar la conexina 43 miocárdica mediante la modulación de las señales cardioprotectoras por la proteína quinasa C (PKC) en ratas hipertensas (Benova et al., 2013). Los efectos antiarrítmicos se atribuyen a la atenuación de las anormalidades miocárdicas de la conexina asociadas con la preservación de la arquitectura miocárdica y la mejora de la conducción cardíaca.

La respuesta la melatonina crónica en modelos con mayor arritmogénesis.

La mayoría de las intervenciones terapéuticas postuladas hasta el momento han mostrado buenos resultados a nivel experimental en modelos con animales “jóvenes y sanos”. Sin embargo, muchas de ellas no han podido ser reproducidas y llevadas a la práctica en el ámbito clínico o los resultados no han sido significativos (Hausenloy, Baxter et al. 2010; Ovize, Baxter et al. 2010; Schwartz Longacre, Kloner et al. 2011; Morel, Perret et al. 2012).

Esta falla en obtener nuevos tratamientos podría deberse a múltiples factores, entre los que se destacan las modificaciones en la fisiología que se asocian a las condiciones clínicas de los pacientes, como patologías comórbidas, tratamientos previos, o reperfusión muy tardía (Ferdinandy, Schulz et al. 2007). La aterosclerosis afecta el equilibrio entre las especies reactivas del oxígeno y el óxido nítrico, la hipertrofia se acompaña de remodelado estructural y funcional del miocardio y la edad reduce la expresión de varias proteínas quinazas. En ratas

espontáneamente hipertensas, el poscondicionamiento no logró reducir el infarto, pero sí mejora la disfunción contráctil (Fantinelli and Mosca 2007; Penna, Tullio et al. 2010). Pero en ratas con hipertrofia del VI inducida sobrecarga de presión, el poscondicionamiento aún es capaz de reducir el tamaño del infarto (Feng, Fischer et al. 2006; Zhu, Feng et al. 2006). Por otra parte, el poscondicionamiento isquémico se pierde en los corazones de ratas con estenosis coronaria crónica, y la protección es restaurada por el carvedilol (Oikawa, Yaoita et al. 2008). Tanto el poscondicionamiento isquémico como el inducido por sevoflurano se pierden en ratas y conejos tratados con agentes antidiabéticos bloqueadores de los canales K_{ATP} (Obal, Dettwiler et al. 2005; Donato, DAnnunzio et al. 2007).

Recientemente demostramos que la obstrucción ureteral unilateral provocó un remodelado cardíaco que se acompañó de un aumento de las arritmias de reperfusión (ER. Diez et al., 2015). Los eventos cardiovasculares ocurren con mayor frecuencia en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC). Las arritmias ventriculares son particularmente prevalentes entre los pacientes con ERC, incluso cuando esos pacientes no sufren ningún tipo de desequilibrio de electrolitos. El riesgo de mortalidad también aumenta en los pacientes con ERC que sufren un síndrome coronario agudo.

Se desconoce si la melatonina presentará alteraciones en sus propiedades cardioprotectoras si es administrada en animales con factores de riesgo proarritmogénicos. Por lo tanto, es de suma importancia evaluar los efectos de la protección antiarrítmica en condiciones donde la fisiología cardiovascular se ha modificado previamente al episodio de isquemia-reperfusión.

Capítulo II - Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

En esta tesis se postula que la melatonina protege contra las enfermedades cardiovasculares, en particular contra las arritmias por reperfusión y contra la hipertensión arterial. El efecto lo logra, en parte, mediante la activación de receptores para esta indolamina presentes en la membrana, vías de señalización relacionada con los receptores de membrana y la preservación de la comunicación intercelular mediada por las uniones en hendidura de los miocitos. Sus efectos se ejercen tanto a niveles fisiológicos como farmacológicos. La protección obtenida mediante la administración aguda durante la reperfusión persiste en modelos animales expuestos a factores capaces de incrementar la arritmogénesis. Cuando se la administra crónicamente el remodelado cardíaco y las arritmias.

Objetivos

Generales

Determinar la protección con melatonina sobre las arritmias ventriculares generadas en un modelo experimental de isquemia-reperfusión en corazones aislados de ratas, tratar de dilucidar los mecanismos electrofisiológicos, subcelulares e intercelulares involucrados y probar la efectividad antiarrítmica de la melatonina endógena y de tratamientos crónicos en corazones de animales con mayor arritmogénesis.

Específicos

1. Demostrar la participación de los receptores de melatonina, de la proteína quinasa C, de los canales de K^+ regulados por ATP (K_{ATP}), de los canales de K^+ asociados al receptor (Kir3.x) y de la conexinas en el efecto antiarrítmico de la melatonina al inicio de la reperfusión y también en corazones perfundidos con bajas concentraciones de potasio.
2. Evaluar si la reducción de la producción endógena de melatonina tras la exéresis bilateral de los ganglios cervicales superiores provoca un aumento en la arritmogénesis en corazones sometidos a isquemia/reperfusión.
3. Determinar si la administración crónica de melatonina es capaz de proteger contra las taquiarritmias ventriculares en corazones de ratas con demostrada mayor arritmogénesis como ser los obtenidos de animales con obstrucción ureteral unilateral o los obtenidos de ratas espontáneamente hipertensas.

Capítulo III - Materiales y Métodos Generales

Animales

Se procedió conforme lo estipulado en el aval 106/2017 del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNCuyo.

Modelos experimentales murinos

Exéresis del ganglio cervical superior bilateral: Los animales fueron operados según la técnica por colegas de nuestra institución. Los experimentos en corazón aislado se realizaron luego de 21-25 días (Savastano et al., 2010).

Nefropatía obstructiva unilateral: Obstrucción quirúrgica a nivel urétero-pélvico mantenida durante 15 días. Los experimentos de corazón aislado se realizaron a los tres meses de vida.

Ratas machos normotensas cepa WKY y ratas espontáneamente hipertensas cepa SHR de 3 meses de edad recibieron 4 mg/Kg/día de melatonina en frascos protegidos de la luz disuelta en el agua de bebida durante 15 días o agua corriente como controles

Arritmias en corazones aislados de rata.

Los modelos patológicos estudiados fueron sometidos a protocolos de isquemia reperfusión al finalizar la etapa experimental in vivo en todos los casos ,

Luego de 20 min de estabilización y 10 min de preisquemia, se realizó una isquemia regional (por ligadura de la arteria coronaria descendente anterior) de 10 min, seguidos de 10 minutos de reperfusión.

En los experimentos donde se administraron las drogas al momento de la reperfusión se utilizaron las siguientes concentraciones

Durante la reperfusión se administraron los siguientes tratamientos: MEL melatonina 50 μ M, LUZ luzindole 5 μ M, CHE Chelerythrina 2 μ M, GLI glibenclamida 10 μ M, TQ tertiapina-Q 10 nM. Las dosis son acordes a publicaciones previas. En otro grupo de corazones se reperfundi6 con una soluci6n de 1 mmol/L de K⁺ durante 25 minutos luego de la estabilizaci6n del preparado.

Electrocardiograma y ecocardiograma.

Ambos estudios se realizaron en ratas sedadas con ketamina 80mg/kg, bajo monitoreo y control de la temperatura a fin de evitar hipotermia. Se estudiaron al inicio del tratamiento, luego cada semana y finalmente previo a la eutanasia. Se determinaron la frecuencia, ritmo cardíaco, los intervalos y amplitudes del ECG y el eje eléctrico. Se estudió la variabilidad de

la frecuencia cardíaca. Se analizó la función y morfología ventricular mediante ecocardiograma bidimensional, modo M.

Variables electrofisiológicas en corazones aislados.

La presión de perfusión fue ajustada de acuerdo a la presión diastólica por elevación de la columna de líquido. Se registraron y midieron los potenciales de acción epicárdicos. Se determinaron las arritmias de acuerdo a la Convención de Lambeth y a un escala de severidad: 0-Ritmo sinusal, 1-Latidos ventriculares prematuros o bigeminia, 2-Salvas, 3-TV no sostenida (<30 segundos) y 4-TV sostenida (>30 segundos) ó FV. Estos procedimientos han sido descriptos previamente, y datos detallados de pueden encontrar en las publicaciones de nuestro grupo.

Peso, parámetros bioquímicos.

Se evaluó la evolución del peso de los animales a lo largo de los protocolos. Los cambios metabólicos se constataron a través de tolerancia a la sobrecarga de glucosa, glucemia e insulinemia (RIA) basales (cálculo del índice HOMA), triglicéridos, colesterol total, HDL y LDL (método colorimétrico enzimático). Los cambios a nivel de la función renal se evaluaron con uremia, creatinina, PTH, calcemia, fosfatemia y ionograma.

Inmunofluorescencia y westernblot de conexina 43, NFκB y vCAM.

Se fijaron 5 a 8 corazones por grupo de cada protocolo experimental y se prepararon para inmunofluorescencia. Se evaluó la distribución en el tejido mediante anticuerpos monoclonales para conexina 43, NFκB p65 y vCAM. Muestras de ventrículo izquierdo fueron congelados al 4to min de reperfusión usando nitrógeno líquido. Los mismos fueron usados para cuantificación por westernblot utilizando anticuerpos policlonales fosfo-especifico de conexina 43 (ser368) y contra la PKCε; monoclonales contra conexina 43 y N-cadherina y nitrotirosina.

Cambios estructurales cardiovasculares:

Se utilizó la tinción tricrómica de Masson para examinar los diámetros de la pared y la luz vascular, con ello se calculó la relación lineal o superficial lumen/media. Se determinaron las moléculas de adhesión por inmunohistoquímica de VCAM-1 e NFκB en cortes vasculares usando anticuerpos vCAM-1 y Rel-A, a través de la técnica inmunofluorescencia indirecta (IFI) y co-localización en tejido. Usando anticuerpos contra dichas proteínas, examinamos el remodelado de matriz extracelular por inmunohistoquímica de MMP-2, MMP-9 y conexina 43 en cortes vasculares.

Determinaciones de Estrés Oxidativo

Se determinaron las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en muestras de tejido ventricular, el poder antioxidante total como porcentaje de inhibición de la absorbancia del radical ABTS, la actividad de NAD(P)H oxidasa en tejido, por emisión de quimioluminiscencia tras reacción con lucigenina. Se determinó el nivel de nitrotirosina por western blot.

Análisis estadístico

Se establecieron los contrastes entre grupos por ANOVA o por Kruskal-Wallis, según corresponda. La frecuencia de variables cualitativas fue evaluada por la prueba exacta de Fisher. La supervivencia se comparó con tests log-rank y Gehan-Wilcoxon. Se fijó la significancia en $p < 0.05$. Se usó el programa PRISM 5.0 para los cálculos estadísticos

Capítulo IV - CARDIOPROTECCIÓN AGUDA

Este capítulo describe los efectos cardioprotectores de la administración aguda de melatonina frente a tres formas de injuria miocárdica: el estrés oxidativo, la hipocalcemia y la isquemia-reperusión.

El estrés oxidativo provoca daño miocárdico y se asocia al desencadenamiento de arritmias. El principal y mejor estudiado mecanismo protector de la melatonina es su efecto antioxidante. La primera sección del capítulo describe las acciones electrofisiológicas de la melatonina ante la generación exógena de radicales libres mediante el sistema xantina-xantina oxidasa y se la compara con otros antioxidantes.

La hipocalcemia prolonga los intervalos QRS y QT, y aumenta el riesgo de sufrir arritmias. La melatonina acorta el potencial de acción y mejora la comunicación intercelular como posibles mecanismos antiarrítmicos. La segunda sección del capítulo describe las propiedades de la melatonina ante la hipocalcemia y evalúa la participación de los receptores de membrana y la comunicación intercelular mediada por conexina 43.

El proceso de isquemia-reperusión es complejo e involucra eventos fisiopatológicos entre los que se destacan el desbalance metabólico, el estrés oxidativo y las alteraciones en la homeostasis hidroelectrolítica. La tercera sección del capítulo evalúa los mecanismos protectores de la melatonina al ser administrada durante la reperusión en corazones aislados. Se analiza la participación de los receptores de membrana de la melatonina, la señalización mediada por proteína quinasa C, la activación de canales de K^+ .

La cuarta sección desarrolla los efectos electrofisiológicos de la administración endovenosa previo a la reperusión de melatonina, el luzindol y la combinación de ambos mediante mapeo epicárdico en corazones in situ y la relación con la expresión y distribución de la conexina 43.

Generación exógena de radicales libres

La producción de radical libres sufre un gran aumento durante la reperusión miocárdica y provoca estrés oxidativo. Una de las principales fuentes de radicales libres en el corazón de la rata es la xantina oxidasa. Esta enzima, en presencia de oxígeno, convierte la hipoxantina en ácido úrico y como subproducto genera radical superóxido [8]. En las células isquémicas existe una concentración elevada del sustrato de la xantina oxidasa, dado que el ATP es metabolizado con la acumulación de AMP, que luego es degradado a hipoxantina [13]. Es importante destacar que en las células no isquémicas, la hipoxantina es oxidada por una xantina dehidrogenasa que no reduce al O_2 sino que reduce al NAD^+ , por lo tanto, esta enzima no produce radicales libres, pero en las células isquémicas la xantina dehidrogenasa es convertida en xantina oxidasa, como resultado de una modificación proteolítica mediada por el Ca^{2+} . En condiciones de isquemia, la concentración intracelular de este ion se halla

aumentada y juega un papel destacado en la génesis de la arritmias por otros mecanismos electrofisiológicos [9]. Debido a la alta reactividad de los radicales libres y su consecuente corta vida media, no es posible administrarlos exógenamente. Por ello se recurrió a la administración exógena de la enzima xantina oxidasa y la xantina como sustrato ya permiten evaluar el efecto de la generación de radicales superóxido en corazones sin que otras alteraciones hidroelectrolíticas o metabólicas fueran el evento primario. En especial nos enfocamos en evitar como desencadenantes al aumento intracelular de Ca^{2+} y Na^{+} o extracelular de K^{+} , al déficit energético y la sobre disponibilidad de hipoxantina endógena. Como se describió en la introducción, la melatonina posee propiedades antioxidantes y antiarrítmicas. El principal mecanismo protector contra la injuria por isquemia-reperfusión asociado a la melatonina es su efecto antioxidante [6]. Sin embargo, no se ha demostrado protección con melatonina contra las arritmias en corazones aislados en los que se les genere en forma aguda y exógena radicales libres.

En este capítulo se explora la siguiente hipótesis: la melatonina protege contra los trastornos electrofisiológicos que provoca la administración aguda de agentes capaces de generar estrés oxidativo.

Para probar esta hipótesis aplicamos especies reactivas derivadas del oxígeno generadas por el sistema xantina+xantina oxidasa (X+XO) administrado exógenamente a corazones aislados en presencia o ausencia de 50 μM de melatonina. Estudiamos los potenciales transmembrana para evaluar las modificaciones electrofisiológicas locales durante las intervenciones y analizamos el ritmo en los electrocardiogramas de superficie.

El tratamiento con X+XO provocó fibrilación ventricular a partir de los 15 min de exposición, mientras que esto fue evitado en presencia de melatonina y de superóxido dismutasa (Fig. 1A). La adición de catalasa no protegió contra la fibrilación ventricular. Durante el periodo de lavado de los tratamientos, los corazones tratados con melatonina o con SOD presentaron ritmo sinusal, mientras el resto de los grupos mantuvieron un predominio de arritmias ventriculares sostenidas (Fig. 1B).

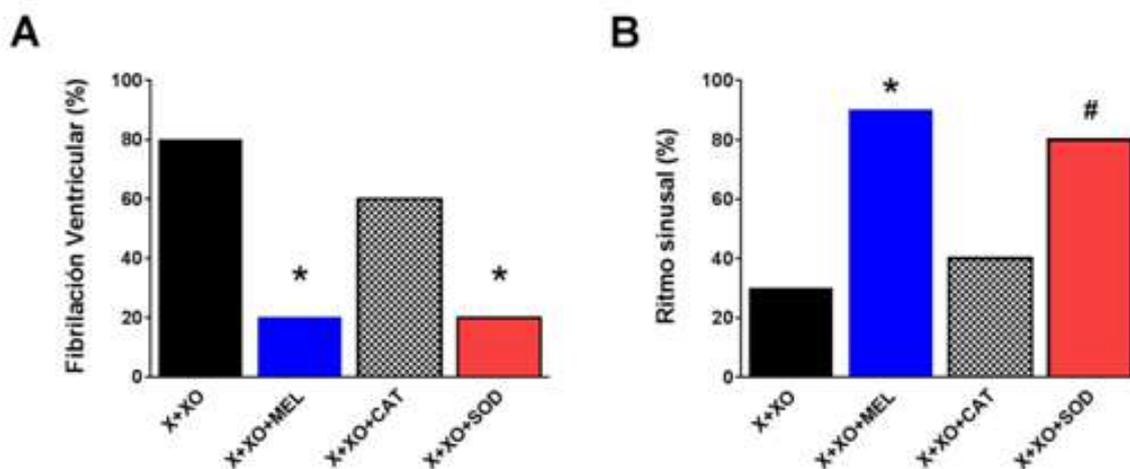


Fig. 1. Incidencia de arritmias durante el tratamiento con X+XO y ritmo sinusal en el periodo de lavado. **A.** Las barras indican el porcentaje de corazones que se desarrollaron fibrilación ventricular (FV) para cada grupo. * $P = 0,023$ vs X+XO por la prueba exacta de Fisher. **B.** Las barras indican el porcentaje de corazones para cada grupo. * $P = 0,0055$ vs X+XO y # $=0,023$ vs X+XO por la prueba exacta de Fisher.

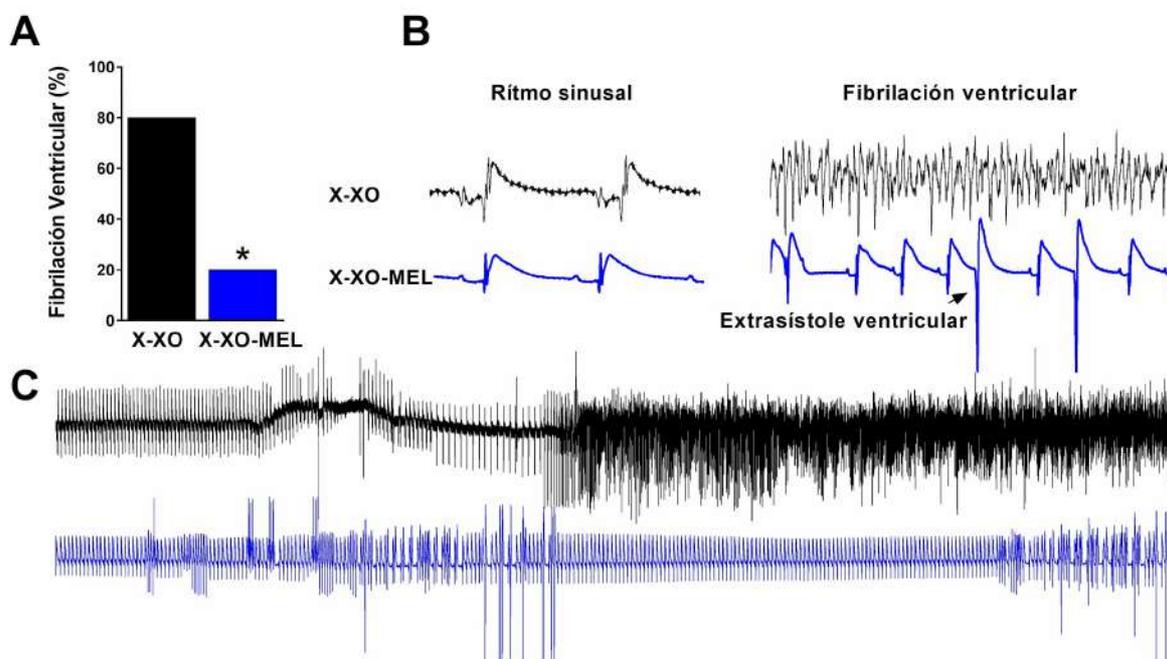


Figura 2. Arritmias ventriculares y electrocardiogramas. Trazados representativos del electrocardiograma, en ritmo sinusal y en dos tipos de arritmias. La forma más severa es la fibrilación ventricular, la menos severa es la extrasístole ventricular. **C.** Contraste entre arritmias severas sostenidas en el grupo X-XO y poco severas y autolimitadas en el grupo

Cambios en los potenciales de acción epicárdicos

Las especies reactivas del oxígeno generadas por el complejo X+XO produjeron una disminución significativa del potencial de reposo de las células epicárdicas ventriculares, y este fenómeno indujo una acentuada disminución de la amplitud del potencial de acción (Fig-3). La SOD anuló por completo ambos cambios mientras que la melatonina los atenuó y la adición de CAT no los evitó. La melatonina fue el único tratamiento que impidió la prolongación de la duración del potencial de acción provocado por la generación exógena de radicales libres. Los resultados de los tratamientos individuales no provocaron diferencias en los potenciales de acción.

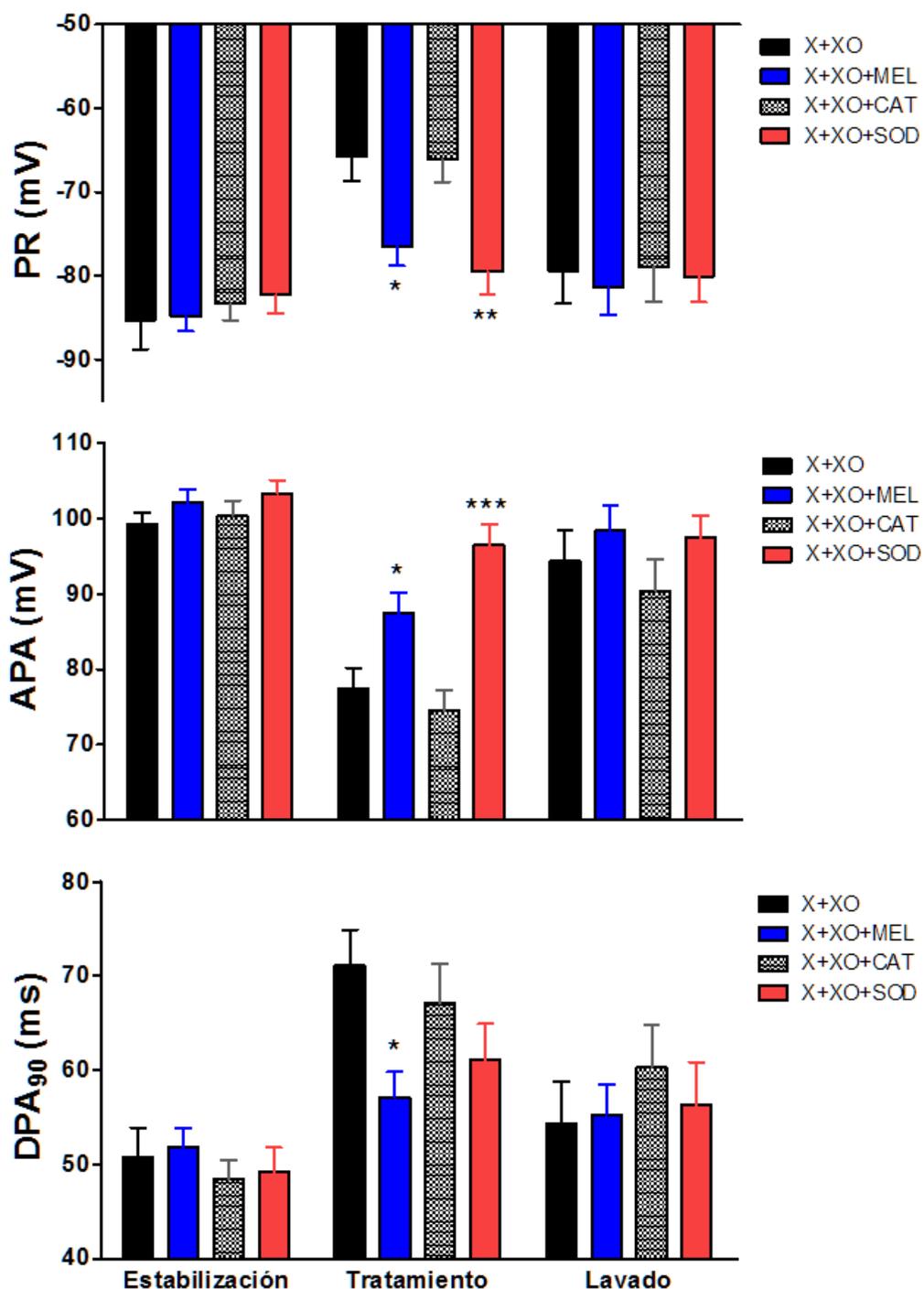


Fig 3. Potencial transmembrana para cada grupo en tres periodos: estabilización, durante los 20 minutos de exposición a los tratamientos, al cabo de los 10 minutos de lavado. PR Potencial de reposo. APA Amplitud del potencial de acción. DPA₉₀ duración del potencial al 90% de la repolarización. * P < 0,05; ** P < 0,01 *** P < 0,001 por ANOVA dos vías de medidas repetidas.

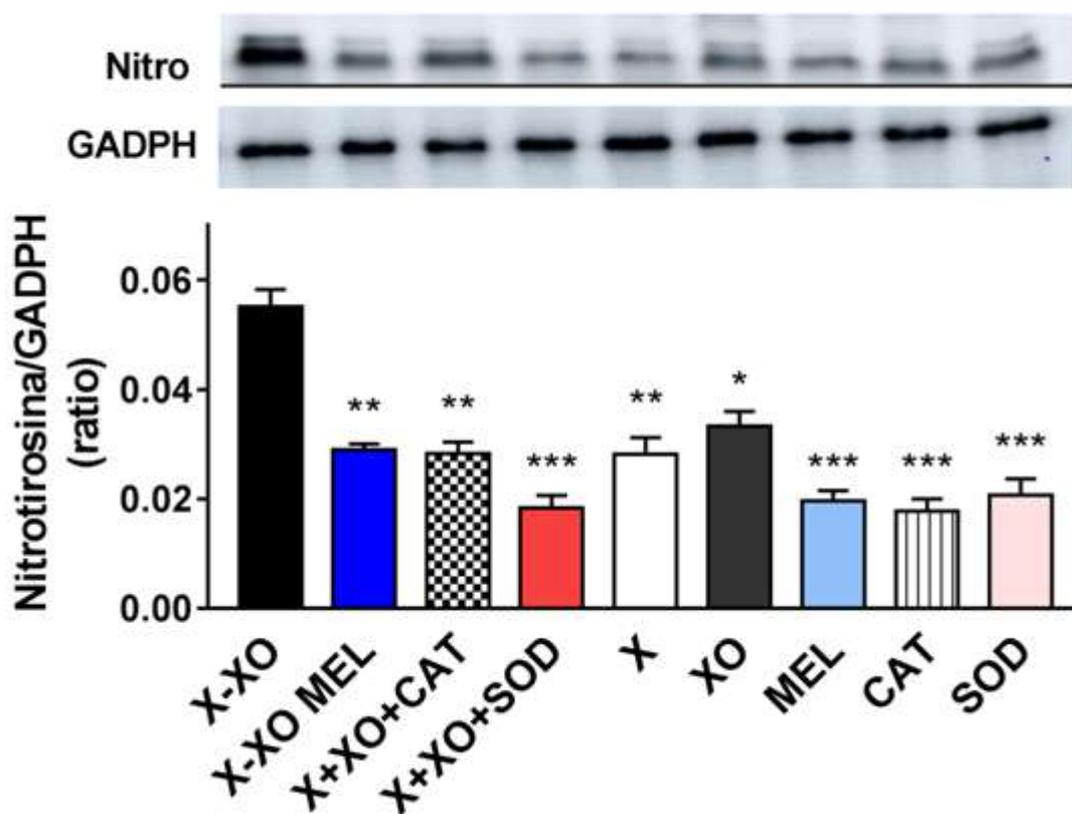


Fig. 3. Determinación de los niveles de nitrotirosina. En la parte superior se muestran imágenes representativas de los inmunoblot obtenidos con un anticuerpo que detecta 3-nitro-L-tirosina de proteínas nitradas por peroxinitritos y una proteína de referencia de carga (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, GAPDH). Las barras indican la proporción entre la intensidad de las señales de nitrotirosina/GADPH como promedio \pm error estándar de n=4-5 muestras por grupo. * P <0,05; ** P <0,01 *** P<0,001 por ANOVA y post test de Bonferroni.

Los corazones tratados con X-XO presentaron un aumento en los niveles de estrés oxidativo, evidenciado por el aumento de la nitrotirosina en las muestra de tejido. La acción pro-oxidante de la X-XO fue reducida por los tres antioxidantes, siendo la protección sutilmente superior en los tratados con SOD.

Conclusiones

Con el objeto de evitar las complejas interacciones que ocurren durante la isquemia y la reperfusión que van más allá del estrés oxidativo, evaluamos los efectos de las especies reactivas del oxígeno a través de la perfusión de corazones no sujetos a isquemia previa, usando el sistema enzimático X+XO. En este sistema la xantina oxidasa y la xantina reaccionan para dar: Xantina + O₂ → Ác. Úrico + superóxido. La dismutación del superóxido genera también agua oxigenada que por medio de las reacciones de Fenton y de Haber-Weiss pueden producir hidroxilo, otro radical altamente reactivo. El anión superóxido puede unirse al óxido nítrico y formar radicales peroxinitritos que son altamente reactivos con las proteínas. Como un fuerte agente oxidante y nitrante, el peroxinitrito media las reacciones de

nitricación de la tirosina en las proteínas, lo que resulta en la inactivación de ciertas enzimas de mantenimiento (por ejemplo, alfa1-antiproteinasa), así como enzimas antioxidantes endógenas como la catalasa y superóxido dismutasa. Las modificaciones que provocan las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno se manifiestan a nivel electrofisiológico como cambios en los potenciales de acción y el desencadenamiento de arritmias.

Los mayores efectos observados sobre el potencial de acción ventricular fueron una despolarización reversible asociada con un descenso en la amplitud y la prolongación de la duración, que se acompañaron de taquiarritmias ventriculares en la mayoría de los corazones tratados con X+XO. La figura 3 confirma que la X-XO aumentó los niveles de nitrotirosina y que la melatonina, la SOD y la CAT los disminuyeron. Los cambios electrofisiológicos inducidos por X-XO fueron atenuados por acción de la melatonina y de la SOD, pero la CAT no los evitó. Sería poco esperable que los cambios eléctricos sean mediados por H_2O_2 ya que la CAT los hubiera evitado. Estos resultados confirman que la melatonina es un potente antioxidante y, además, cambia algunos parámetros del potencial de acción por otros mecanismos que van más allá de ser antioxidante. La melatonina comparte con la superóxido dismutasa la protección frente a los cambios por estrés oxidativo y el mantenimiento del potencial de reposo y la amplitud. La melatonina además tiene un efecto sobre la duración del potencial, que ya no es tan sólo explicable por los efectos antioxidantes. Otro antioxidante como la CAT protege contra el estrés oxidativo pero no contra los cambios en el potencial transmembrana o las arritmias. Cuando se analizan en el mismo sistema agentes productores de estrés oxidativo y antioxidantes se pueden separar efectos asociados al estrés oxidativo de otros efectos antiarrítmicos.

Cabe destacar que la prolongación en la duración del potencial de acción inducida por el estrés oxidativo solo fue evitada por la melatonina. La SOD no impidió la prolongación, pero el efecto antiarrítmico fue similar al de la melatonina. Estos resultados son un primer indicio de que los cambios en la duración provocados por la melatonina podrían no ser determinantes en su protección antiarrítmica. En las secciones que se desarrollan a continuación se profundiza el análisis entre el efecto de la melatonina sobre la duración del potencial de acción y la protección antiarrítmica.

Hipocalemia, comunicación intercelular y repolarización

La hipopotasemia prolonga los intervalos QRS y QT, y aumenta el riesgo de sufrir arritmias. La melatonina acorta el potencial de acción y mejora la comunicación intercelular como posibles mecanismos antiarrítmicos. La segunda sección del capítulo describe las propiedades de la melatonina ante la hipocalemia y evalúa la

participación de los receptores de membrana y la comunicación intercelular mediada por conexina 43.

3.1 arritmias

La melatonina fue el único tratamiento que redujo la incidencia de fibrilación ventricular a 59% (10/17, $P = 0,0029$ vs control, Figura 1). En los otros grupos, se produjo fibrilación ventricular en casi todos los casos (control 18/18, luzindol 11/11 y luzindol + melatonina 14/15). La melatonina retrasó el inicio de la fibrilación ventricular a 12 minutos (9-25 RIC) ($P = 0.041$), 5 minutos más que el inicio encontrado en el grupo control, que fue de 7 minutos (5-12 rango intercuartil, ICR). Los corazones perfundidos con luzindol y luzindol + melatonina tuvieron una apariencia mediana de fibrilación ventricular de 6 minutos (4-11 RIC) y 8 minutos (6-14 RIC), respectivamente.

La incidencia de otros tipos de arritmias ventriculares como la taquicardia ventricular, las salvas y el complejo ventricular prematuro no difirió entre los cuatro grupos. Las arritmias auriculares y las alteraciones de la conducción atrioventricular ocurrieron con la misma frecuencia en todos los grupos.

Durante NormoK, los corazones tratados con melatonina recuperaron el ritmo sinusal más rápidamente. Más de la mitad de los corazones no se recuperaron de los otros tres grupos.

3.2 ECG

LowK indujo bradicardia y prolongó los intervalos PR, QRS y QT, QTc (Figura 2). La melatonina evitó la ampliación del QRS que se muestra en los grupos control y luzindol. En MEL + LUZ, la ampliación fue parcial, no alcanzando diferencias con respecto al período de estabilización o el grupo de control. La perfusión con melatonina, luzindol y luzindol + melatonina no modificó la frecuencia cardíaca ni

ninguno de los intervalos: PR, QT y QTc. Esto indica que la preservación de la conducción de melatonina se encontraba principalmente en el tejido ventricular.

El ventrículo izquierdo desarrolló presión.

Al comienzo de la K baja, todo el corazón mostró una reducción transitoria de la presión desarrollada en el ventrículo izquierdo, seguido de un aumento progresivo que alcanzó valores más altos que durante el período de estabilización (Figura 2). Cuando comenzó la fibrilación ventricular la curva se aplanó. Todos los corazones que recuperaron el ritmo sinusal durante el uso de NormoK mostraron una presión reducida en el desarrollo del ventrículo izquierdo hasta el final de los períodos experimentales sin diferencias entre los grupos.

3.4 potenciales de acción

Los potenciales de acción se alargan durante el LowK y las oscilaciones del potencial de membrana se hacen cada vez más frecuentes (Figura 3). Las 0 fases de los potenciales de acción se retrasaron con respecto al inicio de los complejos QRS, lo que indica una perturbación de la conducción, pero sin cambios en la amplitud o el dV / dt_{max} , lo que sugiere que los canales de Na no se vieron afectados.

La melatonina redujo la duración del potencial de acción al 50% de la repolarización, pero no al 90% de repolarización. Un efecto modesto después de la reducción de la despolarización no fue suficiente para prevenir las arritmias transitorias (Figuras 2 y 3). La melatonina fue el único tratamiento que conservó el mismo retraso de activación que el observado durante el período de estabilización. La hiperpolarización, la amplitud y el dV / dt_{max} no difirieron entre los grupos.

3.5. Conexina 43

3.5.1 Contenido de la conexina 43 y fosforilación.

La cantidad total de conexina 43 se mantuvo sin cambios después de 5 minutos de LowK y ninguno de los tratamientos mostró diferencias durante este período (Figura 4). Sin embargo, las tres bandas de los diferentes estados de fosforilación de la conexina mostraron un predominio de la forma desfosforilada (P0) con respecto a las dos formas fosforiladas (P2 y P1) en los grupos control y LUZ. La melatonina mostró una mayor proporción de formas P2 independientemente de la presencia de luzindol. Después de dos minutos de fibrilación ventricular, todos los corazones mostraron un aumento en el contenido de conexina, principalmente en su estado desfosforilado. Al final de los 25 minutos de NormoK, solo el grupo de control mostró un aumento en la forma P0 de conexina 43 (Figura 5). La cuantificación de la forma desfosforilada de conexina 43 confirmó los resultados de las mediciones totales de conexina 43 (Figura 6).

3.5.2 Distribución de Connexin 43

Después de la estabilización, el 80% de la conexión 43 mostró la ubicación termino-terminal (Figura 7). La baja concentración de K⁺ redistribuyó la conexina 43 a otros sitios. La melatonina evitó la lateralización de la conexina 43 durante los primeros 5 minutos de K⁺ bajo, pero después de 2 minutos la FV todos los corazones mostraron un nivel similar de desarreglo. Después de la restitución de potasio, la conexina no se recuperó en el grupo de control y se recuperó parcialmente en los otros grupos.

La baja exposición a K⁺ redistribuye alrededor del 40% de la conexión 43 lejos de la ubicación de la terminal.

Discusión

En este estudio, demostramos que la administración aguda de melatonina durante la perfusión baja en potasio protege contra la FV. Este efecto fue mediado por la

activación de los receptores de melatonina y por la prevención de la desfosforilación y la lateralización de Cx43.

Los cambios electrofisiológicos inducidos por la hipopotasemia se han documentado en humanos y en modelos experimentales. La hipopotasemia grave induce cambios en la repolarización ventricular, como el alargamiento del intervalo QT, la disminución de la amplitud y la ampliación de las ondas T, las ondas U prominentes, la fusión de las ondas T y U asociadas a un mayor riesgo de muerte arrítmica. Aquí confirmamos el alargamiento del intervalo QT que se correlacionó con un aumento en la duración del potencial de acción. La melatonina no evitó la prolongación del potencial de acción inducida por la hipopotasemia cuando se midió al 90% de la repolarización, pero mantuvo la APD50 y hizo que el potencial de membrana fuera más estable, mostrando menos despolarizaciones (ver flechas en la Fig.). La luzindol anuló ambos efectos de la melatonina, lo que sugiere la participación de la activación del receptor de melatonina en la preservación del potencial de membrana.

La hipopotasemia disminuye la actividad de la ATPasa de Na-K, lo que conduce a una sobrecarga intracelular de Ca^{2+} y esto facilita el desarrollo de posdepolarizaciones retrasadas a través de la corriente de entrada transitoria. Las despues de despolarizaciones tardías se consideran posibles desencadenantes de la arritmia porque pueden iniciar un potencial de acción en células aisladas. Sin embargo, es poco probable que se pueda iniciar un potencial de acción en el tejido debido a una falta de coincidencia entre la fuente y el sumidero. Para superar el desajuste, debe haber un sumidero reducido a través del desacoplamiento o un aumento de la fuente a través de la sincronización de posdepolarizaciones retardadas entre celdas adyacentes. Ambas situaciones podrían asumirse

basándose en los resultados de los estudios de conducción anisotrópica y las imágenes de inmunofluorescencia.

De hecho, la hipopotasemia induce anomalías en la conducción como aumento de la amplitud y la duración de la onda P, una ligera prolongación del intervalo PR, bloqueo auriculoventricular, aumento de la duración del QRS y paro cardíaco.

Encontramos estos trastornos de la conducción electrocardiográfica completos durante nuestro modelo experimental de hipopotasemia. La melatonina evitó el ensanchamiento del QRS y el retraso de activación del potencial de acción epicárdica. Este último podría considerarse como un sustituto de la velocidad de conducción en tejidos complejos como los ventrículos, asumiendo las rutas desconocidas desde los puntos de activación endocárdicos que indican el inicio de QRS a los miocitosepicárdicos empalados.

La lateralización de las conexinas se ha detectado en fibrilación auricular crónica, hipertrofia cardíaca, insuficiencia cardíaca y después de un infarto de miocardio. Un aumento en la fracción de las conexinas laterales que forman canales funcionales mejora la velocidad de conducción transversal y contribuye a la propagación del impulso arritmogénico. La lateralización de la unión de la brecha con un alto acoplamiento lado a lado de cardiomiocitos puede favorecer el bloqueo de la conducción debido a los desajustes entre la fuente y el sumidero. Un bloqueo unidireccional puede conducir a círculos de reentrada que dan como resultado taquicardia o fibrilación ventricular. La lateralización aguda aquí descrita debe considerarse como otro factor arritmogénico ... la melatonina evitó la lateralización. Además, otros agentes antiarrítmicos como el metoprolol llevaron a un menor grado de lateralización y una menor velocidad de conducción transversal.

Cx43 tiene múltiples sitios de fosforilación que podrían conducir a un mejor acoplamiento o desacoplamiento con respecto al aminoácido residuo objetivo, pero

la desfosforilación está claramente asociada con el desacoplamiento. Aún no se sabe si la desfosforilación de Cx43 durante el bajo nivel de potasio es el resultado del aumento de la actividad de la fosfatasa y / o de la quinasa y cuáles son los objetivos de la melatonina que impidieron la desfosforilación. La desfosforilación de Cx43 se atribuyó previamente a la disminución de la concentración de ATP intracelular y la disminución de la fuerza conductora termodinámica para la fosforilación. Curiosamente, nuestros resultados histoquímicos indican una disminución moderada en las fuentes de ATP que coincide con el aumento de Cx43 no fosforilado.

Las reducciones dramáticas en la comunicación de la brecha y la pérdida concomitante de Cx43 fosforilada y la acumulación de Cx43 no fosforilada se informaron previamente en otros modelos experimentales, pero la relación entre los cambios en la desfosforilación y el desacoplamiento no se definió directamente en este estudio.

Nuestros resultados podrían ser relevantes principalmente en aquellas situaciones en las que se puede anticipar la hipopotasemia aguda como en la diálisis. El proceso de diálisis, incluso con todas las mejoras en los últimos años, todavía tiene que lidiar con el desequilibrio agudo de electrolitos. Se encontraron aumentos importantes en el intervalo QT y la dispersión QT después de la diálisis.

Proponemos que la melatonina podría hacer que el corazón sea más resistente a los eventos arrítmicos desencadenados por cambios rápidos en las concentraciones de electrolito-plasma, independientemente de la falta de efectos en el ECG.

Además, esos pacientes también sufren trastornos en los ritmos circadianos y niveles bajos de melatonina.

Sin embargo, las traducciones clínicas de nuestros resultados deben hacerse con precaución, principalmente porque usamos una dosis alta de melatonina

administrada directamente al corazón. Basado en la farmacocinética de la melatonina en humanos, para lograr una concentración similar en el plasma, debe administrarse más de 10 veces la dosis intravenosa más alta probada hasta que se sepa [Andersen 2016]

Se requerirán estudios futuros para definir los residuos de aminoácidos específicos de Cx43 involucrados en los efectos antiarrítmicos de la melatonina.

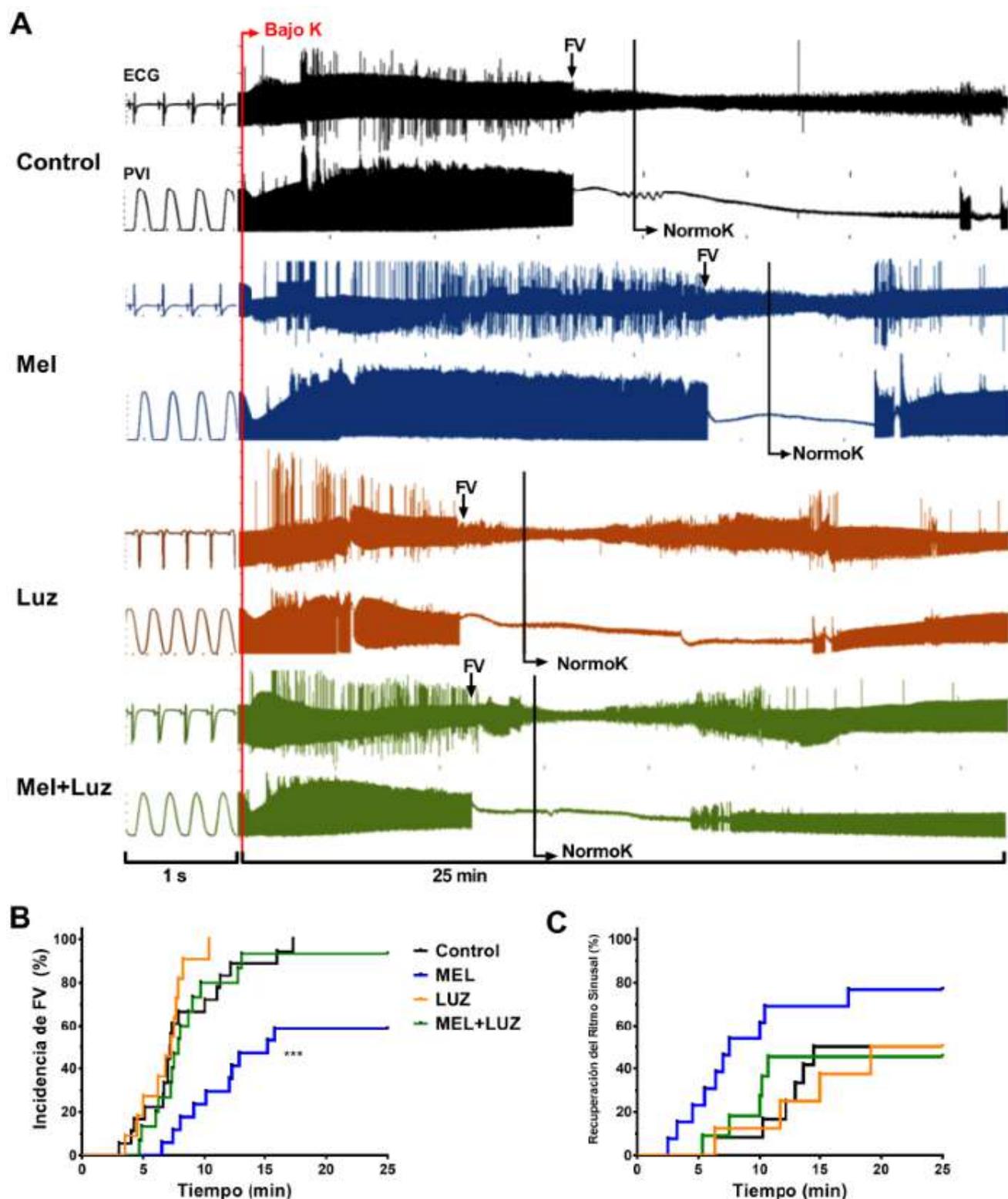


FIGURA 1-Figura 1. Fibrilación ventricular (VF) inducida por niveles bajos de potasio (LowK) y recuperación después de la restitución del nivel normal de potasio (NormoK) en respuesta a melatonina 100 μ M (MEL), luzindol 5 μ M (LUZ). Melatonina + luzindol (MEL + LUZ) y 0,25 ml / L de dimetilsulfóxido como vehículo

de drogas (Control). A. Electrograma (ECG) y presión del ventrículo izquierdo (LVP) durante la exposición a LowK y restitución de potasio después de 2 min VF. El último segundo antes de LowK se expande para mostrar que el ECG y el EVP no difirieron entre los grupos. Después de la línea roja que indica el comienzo de LowK, la escala de tiempo cambió para mostrar la evolución de 25 minutos. El inicio de la FV está marcado en la parte superior de las trazas de ECG para cada grupo, así como en la restitución de NormoK indicada por una línea negra en ambas señales. La melatonina retrasó el inicio de la FV y aceleró la recuperación del ritmo sinusal.

B. La melatonina no solo retrasó el inicio de la FV cuando se evaluó mediante la prueba de Mantel-Cox (** $P < 0,001$), también redujo la incidencia de FV cuando se analizó mediante la prueba exacta de Fisher ($P = 0,0029$ vs. control).

C. Recuperación del ritmo sinusal durante los 25 minutos en NormK.

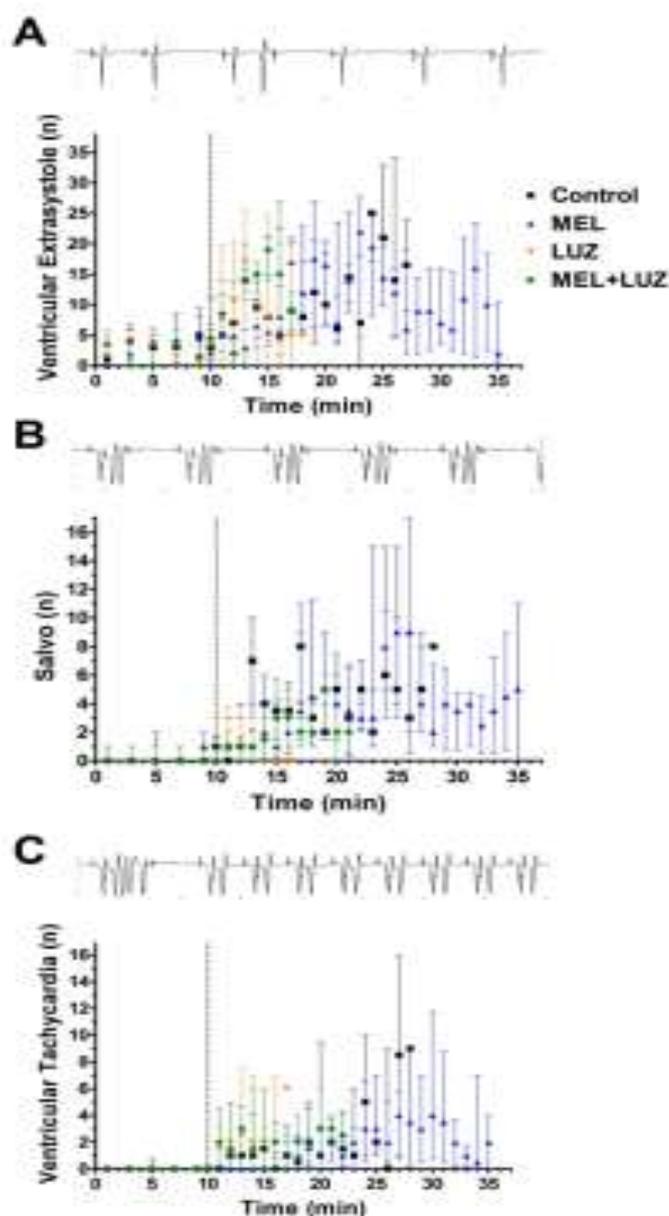


Figura 2. Eventos arrítmicos por minuto encontrados durante la exposición a LowK. Los símbolos indican la mediana y las líneas del rango intercuartil porque los valores no seguían una distribución gaussiana. Los cuadrados negros indican el grupo de control, los triángulos azules el grupo de melatonina (MEL), los triángulos naranjas el LUZ, los diamantes verdes MEL + LUZ. A. En la parte superior de la cuantificación, una traza representativa muestra un latido prematuro ventricular (VPB) después de tres latidos supraventriculares de intervalos de acoplamiento irregulares. B. Representantes salvo con dos complejos ventriculares después de un

complejo en ritmo sinusal, en esta traza particular se muestra un ritmo de trigeminy. C. El complejo ventricular (\geq cuatro complejos) después del latido sinusal se contó como taquicardia ventricular. La traza también muestra un bigeminy, un ritmo de un complejo sinusal y un complejo ventricular. Tenga en cuenta que este tipo de eventos arrítmicos persistió durante los 25 minutos de perfusión con LowK solo en los grupos MEL, porque los otros grupos desarrollaron fibrilación ventricular sostenida.

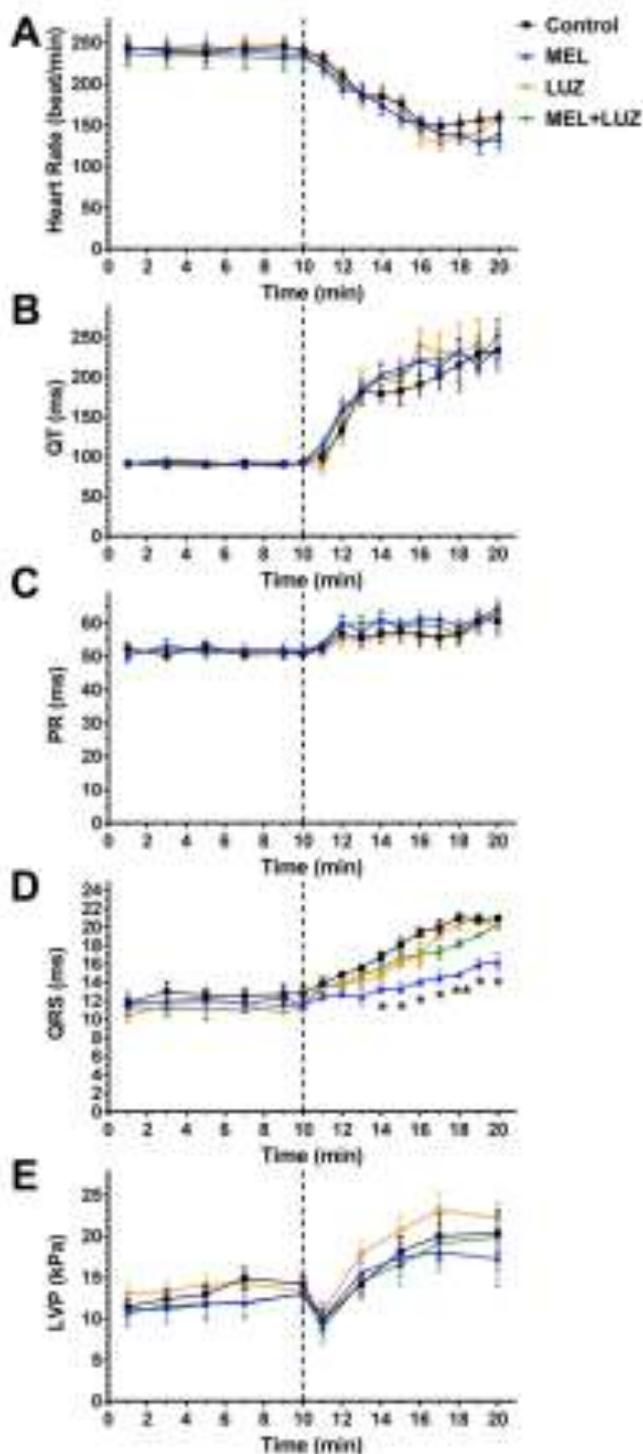


Figura 3. Respuestas miocárdicas eléctricas y mecánicas bajo perfusión de potasio bajo. El valor medio (\pm SEM) encontrado durante diez minutos de estabilización y los primeros diez minutos de baja perfusión de potasio (la línea vertical de la traza

indica el cambio a una solución de LowK). Los cuadrados negros indican los valores de los grupos de control, los triángulos azul y naranja para los grupos MEL y LIGHT, respectivamente, y los diamantes verdes para el grupo MEL + LIGHT. A. Frecuencia cardíaca medida a partir de los intervalos R a R de latidos consecutivos que estaban en ritmo sinusal y expresados en latidos cardíacos por minuto. B. Intervalo QT en milisegundos medido desde el inicio del complejo QRS hasta el final de la onda T. C. Intervalo PR en milisegundos medido desde el inicio de las ondas P hasta el inicio del QRS. D. Intervalo de QRS en milisegundos determinado desde el principio hasta el final del complejo QRS. E. La presión desarrollada en el ventrículo izquierdo (PDVI) mide desde el valor diastólico final hasta el pico sistólico y se expresa en kilopascales. * P <0.05 y ** P <0.01 vs. Control

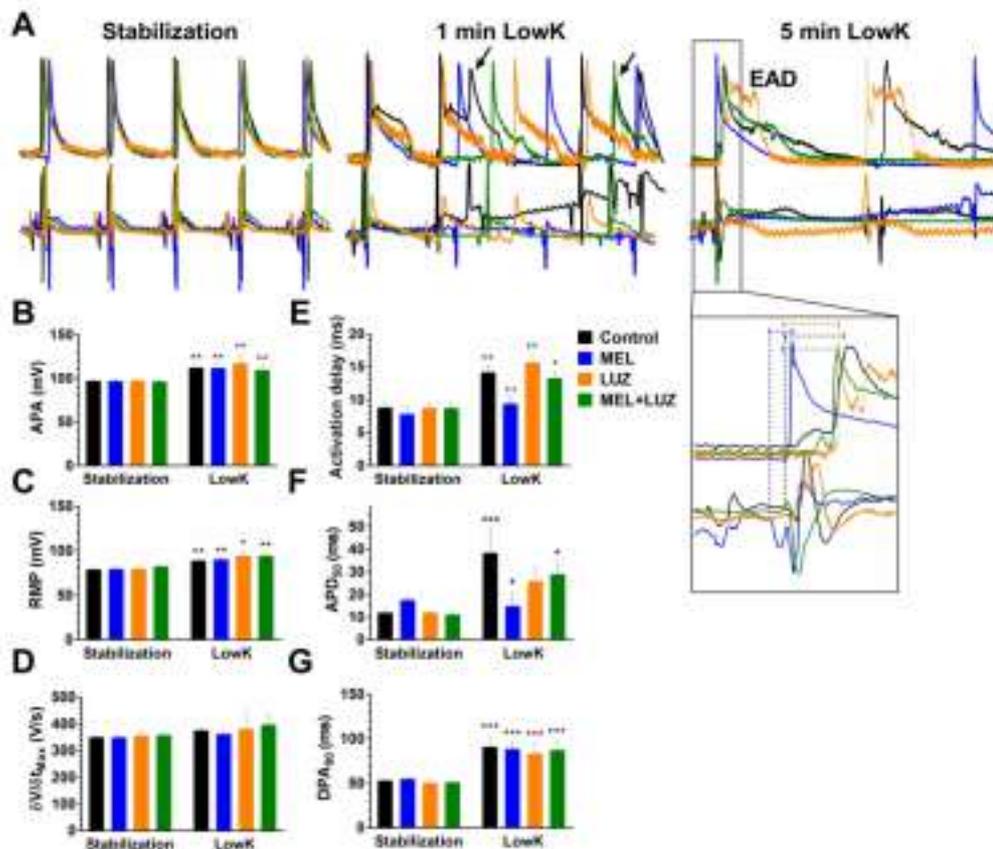


Figura 4. Cambios potenciales de acción epicárdica inducidos por la baja perfusión de potasio y los efectos protectores de la activación del receptor de melatonina. A. Potencial de acción obtenido de los cuatro grupos durante la estabilización (izquierda), después de uno (medio) y cinco (derecha) minutos de exposición a K bajo. Cada trazo representativo muestra un segundo de las grabaciones simultáneas de potenciales de acción y electrogramas. Negro, azul, naranja y verde se utilizan para los grupos Control, MEL, LUZ y MEL + LUZ, respectivamente. Las flechas durante 1 min LowK indican una acción potencial generado antes de la repolarización completa y simultáneamente con un complejo ventricular prematuro en el ECG del grupo de control. Los corazones tratados con melatonina apenas mostraron una despolarización temprana (EAD), mientras que con frecuencia ocurrieron en los otros grupos. El recuadro debajo de los rastros de cinco minutos muestra la medición del retardo de activación desde el inicio del complejo QRS hasta el pico del potencial de acción. B. Todos los grupos aumentaron la amplitud del potencial de acción (APA, en mV) durante la exposición a LowK. C. Potencial de membrana en reposo (RMP, en mV) hiperpolarizado en respuesta a lowK independientemente de los tratamientos. D. La tasa máxima de despolarización ($\delta V / \delta t_{Max}$, en V / s) no cambió. E. Retardo de activación alargado durante LowK excepto en MEL. F. La duración del potencial de acción al 50% de la repolarización (APD50, en ms) aumentó durante LowK y los valores mostraron una mayor dispersión. La melatonina previno la prolongación de la APD50. G. Todos los grupos alargaron la duración del potencial de acción al 90% de la repolarización (APD90, en ms). Las barras indican la media \pm SEM de n = 4-5 corazones por grupo. * P <0.05, ** P <0.01, y *** P <0.001 en comparación con la estabilización; + P <0.05 y ++ P <0.01 vs. Control.

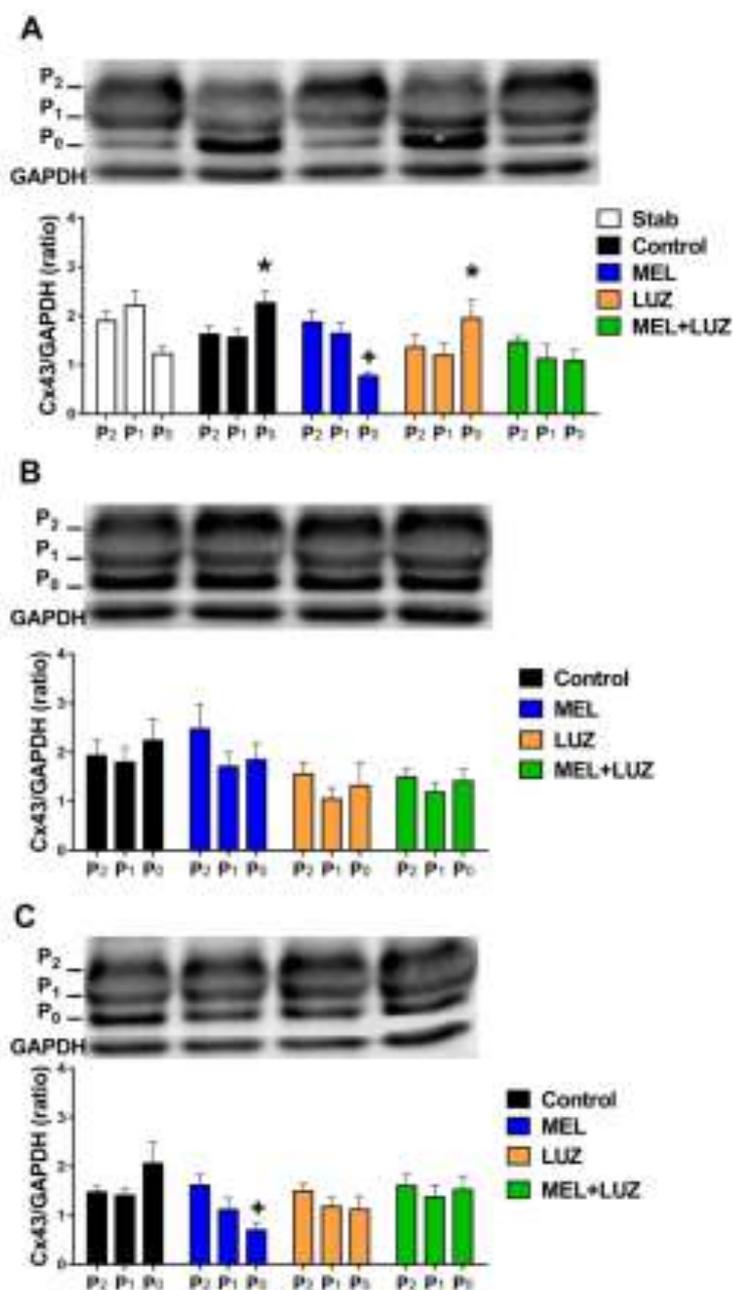


Figura 5. Inmunoblot representativa que muestra tres niveles de fosforilación (P₂, P₁ y P₀) de conexina 43 (Cx43) y cuantificación densitométrica normalizada a GAPDH (relación Cx43 / GAPDH). A. Muestras ventriculares del período de estabilización y después de 5 minutos de perfusión baja en potasio en presencia de los cuatro tratamientos: melatonina (MEL), luzindol (LUZ), MEL + LUZ y el vehículo de las drogas (Control). El estado menos fosforilado de conexina 43 (P₀) aumentó

en los grupos Control y LUZ y la melatonina lo redujo en comparación con el Control. B. Las muestras obtenidas después de dos minutos de FV sostenida muestran un aumento similar en la banda P0 en todos los grupos. C. Las muestras después de 25 minutos de la restitución de la concentración de potasio mostraron una persistencia de niveles altos en la forma P0 de conexina 43 en el grupo de control. La reducción de melatonina de P0 persistió. Las barras indican la media \pm SEM de cada fosforilado enunciado desde $n = 3-6$ corazones por grupo. * $P < 0.05$ vs. estabilización y + $P < 0.05$ vs. Control.

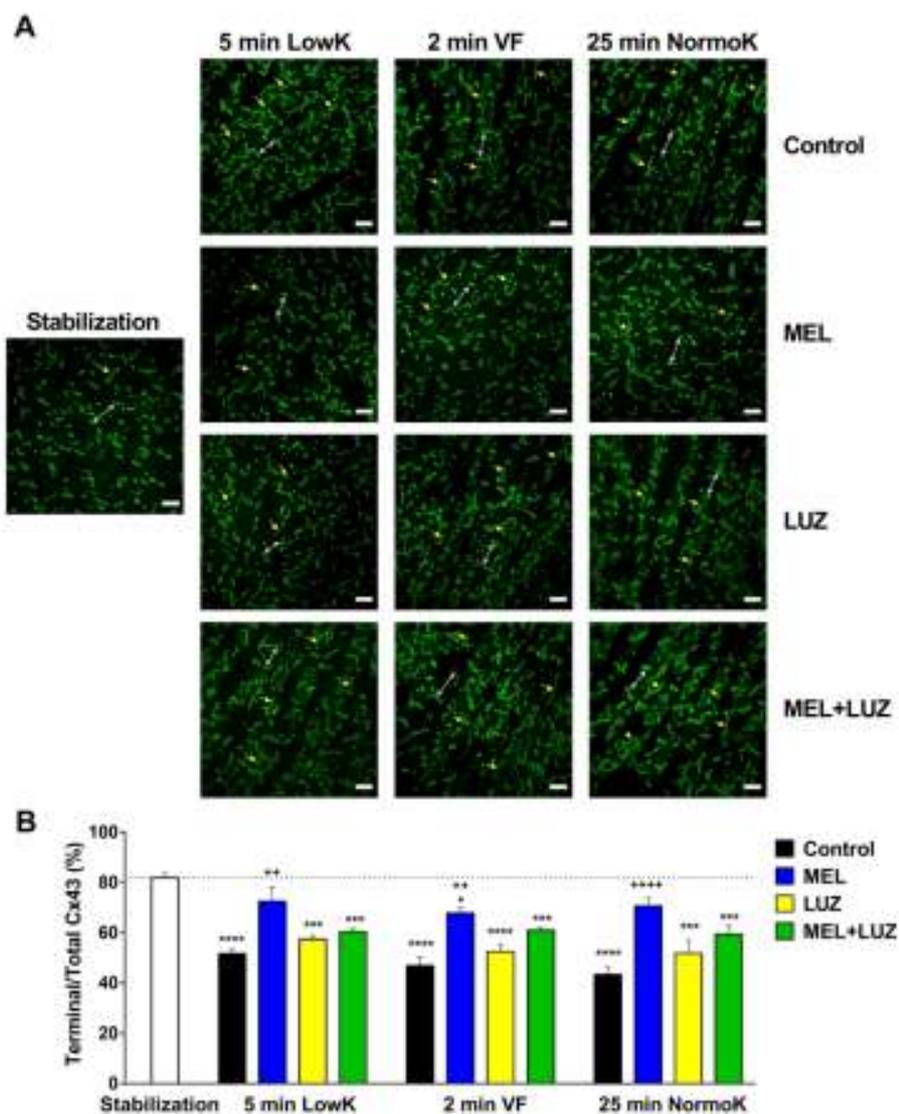


Figura 6. Topología de la conexina 43 en ventrículos de ratas revelada con anticuerpos policlonales anti-conexina 43. A. Imágenes representativas de diferentes períodos experimentales (indicados en la parte superior de cada columna) y tratamientos (indicados a la derecha de cada fila). En muestras del período de estabilización, la señal inmunorreactiva es prevalente (> 80%) en los sitios de aposición intercelular en los extremos terminales de los cardiomiocitos (líneas blancas con flechas dobles), y puntos discretos de la señal distribuidos a lo largo del borde lateral (flechas amarillas) y en el citoplasma. El tratamiento con melatonina mantuvo positiva la conexina 43. Señal superior a 2/3 en la localización del terminal en todos los periodos experimentales. Barra de escala blanca indica 50 μ M. B. Análisis cuantitativo de la topología terminal expresado en porcentaje. Las barras indican el porcentaje medio \pm SEM de 24-48 campos de prueba de n = 3-6 corazones por grupo. * P <0.05, *** P <0.001, y **** P <0.0001 vs. estabilización; + P <0.05, ++ P <0.01, y +++++ P <0.0001 vs. Control.

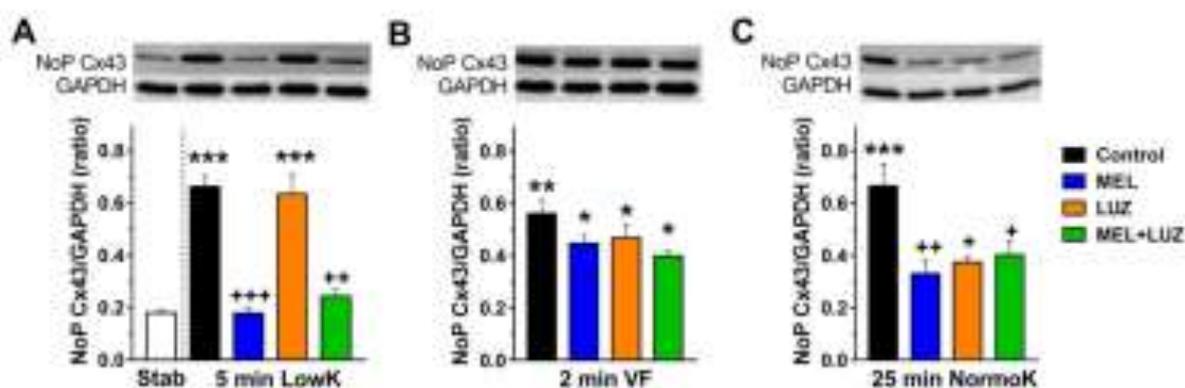


Figura 7. Inmunoblot representativa que muestra una forma desfosforilada de conexina 43 (NoP Cx43) y cuantificación densitométrica normalizada a GAPDH (relación NoPCx43 / GAPDH). A. Muestras ventriculares del período de estabilización (Stab) y después de 5 min de perfusión baja en potasio en presencia

de los cuatro tratamientos: melatonina (MEL), luzindol (LUZ), MEL + LUZ y el vehículo de los fármacos (Control). . El control y LUZ aumentaron la desfosforilación de conexina 43, y MEL y MEL + LUZ la redujeron con respecto al control. B. Las muestras obtenidas después de dos minutos de FV sostenida mostraron un aumento similar. C. Después de 25 minutos de la restitución de la concentración de potasio (NormoK), la conexina 43 desfosforilada persistió elevada solo en las muestras del grupo de Control. Las barras indican la media \pm SEM de n = 3-6 corazones por grupo. * P <0.05, ** P <0.01, y *

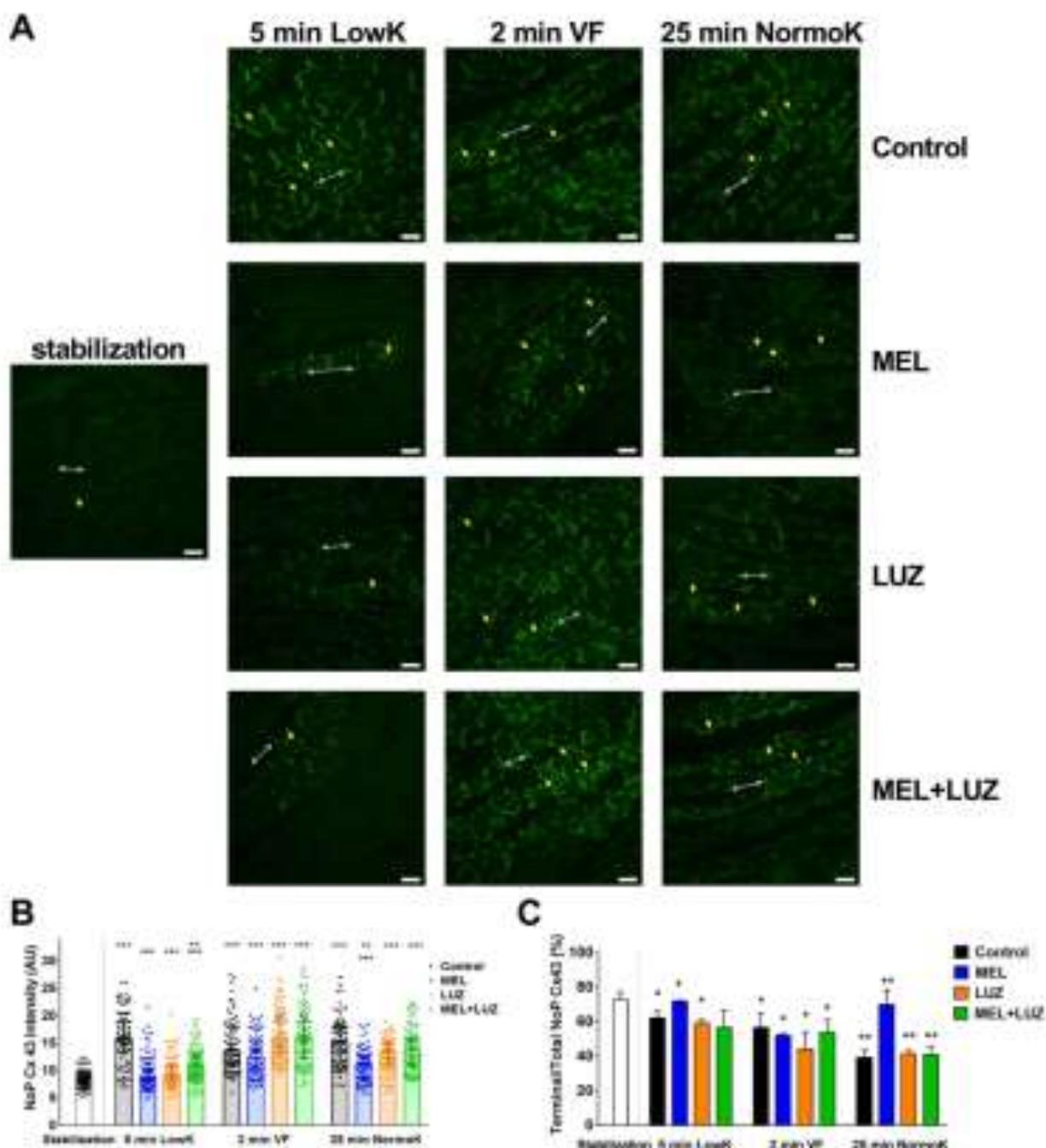


Figura 8. Distribución de conexina desfosforilada 43 revelada con anticuerpos monoclonales anti-conexina 43 en ventrículos de rata. A. Imágenes representativas de diferentes períodos experimentales (indicados en la parte superior de cada columna) y tratamientos (indicados a la derecha de cada fila). En muestras del período de estabilización, la señal se distribuye en puntos discretos con una intensidad muy baja y principalmente restringida a los extremos terminales de los

cardiomiocitos. Las áreas con mayor inmunopositividad ocurrieron en todos los protocolos y grupos de tratamientos. La melatonina abolió la señalización inmunitaria principalmente en los sitios laterales si los cardiomiocitos, mientras que las áreas inmunopositivas se encontraban con frecuencia en los extremos terminales. B. Análisis cuantitativo de la intensidad. Medido en 80 áreas de disco intercaladas terminales, muestran la dispersión en todos los tratamientos y períodos. Los puntos representan medidas individuales, y las barras indican la mediana y el rango intercuartil. C. Análisis cuantitativo de la topología terminal expresado en porcentaje. Las barras indican el porcentaje medio \pm SEM de 24-48 campos de prueba de n = 3-6 corazones por grupo. * P <0.05, ** P <0.01, y *** p <0.001 vs. estabilización; + P <0.05, ++ P <0.01, y +++ P <0.001 vs. Control

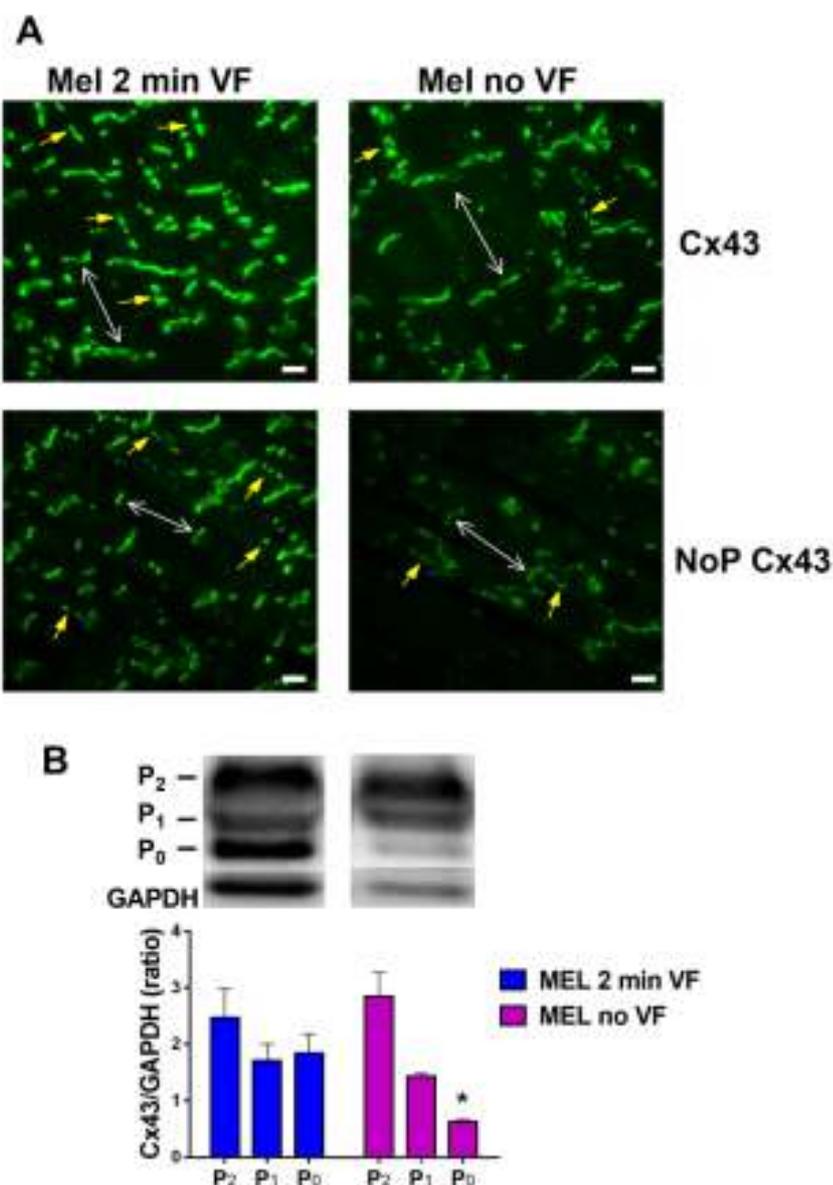


Figura 9. Impacto de la melatonina en la conexina 43 según la aparición o no de fibrilación ventricular (FV) en los corazones de ratas aisladas. A. Imágenes representativas de la ubicación de conexina 43 usando dos diferentes anticuerpos, uno contra el contenido total de conexina 43 (Cx43) y el otro contra la forma desfosforilada de conexina 43 (NoP Cx43). Las líneas blancas con flechas dobles indican la longitudinal. Orientación de la célula y del disco intercalado en los extremos terminales. Las flechas amarillas indican la distribución lateral de la señal. Barra de escala blanca indica 20 μ M. B. Inmunoblot representativa de conexina 43 de corazones tratados con melatonina que sufrieron 2 minutos de FV o de aquellos

que no desarrollaron FV. Las barras indican la media \pm SEM de cada fosforilado enunciado desde $n = 5$ corazones por grupo. * $P < 0.05$ vs. P0 de MEL 2 min VF

Mecanismos antiarrítmicos durante la reperfusión en corazones aislados.

La melatonina protege contra la lesión por isquemia/reperfusión, incluso si se la administra al momento de la reperfusión 7-13. La melatonina disminuye las arritmias de reperfusión y acorta la duración del potencial de acción en corazones aislados de ratas alimentadas con fructosa y de ratas espontáneamente hipertensas, pero los mecanismos implicados en estos efectos siguen sin dilucidar 13. El mecanismo mayormente asociado a la protección de la melatonina contra la lesión por isquemia/reperfusión es su efecto antioxidante 9. Esto lo confirmamos en la primera sección del capítulo, y encontramos que también provoca acortamiento del potencial de acción en contextos de estrés oxidativo. En la sección previa confirmamos la participación de los receptores de melatonina en la protección frente a la hipocalcemia 10, 11, 14. El acortamiento de la duración del potencial de acción y el mantenimiento de la conexina 43 en los discos intercalares provocados por la melatonina fueron bloqueados por luzindol.

La activación de los receptores de melatonina puede activar canales de Kir3.x, y este podría ser el mecanismo responsable del acortamiento del potencial de acción observado en trabajos anteriores y en las secciones anteriores de esta tesis (Nelson et al. 1996; Diez et al. 2013). El uso de un antagonista del receptor de melatonina (luzindol) y un bloqueador de Kir3.x (tertiapin Q) podría discriminar el papel de la melatonina en el acortamiento del potencial de acción y las arritmias porque otros mecanismos intracelulares son desencadenados por la activación del receptor de melatonina.

Otro de los efectos mediados por receptor es la activación de la proteína quinasa C (PKC) 11.

La administración crónica de melatonina protege contra las arritmias ventriculares modulando la familia de la PKC, pero se desconoce si estas quinasas participan del efecto

antiarrítmico durante la administración aguda 15. La PKC media las acciones antiadrenérgicas agudas de la melatonina, pero el bloqueo de estas quinasas no impide la reducción del tamaño del infarto inducida por melatonina 11. Esto coincide con nuestros hallazgos e interpretación de acciones de la melatonina más allá de su efecto antioxidante. La PKC también facilita la apertura de los canales de KATP. La activación de esta corriente de K^+ durante la isquemia/reperfusión acorta el potencial de acción 16.

Nuestra hipótesis para esta sección es que el efecto electrofisiológico de la melatonina durante la reperfusión implica la activación de los receptores de melatonina, de la PKC y de los canales KATP. Para probar esta hipótesis se aplicaron inhibidores de los receptores de melatonina, de la PKC o canales KATP simultáneamente con 50 μ M melatonina durante la reperfusión. Se evaluó estos tratamientos durante la reperfusión, ya que este marco de tiempo es más adecuado para las intervenciones durante los síndromes coronarios agudos. Además, se estudió el potencial transmembrana para evaluar la modificación electrofisiológica local durante las intervenciones.

Resultados en corazones aislados.

Flujo coronario, área isquémica y frecuencia cardíaca

No hubo diferencias en el flujo coronario entre los grupos previo a la isquemia, la reducción fue significativa y estable después de la oclusión coronaria. Durante la reperfusión, los corazones tratados con glibenclamida mostraron una recuperación reducida del flujo coronario en comparación con los otros grupos (Tabla 1). El área isquémica medida al final del protocolo no difirió entre los grupos (Tabla 1). No se encontraron diferencia en la frecuencia cardíaca basal entre los grupos y, durante la isquemia, todos sufrieron una reducción de alrededor de 25 a 45 latidos/min (Tabla 2). Durante la reperfusión, los corazones tratados con melatonina recuperaron la frecuencia cardíaca pre-isquémica excepto aquellos tratados con GLI (Tabla 2).

Tabla 1. Flujo coronario en las distintas etapas del experimento y área en riesgo.

	Flujo coronario (ml/g)			Área isquémica
	Pre-isquemia	Pre-reperusión	Minuto 10 de la reperusión	
Control	7,0 ± 0,3	4,2 ± 0,4 *	5,6 ± 0,4	47,4 ± 1,6
MEL	6,9 ± 0,4	4,1 ± 0,3 *	5,5 ± 0,3	49,1 ± 1,7
LUZ	6,8 ± 0,3	4,0 ± 0,3 *	5,5 ± 0,3	46,2 ± 2,2
TQ				
QUE	6,8 ± 0,4	4,1 ± 0,3 *	5,5 ± 0,4	44,3 ± 1,9
GLI	7,0 ± 0,3	4,1 ± 0,5 *	4,9 ± 0,3#	45,6 ± 1,8
MEL+LUZ	6,9 ± 0,3	4,0 ± 0,2 *	5,3 ± 0,3	49,8 ± 1,5
MEL+TQ				
MEL+QUE	7,0 ± 0,2	4,2 ± 0,2 *	5,4 ± 0,2	48,9 ± 1,9
MEL+GLI	6,9 ± 0,3	4,1 ± 0,3 *	4,8 ± 0,3#	46,3 ± 2,1

Todos los valores representan la media ± error estándar de la media. * $P < 0.01$ vs Pre-isquemia # $P < 0.05$ vs Control. GLI glibenclamida, LUZ luzindole, MEL melatonina, QUE Queleritrina.

Tabla 2. La frecuencia cardíaca en las distintas etapas del experimento.

Frecuencia cardíaca (latidos/minuto)

	Pre-isquemia	Pre-reperusión	Minuto 10 de la reperusión
Control	292 ± 14	262 ± 20*	282 ± 25 (3)
MEL	296 ± 15	260 ± 19*	291 ± 15 (11)
LUZ	294 ± 16	266 ± 15*	251 ± 24 (3)
TQ			
CHE	300 ± 18	257 ± 19*	287 ± 18 (3)
GLI	294 ± 16	261 ± 21*	251 ± 24 (4)
MEL+LUZ	303 ± 17	266 ± 18*	287 ± 12 (4)
MEL+TQ			
MEL+CHE	297 ± 15	259 ± 18*	279 ± 19 (5)
MEL+GLI	291 ± 13	269 ± 21*	248 ± 14 (6)

Todos los valores representan la media ± error estándar de la media de un n=12. La frecuencia cardíaca durante la reperusión corresponde al número de corazones en ritmo sinusal indicado entre paréntesis. * P<0.01 vs Pre-ischemia. GLI glibenclamida, LUZ luzindole, MEL melatonina, QUE Queleritrina.

Arritmias por reperusión

Las arritmias ventriculares ocurrieron al inicio de la reperusión en la mayoría de los grupos, con la excepción de los tratados sólo con melatonina (Figura 1).

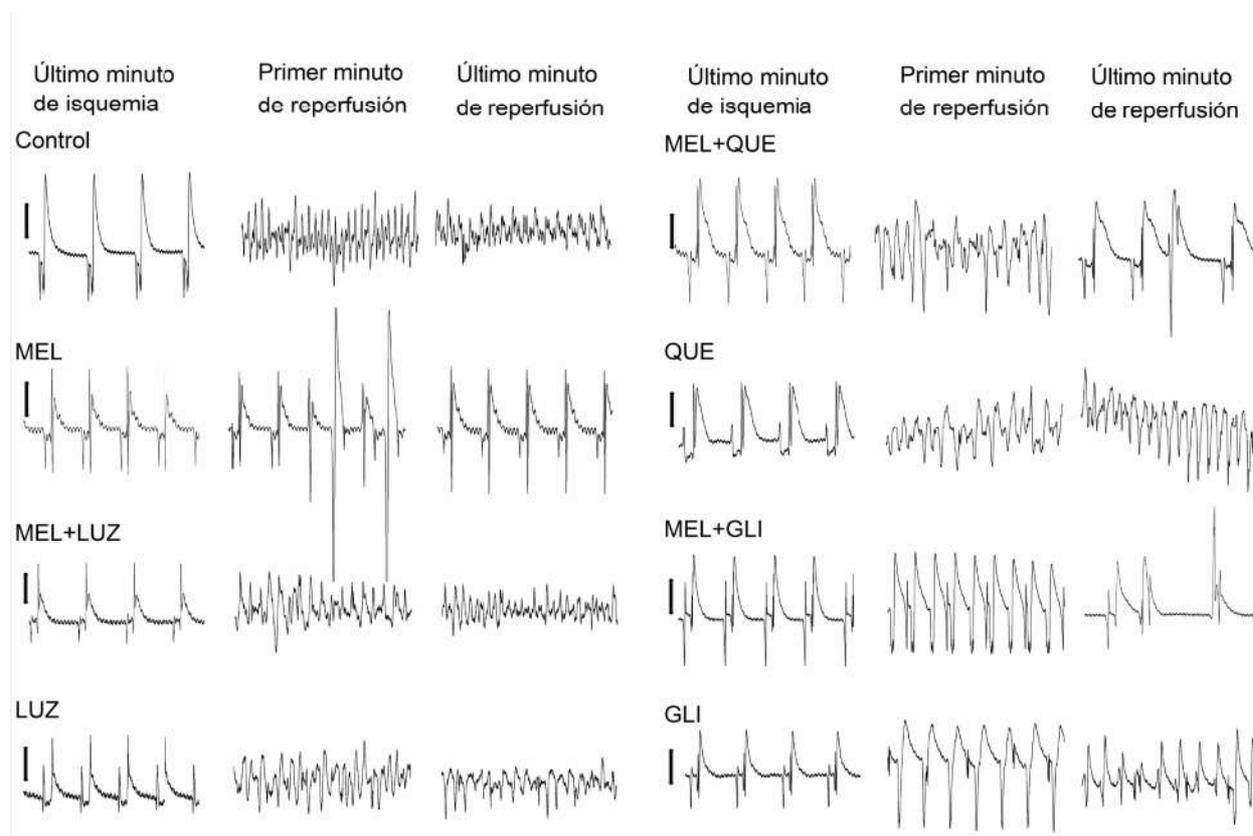
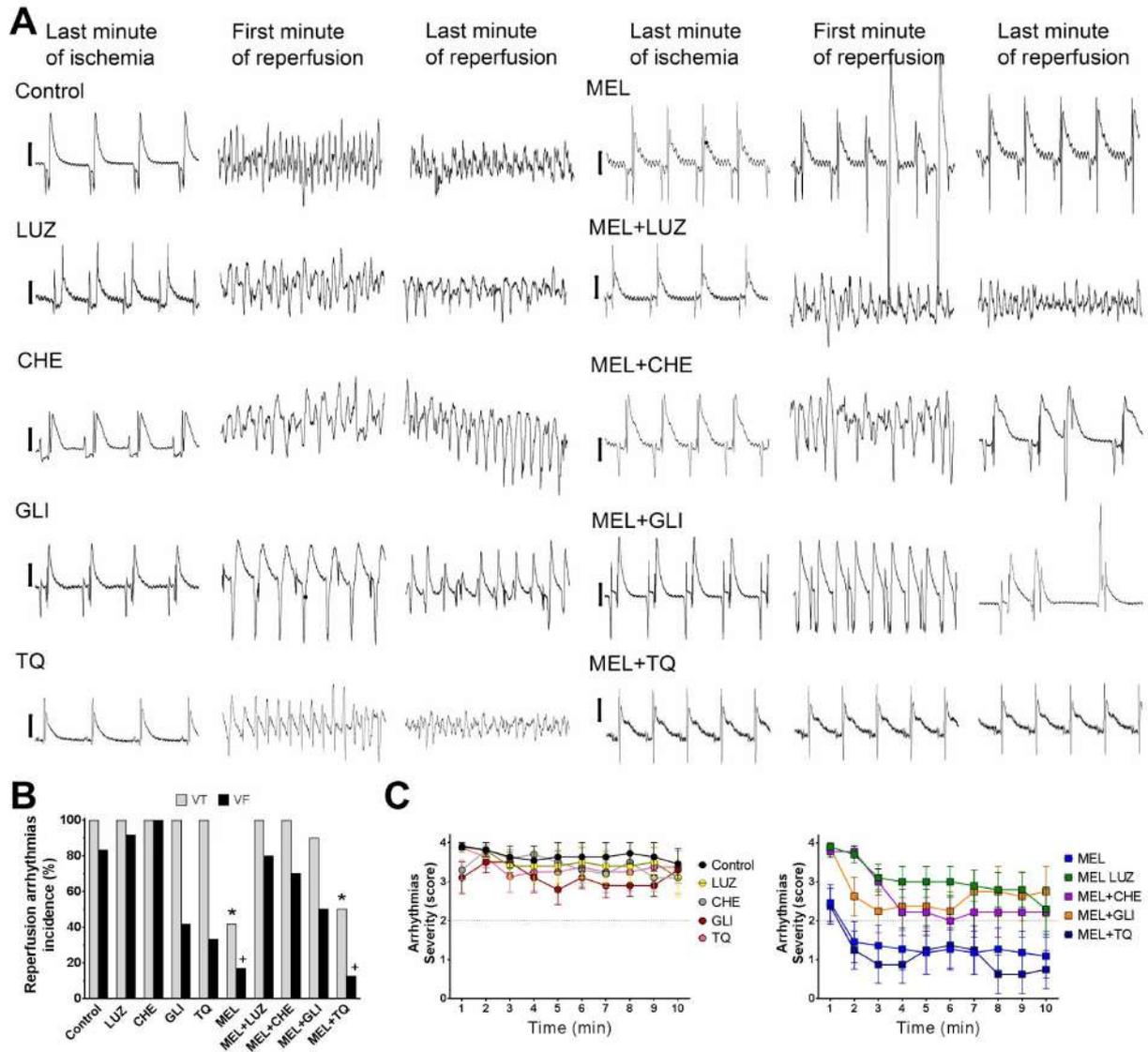


Figura 1. Electrogramas de superficie obtenidos de cada grupo en los tres periodos experimentales, según se indica en la parte superior. Cada trazados corresponde a 1 segundo. La escala vertical al principio de cada grupo corresponde a una amplitud de 0,5 mV. GLI glibenclamida, LUZ luzindole, MEL melatonina, QUE Queleritrina.



La administración de melatonina redujo la incidencia y la duración de la FV (Figura 2 y Tabla 3), y la incidencia de TV, pero no su duración (Tabla 3). Sin embargo, la ausencia de efecto en la duración de la TV no reflejó claramente que en los corazones tratados con melatonina, esta arritmia fue seguida por ritmo sinusal durante la reperusión, mientras que en los otros grupos siguieron episodios recurrentes de arritmias sostenidas. De hecho, los corazones tratados con glibenclamida sufrieron de episodios de TV sostenida. La glibenclamida no redujo la incidencia de FV inducida por reperusión. Sin embargo, se observó una acción antifibrilatoria de la glibenclamida evidenciada por la reducción en la duración de la FV durante la reperusión. La coadministración de glibenclamida y melatonina se acompañó de TV persistente.

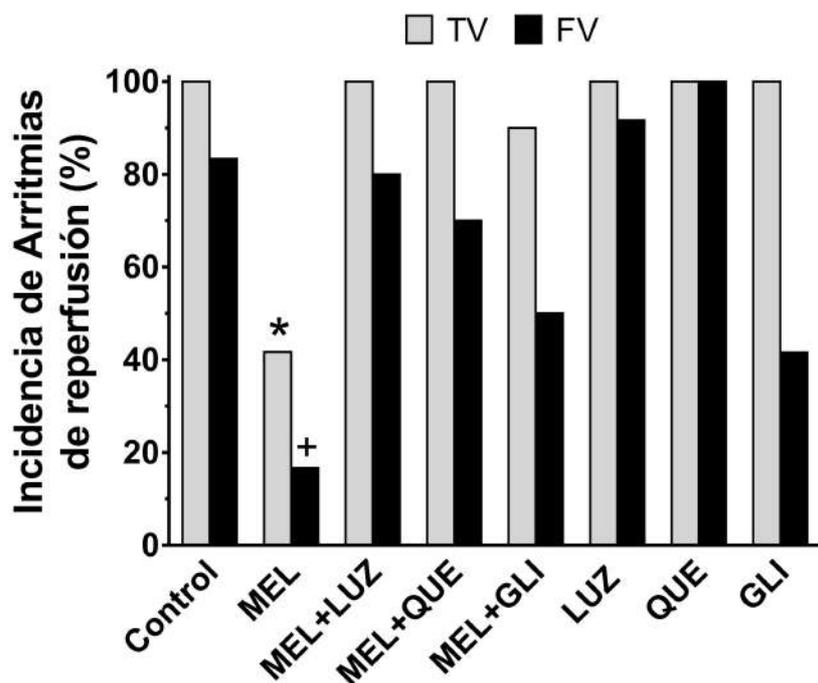


Figura 2. Incidencia de arritmias ventriculares durante la reperusión. Las barras grises indican el porcentaje de corazones que desarrollaron taquicardia ventricular (TV) y las barras negras indican aquellos que sufrieron fibrilación ventricular (FV) para cada grupo. * $P = 0,0033$ vs Control; + $P = 0,0046$ vs Control, ambos mediante la prueba exacta de Fisher. GLI glibenclamida, LUZ luzindole, MEL melatonina, QUE Queleritrina.

Tabla 3. Duración de las arritmias de reperusión.

	Taquicardia ventricular	Fibrilación ventricular
Control	33,0 (0-41)	442,0 (338-563)
MEL	0 (0-59)	0,0 (0-22) *
LUZ	40,5 (29-55)	496,0 (398-578)
CHE	42,5 (30-72)	469,0 (364-548)

GLI	416,0 (198-458)*	121,5 (0-228)*
MEL+LUZ	155,0 (20-85)	415,5 (211-477)
MEL+CHE	121,5 (55-129)	194,0 (90-327)
MEL+GLI	239,5 (156-297) *	159,5 (0-398)

Todos los valores representan la mediana (1^{er} cuartil - 3^{er} cuartil) expresado en segundos. *

P<0.01 vs Control según la prueba de Kruskal-Wallis y las comparaciones múltiples según la prueba de Dunn. GLI glibenclamida, LUZ luzindole, MEL melatonina, QUE Queleritrina.

La melatonina y la melatonina+tertiapina Q fueron los único tratamientos que redujeron la severidad de las arritmias de reperfusión, mientras que los corazones de los otros grupos control mantuvieron arritmias severas durante toda la reperfusión (Figura 3). Se apreció una ligera tendencia a una reducción de la severidad de las arritmias en los grupos que combinaban la melatonina y los distintos inhibidores.

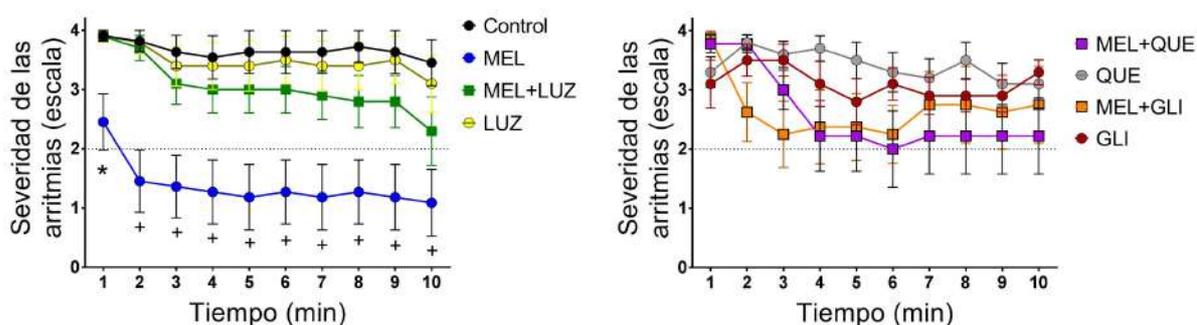


Figura 3. Gravedad de las arritmias durante cada minuto de la reperfusión usando la siguiente escala:

0 - ritmo sinusal, 1 - latidos ventriculares prematuros o bigeminia, 2 - Salvas, 3 - TV no sostenida

(<30 segundos), 4 - TV sostenida (>30 segundos) o FV. Para facilitar la comparación de grupos, se

añadió una línea horizontal discontinua en el segundo punto de la escala. * P < 0,05 y + P < 0,01 vs

Control por ANOVA de dos vías repetidas para medidas repetidas. GLI glibenclamida, LUZ luzindole,

MEL melatonina, QUE Queleritrina.

Potenciales epicárdicos transmembrana

El potencial transmembrana de los cardiomiocitos epicárdicos no presentó diferencias entre los grupos antes de la reperfusión (Figura 4 y Figura 5B). La amplitud del potencial de acción, el potencial de membrana en reposo y la $\delta V/\delta t_{\max}$ se recuperaron progresivamente a lo largo de la reperfusión sin diferencias entre los grupos (Figura 4A-C).

La activación presentó un retraso respecto al inicio del QRS en los corazones

Durante la reperfusión, estos parámetros del potencial de acción presentaron mayor dispersión.

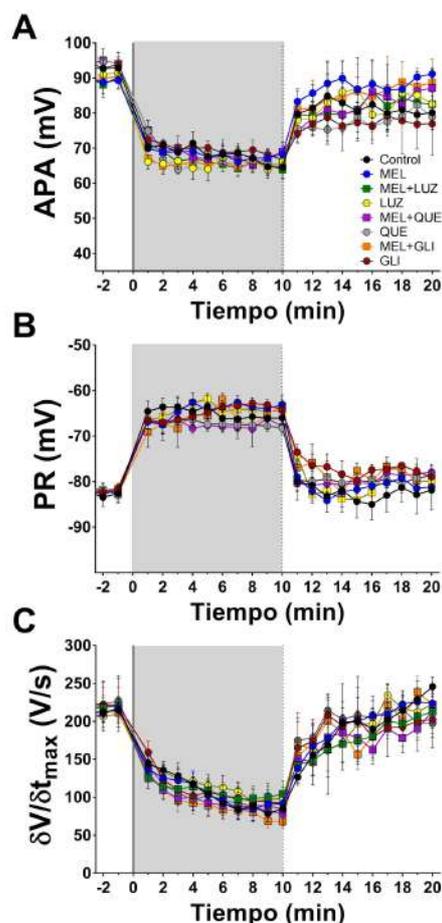


Figura 4. Evolución de las características del potencial transmembrana durante el protocolo de isquemia/reperfusión para cada grupo. El período de isquemia regional está indicado con un fondo gris. A. Amplitud del potencial de acción (APA). B. Potencial de membrana en reposo (PR). C. Tasa máxima de despolarización ($\delta V/\delta t_{\max}$). GLI glibenclamida, LUZ luzindole, MEL melatonina, QUE Queleritina.

Durante la isquemia, todos los grupos mostraron un incremento transitorio en la duración del potencial de acción seguido de un acortamiento progresivo, que alcanzó un valor de $39,8 \pm 0,9$ ms previo a la reperfusión. Al inicio de la reperfusión, el grupo control mostró un alargamiento precoz hacia los valores pre-isquémicos mientras que la melatonina redujo la duración del potencial de acción (Figura 5). El acortamiento del potencial de acción persistió durante los primeros 5 min de reperfusión en el grupo MEL. Estos efectos de la melatonina

fueron anulados por luzindole y por tertiapina Q. La queleritrina no interfirió con el acortamiento inducido por la melatonina. La glibenclamida redujo ligeramente el efecto de la melatonina, pero cuando fue perfundida sola la duración del potencial no difirió con la duración registrada en el grupo control.

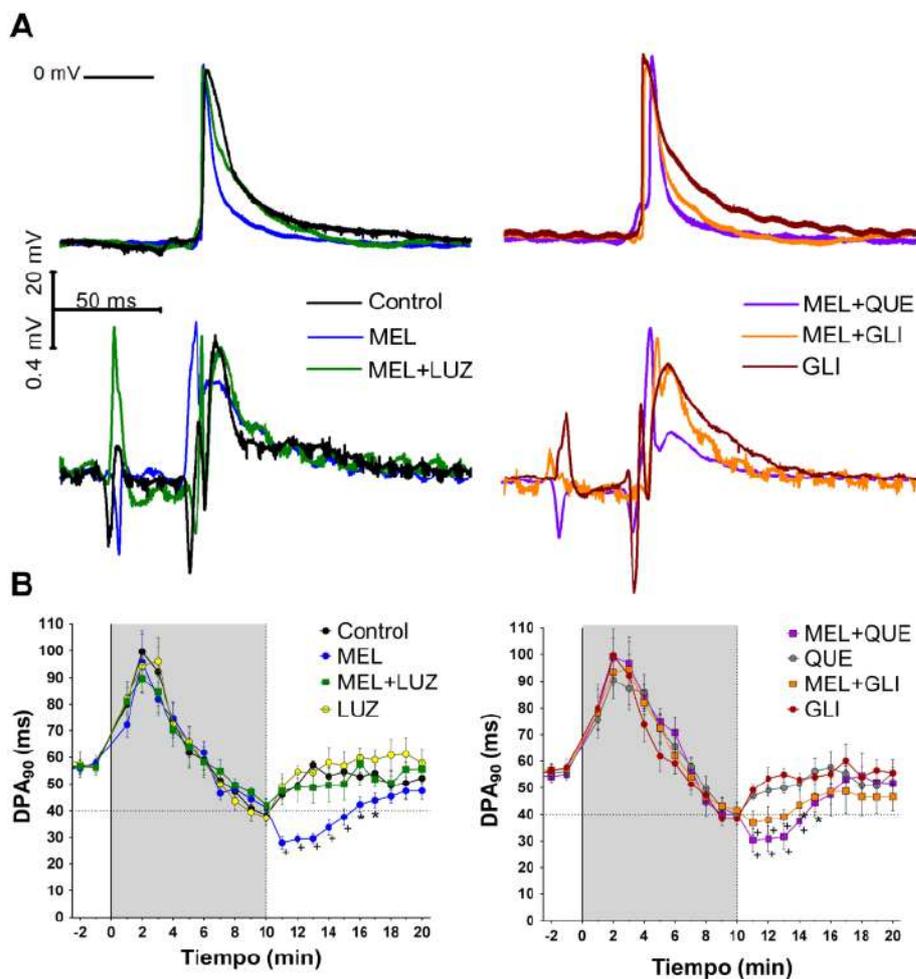


Figura 5. Mecanismo implicado en el acortamiento de la duración potencial de la acción inducida por la melatonina. A. Trazados representativos obtenidas durante el segundo minuto de la reperfusión de latidos en ritmo sinusal. B. Duración potencial de la acción al 90% de la repolarización (DPA₉₀). Para facilitar la comparación de grupos, se añadió una línea horizontal discontinua a 39,8 ms, que fue el valor medio al final del período isquémico. * P < 0,05 y + P < 0,01 por medio de medidas repetidas de dos vías ANOVA. GLI glibenclamida, LUZ luzindole, MEL melatonina, QUE Queleritrina.

Mecanismos antiarrítmicos durante la reperfusión en corazones in situ de ratas hembras.

Gran parte de los datos sobre la acción antiarrítmica de la melatonina se obtuvieron en preparaciones de corazón aislado. En estas condiciones el corazón es más estable como

preparado de investigación para evaluar vías de señalización, como se vió en la secciones anteriores, pero no tiene otros importantes factores que modifican la respuesta eléctrica del corazón. En modelos *in vivo* participan de un modo menos controlable la precarga, la poscarga, las adaptaciones autonómicas, respiratorias y los agentes anestésicos. La perfusión coronaria puede verse fuertemente afectada si la función de bomba se altera por arritmias. Modificaciones sistémicas pueden influir en el componente metabólico e hidroelectrolíticos. A pesar de todas estas limitaciones, estas condiciones también se dan a nivel clínico, por lo que es necesario evaluar la efectividad en modelos *in vivo*.

Para determinar los mecanismos antiarrítmicos, es necesario caracterizar los cambios del sustrato electrofisiológico arritmogénico en el miocardio en las condiciones arriba mencionadas y relacionarlos con la melatonina administrada por vía endovenosa. Para ello, logramos colaborar con un grupo que contaba con un sistema de registro multicanal de potenciales extracelulares del epicardio y el posterior procesamiento de datos nos permitió la evaluación la respuesta a los tratamientos. Teniendo en cuenta que el aumento de la heterogeneidad en la activación y en la repolarización ventricular son sustratos para el desarrollo de arritmias letales, nos propusimos determinar la respuesta electrofisiológica de los corazones *in situ* a la administración de los tratamientos endovenosos previos a la reperfusión (Wit, Janse 2001).

En esta sección se analizan las propiedades electrofisiológicas de la melatonina, el luzindol y la combinación de ambos al ser administrados por vía endovenosa previo a la reperfusión en corazones *in situ*. Se realizó mapeo de electrogramas epicárdicos de distintas zonas de los ventrículos y se analizaron la expresión y localización de la conexina 43 en muestras de tejido. Después de un largo periodo desde la primera publicación de nuestro grupo de investigación sobre el efecto antiarrítmico de la melatonina, se volvió a utilizar ratas hembra en la fase de diestro del ciclo estral.

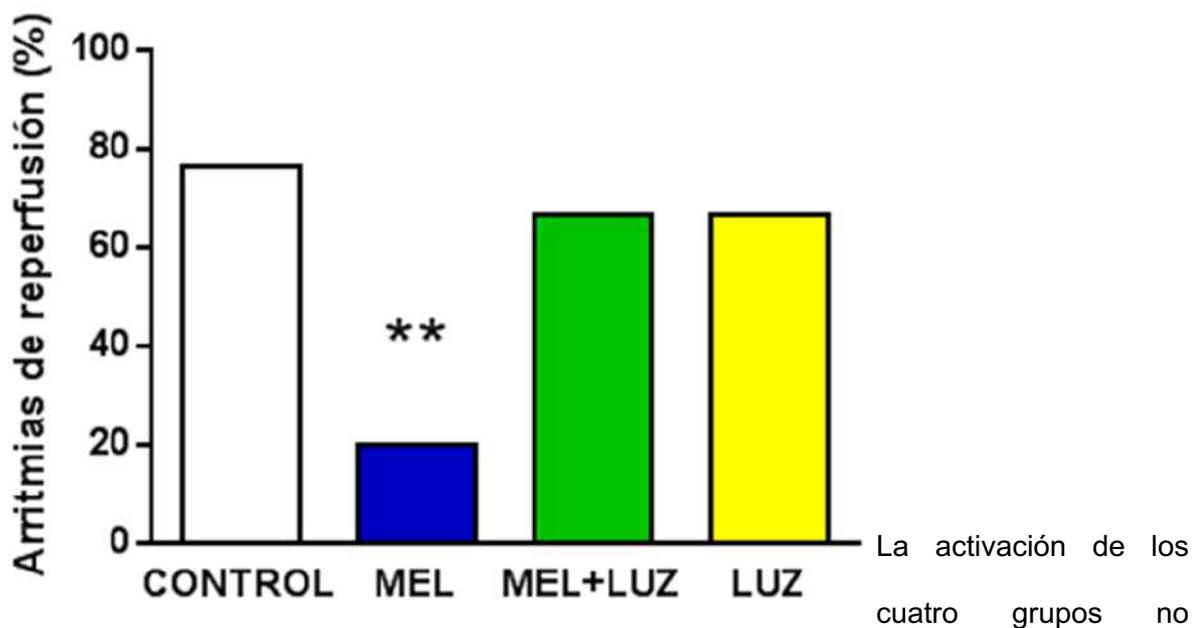
Dado que el bloqueante de los receptores de melatonina, luzindol también tiene efecto antioxidante, se analizaron los niveles de nitro tirosina en muestras de tejido miocárdico.

El objetivo de esta sección fue determinar si la activación de los receptores de melatonina disminuye la dispersión en la actividad eléctrica ventricular como mecanismo antiarrítmico, si las acciones se relaciona con la expresión y distribución de la conexina 43 y con los niveles de daño oxidativo.

Para ello se trabajó en corazones in situ, a tórax abierto de ratas hembras en los que se registró la despolarización y repolarización con 128 electrogramas unipolares epicárdicos en estado basal, al 5to minuto de los 8 que se mantuvo la isquemia por oclusión de la arteria coronaria descendente anterior y al 5to minuto de lo 10 que duró la reperfusión. Cuatro tratamientos se administraron por vía endovenosa un minuto antes de la reperfusión: 1) melatonina, 4 mg/kg; 2) luzindole, 0,4 mg/kg ;3) melatonina+luzindole; 4) vehículo de las drogas.

El grupo control desarrolló taquicardia y/o fibrilación ventricular (13 de 17). La melatonina evitó la fibrilación ventricular y redujo la incidencia taquicardia a 2 de 10 ($p < 0,01$ por prueba de Fisher). Las arritmias con luzindole fueron como en el grupo control (7 de 10). La administración conjunta de luzindole impidió la protección observada con melatonina sola (7 de 10), (Figura 1). La melatonina redujo la incidencia de arritmias ventriculares (taquicardia y/o fibrilación). Las arritmias con luzindol fueron como en el grupo control. La administración conjunta de melatonina y luzindole impidió la protección observada con melatonina sola. **

$P < 0,01$



presentó diferencias en condiciones basales. Todos los corazones respondieron con un incremento en el tiempo de activación y una acortamiento en tiempo de repolarización en la zona isquémica, sin evidenciar cambios en la zona no isquémica.

Durante la reperusión la activación fue más homogénea en el grupo tratado con melatonina (Figura activación). Los corazones tratados con luzindol presentaron mayores retrasos en la activación de la zona reperfundida.

Mapas de **activación** en reperfusión

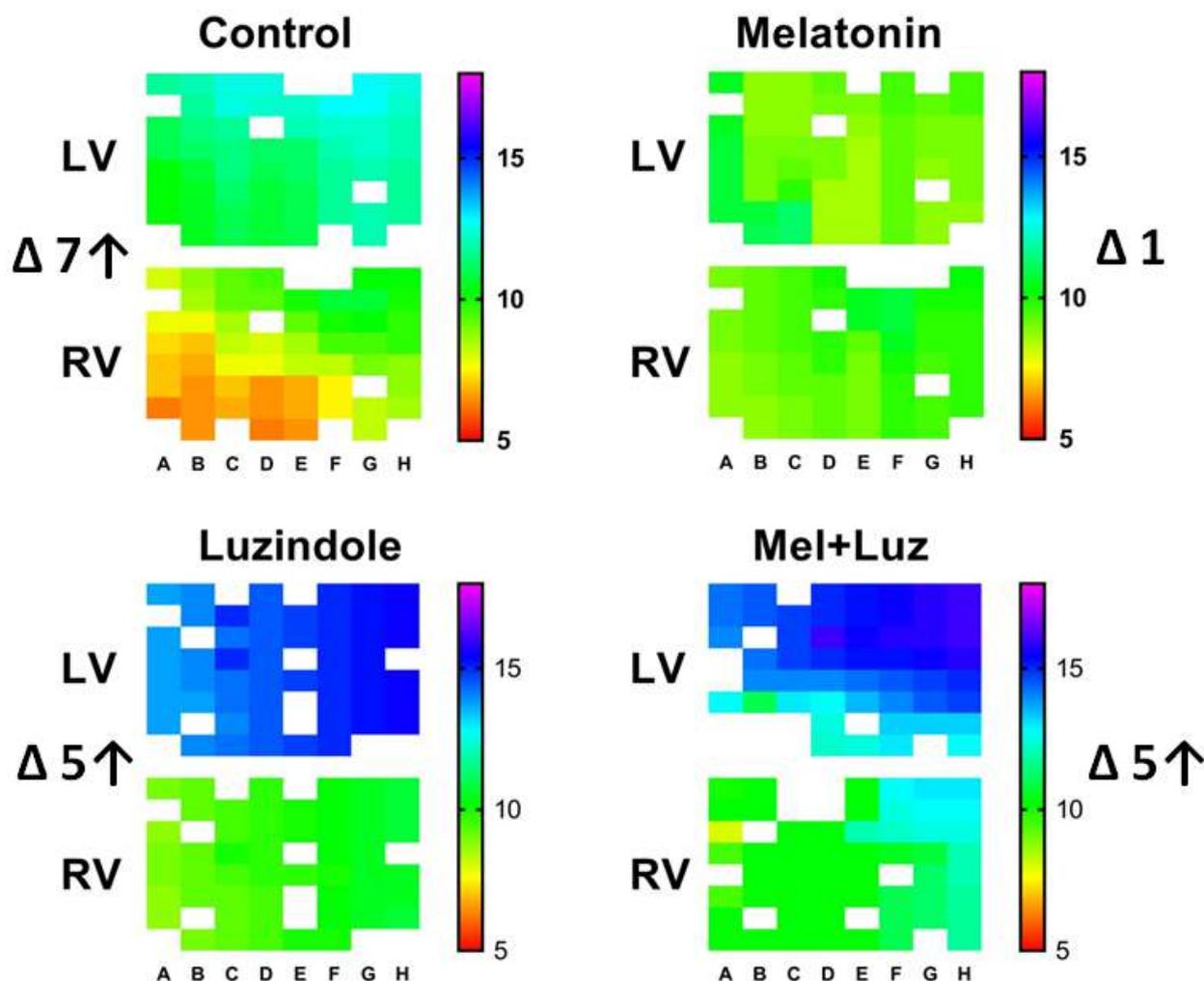


Figura ##. Mapas de activación del minuto cinco de la reperfusión. Gráficos representativos del tiempo de activación medido en cada electrodo unipolar del ventrículo izquierdo y del derecho en corazones latiendo espontáneamente. La variación entre los valores medios registrados en cada ventrículo se indica a la izquierda (Δ) y la flecha indica el sentido de la activación. Las barras de colores indican los milisegundos.

La melatonina impidió el acortamiento en el tiempo de repolarización en la zona reperfundida ($p < 0,05$ por Kruskal–Wallis), lo que llevó a un patrón más homogéneo de repolarización global debido a una reducción en la dispersión de $13,1 \pm 1,6$ ms en el control a $3,1 \pm 2,2$ ms ($p < 0,05$).

Mapas de repolarización en reperfusión

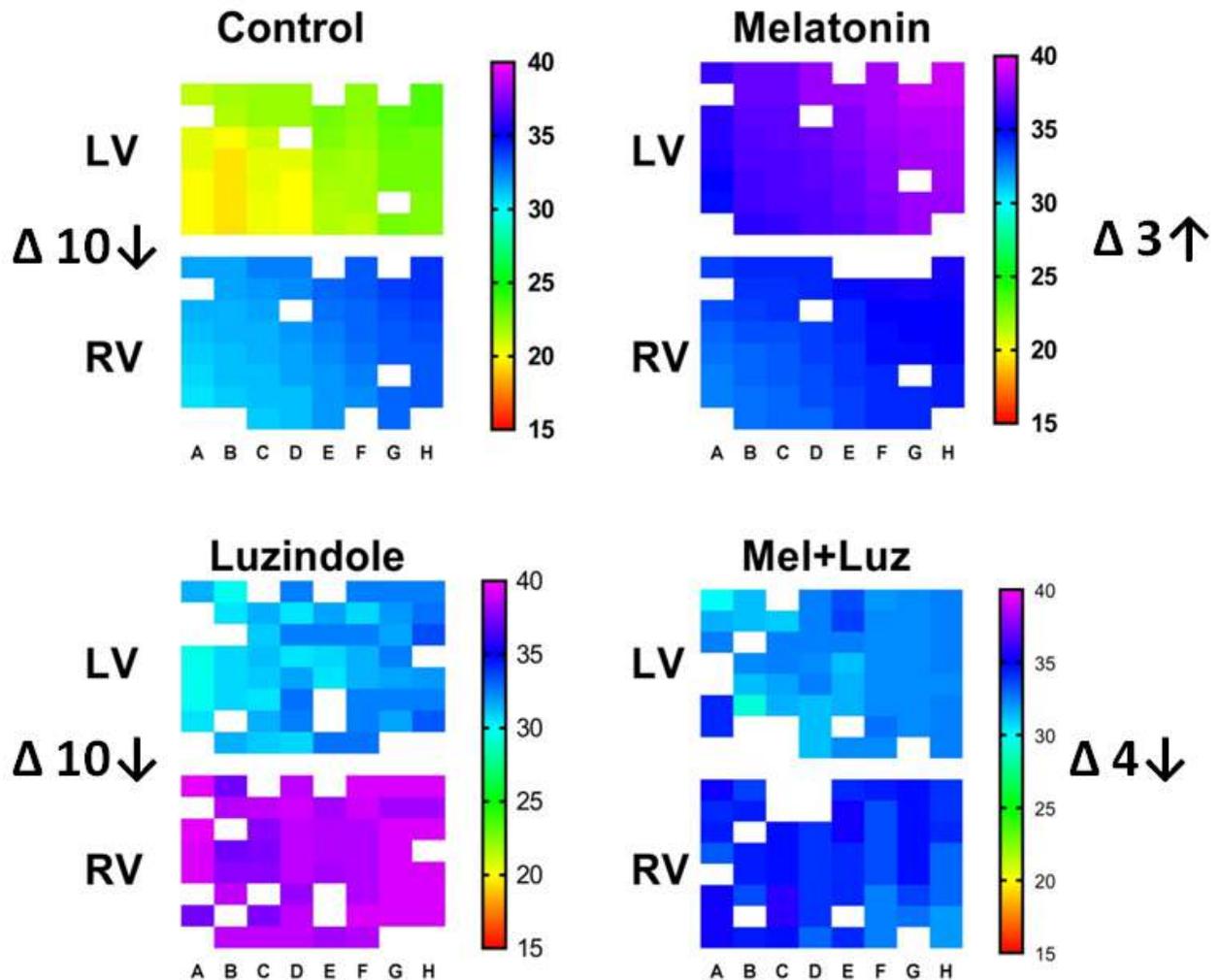
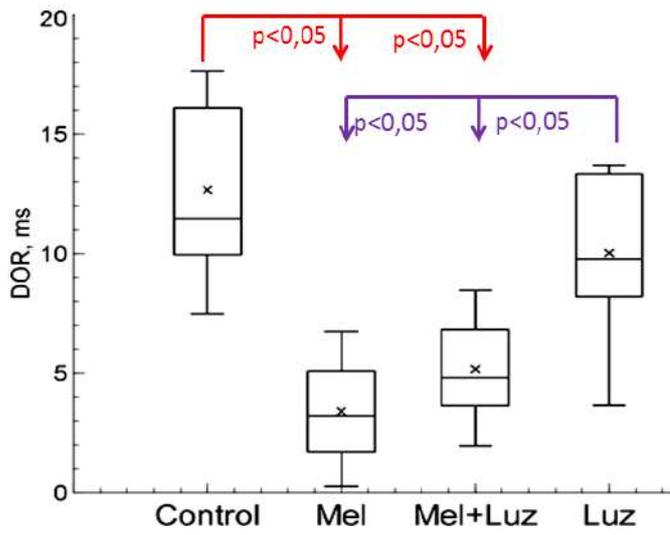


Figura ##. Mapas de activación del minuto cinco de la reperfusión. Gráficos representativos del tiempo de activación medido en cada electrodo unipolar del ventrículo izquierdo y del derecho en corazones latiendo espontáneamente. La variación entre los valores medios registrados en cada ventrículo se indica a la izquierda (Δ) y la flecha indica el sentido de la activación. Las barras de colores indican los milisegundos.

La melatonina redujo la dispersión de los intervalos activación-repolarización, lo que llevó a un patrón más homogéneo de repolarización global. Este efecto fue independiente de los receptores de membrana.



Como ya se describió en la sección de hipocalemia, la conexina 43 presenta 3 bandas según el nivel de fosforilación que presente la proteína. La banda P2 representa el mayor nivel de fosforilación, la banda P1 un nivel intermedio y la banda P0 el menor nivel de fosforilación, que en muchos trabajos se refiere como desfosforilada.

Las muestras provenientes de tejido sometido a isquemia/reperfusión presentaron un ligero incremento en los niveles de la forma P0, que coincide con reportes previos de otros autores, pero en nuestro experimento estos valores no alcanzaron significación estadística.

La melatonina redujo el nivel de las formas desfosforiladas (P0) respecto al grupo control al comparar las muestras sometidas a isquemia/reperfusión.

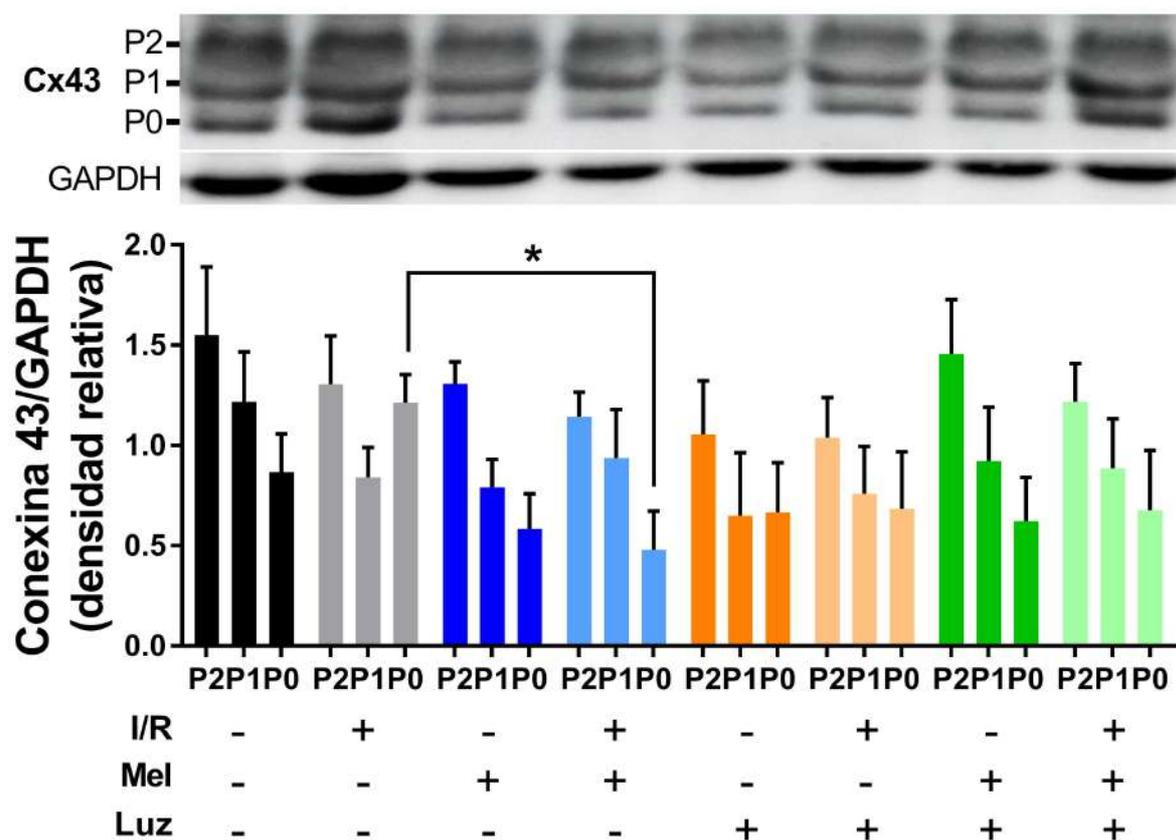


Figura Cx total.

La valoración con un anticuerpo monoclonal que se une a la conexina cuando esta se encuentra desfosforilada confirmó el hallazgo que obtuvimos con la determinación de la conexina total. La melatonina redujo el nivel de la conexina desfosforilada respecto al grupo control solo en la zona sometida a isquemia/reperfusión.

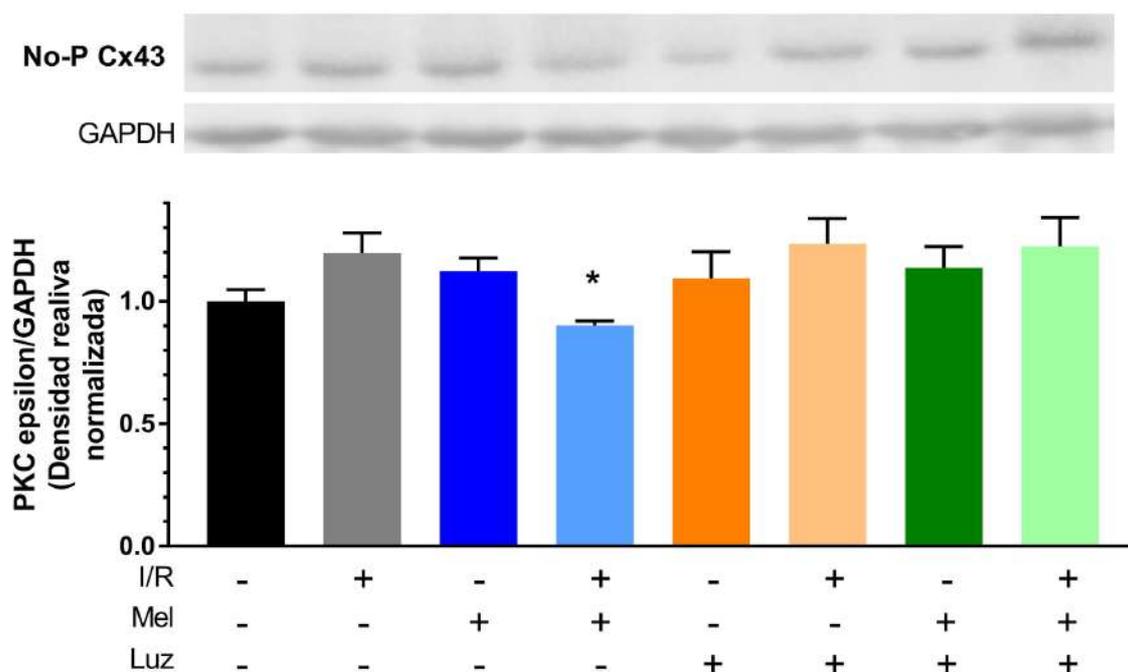


Figura NoP.

Dado que el anticuerpo que se une a la forma desfosforilada requiere que la serina 368 no esté fosforilada, y que ese aminoácido es blanco de la PKC epsilon, decidimos evaluar el nivel de esta quinasa y la forma fosfoespecífica para serina 368 de la conexina 43. Ya estaba descrito que la isquemia incrementa los niveles de la

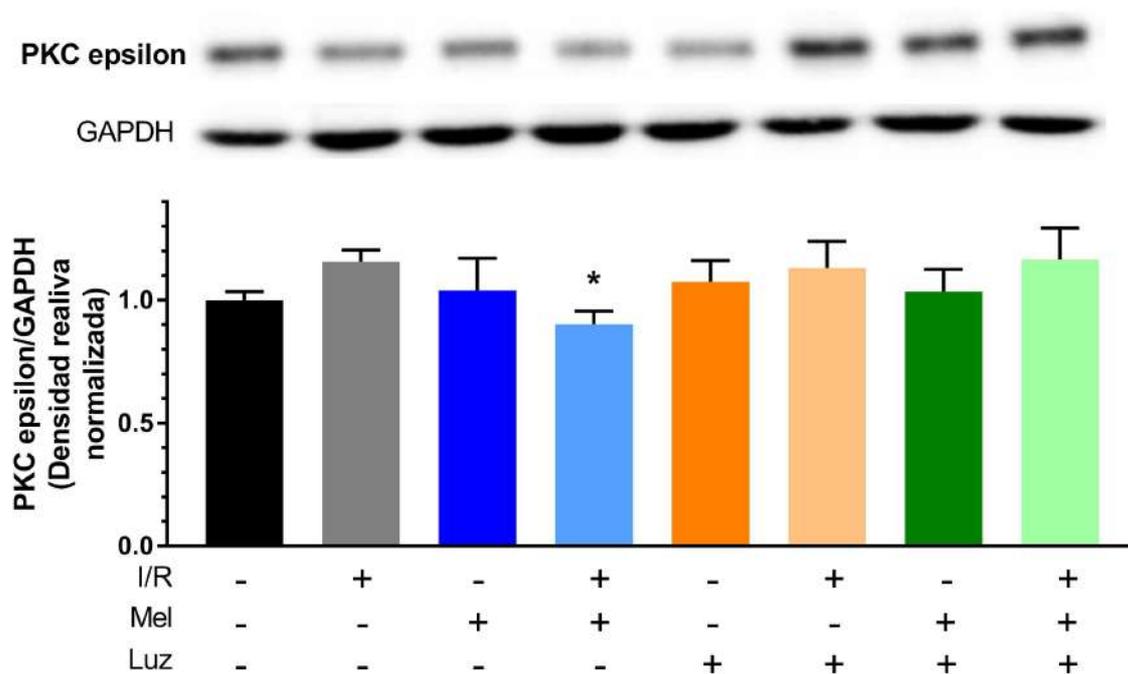


Figura pkc

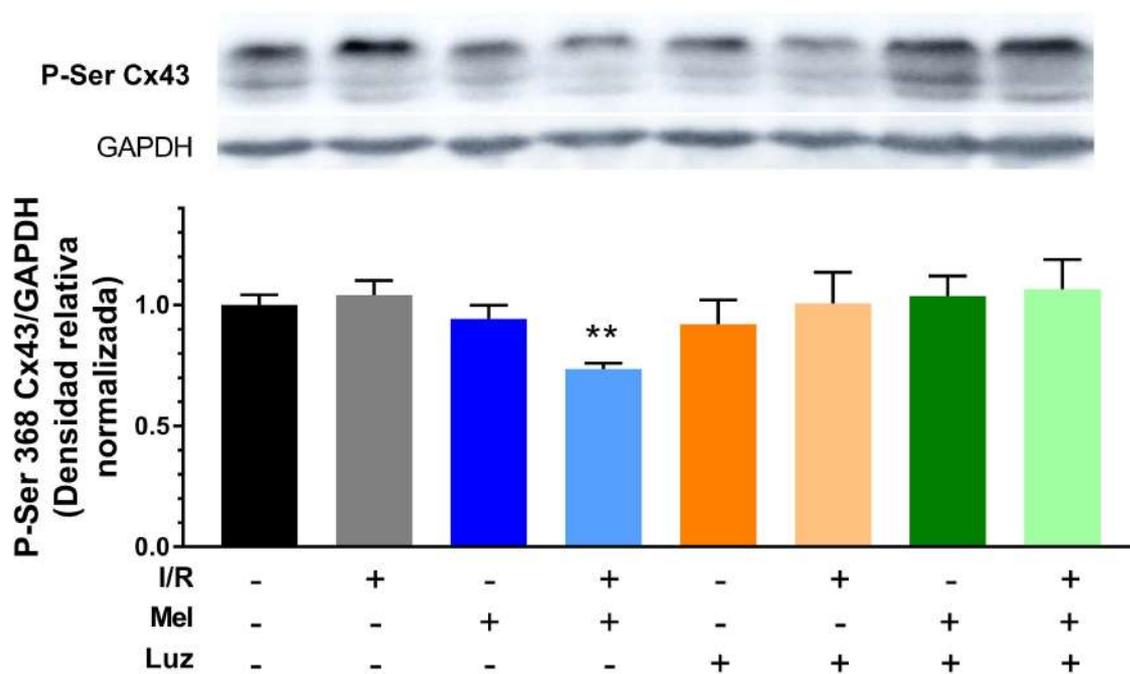
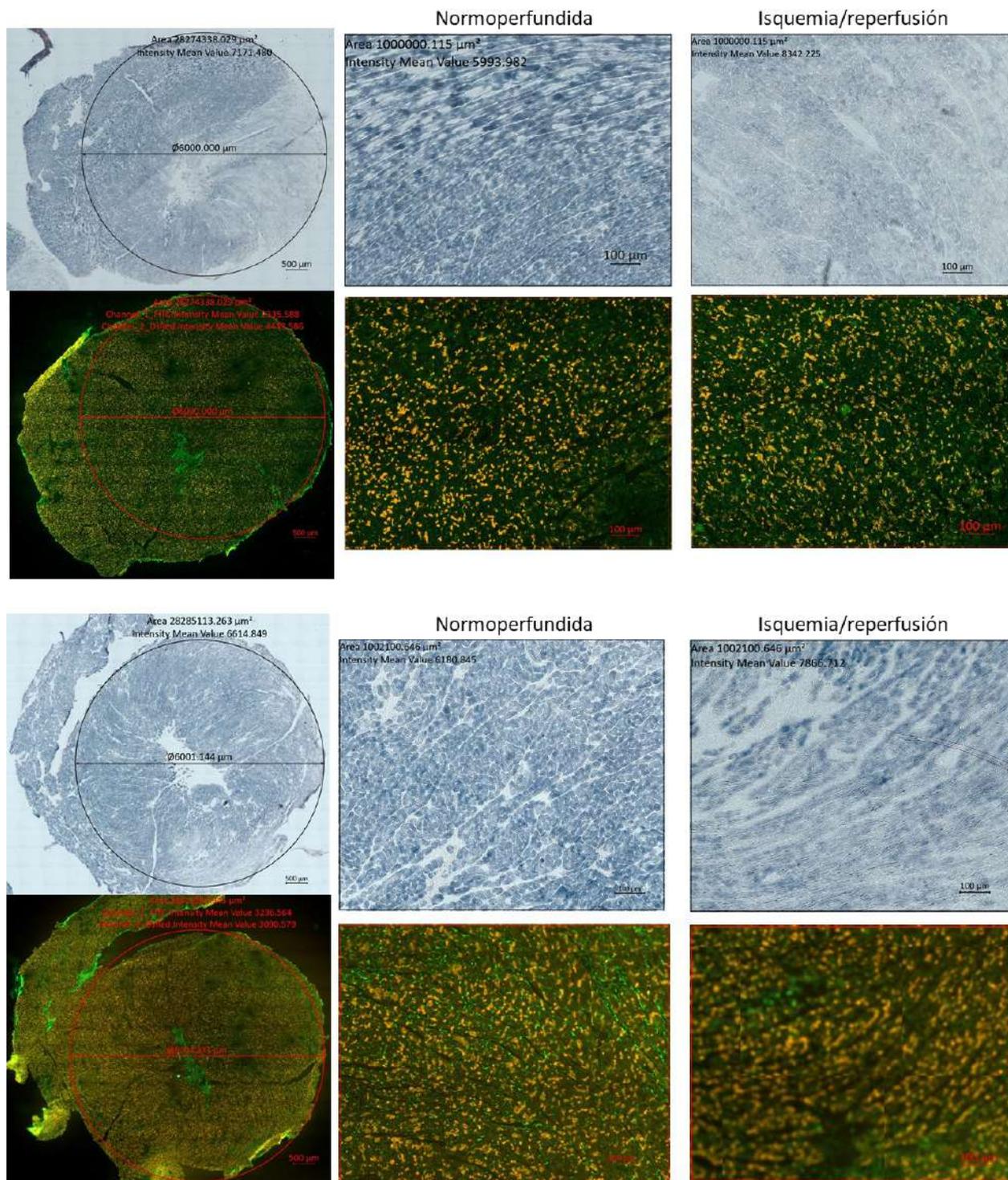
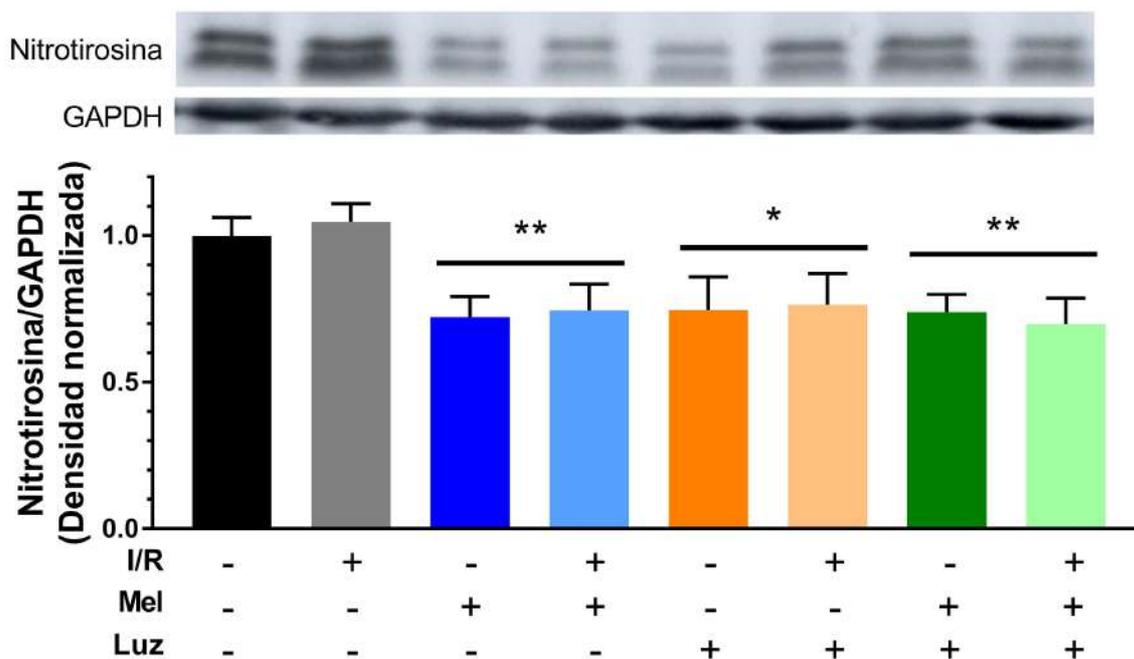


Figura P-Ser 368



Los niveles de nitrotirosina disminuyeron con la melatonina, el luzindol y la combinación de ambos en el tejido sometido a la isquemia/reperfusión y en el que no estuvo expuesto directamente a la injuria (Figura nitro).



Conclusiones

El efecto antiarrítmico de la melatonina administrada durante la reperfusión requiere de la activación de los receptores de membrana y se relaciona con su capacidad para evitar la dispersión global de la repolarización ventricular.

El efecto antiarrítmico de la melatonina administrada durante la reperfusión requiere de la activación de los receptores de membrana.

Restituir la activación sincrónica es un proceso dependiente del receptor de membrana. Reducir la dispersión (DOR) tiene ocurriría por una componente en la repolarización que es independiente de receptor. Dado que luzindol también es antioxidante, esta propiedad no sería primordial para lograr la protección. Los resultados en corazones in situ respaldan su potencial translación hacia la clínica.

CAPÍTULO V - CARDIOPROTECCIÓN CRÓNICA

El efecto cardioprotector crónico de la melatonina fue evaluado mediante un déficit de secreción circadiana y por suplementación en modelos de afección cardiovascular por hipertensión o daño renal. En estos complejos modelos nos concentramos en analizar los cambios eletrofisiológicos, con especial atención en el potencial transmembrana durante episodios de isquemia/reperfusión y la ocurrencia de arritmias.

Ganglionectomía cervical superior

La liberación de melatonina está sincronizada con el ciclo de la luz diurna a través de una vía multisináptica existente entre los ojos y la glándula pineal. La luz tiene un efecto inhibitor de la secreción de melatonina por una vía que comienza en la retina y que modula la actividad del núcleo supraquiasmático, que es el reloj maestro biológico. Este núcleo envía aferencias al ganglio cervical superior, y este envía aferencias adrenérgicas a la glándula pineal.¹

Sólo encontramos un artículo del incremento de las arritmias por reperfusión en animales pinealectomizados.¹¹ Si bien este es una cirugía sencilla el modelo de reducción de la producción endógena de melatonina propuestos en este proyecto es menos invasivo.¹²

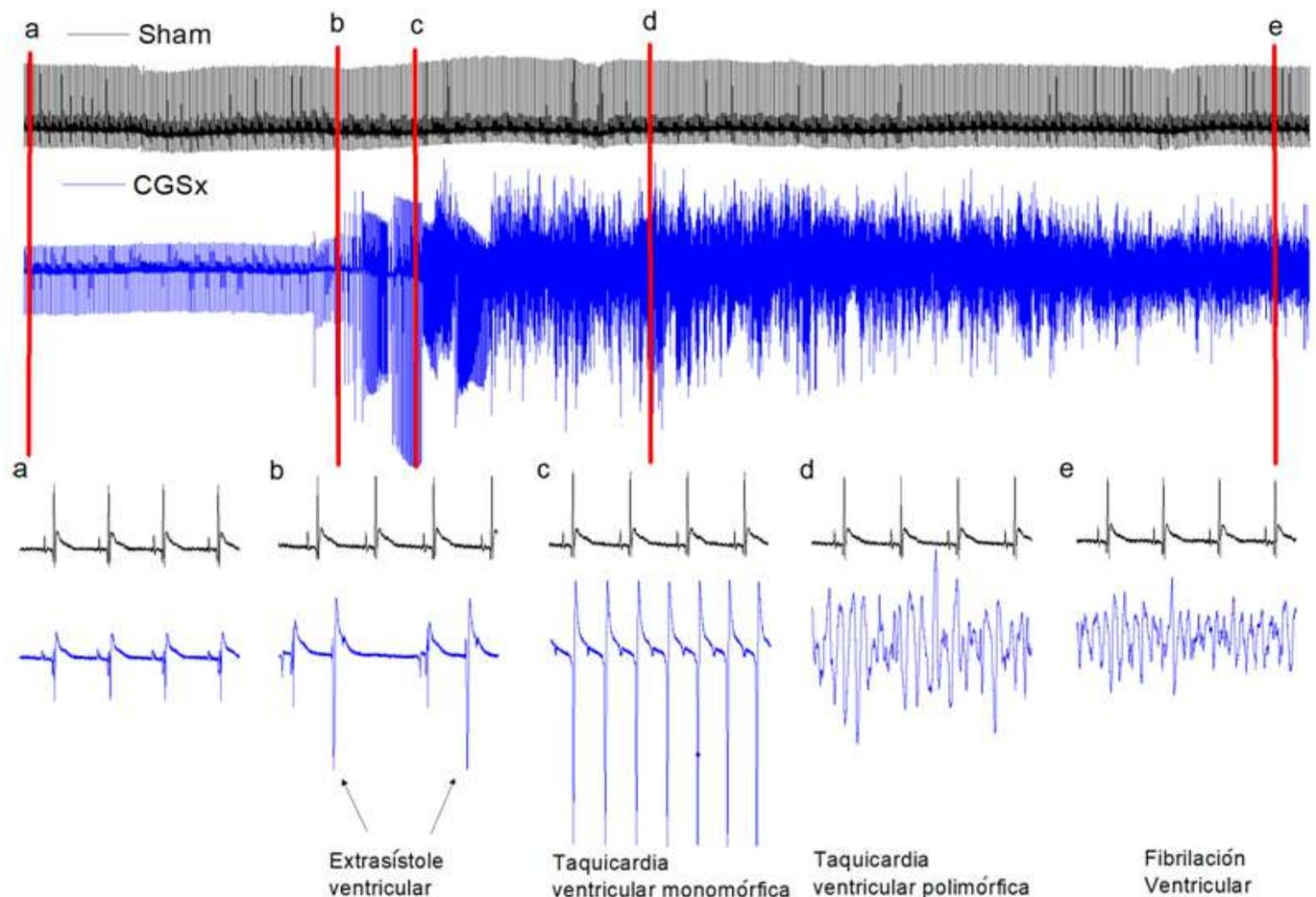


FIG 1. Las arritmias de reperfusión de corazones del grupo CxGCS fueron severas y frecuentes. Trazados representativos de los primeros 3 min. de la reperfusión. Las marcas rojas y sus correspondientes letras indican dónde se amplió la escala de tiempo a 1 seg. Se identifican los distintos tipos de arritmias.

Los animales gangliectomizados presentaron mayor número de arritmias en comparación con aquellos falsamente operados (Figura 1). Se evidencia que en los animales en los que se realizó la CxGC la arritmia más frecuente fue la taquicardia ventricular, comparativamente con aquellos falsamente operados en los cuales predominó un fenómeno arrítmico diferente de la TV.

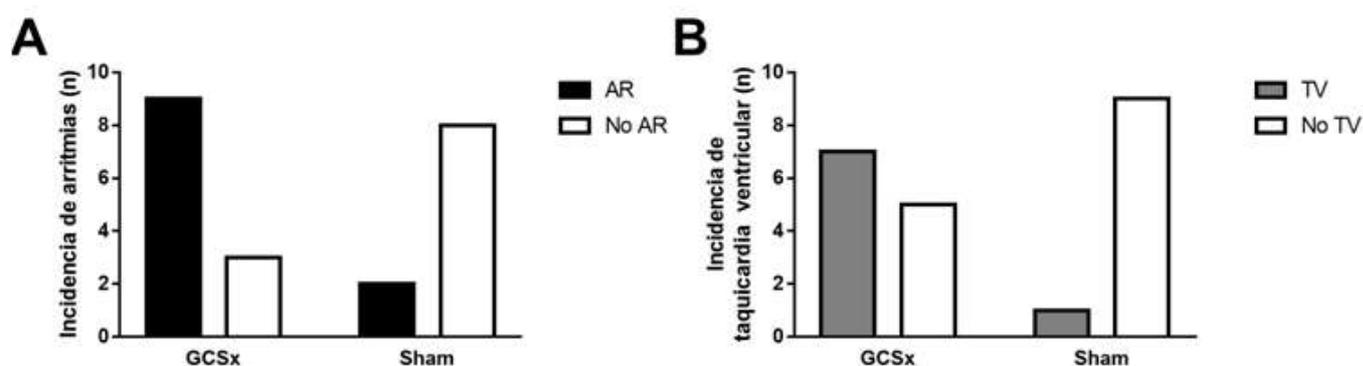


FIG. 2: Arritmias de reperfusión.

A. Los animales sin GCS presentaron mayor número de arritmias en comparación con aquellos falsamente operados (Sham) ($P=0,03$ por Test exacto de Fisher).

B. En los animales en los que se realizó la CxGC aumentó la incidencia de taquicardia ventricular ($P=0,031$ por Test exacto de Fisher).

El intervalo PR no presentó cambios durante la etapa previa a la isquemia (Figura 3, B). Los animales sin GCS presentaron mayor dispersión en las mediciones del PR, que se exacerbó durante la isquemia.

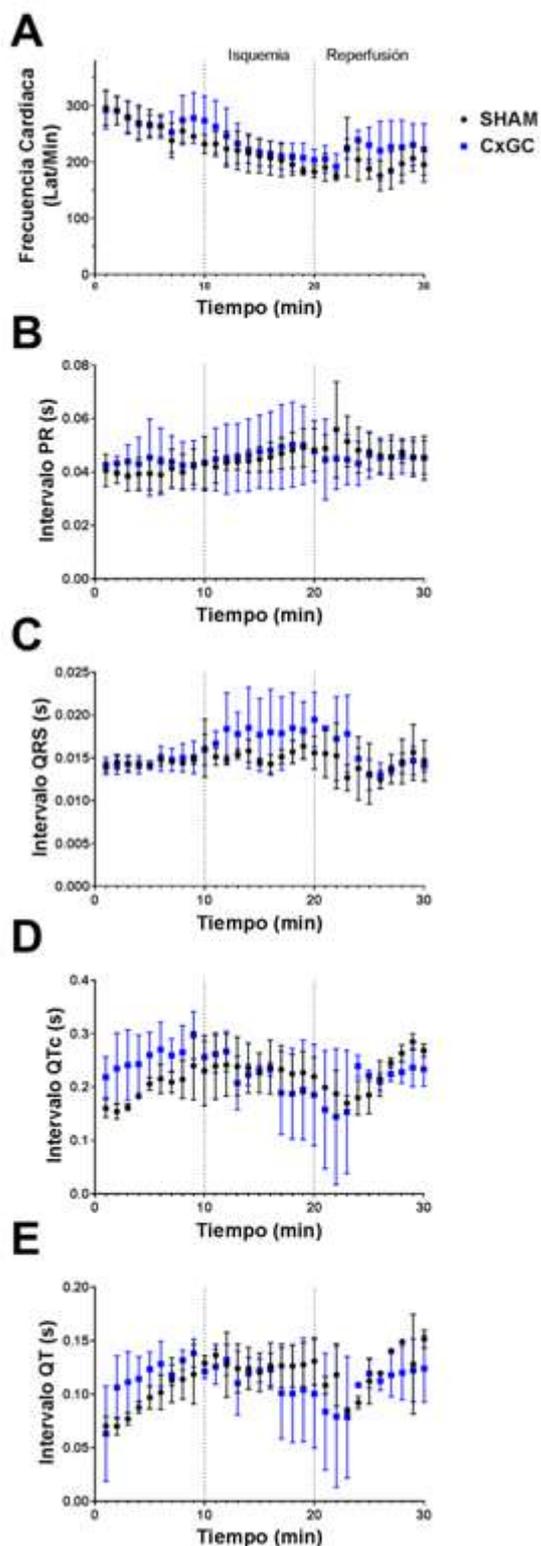


FIG. 3: La respuesta de la activación ventricular, reflejada en el intervalo QRS, en la isquemia presentó mayor dispersión **C**. Estos datos podrían deberse a un trastorno de conducción que se manifiesta en la isquemia con mayor intensidad en los animales sin GCS.

Al final de la isquemia y al inicio de la reperfusión, se observó un aumento de la dispersión del intervalo QT. Los corazones presentaban inestabilidad en este parámetro sobre todo en los primeros minutos de la reperfusión **E**. Estos hallazgos persistieron aún al ser corregidos por la frecuencia cardíaca, lo que se aprecia en el cálculo del intervalo QT corregido (Figura 2, D).

La combinación de variabilidad en la activación y en la repolarización ventriculares evidencian en los intervalos QRS y QT son un sustrato para el desarrollo de circuitos de reentrada, y podrían explicar el aumento de taquicardia ventricular observado en los animales del grupo CGSx.

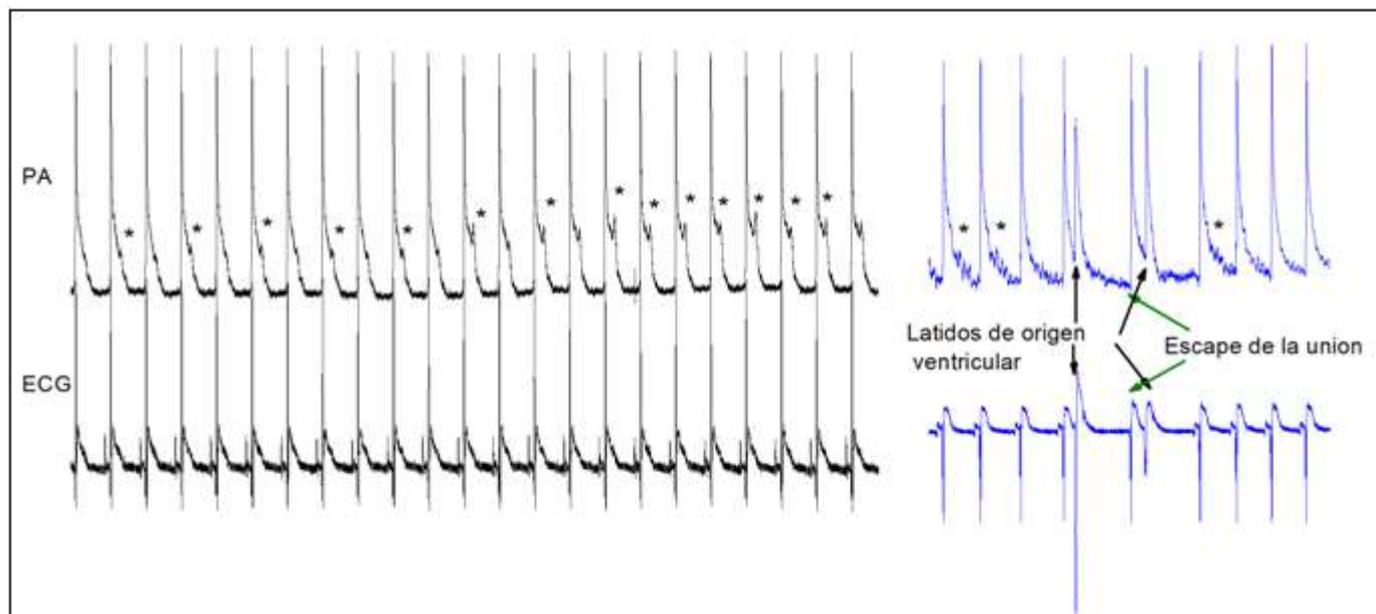


FIG. 4. Potenciales de acción, pospotenciales y arritmias gatilladas. Los potenciales de acción presentaron pospotenciales (indicados por *) en ambos grupos. Los trazados en negro corresponden a 6 seg. del grupo Sham y los azules 3 seg del grupo CGSx. En éste grupo se indican los eventos arrítmicos y su correspondiente manifestación en el potencial de membrana (con flechas en negro). Se indica un latido no sinusal, por ausencia de onda P, pero con morfología del QRS similar a la activación supraventricular (flechas verdes) que se asume como un latido de escape del sistema de conducción AV.

El análisis preliminar de los potenciales de acción nos permitió identificar eventos arrítmicos por actividad gatillada. Los potenciales mostraban oscilaciones del potencial de membrana durante la repolarización en ambos grupos, pero los animales del grupo CGSx sufrían eventos arrítmicos mientras que los falsamente operados no desencadenaban arritmias.

CONCLUSIONES: Aquellos animales en los que se alteró el ritmo circadiano de la hormona melatonina, mediante la GCSx, presentaron mayor predisposición a realizar arritmias,

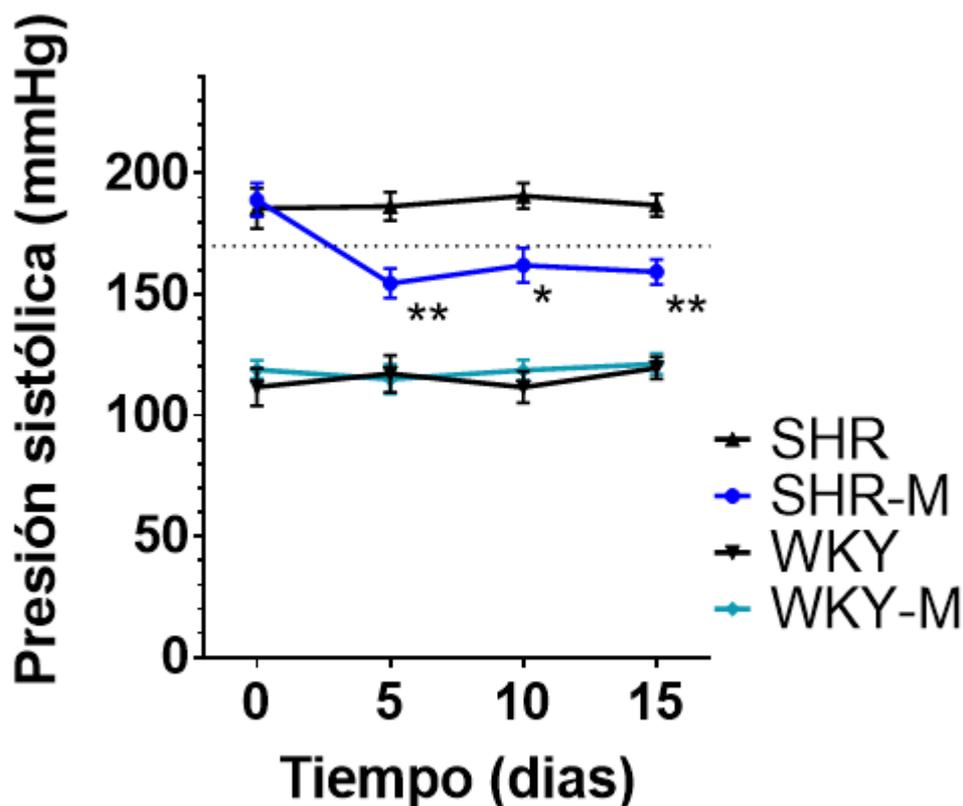
principalmente taquicardia ventricular. Esto podría deberse a trastornos de conducción y a cambios en la repolarización.

Cardioprotección en ratas SHR

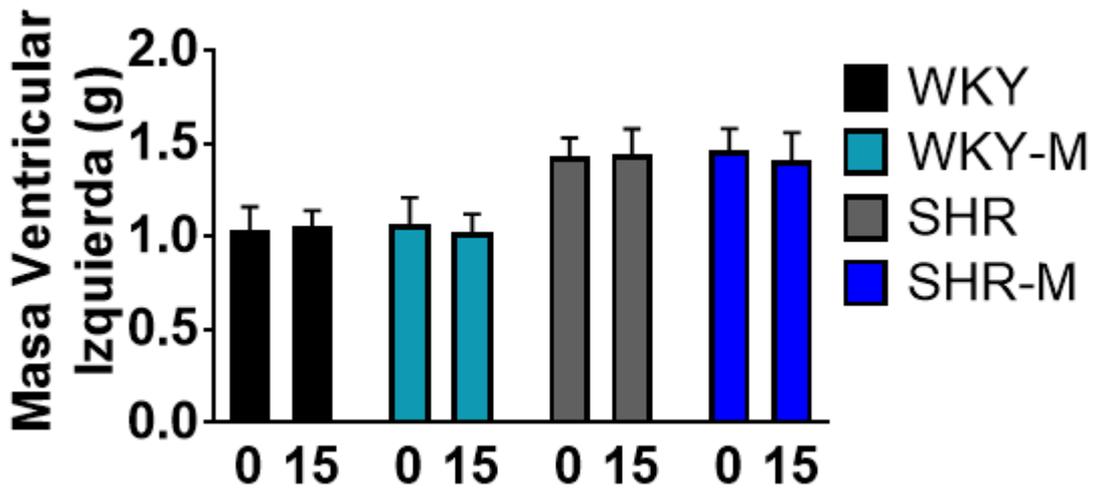
La melatonina tiene efectos antihipertensivos y antiarrítmicos, pero se desconoce si la administración vía oral es capaz de reducir las arritmias de reperfusión. El objetivo de este trabajo fue determinar si la administración crónica de melatonina en el agua de bebida era capaz de reducir la presión arterial y si el efecto persistía en corazones aislados de rata para proteger contra las arritmias de reperfusión.

Ratas machos normotensas y ratas espontáneamente hipertensas de 3 meses de edad recibieron 4 mg/Kg/día de melatonina disuelta en el agua de bebida durante 15 días o agua corriente como controles. Se determinó la presión arterial cada 5 días por pletismografía en la cola de los animales. Se evaluó la función ventricular por ecocardiografía previo al inicio del tratamiento y antes de la eutanasia. Los órganos de tres animales por grupo fueron fijados inmediatamente y luego procesados histológicamente. En otros diez animales por grupo se analizaron los electrogramas y los potenciales transmembrana epicárdicos de corazones aislados sometidos a 10 minutos de isquemia regional y 10 minutos de reperfusión.

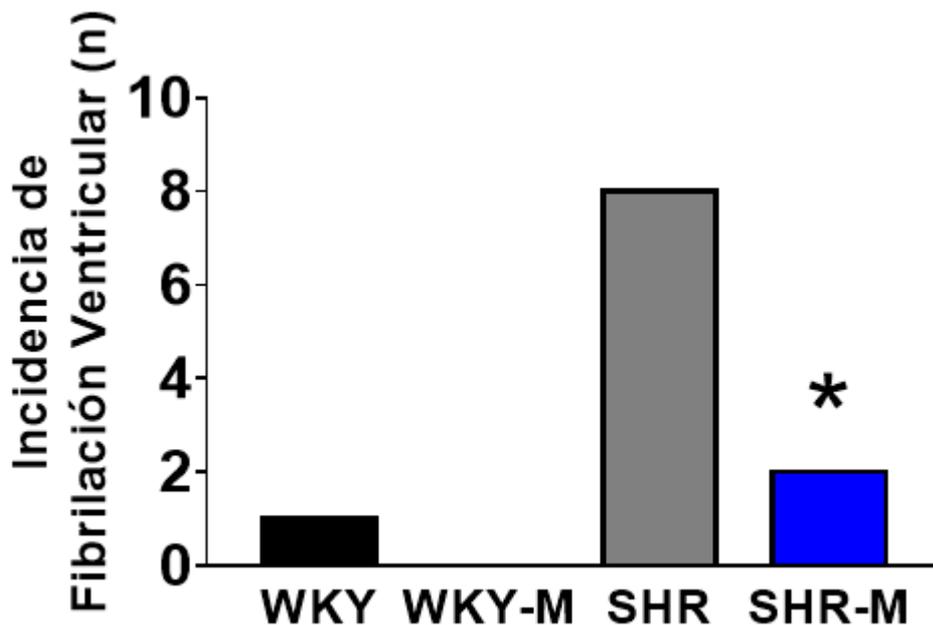
La melatonina redujo la presión sistólica en las ratas hipertensas de $186,8 \pm 2,4$ a $159,2 \pm 3,7$ ($P < 0,01$) pero no en las ratas normotensas (tratadas $118,8 \pm 4,6$ y no tratadas $119,8 \pm 4,1$).



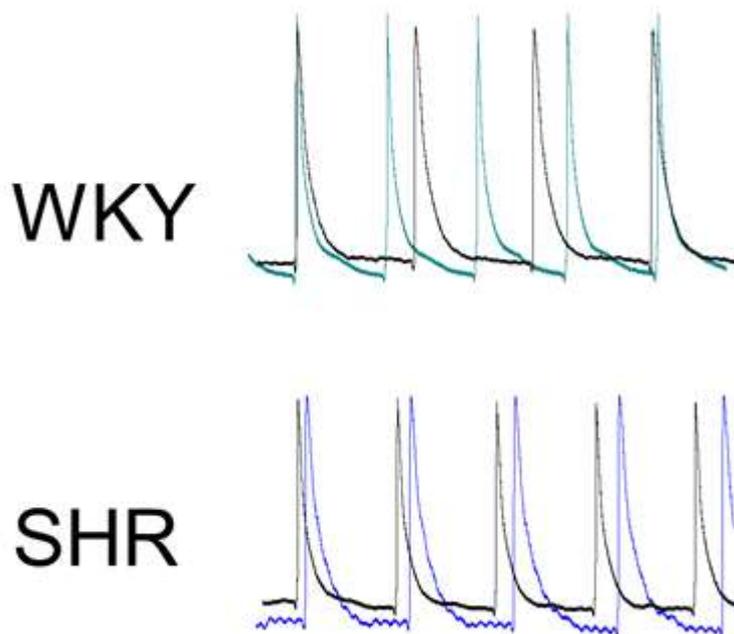
La melatonina no evitó hipertrofia ventricular de las ratas hipertensas (confirmado por ecocardiograma e índice peso cardíaco/longitud tibial) ni produjo cambios en la función ventricular.



Las ratas hipertensas sufrieron más fibrilación ventricular durante la reperfusión y la melatonina la redujo a los valores encontrados en las normotensas (hipertensas 8/10, hipertensas tratadas 2/10, $P=0,023$; normotensas tratadas 0/10, no tratadas 1/10).



La melatonina provocó hiperpolarización y aumento de la amplitud en ambos grupos de animales tratados.



La melatonina vía oral mantiene su efecto antihipertensivo y provoca un remodelado eléctrico que se asoció a una reducción en las arritmias de reperfusión.

Cardioprotección en ratas con nefropatía

3. RESULTADOS

3.1. Química sérica

En el grupo UUO, los datos analíticos de la bioquímica sanguínea mostraron un ligero aumento en los parámetros medidos (urea y creatinina) sin significación estadística. Estas leves tendencias estaban ausentes en aquellos animales que recibieron Mel (Tabla 2).

3.2. Efectos de la melatonina sobre la fibrosis intersticial, apoptosis, actividad de NADPH oxidasa y cambios ultraestructurales mitocondriales durante UUO

Las cortezas renales de los riñones de UUO mostraron una mayor acumulación de colágeno (tres veces) en el intersticio expandido en relación con las cortezas renales del grupo de Sham (v. Fig. 1, A y B). En comparación con los del grupo UUO, los riñones tratados con Mel mostraron una menor acumulación de colágeno en el intersticio expandido, junto con infiltrados intersticiales celulares en la corteza. Los riñones de control y control + Mel no tenían diferencias en la deposición intersticial de colágeno.

La estructura microscópica de los corazones reveló evidencia de aumento de la fibrosis. Los corazones de control + Mel no parecían ser diferentes de los de control (Fig.1, C y D). Sin

embargo, los corazones del grupo UUO + Mel mostraron una menor acumulación de colágeno en el intersticio expandido, junto con infiltrados intersticiales celulares en relación con el grupo UUO. Las cortezas renales que se muestran en la Figura 2A, B muestran un número mayor de células apoptóticas positivas para TUNEL en las células epiteliales glomerular y tubular de la UUO en comparación con las del grupo Sham. El número de células apoptóticas positivas para TUNEL en el grupo UUO + Mel fue menor que el número encontrado en el grupo UUO no tratado. Un análisis TUNEL de los corazones del grupo UUO mostró un mayor número de células apoptóticas en comparación con las del grupo Sham. El tratamiento con melatonina redujo la apoptosis en células miocárdicas UUO (UUO + Mel) con respecto al grupo UUO. La distribución de la apoptosis en el área de los cardiomiocitos fue bastante difusa (Figura 2C, D). Los riñones y los corazones de Sham + Mel no tuvieron diferencias en el número de células apoptóticas positivas para TUNEL en comparación con el grupo de Sham. Los riñones y los corazones del grupo UUO mostraron edema mitocondrial con crestas dilatadas (puntas de flecha en la Figura 3B, E). De acuerdo con estos hallazgos ultraestructurales, mostramos, en las fracciones mitocondriales, que la actividad de la NADPH oxidasa fue significativamente mayor en el grupo UUO que en el grupo Sham (panel inferior de la Figura 3). La melatonina previno el edema mitocondrial (Figura 3C, F) y disminuyó la actividad de la NADPH oxidasa (en riñones y corazones). El grupo Sham and Sham + Mel muestra abundantes mitocondrias, en su mayoría con una ultraestructura normal y sin diferencias significativas en la actividad de la NADPH oxidasa.

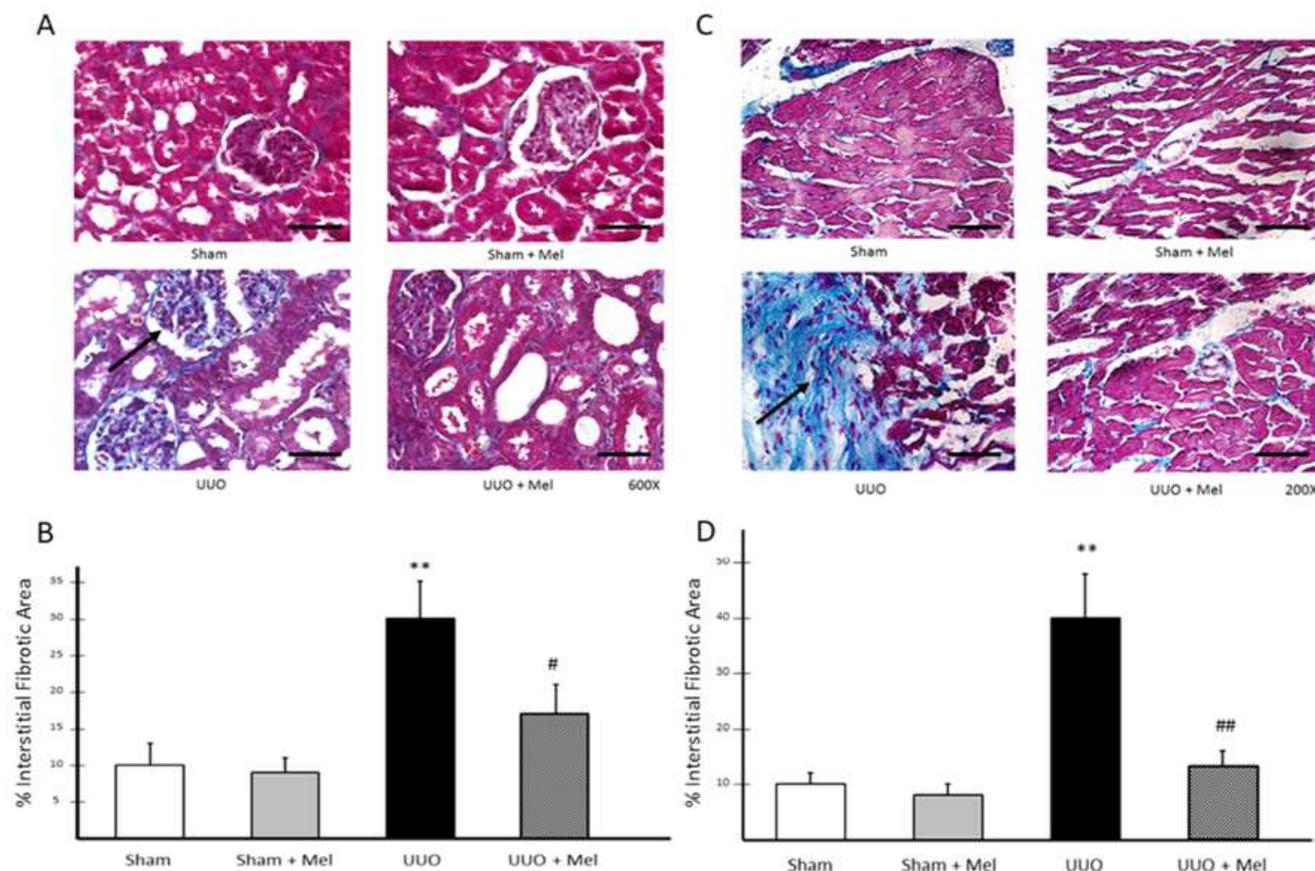


FIG 1. La melatonina previene la fibrosis en riñón y corazón.

El tricrómico de Masson en las cortezas renales y el tejido miocárdico: el efecto de la melatonina en la deposición de colágeno durante la UUU.

A: Imágenes representativas de la corteza renal de ratas tratadas con vehículo (Sham), ratas tratadas con Mel (Sham + Mel), ratas obstruidas y tratadas con vehículo (UUU), y ratas obstruidas y tratadas con Mel (UUU + Mel). La deposición de colágeno se tiñe de azul (puntas de flecha), los núcleos se tiñen de rojo oscuro / púrpura, y El citoplasma se tiñe de rojo / rosa. Las barras de escala (negro) indican 50 μ m.

B: la cuantificación tricrómica de Masson a partir de tejido renal. El intersticial fibrótico. El área de la UUU reveló una expansión significativa del espacio intersticial en comparación con lo que se vio en las ratas Sham. Por el contrario, en UUU + Mel En grupo, la expansión del espacio intersticial se redujo significativamente en comparación con la de las ratas UUU. Las cortezas de Sham + Mel El grupo no mostró diferencias en relación con los del grupo Sham. C, tejido miocárdico representativo. D, la cuantificación tricrómica de Masson. El área fibrótica intersticial de la miocardia de ratas UUU reveló una expansión significativa del espacio intersticial en comparación con la miocardia de los sujetos del grupo Sham. La melatonina después de la obstrucción unilateral (UUU + Mel) disminuye la fibrosis miocárdica y remodela comparación con UUU. Los resultados son medias \pm SEM de 5

observaciones independientes. ** $P < .01$ frente a Sham y Sham + Mel, # $P < .05$ y ## $P < .01$ vs UOO

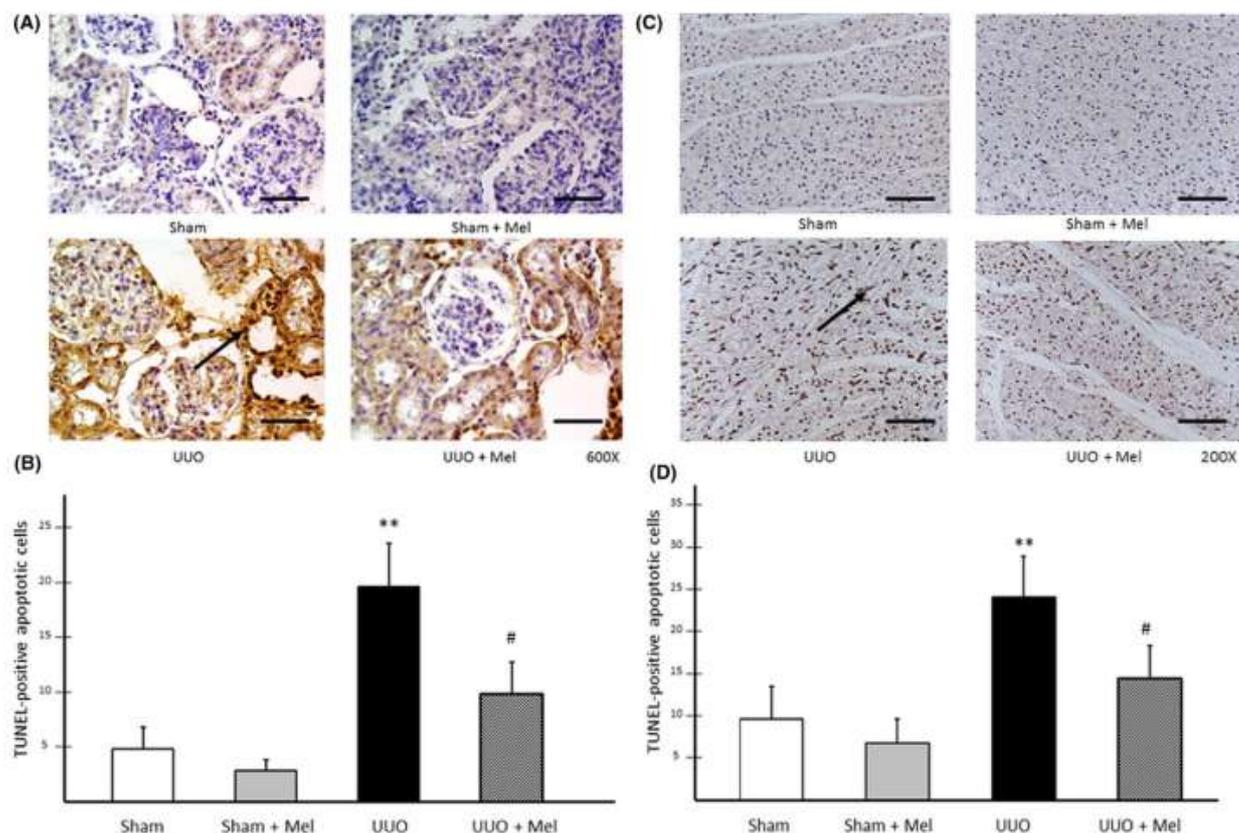


FIG 2. La melatonina redujo la apoptosis en riñón y corazón

Identificación y cuantificación de la apoptosis celular mediante la técnica TUNEL en cortezas renales y miocardio: melatonina. Efecto sobre la muerte celular durante la UOO.

A: Ubicación de los núcleos apoptóticos utilizando la técnica de marcado TdT-ridine-nick-end (TUNEL). Imágenes representativas de la corteza renal de los grupos Sham, Sham + Mel, UOO y UOO + Mel. Los núcleos apoptóticos positivos aparecen como núcleos pesados teñidos de marrón (puntas de flecha) en células epiteliales tubulares, glomerulares. Las barras de escalada indican 50 μm .

B: Cuantificación de células apoptóticas en cortezas. El número de núcleos positivos para TUNEL aumentó en células epiteliales glomerulares y tubulares de UOO en comparación con los animales tratados con Sham. En el grupo UOO + Mel, los núcleos apoptóticos disminuyeron en comparación con los UOO. C, tinción representativa de TUNEL del tejido miocárdico de los 4 grupos como se indica debajo de las imágenes. La UOO incrementó la apoptosis en los cardiomiocitos (las flechas indican el núcleo apoptótico) y la melatonina previno este tipo de muerte celular. Las barras de escala indican 100 μm . D, cuantificación

de células apoptóticas en el miocardio. El corazón de ratas UUO es el número de núcleos positivos para TUNEL en la comparación con animales tratados con Sham. La melatonina reduce la apoptosis inducida por la obstrucción unilateral. Los resultados son medias \pm SEM de 5 observaciones independientes. ** $P < .01$ contra Sham y Sham + Mel; y # $P < .05$ vs UUO

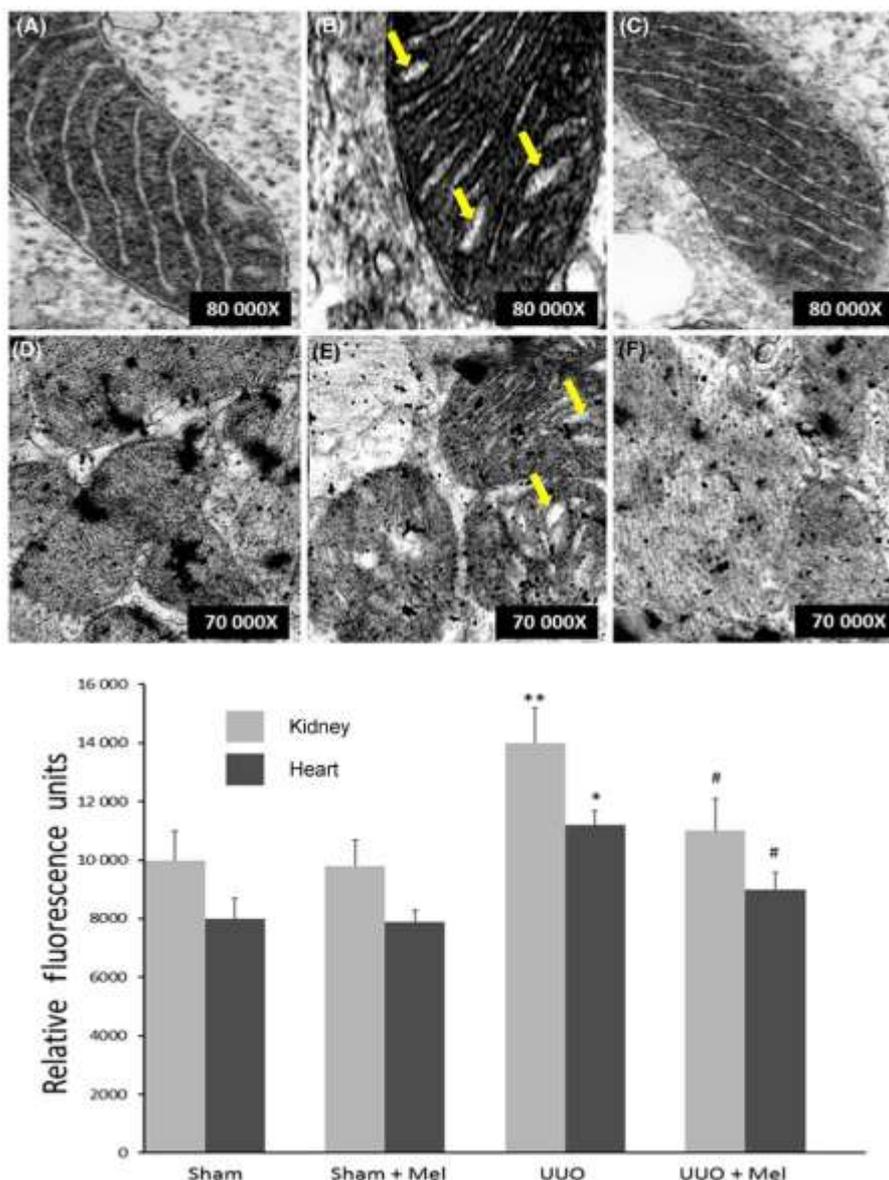


FIG 3. La melatonina contrarrestó el aumento de la actividad de la NADPH oxidasa en fracción mitocondriales de riñón y corazón. Estudios de microscopía electrónica y actividad de la NADPH oxidasa en la corteza renal y el corazón durante la UUO: el efecto de la melatonina. Panel superior:

A, Microscopía electrónica de las cortezas corticales de animales tratados con Sham.

B, Microscopía electrónica de cortezas corticales de animales tratados con UUO. **C,** las mismas condiciones experimentales que en B, pero con tratamiento con melatonina (UUO + Mel). **D,** Microscopía electrónica del miocardio de animales tratados con Sham. **E,** Microscopía electrónica del miocardio de ratas tratadas con UUO. **F,** las mismas

condiciones experimentales que en E, pero con tratamiento con melatonina (UUO + Mel). Las mitocondrias están presentes en los espacios entre las crestas mitocondriales dilatadas (flechas en B y E) en los riñones no tratados y el miocardio. Panel inferior: gráficos representativos de la cuantificación de la actividad de la NADPH oxidasa en fracciones mitocondriales que muestran riñones y corazones. La actividad oxidasa de NADPH de los riñones y los corazones fue significativamente mayor en animales UUO que en el grupo Sham. Sin embargo, la actividad oxidasa NADPH de los riñones y los corazones se redujo más en los animales UUO + Mel que en el grupo UUO. No se observaron diferencias en las cortezas renales y en la miocardia de los animales Sham + Mel sobre lo que se observó en el grupo Sham. Los resultados son medias \pm SEM de 5 observaciones independientes. * $P < .5$ y ** $P < .01$ contra Sham and Sham + Mel; y # $P < .05$ vs UUO

3.3. Efectos de la melatonina en la expresión renal / miocárdica VDR, AT1 y Hsp70 durante UUO

La Fig. 4 muestra la expresión del ARNm de VDR, AT1 y Hsp70 en las cortezas renales (Fig. 4, A y B) y la miocardio (Fig. 4, C y D) de todos los grupos. Más específicamente, el análisis del ARNm de VDR y Hsp70 de las cortezas renales del grupo UUO mostró una expresión significativamente menor en comparación con las del grupo control. La expresión de ARNm de AT1 renal reveló un aumento del doble en el grupo UUO en comparación con el grupo Sham. Mel aumentó la expresión de ARNm de VDR y Hsp70 y la disminución de la expresión de ARNm de AT1 en las cortezas renales del grupo UUO (UUO + Mel) en comparación con los del grupo de UUO no tratado (Fig. 4, A y B). Como se observó en la insuficiencia renal corticales, la expresión del ARNm del miocardio de VDR y Hsp70 disminuyó y AT1 aumentó en el grupo UUO. Mel restauró la expresión de ARNm de VDR y Hsp70 en el miocardio y disminuyó la expresión de ARNm de AT1 (Fig. 4, C y D).

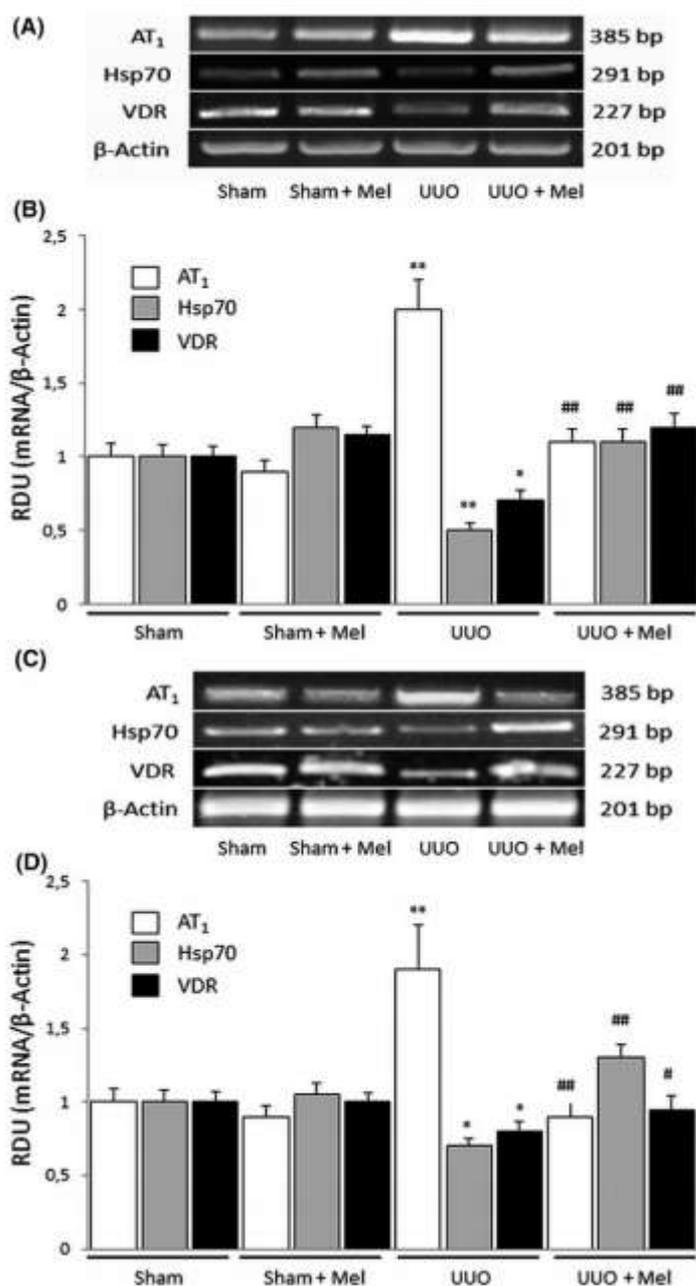


FIG. 4: Expresión de ARNm por RT-PCR y semicuantificación de AT₁, Hsp70 y VDR en UUO: efecto de la melatonina. Los ARNm representativos de ARNm AT₁, Hsp70 y VDR se muestran en las cortezas renales (A) y miocárdicas (C) de ratas operadas de forma simulada y obstruidas, tratadas o no con Mel. El mantenimiento correspondiente β-actina se incluye a continuación (A y C). La cantidad relativa de expresión de ARNm se determinó después de la normalización del nivel de AT₁, el ARNm de Hsp70 y VDR del control apropiado y se muestra en los histogramas debajo de las transferencias correspondientes (B y C). La corteza renal y el tejido miocárdico de los animales UUO mostraron una mayor expresión de AT₁ y una menor expresión de ARNm de VDR y Hsp70 en comparación con los de los animales Sham. En los animales UUO + Mel, la melatonina disminuyó el ARNm de AT₁ y restauró la expresión de VDR en la corteza renal y los ventrículos. La melatonina

retuvo la expresión del ARNm de Hsp70 en los riñones y aumentó su expresión en los corazones de los animales UUO. Los resultados son medias \pm SEM de 5 observaciones independientes. * P <.05 y ** P <.01 vs Sham; #P <.05 y ## P <.01 vs UUO.

En apoyo de los resultados transcripcionales (ARNm), las Figuras 5 y 6 muestran VDR, AT1 y Hsp70, mientras que las Figuras. 7 y 8 muestran la expresión de la proteína AT1 y Hsp70 en las cortezas renales y los miocardios de todos los grupos. Se realizaron análisis inmunocitoquímicos (figuras 5 y 6) e inmunofluorescencia (figuras 7 y 8) para establecer la localización de la proteína y la intensidad de la inmunorreacción.

Las cortezas renales y el tejido miocárdico del grupo UUO mostraron bajos niveles de inmunotinción VDR y Hsp70, así como un bajo nivel de inmunofluorescencia de Hsp70 (Figuras 5-8). Se observó un nivel muy elevado de tinción de AT1 en las cortezas renales y la miocardio del UUO en comparación con los grupos de control. Para más detalles, vea las puntas de flecha para AT1 en las figuras 5A, 6A, 7A, 7B y 8A. El tratamiento con Mel indujo un VDR y Hsp70 más altos y una reducción en la inmunotinción / fluorescencia de AT1 en comparación con los del grupo de UUO no tratado.

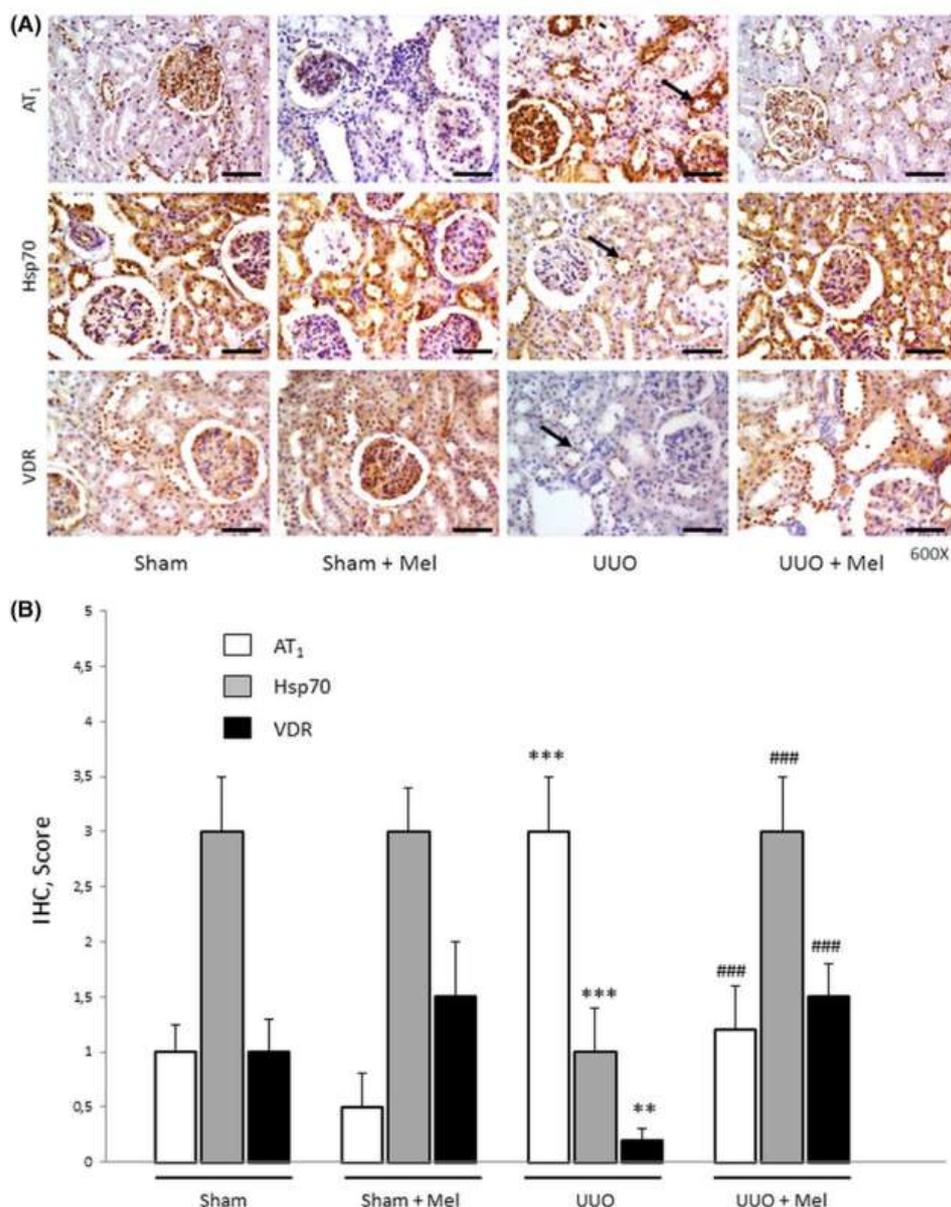


FIG 5. A: La melatonina atenuó AT₁ y aumento HSP70 y VDR en riñón

Técnica de inmunohistoquímica (IHC) y semicuantificación de la expresión de AT₁, Hsp70 y VDR en cortezas renales de animales tratados con UUO: el efecto de la melatonina. Un representante imágenes de cortes renales de ratas tratadas con vehículo (Sham), ratas tratadas con Mel (Sham + Mel), ratas obstruidas y tratadas con vehículo (UUO), y ratas tratadas y tratadas con Mel (UUO + Mel). Expresión positiva de la proteína AT₁, Hsp70 y VDR

Aparecen como núcleos teñidos de marrón y citosol (puntas de flecha) en células epiteliales glomerulares y tubulares. Las barras de escala indican 50 μm.

B: La melatonina atenuó AT₁ y aumento HSP70 y VDR en riñón

Evaluaciones cuantitativas de la tinción IHC en cortezas renales. La puntuación IHC de los animales UUO reveló un aumento muy significativo en la tinción AT₁ y una disminución para Hsp70 y VDR en comparación con la tinción de los animales Sham. La melatonina evitó los

cambios en la tinción de AT₁, Hsp70 y VDR inducida por UUO pero no con respecto al grupo Sham. Los resultados son medias \pm SEM de 5 observaciones independientes. ** P <.01 y *** P <.001 contra Sham; ### P <.001 vs UUO

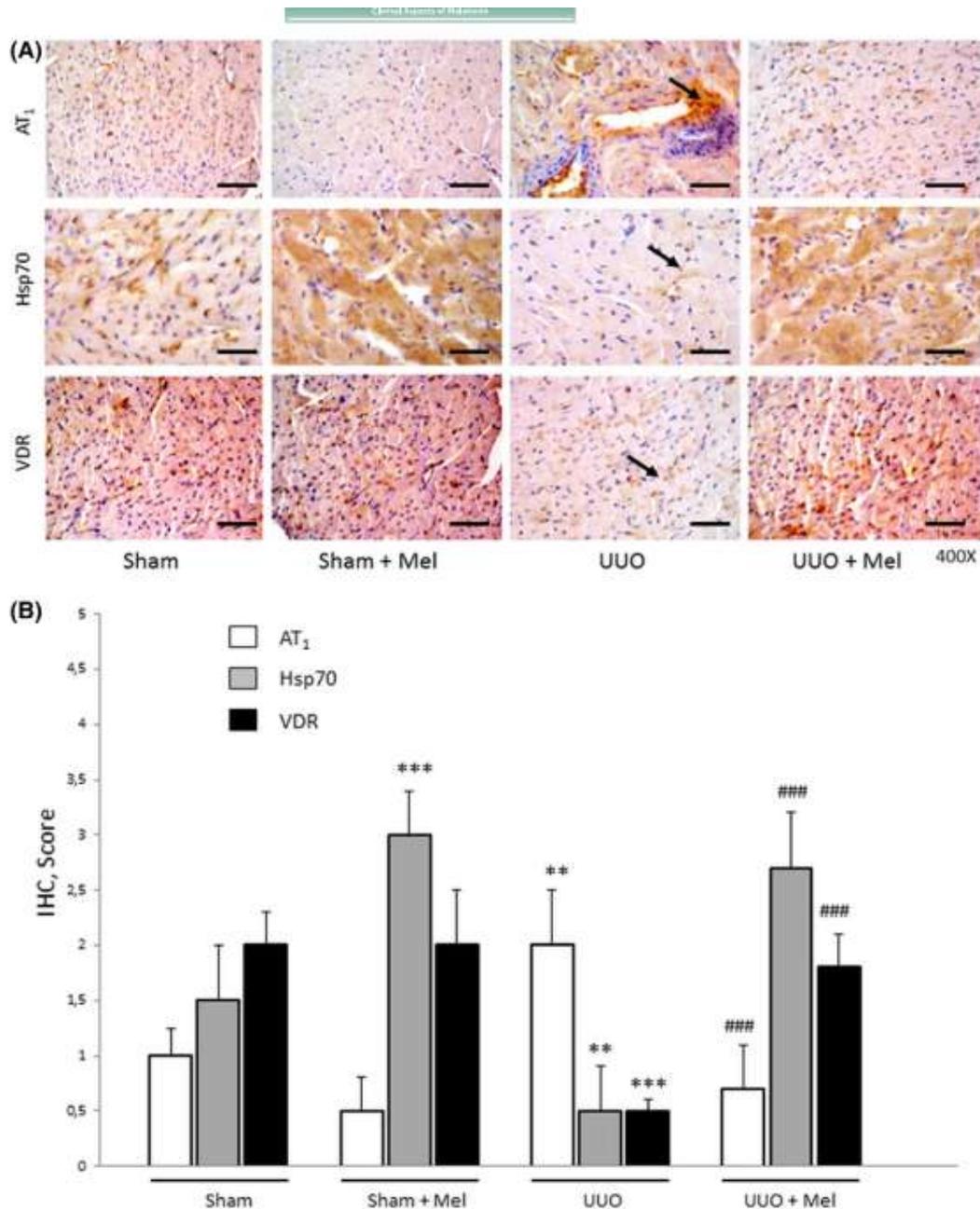


FIG. 6: técnica de inmunohistoquímica (IHC) y semicuantificación de la expresión de AT₁, Hsp70 y VDR en el miocardio de UUO: efecto de la melatonina.

A, imágenes representativas de IHC de el tejido miocárdico de los 4 grupos, como se indica debajo de cada columna de imágenes. Proteína positiva AT₁, Hsp70 y VDR la expresión aparece como núcleos teñidos de marrón y citosol (puntas de flecha) en las células del miocardio. Las barras de escala indican 50 μ m.

B, evaluaciones cuantitativas de la tinción de IHC en el miocardio. La melatonina aumentó la puntuación IHC para Hsp70 en ambos grupos tratados (Sham y UUO). En los corazones

de UOU, la tinción AT1 aumentó, pero la tinción con Hsp70 y VDR disminuyó en comparación con los animales Sham. En el grupo UOU + Mel, la tinción AT1 se redujo significativamente en comparación con la de UOU solo ($P < .001$). Los resultados son medias \pm SEM de 5 observaciones independientes. ** $P < .01$ y *** $P < .001$ contra Sham; #### $P < .001$ vs UOU

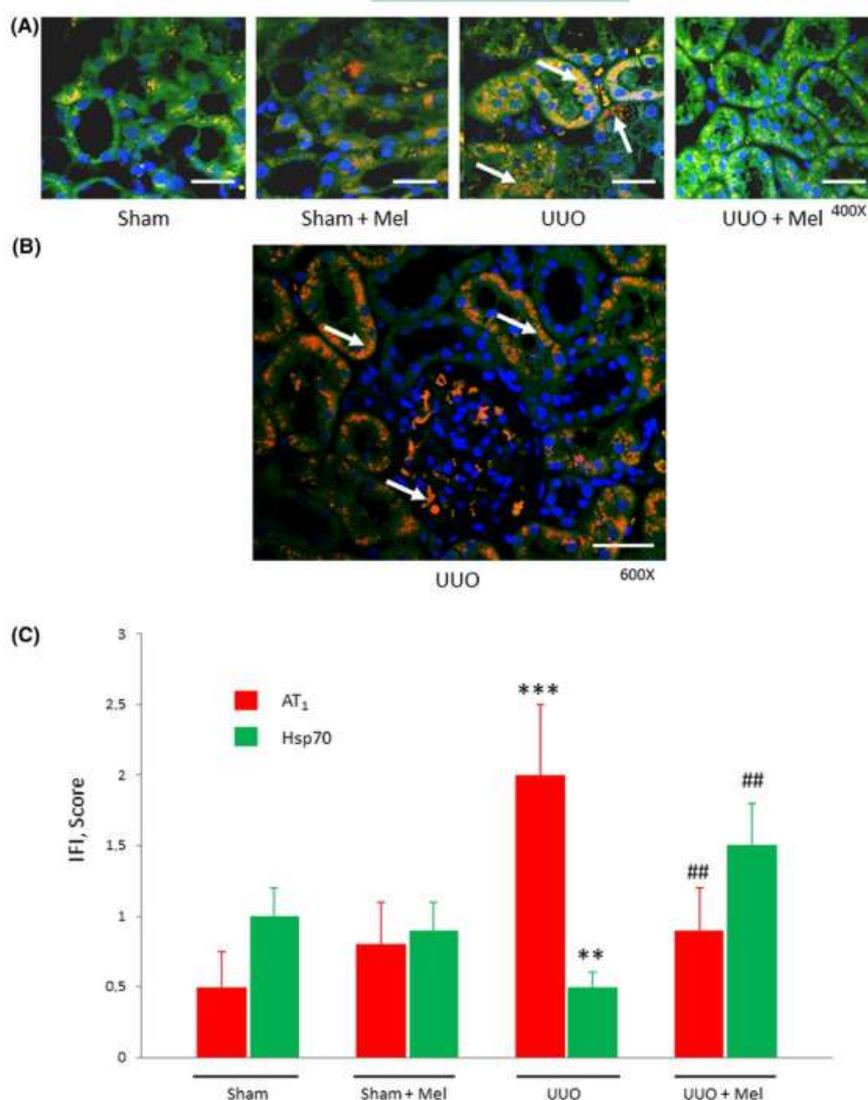


FIG. 7: Técnica de inmunofluorescencia (IFI) y semicuantificación de la expresión de AT1 y Hsp70 en cortezas renales de UOU: efecto de la melatonina.

A: Imágenes IFI representativas de microscopía confocal de cortezas renales de Sham, Sham + Mel, UOU y UOU + Mel.

B: Imagen ampliada de las cortezas renales de ratas UOU. La localización positiva de IFI para AT1 (puntas de flecha) aparece en tejidos de la corteza renal marcados en rojo y Hsp70 en verde. Los núcleos están en azul. Las barras de escala indican 50 μ m. C, evaluaciones cuantitativas de la tinción de inmunofluorescencia en cortezas renales. Las puntuaciones IFI de las cortezas renales de los animales UOU mostraron una expresión

muy alta de AT1 en comparación con las de los animales Sham (ver flechas en A y B). Por el contrario, la expresión de Hsp70 fue menor en el grupo UO. Tratamiento con melatonina después de la UO indujo una alta inmunofluorescencia de Hsp70 y redujo la intensidad de AT1 en comparación con el During ischemia, premature ventricular complexes developed in half of the hearts of the members of the UO group. Most arrhythmias started a few seconds after reperfusion

(Figure 9A). Salvos were seen in all the groups. Ventricular tachycardia was frequent in the Sham and UO groups (Figure 9A,B). Ventricular fibrillation increased only in the UO group. A sample of this lethal arrhythmia is evident in Figure 9. Melatonin effectively prevented severe reperfusion arrhythmias. The arrhythmic episodes were shorter SS grupo UO. Los resultados son medias \pm SEM de 5 observaciones independientes. ** $P < .01$ y *** $P < .001$ contra Sham; ## $P < .01$ vs UO

3.4. Efectos electrofisiológicos de la melatonina.

Durante la isquemia, se desarrollaron complejos ventriculares prematuros en la mitad de los corazones de los miembros del grupo UO. La mayoría de las arritmias comenzaron unos pocos segundos después de la reperfusion (Fig.9A). Se vieron salvos en todos los grupos. La taquicardia ventricular fue frecuente en los grupos control y UO (Fig.9, A y B). La fibrilación ventricular aumentó solo en el grupo UO. Una muestra de esta arritmia letal es evidente en la Fig. 9. Mel evitó eficazmente arritmias de reperfusion graves. Los episodios arrítmicos fueron más cortos con Melatonina. La duración media de la taquicardia ventricular disminuyó de 43 s (IQR 33 - 81 s) en el grupo control a 0 s (IQR 0 - 0 s) en el grupo control + Mel ($P < .01$), y de 79 s (IQR 61 - 90 s) en el grupo UO a 0 s (IQR 0 - 9 s) en el grupo UO + Mel ($P < .01$). En los corazones del grupo UO, la duración media de la fibrilación ventricular aumentó a 290 s (IQR157 - 415 s), mientras que las otras medianas se mantuvieron a 0 s (IQR 0 - 0 s) ($P < .001$ frente a cada grupo). La mayor duración de la taquicardia ventricular y la fibrilación parecen explicar los puntajes arrítmicos más altos en los miembros del grupo UO (Fig. 9C).

El tratamiento crónico con melatonina cambió las características del potencial de acción epicárdico. Melatonina aumentó la amplitud en ambos grupos tratados a lo largo de todos los períodos experimentales (Fig.10). Concomitantemente, melatonina hiperpolarizó el potencial de reposo. La hiperpolarización persistió durante la isquemia y la reperfusion en los corazones tratados. La isquemia inducía una bradicardia leve y progresiva, pero la frecuencia cardíaca era la misma para los miembros de los cuatro grupos. El tratamiento alargó la duración del potencial de acción (medida al 50% y 90% de la repolarización, desde el período de estabilización). Durante la primera mitad de la isquemia, todos los corazones aumentaron a la duración del potencial de acción. Antes de la reperfusion, la duración del

potencial de acción se acortó en los corazones de los miembros del grupo UUO a valores más cortos que los de estabilización. Durante la reperfusión, se produjo un alargamiento progresivo en todos los grupos.

En este estudio, demostramos las acciones preventivas de melatonina contra el daño renal y cardíaco inducido por UUO. Los mecanismos de protección implican el contrapeso AT1 y Hsp70-VDR. Las nuevas propiedades electrofisiológicas de melatonina crónica merecen atención, debido a su relevancia para situaciones cardiorenales con alto riesgo arrítmico y falta de tratamientos.

Las propiedades antiinflamatorias, antiapoptóticas, antifibróticas y antioxidantes de melatonina confieren protección contra varios tipos de enfermedades renales. 30.31 Ozbek et al. demostraron que melatonina atenúa la lesión renal inducida por UUO al reducir el estrés oxidativo, el daño tubular y la fibrosis intersticial, y al aumentar la capacidad antioxidante¹. 3 Recientemente, Yildirim et al. informaron que melatonina reduce la apoptosis en los riñones con UOO. Sin embargo, la naturaleza precisa de la citoprotección mediada por melatonina y el mecanismo por el cual se preserva el sistema cardiorrenal del daño durante UUO siguen siendo completamente desconocidos. El presente estudio confirmó los efectos antifibróticos, antiapoptóticos y antioxidantes de la melatonina (Figuras 1-3, respectivamente) y los vinculó a un contrapeso AT1-Hsp70-VDR (Figuras 4-8), que previene el daño renal y la remodelación arritmogénica del corazón. (Figura 9)

En el tejido renal y miocárdico, melatonina aumentó Hsp70 y VDR y disminuyó AT1 y fibrosis (ver Figuras 4-8). Melatonina aumenta HSP como parte de su efecto antioxidante protector en tomates.¹ 4 De interés para nuestro hallazgo, melatonina aumenta la Hsp70 y protege el hígado de las ratas expuestas al tolueno de la citotoxicidad inducida por el estrés oxidativo. 5 Hsp70 regula las respuestas antioxidantes al estrés oxidativo celular, y nuestro laboratorio demostró que Hsp70 reduce la actividad y la expresión de NADPH oxidasa. 2.33 De acuerdo con nuestros hallazgos previos, ahora demostramos un aumento en Hsp70 en ratas tratadas con melatonina. Hsp70 induce VDR, facilita la localización intracelular de metabolitos activos de vitamina D y VDRs transactivativos. 4 Los receptores nucleares de melatonina, como miembros de receptores huérfanos relacionados con retinoides, pueden interactuar y prevenir la degradación de VDR.³⁵, ³⁶ La expresión del VDR del miocardio vincula la enfermedad renal crónica con la enfermedad cardiovascular debido a la reducción del VDR que amplifica los efectos de la angiotensina.³⁷ Sin precedentes, melatonina disminuyó la sobreexpresión renal y miocárdica de AT1. Está bien documentado que la vía AT1 conduce a la fibrosis miocárdica durante la CKD.⁶ Como se sugirió anteriormente, la baja expresión de AT1 a través de la inducción de VDR podría ser una consecuencia de la protección celular mediada por Hsp70.³⁸ Curiosamente, la secreción de melatonina circadiana endógena se altera durante CKD.¹⁰ Además, la angiotensina II ejerce una

modulación tónica de la síntesis de melatonina al influir en la actividad de la triptófano hidroxilasa a través de los receptores AT1.³⁹ Nuestros hallazgos sugieren que melatonina modula la expresión de AT1 y que Hsp70 y VDR son factores clave. El último hecho nos permite apoyar la retroalimentación postulada (o regulación recíproca) entre AT1 y melatonina.

En estrecha conexión, la dinámica mitocondrial es un punto de interacción para las alteraciones circadianas en las enfermedades cardiovasculares relacionadas con la regulación positiva del sistema renina-angiotensina-aldosterona.^{40,41} Demostramos que melatonina previene el edema mitocondrial, la dilatación de las crestas, la actividad elevada de la NADPH oxidasa y la apoptosis (Figuras 2 y 3). Varios informes indican que las mitocondrias son un objetivo esencial para la protección de la melatonina. Los mecanismos implicados incluyen la preservación de la función compleja I y III, la inhibición de la apertura de los poros de transición de la permeabilidad mitocondrial y la liberación de citocromo c.^{42,43} Melatonina mejora la expresión de mitofusina-2, que preserva la red funcional mitocondrial y previene la apoptosis.^{43,44} Yu et al. informó que la mitofusina-2 inhibe la hipertrofia miocárdica inducida por la angiotensina II.⁴⁵ En este sentido, la reducción de melatonina del daño mitocondrial podría estar relacionada con la regulación negativa de AT1. La inducción de Hsp70 a través de melatonina es compatible con un mecanismo adicional relacionado con Tom 70, una translocasa de la membrana mitocondrial externa. La interacción de Hsp70 con Tom 70 es esencial para el inicio del proceso de importación.⁴⁶ Pertinente a nuestro entendimiento, Tom 70 regula la protección inducida por melatonina contra el infarto de miocardio, al romper el ciclo de deterioro mitocondrial y la generación de ROS.^{47,48} Todos estos datos nos permiten suponer que la inducción de Hsp70 por melatonina y la reducción de AT1 son componentes críticos de la respuesta de estrés celular.

Finalmente, y en paralelo con los estudios moleculares y estructurales, fue de interés central para nuestro estudio evaluar la funcionalidad del corazón. Por lo tanto, UO aumentó la vulnerabilidad a sufrir fibrilación ventricular durante la reperfusión (Figura 9). Atribuimos esta arritmogénesis a los cambios prooxidativos y profibróticos que acompañaron el aumento de AT1 y la disminución de Hsp70. El estrés oxidativo miocárdico -particularmente en la mitocondria- y la fibrosis son sustratos proarrítmicos bien conocidos.⁴⁹⁻⁵¹ Los radicales libres actúan como disparadores para el comienzo de los eventos arrítmicos. La persistencia de los ritmos de alta frecuencia requiere alguna reentrada.⁵² La conducción alterada y el acortamiento del potencial de acción (como se muestra en las Figuras 9 y 10) contribuyen a los complejos mecanismos de reentrada implicados en la fibrilación ventricular.

La protección de melatonina contra la remodelación miocárdica inducida por UO es uno de los factores que protegen contra la fibrilación ventricular. El aumento en Hsp70 limita la deletérea regulación ascendente AT1 y la regulación descendente de VDR. Hsp70 también

contribuye al efecto antioxidante de melatonina, confirmado aquí por la reducción de la actividad NADPH mitocondrial. Además, el alargamiento del potencial de acción y la hiperpolarización (que se muestran en la Figura 10) son factores que contribuyen razonablemente al efecto antiarrítmico de melatonina. Estos cambios son el primer informe de modificación del potencial de acción del miocardio por la administración crónica de melatonina. Los receptores Mel activan corrientes rectificadoras de potasio que podrían explicar la hiperpolarización.⁵³ El alargamiento del potencial de acción se corresponde con el efecto inhibitor de melatonina contra las corrientes de potasio externas, que son principalmente responsables de la repolarización de miocitos de rata.⁵⁴ La respuesta atenuada al acortamiento del potencial de acción inducido por la isquemia se ha observado previamente en nuestro laboratorio y está de acuerdo con la regulación negativa de los canales de cloruro regulados por el volumen informados por Ben Soussia et al.⁵⁵ El complejo escenario de los efectos crónicos de la administración de melatonina sobre las corrientes iónicas requiere una mayor investigación.

Para concluir, en este artículo exploramos los mecanismos de protección del tratamiento crónico de la melatonina en la enfermedad renal y las complicaciones cardiovasculares. Centramos nuestra atención en los efectos preventivos de la melatonina contra la alteración de la capacidad oxidante mitocondrial, la ultraestructura y la apoptosis. Además, la melatonina protege del proarrítmico. Estado asociado a la UUO. Nuestros resultados sugieren nuevos mecanismos de renal y cardioprotección por la melatonina. La modulación de los receptores AT1 y VDR relacionados con el aumento de Hsp70 contribuye a los efectos de la melatonina. Finalmente, destacamos el potencial terapéutico de Mel contra las enfermedades asociadas a los efectos perjudiciales del aumento de la función AT1.

Capítulo VI Conclusión general

Confirmamos la hipótesis que la melatonina protege contra las enfermedades cardiovasculares, en particular contra las arritmias por reperfusión. La protección aguda la ejerce, en parte, mediante la activación de receptores de membrana, vías de señalización y a la preservación de la comunicación intercelular mediada por uniones en hendidura de los miocitos. Sus efectos crónicos se ejercen tanto a concentraciones fisiológicas como farmacológicas. La cardioprotección se logró mantener aún en modelos animales con factores de riesgo que aumentan la arritmogénesis y no sólo en animales sanos. Todas estas propiedades y la ausencia de dosis tóxica, hacen de la melatonina un agente cardioprotector notable, capaz de actuar en forma aguda y crónica, y con gran potencialidad traslacional.

La melatonina previno la fibrilación ventricular inducida por radicales libres administrados exógenamente. La protección antiarrítmica fue comparable a la obtenida con la enzima superóxido dismutasa. Ambas protegieron frente a los cambios por estrés oxidativo y mantuvieron el potencial de reposo y la amplitud. La melatonina, además evitó la prolongación de la duración del potencial.

La melatonina redujo las arritmias inducidas por hipocalemia. Se evidenció la participación de los receptores de melatonina en el acortamiento de la duración del potencial de acción y en los efectos en la conducción de los impulsos eléctricos medidos por la preservación de la conexina 43 en los discos intercalares de los cardiomiocitos.

La melatonina administrada durante la reperfusión redujo las taquiarritmias ventriculares. El efecto antiarrítmico requirió la activación de los receptores de melatonina, de la proteína quinasa C, de los canales de K^+ regulados por ATP y de la preservación de la conexina 43. La reducción de la producción endógena de melatonina provocada por la exéresis del ganglio cervical superior bilateral provocó un aumento en la arritmogénesis en corazones sometidos a isquemia/reperfusión.

Para concluir, en este trabajo exploramos los mecanismos de protección del tratamiento crónico de la melatonina en la enfermedad renal y las complicaciones cardiovasculares. Centramos nuestra atención en los efectos preventivos de la melatonina contra la alteración de la capacidad oxidante mitocondrial, la ultraestructura y la apoptosis. Además, la melatonina protege del proarrítmico. Estado asociado a la UO. Nuestros resultados sugieren nuevos mecanismos de renal y cardioprotección por la melatonina. La modulación de los receptores AT1 y VDR relacionados con el aumento de Hsp70 contribuye a los efectos de la melatonina. Finalmente, destacamos el potencial terapéutico de Mel contra las enfermedades asociadas a los efectos perjudiciales del aumento de la función AT1.

Referencias bibliográficas

- Adabag, A. S., Luepker, R. V., Roger, V. L., & Gersh, B. J. (2010). Sudden cardiac death: epidemiology and risk factors. *Nature Reviews Cardiology*, 7(4), 216–225. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2010.3>
- Ambale-Venkatesh, B., Yang, X., Wu, C. O., Liu, K., Hundley, W. G., McClelland, R., ... Lima, J. A. C. (2017). Cardiovascular Event Prediction by Machine Learning. *Circulation Research*, 121(9), 1092–1101. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311312>
- Antzelevitch, C. (2004). Molecular genetics of arrhythmias and cardiovascular conditions associated with arrhythmias. *Heart Rhythm*. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2004.10.018>
- Beckman, J. S., & Koppenol, W. H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 271(5), C1424–C1437. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1996.271.5.C1424>
- Benova, T., Viczenczova, C., Radosinska, J., Bacova, B., Knezl, V., Dosenko, V., ... Tribulova, N. (2013). Melatonin attenuates hypertension-related proarrhythmic myocardial maladaptation of connexin-43 and propensity of the heart to lethal arrhythmias. *Can J Physiol Pharmacol*, 91(8), 633–639. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2012-0393>
- Bernikova, O., & Azarov, J. (2018). The assessment of electrophysiological indices and ecg parameters as predictors of fatal arrhythmias under ischemia/reperfusion setting in multivariate regression model. *FASEB Journal*.
- Bertuglia, S., & Reiter, R. J. (2007). Melatonin reduces ventricular arrhythmias and preserves capillary perfusion during ischemia-reperfusion events in cardiomyopathic hamsters. *Journal of Pineal Research*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2006.00383.x>
- Bryan, N. S., Rassaf, T., Maloney, R. E., Rodriguez, C. M., Saijo, F., Rodriguez, J. R., & Feelisch, M. (2004). Cellular targets and mechanisms of nitros(y)lation: An insight into their nature and kinetics in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(12), 4308–4313. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306706101>
- Carmeliet, E. (1999). Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. *Physiological Reviews*, 79(3), 917–1017.
- Castro, A. E., Benitez, S. G., Farias Altamirano, L. E., Savastano, L. E., Patterson, S. I., & Muñoz, E. M. (2015). Expression and cellular localization of the transcription factor NeuroD1 in the developing and adult rat pineal gland. *Journal of Pineal Research*. <https://doi.org/10.1111/jpi.12228>
- Chen, S., & Yaari, Y. (2008). Spike Ca²⁺ influx upmodulates the spike afterdepolarization and bursting via intracellular inhibition of K_v7/M channels. *The Journal of Physiology*, 586(5), 1351–1363. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.148171>

- Chouchani, E. T., James, A. M., Methner, C., Pell, V. R., Prime, T. A., Erickson, B. K., ... Murphy, M. P. (2017). Identification and quantification of protein S -nitrosation by nitrite in the mouse heart during ischemia. *Journal of Biological Chemistry*, 292(35), 14486–14495. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.798744>
- Cinca, J., Warren, M., Carreño, A., Tresánchez, M., Armadans, L., Gómez, P., & Soler-Soler, J. (1997). Changes in Myocardial Electrical Impedance Induced by Coronary Artery Occlusion in Pigs With and Without Preconditioning. *Circulation*, 96(9), 3079–3086. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.96.9.3079>
- Clarkson, C. W., & Ten Eick, R. E. (1983). On the mechanism of lysophosphatidylcholine-induced depolarization of cat ventricular myocardium. *Circulation Research*. <https://doi.org/10.1161/01.RES.52.5.543>
- Coronel, R., Wilms-Schopman, F. J., Dekker, L. R., & Janse, M. J. (1995). Heterogeneities in [K⁺]_o and TQ potential and the inducibility of ventricular fibrillation during acute regional ischemia in the isolated perfused porcine heart. *Circulation*, 92(1), 120–129.
- Coronel, R., Wilms-Schopman, F. J., Opthof, T., Cinca, J., Fiolet, J. W., & Janse, M. J. (1992). Reperfusion arrhythmias in isolated perfused pig hearts. Inhomogeneities in extracellular potassium, ST and TQ potentials, and transmembrane action potentials. *Circulation Research*, 71(5), 1131–1142.
- Craig, T. J., Ashcroft, F. M., & Proks, P. (2008). How ATP Inhibits the Open K ATP Channel. *The Journal of General Physiology*, 132(1), 131–144. <https://doi.org/10.1085/jgp.200709874>
- Curtis, M. J., Hancox, J. C., Farkas, A., Wainwright, C. L., Stables, C. L., Saint, D. A., ... Walker, M. J. A. (2013). The Lambeth Conventions (II): guidelines for the study of animal and human ventricular and supraventricular arrhythmias. *Pharmacology & Therapeutics*, 139(2), 213–248. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.04.008>
- De Bakker, J. M. T. T., & Van Rijen, H. M. V. V. Continuous and discontinuous propagation in heart muscle, 17 *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* § (2006). <https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.2006.00367.x>
- De Farias, T. D. S. M., De Oliveira, A. C., Andreotti, S., Do Amaral, F. G., Chimin, P., De Proença, A. R. A., ... Lima, F. B. (2015). Pinealectomy interferes with the circadian clock genes expression in white adipose tissue. *Journal of Pineal Research*, 58(3), 251–261. <https://doi.org/10.1111/jpi.12211>
- Demidova, M. M., Smith, J. G., Höijer, C.-J., Holmqvist, F., Erlinge, D., & Platonov, P. G. (2012). Prognostic impact of early ventricular fibrillation in patients with ST-elevation myocardial infarction treated with primary PCI. *European Heart Journal. Acute Cardiovascular Care*, 1(4), 302–311. <https://doi.org/10.1177/2048872612463553>
- Diez, E. R. E. R., Altamirano, L. B. L. B., García, I. M. I. M., Mazzei, L., Prado, N. J. N. J., Fornes, M. W. M. W., ... Manucha, W. (2015). Heart Remodeling and Ischemia–

- Reperfusion Arrhythmias Linked to Myocardial Vitamin D Receptors Deficiency in Obstructive Nephropathy Are Reversed by Paricalcitol. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 20(2), 211–220.
<https://doi.org/10.1177/1074248414538704>
- Diez, E. R., Prados, L. V., Carrión, A., Ponce, Z. A. Z., & Miatello, R. M. (2009). A novel electrophysiologic effect of melatonin on ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in isolated rat hearts. *Journal of Pineal Research*, 46(2), 155–160.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2008.00643.x>
- Diez, E. R., Renna, N. F., Prado, N. J., Lembo, C., Ponce Zumino, A. Z., Vazquez-Prieto, M., & Miatello, R. M. (2013). Melatonin, given at the time of reperfusion, prevents ventricular arrhythmias in isolated hearts from fructose-fed rats and spontaneously hypertensive rats. *Journal of Pineal Research*, 55(2), 166–173.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12059>
- Dirksen, M., Laarman, G., Simoons, M., & Duncker, D. (2007). Reperfusion injury in humans: A review of clinical trials on reperfusion injury inhibitory strategies. *Cardiovascular Research*, 74(3), 343–355. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.01.014>
- Dominguez-Rodriguez, A., Abreu-Gonzalez, P., Garcia-Saiz, M. del M., Aldea-Perona, A., de la Torre, J. M., Garcia-Camarero, T., ... MARIA Study Investigators. (2015). Cardioprotection with melatonin in the acute myocardial infarction: awaiting results of MARIA trial? *International Journal of Cardiology*, 182, 54–55.
<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.12.126>
- Domínguez-Rodríguez, A., Samimi-Fard, S., Abreu-González, P., & Carlos Kaski, J. (2009). Melatonina y aterosclerosis coronaria. *Clinica e Investigacion En Arteriosclerosis*.
[https://doi.org/10.1016/S0214-9168\(09\)72688-9](https://doi.org/10.1016/S0214-9168(09)72688-9)
- Dröge, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47–95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
- Duan, D. (2009). Phenomics of cardiac chloride channels: The systematic study of chloride channel function in the heart. In *Journal of Physiology*.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.165860>
- Dubocovich, M. L., Delagrangé, P., Krause, D. N., Sugden, D., Cardinali, D. P., & Olcese, J. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacological Reviews*, 62(3), 343–380. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002832>
- Ek-Vitorín, J., Pontifex, T., Burt, J., Ek-Vitorín, J. F., Pontifex, T. K., & Burt, J. M. (2018). Cx43 Channel Gating and Permeation: Multiple Phosphorylation-Dependent Roles of the Carboxyl Terminus. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), 1659.
<https://doi.org/10.3390/ijms19061659>
- Ekmekcioglu, C. (2006). Melatonin receptors in humans: Biological role and clinical

- relevance. *Biomedicine and Pharmacotherapy*.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2006.01.002>
- Eltzschig, H. K., & Eckle, T. (2011). Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm.2507>
- Espey, M. G., Miranda, K. M., Thomas, D. D., & Wink, D. A. (2001). Distinction between Nitrosating Mechanisms within Human Cells and Aqueous Solution. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101723200>
- Favero, G., Franceschetti, L., Buffoli, B., Moghadasian, M. H., Reiter, R. J., Rodella, L. F., & Rezzani, R. (2017). Melatonin: Protection against age-related cardiac pathology. *Ageing Research Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.11.007>
- Ferdinandy, P., Hausenloy, D. J., Heusch, G., Baxter, G. F., & Schulz, R. (2014). Interaction of Risk Factors, Comorbidities, and Comedications with Ischemia/Reperfusion Injury and Cardioprotection by Preconditioning, Postconditioning, and Remote Conditioning. *Pharmacological Reviews*, 66(4), 1142–1174. <https://doi.org/10.1124/pr.113.008300>
- Forman, H. J. (2016). Redox signaling: An evolution from free radicals to aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 97, 398–407.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.07.003>
- Fukuda, K., Davies, S. S., Nakajima, T., Ong, B.-H., Kupersmidt, S., Fessel, J., ... Balsler, J. R. (2005). Oxidative Mediated Lipid Peroxidation Recapitulates Proarrhythmic Effects on Cardiac Sodium Channels. *Circulation Research*, 97(12), 1262–1269.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000195844.31466.e9>
- Galano, A. (2011). On the direct scavenging activity of melatonin towards hydroxyl and a series of peroxy radicals. *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP*, 13(15), 7178–7188. <https://doi.org/10.1039/c0cp02801k>
- Galano, A., & Reiter, R. J. (2018). Melatonin and its metabolites vs oxidative stress: From individual actions to collective protection. *Journal of Pineal Research*.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12514>
- Galano, A., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2011). Melatonin as a natural ally against oxidative stress: A physicochemical examination. *Journal of Pineal Research*.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00916.x>
- Galano, A., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2013). On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *Journal of Pineal Research*.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12010>
- García-Dorado, D., Andrés-Villarreal, M., Ruiz-Meana, M., Inserte, J., & Barba, I. (2012). Myocardial edema: a translational view. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52(5), 931–939. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.01.010>
- García-Dorado, D., Rodríguez-Sinovas, A., Ruiz-Meana, M., & Inserte, J. (2014). Protección contra el daño miocárdico por isquemia-reperfusión en la práctica clínica. *Revista*

- Española de Cardiología*, 67(05), 394–404.
<https://doi.org/10.1016/j.recesp.2014.01.011>
- García-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., & Piper, H. M. (2009). Lethal reperfusion injury in acute myocardial infarction: Facts and unresolved issues. *Cardiovascular Research*.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvp185>
- Gonano, L. A., Sepúlveda, M., Rico, Y., Kaetzel, M., Valverde, C. A., Dedman, J., ... Petroff, M. V. (2011). Calcium-calmodulin kinase II mediates digitalis-induced arrhythmias. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*.
<https://doi.org/10.1161/CIRCEP.111.964908>
- González-Montero, J., Brito, R., Gajardo, A. I., & Rodrigo, R. (2018). Myocardial reperfusion injury and oxidative stress: Therapeutic opportunities. *World Journal of Cardiology*.
<https://doi.org/10.4330/wjc.v10.i9.74>
- Hackett, D., McKenna, W., Davies, G., Maseri, A., Lowe, T., & Aber, V. (1990). Reperfusion arrhythmias are rare during acute myocardial infarction and thrombolysis in man. *International Journal of Cardiology*, 29(2), 205–213. [https://doi.org/10.1016/0167-5273\(90\)90223-R](https://doi.org/10.1016/0167-5273(90)90223-R)
- Harada, M., Luo, X., Murohara, T., Yang, B., Dobrev, D., & Nattel, S. (2014). MicroRNA Regulation and Cardiac Calcium Signaling. *Circulation Research*, 114(4), 689–705.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.301798>
- Hardeland, R., Cardinali, D. P., Srinivasan, V., Spence, D. W., Brown, G. M., & Pandi-Perumal, S. R. (2011). Melatonin-A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Progress in Neurobiology*. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.12.004>
- He, B., Zhao, Y., Xu, L., Gao, L., Su, Y., Lin, N., & Pu, J. (2016). The nuclear melatonin receptor ROR α is a novel endogenous defender against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Journal of Pineal Research*, 60(3), 313–326.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12312>
- Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., & Kurachi, Y. (2010). Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles. *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2009>
- Ibanez, B., Fuster, V., Jiménez-Borreguero, J., & Badimon, J. J. (2011). Lethal myocardial reperfusion injury: a necessary evil? *International Journal of Cardiology*, 151(1), 3–11.
<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2010.10.056>
- Ibanez, B., James, S., Agewall, S., Antunes, M. J., Bucciarelli-Ducci, C., Bueno, H., ... Gale, C. P. (2018). 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *European Heart Journal*, 39(2), 119–177. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx393>
- Issa, Z. F., Miller, J. M., & Zipes, D. P. (2012). Electrophysiological Mechanisms of Cardiac Arrhythmias. In *Clinical Arrhythmology and Electrophysiology: A Companion to*

- Braunwald's Heart Disease* (pp. 36–61). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-1274-8.00003-8>
- Iyyathurai, J., Himpens, B., Bultynck, G., & D'hondt, C. (2016). Calcium Wave Propagation Triggered by Local Mechanical Stimulation as a Method for Studying Gap Junctions and Hemichannels. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 1437, pp. 203–211). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3664-9_15
- Jeong, E.-M., Liu, M., Sturdy, M., Gao, G., Varghese, S. T., Sovari, A. A., & Dudley, S. C. (2012). Metabolic stress, reactive oxygen species, and arrhythmia. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *52*(2), 454–463. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.09.018>
- Jiki, Z., Lecour, S., & Nduhirabandi, F. (2018). Cardiovascular Benefits of Dietary Melatonin: A Myth or a Reality? *Frontiers in Physiology*, *9*, 528. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00528>
- Kennaway, D. J., Voultzios, A., Varcoe, T. J., & Moyer, R. W. (2015). Melatonin in mice: rhythms, response to light, adrenergic stimulation, and metabolism. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00360.2001>
- Kii, Y., Nakatsuji, K., Nose, I., Yabuuchi, M., Mizuki, Y., & Ito, T. (2008). Effects of 5-HT₄ Receptor Agonists, Cisapride and Mosapride Citrate on Electrocardiogram in Anaesthetized Rats and Guinea-Pigs and Conscious Cats. *Pharmacology & Toxicology*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.2001.890206.x>
- Kim, D., Lewis, D. L., Graziadei, L., Neer, E. J., Bar-Sagi, D., & Clapham, D. E. (1989). G-protein $\beta\gamma$ -subunits activate the cardiac muscarinic K⁺-channel via phospholipase A₂. *Nature*, *337*(6207), 557–560. <https://doi.org/10.1038/337557a0>
- Kléber, A. G., & Rudy, Y. (2004). Basic Mechanisms of Cardiac Impulse Propagation and Associated Arrhythmias. *Physiological Reviews*, *84*(2), 431–488. <https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2003>
- Kraft, R. (2007). The Na⁺/Ca²⁺ exchange inhibitor KB-R7943 potently blocks TRPC channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.07.019>
- Krumholz, H. M., & Goldberger, A. L. (1991). Reperfusion arrhythmias after thrombolysis; Electrophysiologic tempest, or much ado about nothing. *Chest*. <https://doi.org/10.1378/chest.99.4.135S>
- Kucera, J. P., Rohr, S., & Kleber, A. G. (2017). Microstructure, Cell-to-Cell Coupling, and Ion Currents as Determinants of Electrical Propagation and Arrhythmogenesis. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, *10*(9). <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.117.004665>
- Kundu, S., Kumar, M., Sen, U., Mishra, P. K., Tyagi, N., Metreveli, N., ... Tyagi, S. C. (2009). Nitrotyrosinylation, remodeling and endothelial-myocyte uncoupling in iNOS, cystathionine beta synthase (CBS) knockouts and iNOS/CBS double knockout mice.

- Journal of Cellular Biochemistry*, 106(1), 119–126. <https://doi.org/10.1002/jcb.21982>
- Lagneux, C., Joyeux, M., Demenge, P., Ribuot, C., & Godin-Ribuot, D. (1999). Protective effects of melatonin against ischemia-reperfusion injury in the isolated rat heart. *Life Sciences*. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00620-7](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00620-7)
- Lavi, R., & Lavi, S. (2011). Melatonin and myocardial protection. *International Journal of Cardiology*, 150(2), 207. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2011.04.028>
- Lee, Y. M., Chen, H. R., Hsiao, G., Sheu, J. R., Wang, J. J., & Yen, M. H. (2002). Protective effects of melatonin on myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo. *Journal of Pineal Research*. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2002.01869.x>
- Li, H., Gutterman, D. D., Rusch, N. J., Bubolz, A., & Liu, Y. (2004). Nitration and Functional Loss of Voltage-Gated K⁺ Channels in Rat Coronary Microvessels Exposed to High Glucose. *Diabetes*, 53(9), 2436–2442. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.9.2436>
- Lou, Q., Li, W., & Efimov, I. R. (2012). The role of dynamic instability and wavelength in arrhythmia maintenance as revealed by panoramic imaging with blebbistatin vs. 2,3-butanedione monoxime. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00711.2011>
- MacDonald, A. C., & Howlett, S. E. (2008). Differential effects of the sodium calcium exchange inhibitor, KB-R7943, on ischemia and reperfusion injury in isolated guinea pig ventricular myocytes. *European Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.10.055>
- Manchester, L. C., Coto-Montes, A., Boga, J. A., Andersen, L. P. H., Zhou, Z., Galano, A., ... Reiter, R. J. (2015). Melatonin: An ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. *Journal of Pineal Research*. <https://doi.org/10.1111/jpi.12267>
- Manning, A. S., Coltart, D. J., & Hearse, D. J. (1984). Ischemia and reperfusion-induced arrhythmias in the rat. Effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol. *Circulation Research*. <https://doi.org/10.1161/01.RES.55.4.545>
- Marban, E., Koretsune, Y., & Kusuoka, H. (1994). Disruption of Intracellular Ca²⁺ Homeostasis in Hearts Reperfused after Prolonged Episodes of Ischemia a. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 723(1), 38–50. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb36715.x>
- Markwald, R. R., Melanson, E. L., Smith, M. R., Higgins, J., Perreault, L., Eckel, R. H., & Wright, K. P. (2013). Impact of insufficient sleep on total daily energy expenditure, food intake, and weight gain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(14), 5695–5700. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216951110>
- Masters, A., Pandi-Perumal, S. R., Seixas, A., Girardin, J.-L., & McFarlane, S. I. (2014). Melatonin, the Hormone of Darkness: From Sleep Promotion to Ebola Treatment. *Brain Disorders & Therapy*, 4(1). <https://doi.org/10.4172/2168-975X.1000151>
- Mazzocchi, G., Sommese, L., Palomeque, J., Felice, J. I., Di Carlo, M. N., Fainstein, D., ...

- Mattiuzzi, A. (2016). Phospholamban ablation rescues the enhanced propensity to arrhythmias of mice with CaMKII-constitutive phosphorylation of RyR2 at site S2814. *Journal of Physiology*. <https://doi.org/10.1113/JP271622>
- McElwee, S. K., Velasco, A., & Doppalapudi, H. (2016). Mechanisms of sudden cardiac death. *Journal of Nuclear Cardiology*. <https://doi.org/10.1007/s12350-016-0600-6>
- Mehta, R. H., Starr, A. Z., Lopes, R. D., Hochman, J. S., Widimsky, P., Pieper, K. S., ... Investigators, A. A. M. I. (2009). Incidence of and outcomes associated with ventricular tachycardia or fibrillation in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention. *JAMA*, *301*(17), 1779–1789. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.600>
- Mehta, R. H., Yu, J., Piccini, J. P., Tchong, J. E., Farkouh, M. E., Reiffel, J., ... Stone, G. W. (2012). Prognostic significance of postprocedural sustained ventricular tachycardia or fibrillation in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention (from the HORIZONS-AMI Trial). *The American Journal of Cardiology*, *109*(6), 805–812. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2011.10.043>
- Moro, M. A., Darley-Usmar, V. M., Goodwin, D. A., Read, N. G., Zamora-Pino, R., Feelisch, M., ... Moncada, S. (1994). Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(14), 6702–6706. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.14.6702>
- Müller, C. E., & Jacobson, K. A. (2011). Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1808*(5), 1290–1308. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.12.017>
- Nduhirabandi, F., Maarman, G., Nduhirabandi, F., & Maarman, G. J. (2018). Melatonin in Heart Failure: A Promising Therapeutic Strategy? *Molecules*, *23*(7), 1819. <https://doi.org/10.3390/molecules23071819>
- Nerbonne, J. M., & Kass, R. S. (2005). Molecular Physiology of Cardiac Repolarization. *Physiological Reviews*, *85*(4), 1205–1253. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2005>
- Pandi-Perumal, S. R. (2018). *Melatonin: Biological Basis of its Function in Health and Disease*. *Melatonin: Biological Basis of its Function in Health and Disease*. <https://doi.org/10.1201/9781498713511>
- Pandi-Perumal, S. R., BaHammam, A. S., Ojike, N. I., Akinseye, O. A., Kendzerska, T., Buttoo, K., ... Cardinali, D. P. (2017). Melatonin and Human Cardiovascular Disease. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, *22*(2), 122–132. <https://doi.org/10.1177/1074248416660622>
- Penna, C., Mancardi, D., Rastaldo, R., & Pagliaro, P. (2009). Cardioprotection: A radical view. Free radicals in pre and postconditioning. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.02.008>
- Petrosillo, G., Colantuono, G., Moro, N., Ruggiero, F. M., Tiravanti, E., Di Venosa, N., ... Paradies, G. (2009). Melatonin protects against heart ischemia-reperfusion injury by

- inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00163.2009>
- Piper, H. M., Siegmund, B., Ladilov, Y. V., & Schlüter, K. D. (1993). Calcium and sodium control in hypoxic-reoxygenated cardiomyocytes. *Basic Research in Cardiology*.
<https://doi.org/10.1007/BF00795413>
- Pk, W., Whelton, P. K., Carey, R. M., Aronow, W. S., Ovbiagele, B., Casey, D. E., ... Mauri, L. (2017). *2017 Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults A Report of the American College of Cardiology / American Heart Association T. Journal of American College of Cardiology*.
<https://doi.org/10.1161/HYP.000000000000065/-/DC1>
- Pogwizd, S. M., & Corr, P. B. (1987). Electrophysiologic mechanisms underlying arrhythmias due to reperfusion of ischemic myocardium. *Circulation*, 76(2), 404–426.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.76.2.404>
- Poole, L. B. (2015). The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free Radical Biology and Medicine*, 80, 148–157.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.013>
- Prado, N. J., Ferder, L., Manucha, W., & Diez, E. R. (2018). Anti-Inflammatory Effects of Melatonin in Obesity and Hypertension. *Current Hypertension Reports*.
<https://doi.org/10.1007/s11906-018-0842-6>
- Prado, N. J., Ferder, L., Manucha, W., & Diez, E. R. (2018). Anti-Inflammatory Effects of Melatonin in Obesity and Hypertension. *Current Hypertension Reports*, 20(5).
<https://doi.org/10.1007/s11906-018-0842-6>
- Pun, P. H., Goldstein, B. A., Gallis, J. A., Middleton, J. P., & Svetkey, L. P. (2017). Serum Potassium Levels and Risk of Sudden Cardiac Death Among Patients With Chronic Kidney Disease and Significant Coronary Artery Disease. *Kidney International Reports*, 2(6), 1122–1131. <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2017.07.001>
- Radi, R. (2004). Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307446101>
- Radi, R. (2018). Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(23), 5839–5848. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804932115>
- Reiter, R. J., Mayo, J. C., Tan, D. X., Sainz, R. M., Alatorre-Jimenez, M., & Qin, L. (2016). Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *Journal of Pineal Research*. <https://doi.org/10.1111/jpi.12360>
- Reiter, R. J., Rosales-Corral, S., Tan, D. X., Jou, M. J., Galano, A., & Xu, B. (2017a). Melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant: one of evolution's best ideas. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2609-7>

- Reiter, R. J., Rosales-Corral, S., Tan, D. X., Jou, M. J., Galano, A., & Xu, B. (2017b). Melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant: one of evolution's best ideas. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2609-7>
- Reiter, R. J., Tan, D.-X., Gitto, E., Sainz, R. M., Mayo, J. C., Leon, J., ... KILIC Pol, Ü. (2004). Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage. *Polish Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.12.073>
- Reiter, R. J., & Tan, D. X. (2003). Melatonin: A novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. *Cardiovascular Research*. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(02\)00827-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(02)00827-1)
- Reiter, R. J., Tan, D. X., & Galano, A. (2014). Melatonin: Exceeding Expectations. *Physiology*. <https://doi.org/10.1152/physiol.00011.2014>
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Paredes, S. D., & Fuentes-Broto, L. (2010). Beneficial effects of melatonin in cardiovascular disease. *Annals of Medicine*. <https://doi.org/10.3109/07853890903485748>
- Ríos-Lugo, M. J., Cano, P., Jiménez-Ortega, V., Fernández-Mateos, M. P., Scacchi, P. A., Cardinali, D. P., & Esquifino, A. I. (2010). Melatonin effect on plasma adiponectin, leptin, insulin, glucose, triglycerides and cholesterol in normal and high fat-fed rats. *Journal of Pineal Research*, 49(4), 342–348. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00798.x>
- Roberts, B. N., & Christini, D. J. (2012). The Relative Influences of Phosphometabolites and pH on Action Potential Morphology during Myocardial Reperfusion: A Simulation Study. *PLoS ONE*, 7(11), e47117. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047117>
- Roth, G. A., Huffman, M. D., Moran, A. E., Feigin, V., Mensah, G. A., Naghavi, M., & Murray, C. J. L. (2015). Global and Regional Patterns in Cardiovascular Mortality From 1990 to 2013. *Circulation*, 132(17), 1667–1678. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.008720>
- Ruiz Petrich, E., Ponce Zumino, A., & Schanne, O. F. (1996). Early action potential shortening in hypoxic hearts: Role of chloride current(s) mediated by catecholamine release. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1996.0026>
- Sahna, E., Olmez, E., & Acet, A. (2002). Effects of physiological and pharmacological concentrations of melatonin on ischemia-reperfusion arrhythmias in rats: Can the incidence of sudden cardiac death be reduced? *Journal of Pineal Research*. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079x.2002.1o853.x>
- Sakamoto, J., Miura, T., Tsuchida, A., Fukuma, T., Hasegawa, T., & Shimamoto, K. (1999). Reperfusion arrhythmias in the murine heart: their characteristics and alteration after ischemic preconditioning. *Basic Research in Cardiology*, 94(6), 489–495. <https://doi.org/10.1007/s003950050165>

- Sallinen, P., Saarela, S., Ilves, M., Vakkuri, O., & Leppäluoto, J. (2005). The expression of MT1 and MT2 melatonin receptor mRNA in several rat tissues. *Life Sciences*, 76(10), 1123–1134. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.08.016>
- Sánchez-Hidalgo, M., Guerrero Montávez, J. M., Carrascosa-Salmoral, M. del P., Naranjo Gutierrez, M. del C., Lardone, P. J., & de la Lastra Romero, C. A. (2009). Decreased MT1 and MT2 melatonin receptor expression in extrapineal tissues of the rat during physiological aging. *Journal of Pineal Research*, 46(1), 29–35. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2008.00604.x>
- Savastano, L. E., Castro, A. E., Fitt, M. R., Rath, M. F., Romeo, H. E., & Muñoz, E. M. (2010). A standardized surgical technique for rat superior cervical ganglionectomy. *Journal of Neuroscience Methods*, 192(1), 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.07.007>
- Sharafati-Chaleshtori, R., Shirzad, H., Rafieian-Kopaei, M., & Soltani, A. (2017). Melatonin and human mitochondrial diseases. *Journal of Research in Medical Sciences : The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 22, 2. <https://doi.org/10.4103/1735-1995.199092>
- Shryock, J. C., & Belardinelli, L. (1997). Adenosine and Adenosine Receptors in the Cardiovascular System: Biochemistry, Physiology, and Pharmacology. *The American Journal of Cardiology*, 79(12), 2–10. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(97\)00256-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(97)00256-7)
- Smith, B. C., & Marletta, M. A. (2012). Mechanisms of S-nitrosothiol formation and selectivity in nitric oxide signaling. *Current Opinion in Chemical Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.10.016>
- Steinberg, C., Laksman, Z. W. M., & Krahn, A. D. (2016). Sudden cardiac death: A reappraisal. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 26(8), 709–719. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2016.05.006>
- Szárszoi, O., Asemu, G., Vaněček, J., Ošťádal, B., & Kolář, F. (2001). Effects of melatonin on ischemia and reperfusion injury of the rat heart. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. <https://doi.org/10.1023/A:1011920407691>
- Tan, D.-X., Manchester, L. C., Reiter, R. J., Qi, W., Kim, S. J., & El-Sokkary, G. H. (1998). Ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in the isolated rat heart: Prevention by melatonin. *Journal of Pineal Research*, 25(3), 184–191. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1998.tb00558.x>
- Tan, D.-X., Manchester, L. C., Terron, M. P., Flores, L. J., & Reiter, R. J. (2007). One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *Journal of Pineal Research*, 42(1), 28–42. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2006.00407.x>
- Tang, P. T., Shenasa, M., & Boyle, N. G. (2017). Ventricular Arrhythmias and Sudden Cardiac Death. *Cardiac Electrophysiology Clinics*, 9(4), 693–708.

<https://doi.org/10.1016/j.ccep.2017.08.004>

- Tengattini, S., Reiter, R. J., Tan, D. X., Terron, M. P., Rodella, L. F., & Rezzani, R. (2008). Cardiovascular diseases: Protective effects of melatonin. *Journal of Pineal Research*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00518.x>
- ter Keurs, H. E. D. J., & Boyden, P. A. (2007). Calcium and Arrhythmogenesis. *Physiological Reviews*, *87*(2), 457–506. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2006>
- Thérroux, P., Chaitman, B. R., Danchin, N., Erhardt, L., Meinertz, T., Schroeder, J. S., ... Jessel, A. (2000). Inhibition of the Sodium-Hydrogen Exchanger With Cariporide to Prevent Myocardial Infarction in High-Risk Ischemic Situations. *Circulation*, *102*(25), 3032–3038. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.102.25.3032>
- Tokube, K., Kiyosue, T., & Arita, M. (1996). Openings of cardiac KATP channel by oxygen free radicals produced by xanthine oxidase reaction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *271*(2), H478–H489. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1996.271.2.H478>
- Tomaselli, G. F., & Barth, A. S. (2010). Sudden Cardio Arrest: Oxidative stress irritates the heart. *Nature Medicine*, *16*(6), 648–649. <https://doi.org/10.1038/nm0610-648>
- Tsutsumi, Y. M., Yokoyama, T., Horikawa, Y., Roth, D. M., & Patel, H. H. (2007). Reactive oxygen species trigger ischemic and pharmacological postconditioning: In vivo and in vitro characterization. *Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.08.031>
- Valverde, C. A., Korniyeyev, D., Ferreira, M., Petrosky, A. D., Mattiazzi, A., & Escobar, A. L. (2010). Transient Ca²⁺ depletion of the sarcoplasmic reticulum at the onset of reperfusion. *Cardiovascular Research*. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp371>
- Vandenberg, C. A. (1987). Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *84*(8), 2560–2564. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.8.2560>
- Verkerk, A. O., Veldkamp, M. W., van Ginneken, A. C. G., & Bouman, L. N. (1996). Biphasic Response of Action Potential Duration to Metabolic Inhibition in Rabbit and Human Ventricular Myocytes: Role of Transient Outward Current and ATP-regulated Potassium Current. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *28*(12), 2443–2456. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1996.0237>
- Walker, M. J., Curtis, M. J., Hearse, D. J., Campbell, R. W., Janse, M. J., Yellon, D. M., ... Harron, D. W. (1988). The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovascular Research*, *22*(7), 447–455.
- Williams, I. A., Xiao, X., Ju, Y., & Allen, D. G. (2007). The rise of [Na⁺]_i during ischemia and reperfusion in the rat heart—underlying mechanisms. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *454*(6), 903–912. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0241-3>
- Xie, Y., Liao, Z., Grandi, E., Shiferaw, Y., & Bers, D. M. (2015). Slow [Na⁺]_i Changes and

- Positive Feedback Between Membrane Potential and $[Ca]_i$ Underlie Intermittent Early Afterdepolarizations and Arrhythmias. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 8(6), 1472–1480. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.115.003085>
- Yang, K.-C., Kyle, J. W., Makielski, J. C., & Dudley, S. C. (2015). Mechanisms of Sudden Cardiac Death. *Circulation Research*, 116(12), 1937–1955. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.304691>
- Yang, M., Camara, A. K. S., Wakim, B. T., Zhou, Y., Gadicherla, A. K., Kwok, W. M., & Stowe, D. F. (2012). Tyrosine nitration of voltage-dependent anion channels in cardiac ischemia-reperfusion: Reduction by peroxyxynitrite scavenging. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. <https://doi.org/10.1016/j.bbambio.2012.06.004>
- Yang, Y., Sun, Y., Yi, W., Li, Y., Fan, C., Xin, Z., ... Yi, D. (2014). A review of melatonin as a suitable antioxidant against myocardial ischemia-reperfusion injury and clinical heart diseases. *Journal of Pineal Research*, 57(4), 357–366. <https://doi.org/10.1111/jpi.12175>
- Yu, L., Gong, B., Duan, W., Fan, C., Zhang, J., Li, Z., ... Wang, H. (2017). Melatonin ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury in type 1 diabetic rats by preserving mitochondrial function: Role of AMPK-PGC-1 α -SIRT3 signaling. *Scientific Reports*, 7, 41337. <https://doi.org/10.1038/srep41337>
- Yu, L., Liang, H., Lu, Z., Zhao, G., Zhai, M., Yang, Y., ... Yu, S. (2015). Membrane receptor-dependent Notch1/Hes1 activation by melatonin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury: in?vivo and in?vitro studies. *Journal of Pineal Research*, 59(4), 420–433. <https://doi.org/10.1111/jpi.12272>