

Efecto de la melatonina y del luzindol sobre la proliferación celular y el estrés oxidativo inducido por plomo

Minerva Martínez-Alfaro¹, Brisa Daniela López-Juárez³, Roberto Carlos Gutiérrez-Hernández³, Lérida Liss Flores-Villavicencio², Juvencio Robles¹,

¹ Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Guanajuato.

² Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Guanajuato.

³ Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, División de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Guanajuato.

alfarom@ugto.mx, roblesj@ugto.mx, llflores@ugto.mx

Resumen

En este estudio se evaluaron los efectos del luzindol, un antagonista de los receptores de melatonina, en la línea celular SH-SY5Y. La melatonina es una hormona con propiedades antioxidantes capaz de atenuar la toxicidad inducida por plomo (Pb). Inicialmente se analizó la viabilidad celular mediante un ensayo XTT en neuroblastos expuestos a Pb y, posteriormente, se aplicó melatonina en diferentes concentraciones. La exposición a Pb redujo significativamente la viabilidad celular; sin embargo, la administración posterior de melatonina incrementó la supervivencia de las células tratadas. Evaluamos también el estrés oxidativo mediante un ensayo de peroxidación lipídica, observamos que los neuroblastos expuestos a Pb presentaron altos niveles de peroxidación, los cuales disminuyeron tras el tratamiento con melatonina a dosis elevadas. Con el fin de determinar si la acción de la melatonina frente a la toxicidad por Pb es mediada por los receptores MT1 y MT2, se utilizó luzindol. La aplicación de este antagonista no redujo el efecto protector de la melatonina sobre la viabilidad celular, lo que sugiere que su acción no depende de dichos receptores. Cabe destacar que el tratamiento exclusivo con luzindol resultó tóxico para las células, evidenciando su propia actividad biológica. En conjunto, los resultados sugieren que el efecto de la melatonina podría atribuirse a su capacidad de reducir el estrés oxidativo mediante la interacción directa con radicales libres.

Palabras clave: melatonina, receptor, neuroblasto, luzindol, estrés oxidativo, viabilidad celular.

Introducción

La melatonina es una hormona secretada principalmente por la glándula pineal (Figura 1), está involucrada en la regulación del ritmo circadiano. Tiene la capacidad de eliminar especies reactivas de oxígeno, como el oxígeno singlete, el radical anión superóxido, el radical hidroxilo, el peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos. Su amplia distribución subcelular le permite interactuar con moléculas tóxicas, reduciendo así el daño oxidativo celular. La melatonina también actúa como antioxidante, agente quelante, agente antiapoptótico y como molécula antienvejecimiento. Se ha comprobado que estas propiedades de la melatonina reducen la toxicidad de los metales pesados en humanos y animales¹.

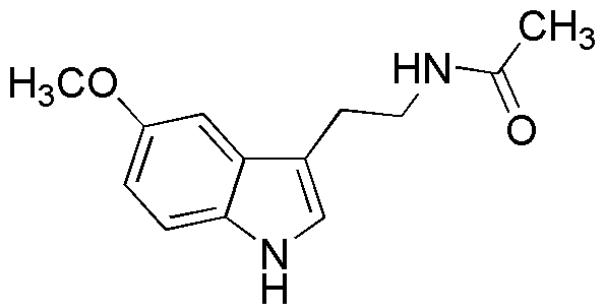


Figura 1. Melatonina (N-acetyl-5-metoxitriptamina).

Los metales esenciales son importantes para una amplia variedad de procesos biológicos de los sistemas vivos. Forman parte de diferentes coenzimas, son segundos mensajeros, determinan la estructura terciaria y secundaria de las proteínas, etc. Los metales tóxicos como el aluminio, el cadmio, el plomo, el mercurio y el arsénico pueden interactuar con macromoléculas biológicas causando daño de diferentes formas. Aunque los mecanismos moleculares no se comprenden completamente, la capacidad de los metales para generar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS) que producen estrés oxidativo, que se considera el evento más importante involucrado en la toxicidad inducida por plomo².

La exposición al plomo en humanos produce efectos neurotóxicos, genotóxicos y hematotóxicos. Se han realizado varios intentos para usar la acción neuroprotectora de la melatonina contra la neurotoxicidad inducida por plomo en ratas³. En estos estudios, la melatonina atenuó casi por completo el aumento de los productos de peroxidación lipídica (como lo es el MDA) inducido por el plomo y restableció los niveles de glutatión reducido (GSH) y la actividad de la super óxido dismutasa (SOD). En la línea celular de neuroblastoma humano cultivada, SH-SY5Y, expuesta a niveles bajos de plomo, la melatonina también restauró el agotamiento de GSH inducido por plomo y protegió contra la apoptosis al inhibir la activación de la caspasa-3.

Por otro lado, también se ha demostrado que el daño causado por plomo depende de la línea celular examinada; por ejemplo, en un estudio anterior se reveló que la IC₅₀, la concentración inhibitoria media de un inhibidor o antagonista necesaria para inhibir una respuesta biológica específica en un 50%, de plomo es más alta en L929 que en SH-SY5Y. Lo que confirma que el plomo induce mayor daño en los neuroblastos que en los fibroblastos⁴. Cabe señalar que, previo a la exposición, las células SH-SY5Y presentan una morfología regular y una confluencia adecuada, como se observa en la Figura 2. Esta condición basal contrasta con los cambios estructurales que aparecen tras el tratamiento con plomo, los cuales se mostrarán con mayor detalle en el apartado de resultados.

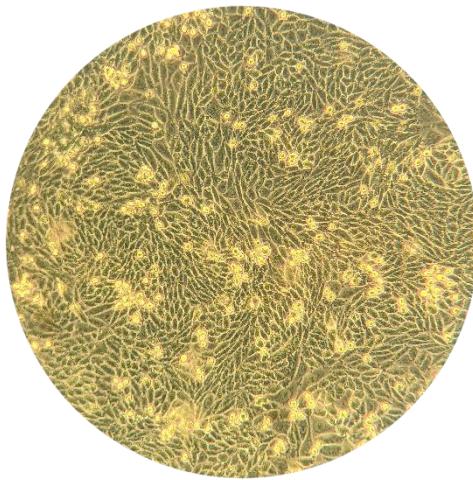


Figura 2. Cultivo confluente (~90-95% de confluencia), donde se observa un estrato celular uniforme y contacto inhibición incipiente. La imagen fue capturada con microscopía óptica de luz a 20X aumentos.

Hasta el momento se conocen cuatro mecanismos de acción de la melatonina: 1) Unión a los receptores de melatonina en la membrana plasmática, 2) Unión a proteínas intracelulares, 3) Unión a receptores nucleares huérfanos y 4) Efecto antioxidante directo sobre las especies reactivas de oxígeno. Los receptores asociados con la melatonina son los siguientes: 1) Receptor de melatonina tipo 1a: MT1 (en la membrana celular), 2) Receptor de melatonina tipo 1b: MT2 (en la membrana celular), 3) Receptor de melatonina tipo 1c (que se encuentra en peces, anfibios y aves), 4) Enzima quinona reductasa 2 (receptor MT3, una enzima de desintoxicación), 5) RZR/ROR α : Receptor nuclear de hormona huérfana relacionado con retinoides (con este receptor, la melatonina se une a los factores de transcripción en el núcleo) y 6) GPR50: Receptor huérfano relacionado con la melatonina ligado al cromosoma X (es eficaz en la unión de la melatonina a MT1)⁵.

El luzindol (Figura 3) es un antagonista competitivo del receptor de melatonina con una afinidad de unión de 11 a 25 veces mayor por el receptor MT2 que por el MT1. Se ha demostrado que diferentes partes de los vertebrados expresan estos receptores, incluyendo los vasos sanguíneos, el riñón, el hígado, la vejiga, el ovario, los testículos, el tracto gastrointestinal, las glándulas suprarrenales y mamarias. La respuesta antagónica del luzindol a la melatonina en mamíferos se ha caracterizado por la reducción de la liberación de dopamina de las neuronas retinianas del sistema nervioso central (SNC) y el bloqueo de los cambios de fase del ritmo circadiano, una respuesta fisiológica mediada por la activación del receptor de melatonina.

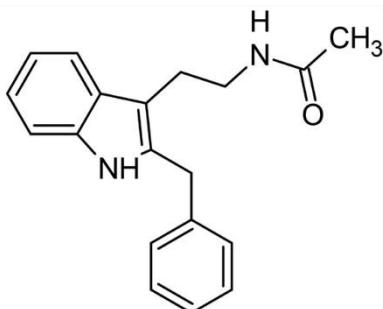


Figura 3. Luzindol (N -acetil-2-benzyltryptamina).

El objetivo de este estudio es determinar si la acción protectora de la melatonina en las células expuestas a plomo es mediada por los receptores MT1 y MT2. Para analizar este efecto utilizaremos un antagonista de los receptores de melatonina, el luzindol.

Metodología

Se utilizaron células SH-SY5Y, medio RPMI 1640 adicionado con rojo de fenol suplementado con suero bovino fetal al 10 %, acetato de plomo trihidratado (Sigma-Aldrich: 915440), melatonina (Sigma-Aldrich: M5250, powder, ≥98% TLC), kit CyQUANT™ XTT Cell Viability Assay Invitrogen™ (X12223), luzindol (Sigma-Aldrich, L2407, pureza ≥90%) y Lipid Peroxidation (MDA) Assay kit (Sigma-Aldrich: MAK085).

Preparación de melatonina:

La concentración endógena de melatonina en humanos oscila entre 30 y 90 pg/mL, lo que corresponde a un rango molar de $\sim 2.1525 \times 10^{-10}$ M. Para simular condiciones fisiológicas y farmacológicas, se preparó una solución madre de 10–1 M disolviendo 23.22 mg de melatonina en 500 μ L de etanol absoluto y 500 μ L de agua destilada (relación 1:1 v/v). A partir de esta solución, se realizaron diluciones seriadas en medio de cultivo hasta alcanzar las concentraciones de trabajo 10–3 M y 10–9 M. Todas las soluciones se almacenaron protegidas de la luz a 4°C (o -20°C para almacenamiento prolongado) bajo condiciones estériles para evitar degradación y contaminación.

Preparación de luzindol:

El antagonista luzindol se preparó a partir de una solución stock de 0.01 M en dimetilsulfóxido (DMSO). Para los experimentos, se generó una solución intermedia de 0.1 M diluyendo un volumen calculado del stock en DMSO estéril, seguido de diluciones seriadas hasta alcanzar la concentración final de 10 micromolar. La concentración final de DMSO en los ensayos se mantuvo por debajo del 0.1% (v/v) para evitar efectos citotóxicos. Las soluciones se almacenaron en alícuotas a -20°C protegidas de la luz.

Siembra y exposición:

La línea celular de neuroblastoma humano se sembró en medio de cultivo completo y mantenidos a una temperatura de 37 °C bajo una atmósfera humidificada de 95 % aire y 5% CO₂. Se mantuvieron las células SH-SY5Y en sus respectivos medios de cultivo hasta alcanzar una confluencia del 70-80%. Se tripzinizaron y contaron utilizando un hemocitómetro para tener una suspensión celular con concentración de 100,000 células/mL. Sembramos 100 μ L de suspensión celular por pocillo en una placa de 96 pocillos. Las placas se incubaron durante 24 horas para permitir la adherencia y el crecimiento de las células. La exposición a plomo se realizó retirando el medio de cultivo a las células y añadiendo medio de cultivo con 125 μ M de plomo. Se incubaron las células con la solución de plomo durante 24 horas en la incubadora de CO₂. Posteriormente se agrega Luzindol 10 μ M y media hora después sin retirar el Luzindol se añade melatonina (se usarán diferentes dosis, 10⁻³ y 10⁻⁹) por 24 horas para evaluar el efecto protector y revertir el daño. Para el grupo control de luzindol, se excluyeron células a las que se les añadió antagonista el tercer día de incubación (Figura 4).

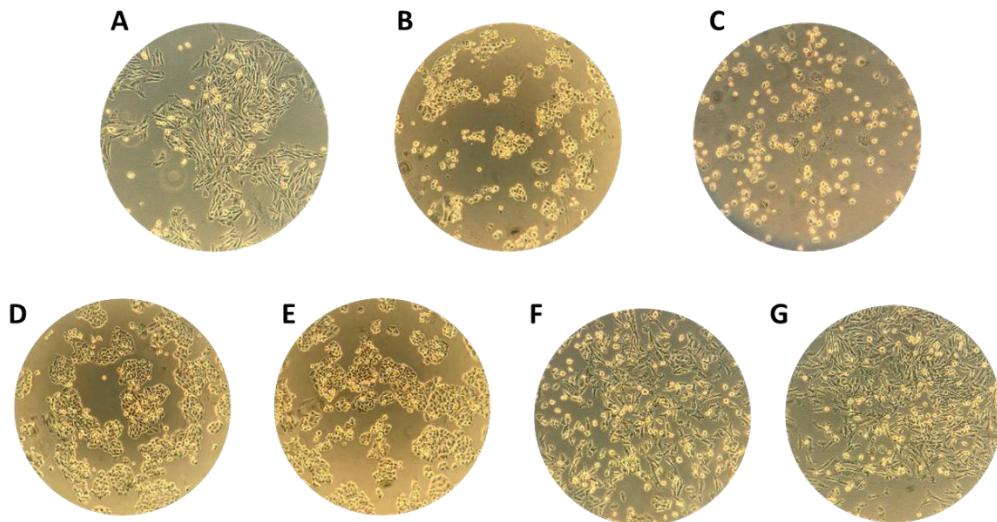


Figura 4. Efectos del plomo, melatonina y luzindol en células SH-SY5Y. (A) Control sin tratamiento (medio fresco). (B) Células expuestas a plomo (125 μ M). (C) Células expuestas a luzindol (10 μ M). (D) Plomo (125 μ M) + melatonina (10⁻³ M). (E) Plomo + luzindol (10 μ M) + melatonina (10⁻³ M). (F) Plomo + melatonina (10⁻³ M). (G) Plomo + luzindol + melatonina (10⁻³ M). Todas las imágenes fueron capturadas mediante microscopía óptica de luz a 20X aumentos.

Ensayo de viabilidad celular:

Se preparó el reactivo de trabajo de acuerdo con las instrucciones del fabricante, añadiendo 70 μ L a toda la placa. Se incubaron las placas durante 4 horas en la incubadora de CO₂. Se midió la absorbancia a 450 nm y 660 nm utilizando un espectrofotómetro de microplacas.

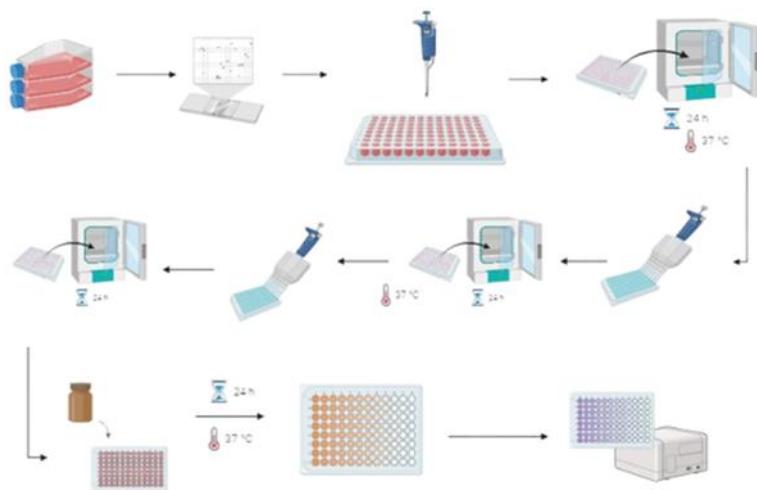


Figura 5. Ensayo de viabilidad celular SH-SY5Y con diferentes tratamientos de plomo, melatonina y luzindol.

Como se muestra en la Figura 5, para evaluar la viabilidad celular se sembraron las células SH-SY5Y y en placas de 96 pocillos y se dejaron crecer durante 24 horas. Posteriormente, las células fueron expuestas a acetato de plomo ($125 \mu\text{M}$) durante 24 horas para inducir daño oxidativo. Luego, se aplicaron tratamientos con melatonina (10^{-3} M y 10^{-9} M) y/o el antagonista luzindol ($10 \mu\text{M}$) durante 24 horas adicionales. Finalmente, se añadió el reactivo XTT y, tras el período de incubación correspondiente, la viabilidad celular se cuantificó midiendo la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de microplacas.

Ensayo de estrés oxidativo:

El kit de ensayo de peroxidación lipídica MDA (Sigma-Aldrich, MAK085) incluye tampón de lisis MDA, solución de ácido fosfotungstico, Butil Hidroxitolueno (BHT), ácido tiobarbitúrico (TBA) y un estándar de MDA (4.17 M). La solución de TBA se reconstituyó con 7.5 mL de ácido acético glacial y se ajustó a 25 mL con agua destilada.

Para la curva estándar, se diluyeron $10 \mu\text{L}$ del estándar de MDA 4.17 M en $407 \mu\text{L}$ de agua destilada, obteniendo una concentración de 0.1 M . Posteriormente, se preparó un estándar de 2 mM diluyendo $20 \mu\text{L}$ de esta solución en $980 \mu\text{L}$ de agua purificada. En seis pozos se dispusieron concentraciones de MDA de 20 , 16 , 12 , 8 , 4 y 0 nmol .

Las muestras celulares (2×10^6) se homogeneizaron en $300 \mu\text{L}$ de tampón de lisis MDA con $3 \mu\text{L}$ de BHT para que las proteínas precipiten, manteniendo todo en hielo. Tras centrifugar a $13,000 \times g$ por 10 minutos, se recuperaron $200 \mu\text{L}$ del sobrenadante en tubos nuevos. Para formar el aducto MDA-TBA, se añadieron $600 \mu\text{L}$ de la solución de TBA a cada vial con estándar y muestra. Las mezclas se incubaron a 95°C por 60 minutos y posteriormente se enfriaron en baño de hielo por 10 minutos. Finalmente, se transfirieron $200 \mu\text{L}$ de cada reacción a una placa de 96 pozos para la lectura espectrofotométrica del aducto coloreado cuya absorbancia se mide a 532 nm . La Figura 6 muestra un breve gráfico del procedimiento condensado.

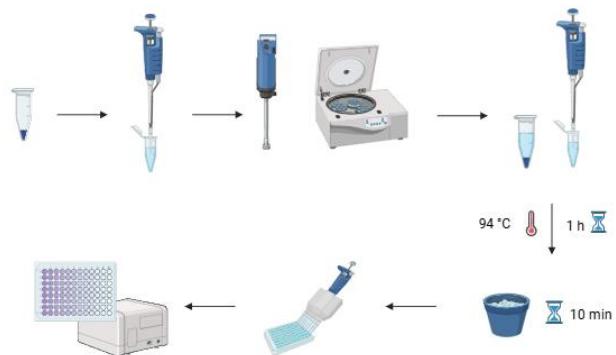


Figura 6. Ensayo de estrés oxidativo de células SH-SY5 con plomo y tratamiento con melatonina en diferente concentración. Se homogenizaron 2 millones de células en tampón de lisis de MDA que contiene BHT y se precipitaron las proteínas centrifugando la muestra. Se tomó el sobrenadante de la muestra y se formó un aducto MDA TBA (malondialdehido y ácido tiobarbitúrico) que se mide a 532 nm utilizando lector de placas multipicillos espectrofotométrico.

Resultados

Las células fueron expuestas a plomo 125 μ M y se trataron con melatonina en dos diferentes concentraciones, un ensayo de viabilidad celular CyQUANT™ XTT permitió medir la actividad metabólica de la célula en cada exposición.

Para comprobar si el mecanismo de acción de la melatonina tiene relación con los receptores de membrana MT1 y MT2, se midió la actividad metabólica usando luzindol como antagonista de la melatonina, se usó un control de luzindol para comprobar su eficiencia y acción. Se realizó el cálculo de absorbancia específica mediante la resta de la lectura de 450 nm a la de 600 nm. Con la absorbancia específica, se determinó el promedio de las absorbancias y la desviación estándar. La siguiente gráfica contiene los resultados condensados de cada tratamiento.

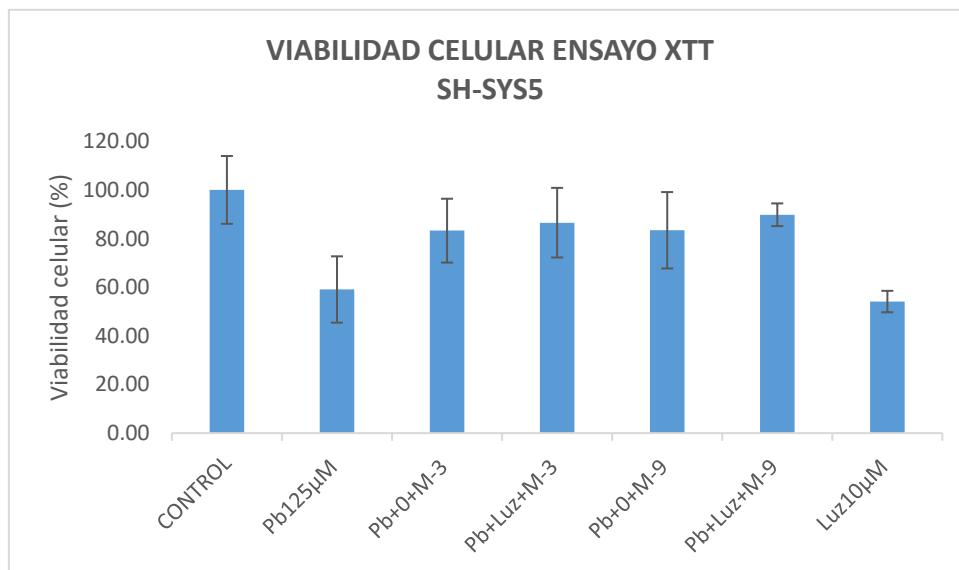


Figura 7. Viabilidad celular por absorbancia en neuroblastos mediante ensayo XTT.

El plomo y el luzindol reducen significativamente la viabilidad. La melatonina protegió las células incluso en presencia de luzindol, lo que sugiere que su efecto neuroprotector no depende principalmente de los receptores MT1/MT2, sino de su capacidad antioxidante directa (Figura 7). La concentración de peroxidación lipídica, a partir de calcular la concentración de la curva estándar dividida entre la cantidad de muestras en los pozos, por el factor de dilución. La absorbancia medida en el ensayo de estrés oxidativo, es directamente proporcional a la cantidad de MDA presente en la muestra. El MDA aumenta en la muestra expuesta a plomo, con los tratamientos de melatonina se reduce considerablemente reduciendo así el daño celular (Figura 8).

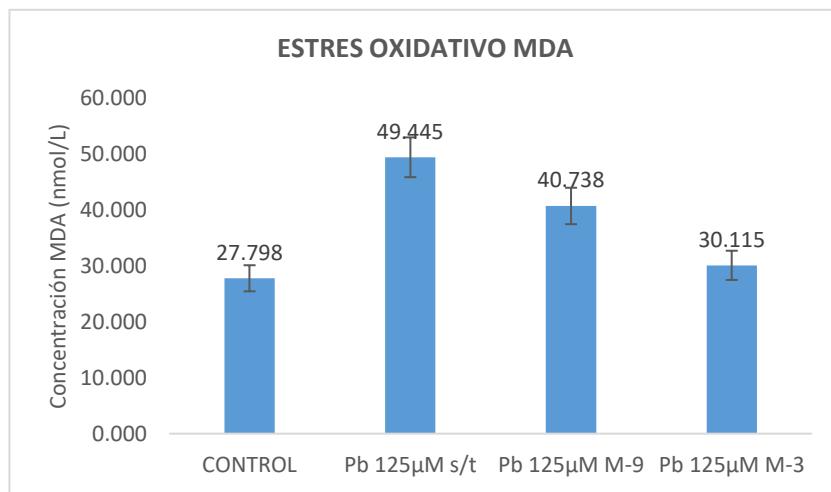


Figura 8. Estrés oxidativo por absorbancia en neuroblastos mediante ensayo MDA. (s/t significa sin tratamiento).

Discusión

Evaluamos la acción a protectora de la melatonina en diferentes dosis, posterior al daño inducido por plomo en neuroblastos, es importante mencionar que el ensayo de XTT en el contexto de estrés oxidativo inducido por plomo indica una disminución en la señal del XTT no por muerte celular, sino por una reducción en la actividad mitocondrial que podría ser reversible si el estrés es mitigado.

Se eligieron las concentraciones de 10^{-3} y 10^{-9} de acuerdo con los valores endógenos y terapéuticos de la melatonina. En la literatura presentan valores plasmáticos diferentes: los niveles de melatonina diurnos publicados para ratas son <5 pg/mL y para humanos, entre 5 y 20 pg/mL. En el caso de la noche, los niveles plasmáticos de melatonina para ratas se encuentran entre 60 y 197 pg/mL y para humanos, entre 46 y 150 pg/mL.⁴ La duración del pico de producción es de entre 2 y 4 horas, y la vida media en sangre de la preparación de melatonina es de una hora. Los efectos de la melatonina in vitro dependen de la concentración, la duración de la exposición y el tipo de células⁶.

Podemos observar que el aumento de viabilidad se da, en ambas concentraciones sin gran diferencia entre cada una, llegando a valores obtenidos en el control. En este caso la mejora es independiente a la dosis administrada.

De acuerdo con el ensayo de estrés oxidativo, apreciamos un incremento de productos de peroxidación lipídica causados por la exposición a plomo 125 μ M, un ligero descenso al agregar tratamiento con melatonina 10^{-9} y un gran descenso casi hasta igualar el control con tratamiento con melatonina 10^{-3} . La medición de MDA ayuda a evaluar el daño y el estrés oxidativos en diversas condiciones biológicas y enfermedades. La reparación del daño depende de la dosis de tratamiento.

Se desconoce el mecanismo de acción de la melatonina. Los dos principales son: la acción dependiente del receptor de melatonina y la interacción directa de la melatonina con radicales libres (molécula depuradora).

El uso de agonistas y antagonistas de los receptores de melatonina ayuda a identificar las funciones fisiológicas de la melatonina. Existen sitios de unión de la melatonina en el hipocampo de varios mamíferos.

Los estudios muestran que los receptores MT1 y MT2 se localizan en el giro dentado, las regiones CA3 y CA1 y el subcúlo del hipocampo. Pertenecen a la superfamilia del receptor acoplado a proteína G (GPCR). Comparten algunas secuencias cortas específicas de aminoácidos, lo que sugiere que representan una subfamilia específica. Se ha descubierto que la melatonina (1 μ M) aumenta la tasa de activación de las neuronas en las regiones CA1, un efecto suprimido por la administración simultánea de luzindol, antagonista del receptor MT 2.⁷ En cortes de hipocampo murino, la melatonina indujo una inhibición dependiente de la concentración de la potenciación a largo plazo, efecto que fue prevenido por los antagonistas del receptor MT2 de melatonina, luzindol y 4-fenil-2-propionamidotetralina⁸. En este caso el comportamiento de las células dañadas por plomo al añadir luzindol y melatonina, podrían inferir que la reversión del daño por plomo no está dada por receptores MT1 y MT2 de membrana.

Se podría entonces pensar en los otros receptores intracelulares como lo es MT3, también conocido como ML2 o enzima quinona reductasa 2 (QR2). Esta enzima pertenece al grupo de las reductasas, que intervienen en la prevención del estrés oxidativo mediante la inhibición de las reacciones de transferencia de electrones de las quinonas. Esta enzima (o receptor MT3) se encuentra en el hígado, el riñón, el corazón, los pulmones, el intestino, el músculo y el tejido adiposo pardo. Es una enzima desintoxicante.⁹ La inhibición de QR2 por la melatonina podría explicar su efecto protector, descrito en diferentes modelos animales y generalmente asociado a sus propiedades antioxidantes bien documentadas.

Por otro lado, también se encuentra el receptor MT4, receptor de hormona nuclear huérfano relacionado con retinoides. Con este receptor, la melatonina se une a los factores de transcripción del núcleo que pertenecen a la superfamilia de receptores de ácido retinoico. Los receptores de membrana y sus agonistas específicos están asociados con el ritmo circadiano, mientras que RZR/ROR α parece ser responsable de la inmunomodulación en la periferia, el crecimiento celular y la diferenciación ósea. La activación de la proteína quinasa C- α es un paso crítico en la formación del efecto de la melatonina¹⁰.

Conclusión

En conclusión, la melatonina demuestra una acción citoprotectora frente a la exposición al plomo, tanto en su forma endógena como en su aplicación terapéutica. Aunque el mecanismo de acción aún no está completamente definido, el uso de luzindol como antagonista de los receptores MT1 y MT2 sugiere que dicho efecto no depende exclusivamente de estos receptores. La eficacia de luzindol fue evaluada de manera independiente, lo que permitió confirmar esta observación.

A futuro, será relevante investigar si la reducción del estrés oxidativo inducida por la melatonina se encuentra mediada por receptores intracelulares, o si su efecto se debe únicamente a la interacción directa con los radicales libres, actuando como antioxidante.

Bibliografía/Referencias

1. Ekmekcioglu, C. (2006). Melatonin receptors in humans: Biological role and clinical relevance. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60(3), 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2006.01.002>
2. El-Sokkary, G. H., Kamel, E. S., & Reiter, R. J. (2003). Prophylactic effect of melatonin in reducing lead-induced neurotoxicity in rats. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 8(2), 461–470.
3. Emet, M., Ozcan, H., Ozel, L., Yayla, M., Halici, Z., & Hacimutuoglu, A. (2016). A review of melatonin, its receptors and drugs. *Eurasian Journal of Medicine*, 48(2), 135–141. <https://doi.org/10.5152/eurasianjmed.2015.0267>
4. Jockers, R., Maurice, P., Boutin, J. A., & Delagrange, P. (2008). Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: What's new? *British Journal of Pharmacology*, 154(6), 1182–1195. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.184>
5. Kennaway, D. J. (2020). Measuring melatonin by immunoassay. *Journal of Pineal Research*, 69(1), e12657. <https://doi.org/10.1111/jpi.12657>
6. Kołodziejska, R., Woźniak, A., Bilski, R., Wesołowski, R., Kupczyk, D., Porzych, M., Wróblewska, W., & Pawluk, H. (2025). Melatonin—A powerful antioxidant in neurodegenerative diseases. *Antioxidants*, 14(7), 819. <https://doi.org/10.3390/antiox14070819>

7. Monteiro, K. K. A. C., Shiroma, M. E., Damous, L. L., Simões, M. J., Simões, R. S., Cipolla-Neto, J., Baracat, E. C., & Soares-Jr., J. M. (2024). Antioxidant actions of melatonin: A systematic review of animal studies. *Antioxidants*, 13(4), 439. <https://doi.org/10.3390/antiox13040439>
8. Musshoff, U., Riewenherm, D., Berger, E., Fauteck, J. D., & Speckmann, E. J. (2002). Melatonin receptors in rat hippocampus: Molecular and functional investigations. *Hippocampus*, 12(2), 165–173. <https://doi.org/10.1002/hipo.10010>
9. Rana, S. V. S. (2018). Protection of metal toxicity by melatonin—Recent advances. *EC Pharmacology and Toxicology*, 6(8), 1–9.
10. Wang, L. M., Suthana, N. A., Chaudhury, D., Weaver, D. R., & Colwell, C. S. (2005). Melatonin inhibits hippocampal long-term potentiation. *European Journal of Neuroscience*, 22(9), 2231–2237. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04409.x>