VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

Efecto de diferentes dosis de melatonina sobre la actividad de la superóxido dismutasa (SOD)

Effect of different doses of melatonin on superoxide dismutase (SOD) activity

Minerva Martínez-Alfaro[1], Sahian Arely Gómez-Hernández[3], Juvencio Robles[1], Lérida Liss Flores-Villavicencio[2], Brisa Daniela López-Juárez[3], Yolanda Alcaraz-Contreras[1], Roberto Carlos Gutiérrez-Hernández[3]
[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

La melatonina, sintetizada por la glándula pineal, es un neuroprotector clave en la regulación del ritmo circadiano que además posee propiedades antioxidantes y apoptóticas. En este trabajo se evaluó la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) como respuesta al efecto protector de la melatonina en células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) sometidas a estrés oxidativo inducido por diferentes concentraciones de plomo (Pb^{2+}). El mecanismo antioxidante de la melatonina mediado por sus receptores MT1 y MT2 se corroboró en el grupo expuesto a la máxima concentración de plomo (125 µM) mediante el empleo de luzindol, un antagonista específico de dichos receptores.

Palabras clave: Melatonina, superóxido dismutasa, SH-SY5Y, plomo, estrés oxidativo.

Introducción

La melatonina es una indolamina sintetizada principalmente por la glándula pineal (Figura 1), que posee capacidad para neutralizar los radicales libres gracias a sus funciones antioxidantes y antiapoptóticas[1] Una de sus funciones bien establecida es la participación en la regulación del ritmo circadiano, las respuestas emocionales y el ciclo sueño vigilia en el sistema nervioso central (SNC).[2] La melatonina actúa como un potente captador de radicales libres y modulador de radicales libres y modulador de sistemas antioxidantes endógenos, además de participar en la regulación de la apoptosis y la homeostasis mitocondrial. Estas características, junto con su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica, debido a que es lipofílica, la convierten en una molécula clave en la protección frente al daño neuronal a través de múltiples mecanismos tales como la regular negativamente los efectos inflamatorios, inhibir la apoptosis celular, modular la transducción de señales y la expresión genética, regular los niveles de enzimas y proteínas neurotróficas, restaurar la función de las mitocondrias y el retículo endoplasmático, reducir el estrés oxidativo y mantener los ritmos circadianos.[3]

[1] Haddad, C. F., Haddad, J. M., Veiga, E. C. D. A., Sorpreso, I. C. E., Simões, R. S., Baracat, E. C., & Soares Júnior, J. M. (2020). Melatonin and organ transplantation: what is the relationship? *Revista da Associação Médica Brasileira*, 66(3), 353-3581.

[2] Ekmekcioglu, C. (2006). Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60(3), 97-108.

[3] Luo, F., Deng, Y., Angelov, B., & Angelova, A. (2025). Melatonin and the nervous system: nanomedicine perspectives. *Biomaterials Science*, 13(13), 3421-3446.

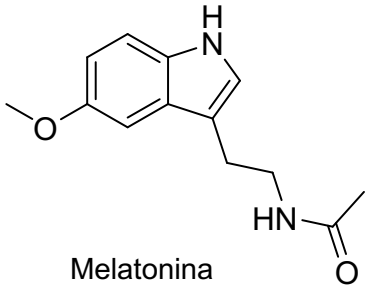


Figura 1. Estructura química de la melatonina.

Para estudiar estos mecanismos en condiciones controladas, la línea celular SH-SY5Y, derivada de neuroblastoma humano, se han consolidado como un modelo ampliamente utilizado en neurobiología experimental. Estás células presentan características similares a neuronas, incluyendo propiedades dopaminérgicas, lo que permite emplearlas en el análisis de procesos de neurotoxicidad y neuroprotección.[4] En este modelo, diversos agentes tóxicos inducen alteraciones en el incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS), disfunción mitocondrial y activación de vías apoptóticas. En este contexto, se ha demostrado que la melatonina puede ejercer efectos protectores en células SH-SY5Y al reducir la producción de ROS, preservar la integridad mitocondrial y activar rutas de señalización de antioxidantes, tanto por acción directa como mediada por sus receptores.

Entre los agentes neurotóxicos de mayor relevancia se encuentra el plomo (Pb^{2+}), un contaminante ambiental que afecta principalmente al SNC y cuya exposición se asocia con alteraciones cognitivas y daño neuronal.[5]. A nivel celular, el plomo induce estrés oxidativo mediate el aumento en la producción de ROS, la alteración del equilibrio redox y la disfunción mitocondrial, lo que conduce finalmente a la muerte celular.[6]

Dado que el estrés oxidativo constituye uno de los principales mecanismos de toxicidad del plomo (Pb^{2+}), el presente proyecto tiene como objetivo evaluar el efecto protector de la melatonina frente a este daño en un modelo celular SH-SY5Y. Existen distintos mecanismos de acción de la melatonina, entre ellos podemos encontrar la unión a proteínas intracelulares, la quinona reductasa, receptores nucleares de retinoides Z.[7] Específicamente, se analizará la participación de los receptores MT1 y MT2 en mediar dicha acción antioxidante empleando el luzindol como antagonista selectivo para bloquear la vía de señalización de la melatonina.

Objetivo: Evaluar el papel de los receptores de melatonina MT1 y MT2 sobre la actividad de la SOD en células SH-SY5Y expuestas a plomo.

Metodología

Preparación de células

Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y se sembraron con una densidad inicial de 10^5 células/mL para cada grupo experimental y se incubaron durante 24 h en condiciones estándar de cultivo. Posteriormente, se aplicaron los diferentes tratamientos con melatonina y las células se incubaron durante 24 h adicionales. Finalizado el período de tratamiento, el medio de cultivo fue retirado y las células se lavaron

[4] Waseem, M., Sahu, U., Salman, M., Choudhury, A., Kar, S., Tabassum, H., & Parvez, S. (2017). Melatonin pre-treatment mitigates SHSY-5Y cells against oxaliplatin induced mitochondrial stress and apoptotic cell death. *Plos ONE*, 12(7), e0180953.

[5] Suresh, C., Dennis, A. O., Heinz, J., Vemuri, M. C., & Chetty, C. S. (2006). Melatonin protection against lead-induced changes in human neuroblastoma cell cultures. *International journal of toxicology*, 25(6), 459–464.

[6] Lopes, A. C. B. A., Peixe, T. S., Mesas, A. E., & Paoliello, M. M. B. (2015). Lead Exposure and Oxidative Stress: A Systematic Review. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 236, 193-238.

[7] Tordjman, S., Chokron, S., Delorme, R., Charrier, A., Bellissant, E., Jaafari, N., & Fougerou, C. (2017). Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. *Current Neuropharmacology*, 15(3), 434-443.

VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

con solución salina tamponada con fosfatos (PBS). La disociación celular se realizó mediante la adición de tripsina 1×, seguida de una incubación de 5 min. Las células desprendidas se recolectaron en tubos de centrifugación y se sometieron a dos lavados consecutivos con PBS mediante centrifugación a 2,000 rpm durante 5 min.

Posteriormente, se añadió buffer de lisis al pellet celular, se homogeneizaron y los lisados obtenidos se centrifugaron a 14,000 × g durante 5 min a 4 °C, recolectándose el sobrenadante para los análisis posteriores.

Exposición al plomo y protocolo de tratamiento

Para los ensayos de exposición al plomo, el medio de cultivo fue reemplazado por medio fresco suplementado con acetato de plomo (II) (Sigma-Aldrich, kit 915440) a concentraciones finales de 50 y 125 µM. Las células fueron incubadas durante 24 h bajo condiciones estándar de cultivo.

Posteriormente, se establecieron dos modalidades de exposición al plomo. En la condición R (recent exposure), las células fueron expuestas al plomo durante 24 h después del período de crecimiento celular y procesadas inmediatamente para la aplicación de los tratamientos correspondientes. En la condición W/T (withdrawal treatment), tras las 24 h de exposición al plomo, el medio que contenía el metal fue retirado y sustituido por medio de cultivo fresco libre de plomo, con el fin de evaluar los efectos posteriores a la suspensión de la exposición.

Para los grupos destinados a evaluar la participación de los receptores de melatonina, se añadió luzindol a una concentración final de 1 µM. Después de 30 min de preincubación con el antagonista, se administró melatonina a concentraciones finales de 10^{-3}, 10^{-6} y 10^{-9} M, manteniendo la presencia de luzindol en el medio de cultivo. Las células fueron incubadas durante 24 h adicionales para evaluar los posibles efectos protectores y de recuperación inducidos por la melatonina.

Todos los experimentos incluyeron los controles experimentales correspondientes, incluyendo controles sin exposición al plomo y controles de tratamiento, con el propósito de garantizar la validez de las comparaciones entre grupos.

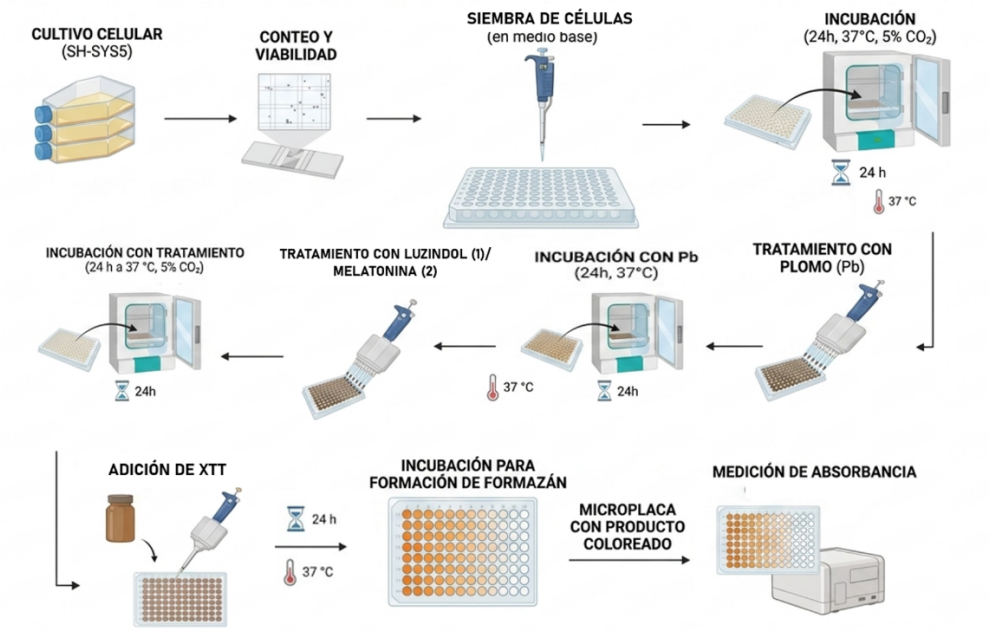


Figura 2. Ensayo de viabilidad celular SH-SY5Y con diferentes tratamientos de plomo, melatonina y luzindol.

VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

Ensayo de actividad de superóxido dismutasa (SOD)

Las células obtenidas se lisaron en una solución tampón que contenía Tris-HCl, 0,5% Triton X-100, β-mercaptoetanol e inhibidores de proteasa. Tras la centrifugación, se utilizó el sobrenadante para determinar la actividad de la superóxido dismutasa.

El ensayo, basado en el catálogo CS0009 de Sigma Aldrich, se basa en el sistema xantina/xantina oxidasa, que genera aniones superóxidos que reducen la sal tetrazolio soluble en agua (WST-1) a un producto formazan coloreado. La actividad SOD inhibe esta reacción; por lo tanto, la actividad enzimática es inversamente proporcional a la formación de formazanos.

La absorbancia se midió a 450 nm tras 30 minutos de incubación a una temperatura entre 20 y 25ºC utilizando un lector de microplacas. Los resultados se expresaron como actividad relativa de la SOD en comparación con las muestras de control.

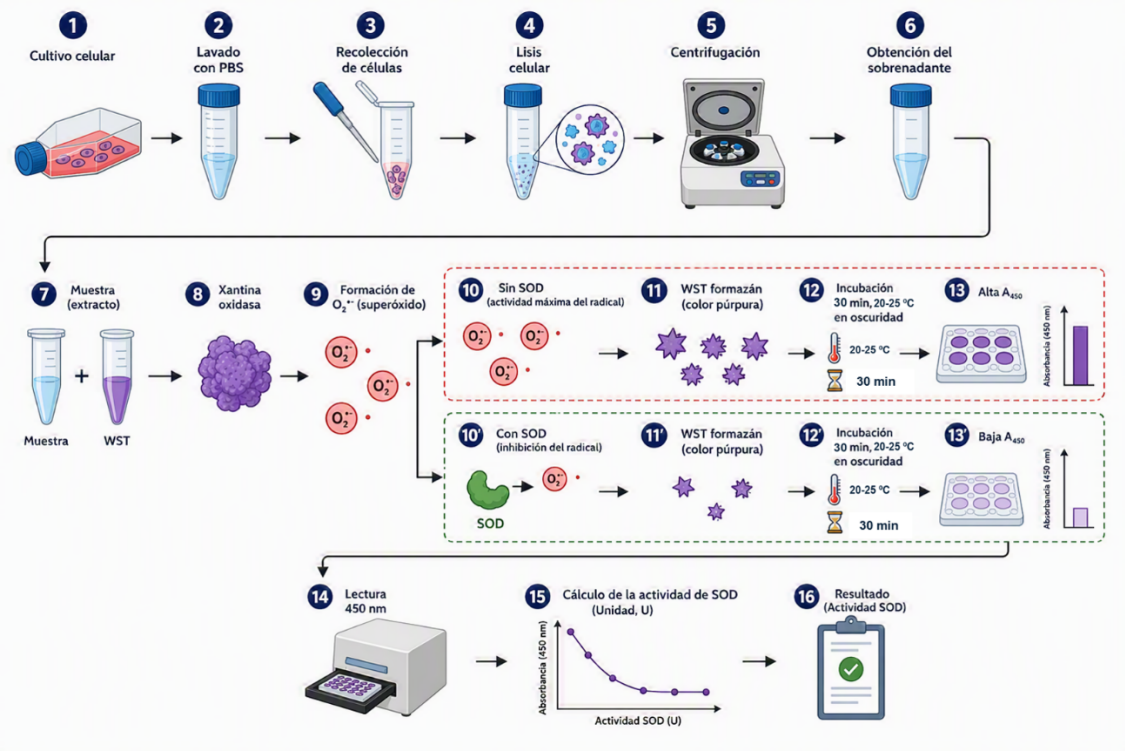


Figura 3 Ensayo de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD).

VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

Resultados

Se expusieron células a 50 y 125 µM plomo y se trataron con melatonina en tres diferentes concentraciones (M 10^{-3}, M 10^{-6} y M 10^{-9}).

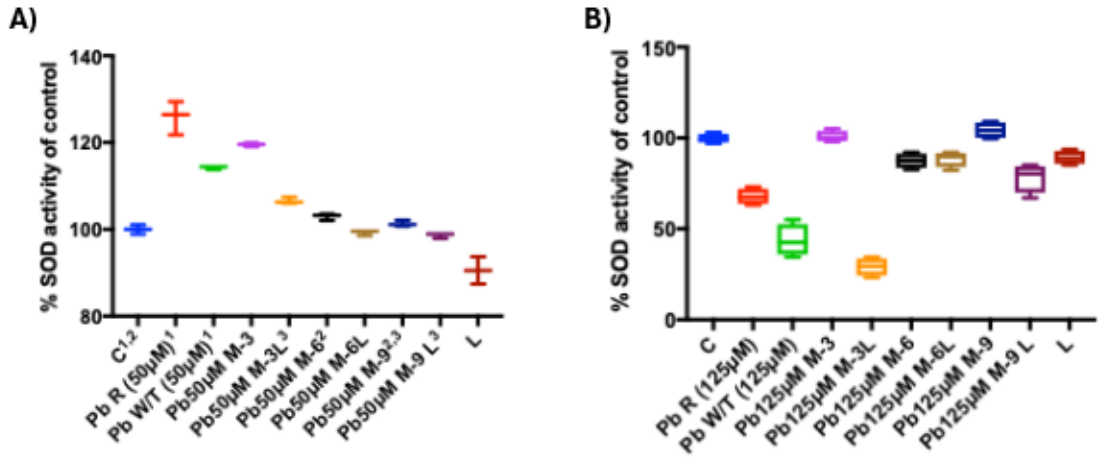


Figura 4. Actividad de la defensa SOD. A) Actividad SOD de la línea celular SH-SY5Y expuesta a 50 mM de acetato de plomo durante 24 horas y posteriormente expuesta a diferentes condiciones durante 24 horas. B) Actividad SOD de la línea celular SH-SYS5 expuesta a125 mM de acetato de plomo durante 24 horas y posteriormente expuesta a diferentes condiciones durante 24 horas. Los superíndices se explican en el texto. ANOVA ordinaria de un solo lado. Prueba de comparaciones múltiples de Turkey p< 0,05.

En la figura (4A) se evidencia la actividad de la SOD en la línea celular SH-SY5Y expuesta a 50 µM de acetato de plomo durante 24 horas, posterior a este tiempo se observó un aumento de la actividad de la SOD en las células expuestas recientemente al acetato de plomo durante 24 horas (PB 50 µM, R) y en las células expuestas adicionalmente durante 24 horas sin tratamiento (Pb 50 µM, W/T1), en relación con la actividad de la muestra control. De igual forma se observó que la actividad de la SOD es similar a las células control en aquellas expuestas a melatonina durante 24 horas tras la exposición al plomo en dosis de ((Pb 50 µM 10^{-6} y Pb 50 µM 10^{-9})².

El luzindol inhibe el efecto de la melatonina sobre la actividad de la SOD en (Pb 50 µM M10^{-3}L³ y Pb 50 µM M10^{-9}L)³.

En La figura (4B) se observó una disminución de la actividad de la SOD de la línea celular SH-SY5Y que fue expuesta a 125 µM de acetato de plomo durante 24 horas; las células expuestas adicionalmente durante 24 horas sin tratamiento (Pb 125 µM W/T) presentaron una mayor disminución de la actividad en comparación con las células de control. Las células con las dosis de melatonina (Pb 125 µM M10^{-9}, Pb 125 µM M10^{-6} y Pb 125 µM M10^{-3}) administradas durante 24 horas tras la exposición al plomo aumentan la actividad de la SOD en comparación con la muestra Pb 125 µM W/T. Se presentó que la muestra (Pb 125 µM 10^{-3})³ es antagonizada por el luzindol.

Discusión

Con el propósito de evaluar el posible efecto protector de la melatonina frente al estrés oxidativo inducido por plomo (Pb) en células SH-SY5Y, se determinó la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en estas células tratadas con diferentes concentraciones de esta indolamina.

Se trabajó con las concentraciones de 10^{-3}, 10^{-6} y 10^{-9}. Estas concentraciones fueron basadas con valores endógenos y terapéuticos de la melatonina, ya que se presentan valores plasmáticos diferentes, los niveles

de melatonina diurnos encontrados en la literatura para humanos oscilan entre 10-20 pg/mL, mientras que los valores nocturnos se encuentran entre 80-150 pg/mL[8].

Los resultados obtenidos demuestran que la exposición al plomo induce una alteración dependiente de la concentración en la actividad de superóxido dismutasa (SOD), lo cual es consistente con su reconocido papel como inductor de estrés oxidativo en el sistema nervioso.

Podemos observar que las células de control hay actividad de la superóxido dismutasa, esto debido a la producción de radicales libres de la cadena oxidativa mitocondrial. A una concentración de 50 µM, el incremento observado en la actividad de SOD en células SH-SY5Y (Pb 50M R y Pb 50M W/T) sugiere la activación de una respuesta adaptativa temprana frente al aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS). La melatonina restauró la actividad de la superóxido dismutasa, alcanzando valores similares a los del grupo control cuando se administró a concentraciones de 10^{-6} y 10^{-9} después de una exposición previa a 50 µM de Pb (Figura 4A). Además, se observó que, en células pretratadas con 50 µM de Pb, la concentración más alta de melatonina evaluada (10^{-3}) incremento la actividad de la SOD por encima de niveles basales.

En contraste, a una concentración mayor, 125 µM, se observó una disminución significativa de la actividad de la superóxido dismutasa, lo cual indica un colapso de la respuesta antioxidante a causa de la concentración del plomo ya que en un estudio anterior se evidenció que la concentración inhibitoria media (IC 50) del plomo en células SH-SY5Y es de 96.76 µM, lo que nos indica que una parte de las células están muriendo, disminuyendo asi la actividad SOD.

Las células expuestas previamente a 125 µM de Pb (Figura 4B), las concentraciones de melatonina de 10^{-3} y 10^{-9} lograron restablecer la actividad de la SOD a valores comparables con los del control. Sin embargo, la administración de luzindol (µM) bloqueó el efecto estimulador de la melatonina sobre la actividad de la SOD tanto a de 10^{-3} como a 10^{-9} independientemente de la dosis de Pb utilizada durante la preexposición.

Estos hallazgos sugieren que el efecto de la melatonina en concentraciones de 10^{-9} podría estar mediado por receptores de melatonina. Considerando que el luzindol presenta valores de Ki de 158 nM para el receptor MT1 y de 10.2 nM para MT2. Por lo tanto, la inhibición observada a concentraciones elevadas de melatonina (10^{-3}) podría atribuirse, al menos en parte, a acciones propias del luzindol. De hecho, las células tratadas exclusivamente con luzindol (1 µM) durante 30 minutos mostraron una reducción significativa en la actividad de la SOD, lo que indica un efecto directo de este compuesto.

Asimismo, estudios previos han demostrado que el luzindol, por sí solo, puede modificar la actividad de enzimas antioxidantes *in vivo*. El luzindol reduce la actividad de la catalasa (CAT) en homogenizados de yeyuno de ratones tratados con una dosis única de luzindol (0,35 mg/kg de peso corporal)[9]. De manera similar, en la literatura se menciona que el luzindol induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células estelares pancreáticas mediante un efecto directo, ya que estas células carecen de receptores de melatonina[10]. Por lo tanto, el aparente efecto potenciador del luzindol podría manifestase particularmente cuando la melatonina se encuentra en concentraciones altas (10^{-3}).

Conclusión

Se evaluó con éxito el papel de los receptores de la melatonina MT1/MT2 sobre la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en células SH-SY5Y expuestas a plomo, demostrando que la melatonina ejerce un efecto neuroprotector eficaz al restaurar por completo la actividad de esta enzima a niveles basales, incluso ante concentraciones citotóxicas del metal. Mediante el uso del luzindol, se determinó que la participación de los receptores MT1 y MT2 es clave y dependiente de la dosis; a concentraciones fisiológicas/terapéuticas de

[8] Kołodziejska, R., Woźniak, A., Bilski, R., Wesołowski, R., Kupczyk, D., Porzych, M, Pawluk, H. et al. (2025). Melatonin—A Powerful Antioxidant in Neurodegenerative Diseases. *Antioxidants*, 14(7), 819.

[9] Matos, R. S., Oriá, R. B., Bruin, P. F. C., Pinto, D. V., Viana, A. F. S. C., Santos, F. A., Bruin, V. M. S. et al. (2021). Acute blockade of endogenous melatonin by Luzindole, with or without peripheral LPS injection, induces jejunal inflammation and morphological alterations in Swiss mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 54(11).

[10] Estaras, M., Marchena, A. M., Fernandez-Bermejo, M., Mateos, J. M., Vara, D., Roncero, V., Gonzalez, A. et al. (2020). The melatonin receptor antagonist luzindole induces the activation of cellular stress responses and decreases viability of rat pancreatic stellate cells. *Journal of Applied Toxicology*, 40(11), 1554-1565.

melatonina (10^{-9} M), el efecto protector está mediado directamente por la activación de estos receptores. En contraste, a concentraciones elevadas (10^{-3} M), la respuesta se ve alterada por un efecto prooxidante e inhibitorio directo del propio luzindol sobre la enzima, independiente de los receptores. Estos hallazgos respaldan el potencial de la melatonina como agente terapéutico contra el daño oxidativo en el sistema nervioso central.

Referencias

Ekmekcioglu, C. (2006). Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. *Biomedicine & Pharmacotherapy,* 60(3), 97-108. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2006.01.002

Estaras, M., Marchena, A. M., Fernandez-Bermejo, M., Mateos, J. M., Vara, D., Roncero, V.,… & Gonzalez, A. (2020). The melatonin receptor antagonist luzindole induces the activation of cellular stress responses and decreases viability of rat pancreatic stellate cells. *Journal of Applied Toxicology,* 40(11), 1554-1565. https://doi.org/10.1002/jat.4018

Haddad, C. F., Haddad, J. M., Veiga, E. C. D. A., Sorpreso, I. C. E., Simões, R. S., Baracat, E. C., & Soares Júnior, J. M. (2020). Melatonin and organ transplantation: what is the relationship? *Revista da Associação Médica Brasileira*, 66(3), 353-358. https://doi.org/10.1590/1806-9282.66.3.353

Kołodziejska, R., Woźniak, A., Bilski, R., Wesołowski, R., Kupczyk, D., Porzych, M., … & Pawluk, H. (2025). Melatonin—A Powerful Antioxidant in Neurodegenerative Diseases. *Antioxidants,* 14(7), 819. https://doi.org/10.3390/antiox14070819

Lopes, A. C. B. A., Peixe, T. S., Mesas, A. E., & Paoliello, M. M. B. (2015). Lead Exposure and Oxidative Stress: A Systematic Review. *Reviews Of Environmental Contamination And Toxicology,* 236, 193-238. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20013-2_3

Luo, F., Deng, Y., Angelov, B., & Angelova, A. (2025). Melatonin and the nervous system: nanomedicine perspectives. *Biomaterials Science*, 13(13), 3421-3446. https://doi.org/10.1039/d4bm01609b

Matos, R. S., Oriá, R. B., Bruin, P. F. C., Pinto, D. V., Viana, A. F. S. C., Santos, F. A., … & Bruin, V. M. S. (2021). Acute blockade of endogenous melatonin by Luzindole, with or without peripheral LPS injection, induces jejunal inflammation and morphological alterations in Swiss mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 54(11). https://doi.org/10.1590/1414-431x2021e11215

Suresh, C., Dennis, A. O., Heinz, J., Vemuri, M. C., & Chetty, C. S. (2006). Melatonin protection against lead-induced changes in human neuroblastoma cell cultures. *International journal of toxicology*, 25(6), 459–464. https://doi.org/10.1080/10915810600959576

Tordjman, S., Chokron, S., Delorme, R., Charrier, A., Bellissant, E., Jaafari, N., & Fougerou, C. (2017). Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. *Current Neuropharmacology*, *15*(3), 434-443. https://doi.org/10.2174/1570159x14666161228122115

Waseem, M., Sahu, U., Salman, M., Choudhury, A., Kar, S., Tabassum, H., & Parvez, S. (2017). Melatonin pre-treatment mitigates SHSY-5Y cells against oxaliplatin induced mitochondrial stress and apoptotic cell death. *Plos ONE*, *12*(7), e0180953. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180953