

————— *Artículo Original* —————

## **Nuevas perspectivas farmacológicas de la melatonina en el tratamiento de las patologías oculares**

JESÚS PINTOR

*Profesor Titular del Dept. de Bioquímica y Biología Molecular IV  
E. U. Óptica, Universidad Complutense de Madrid*

### **RESUMEN**

La melatonina, conocida neurohormona que participa en el control de los ciclos circadianos, presenta una nueva dimensión cuando es ensayada para el tratamiento de algunas patologías oculares. En Particular, la administración de esta neurohormona permite observar una clara y prolongada disminución de la presión intraocular en los modelos animales experimentales. Este hecho es relevante por cuanto el tratamiento de la patología denominada glaucoma se lleva a cabo por medio de fármacos que reducen la presión intraocular. Otro papel relevante que lleva a cabo esta sustancia es la aceleración de la cicatrización en las heridas corneales superficiales. Aplicada en forma de colirio, la melatonina acelera la cicatrización hasta en un 165%, por lo que también podría ser empleada para facilitar la cicatrización de heridas corneales o como complemento tras las operaciones de cirugía ocular.

**Palabras clave:** Cicatrización corneal.—Glaucoma.—Melatonina.—Presión intraocular.

### **ABSTRACT**

Melatonin is a neurohormone which participates in the control of circadian cycles. This substance presents a new dimension as a drug when it is assayed for the treatment of some ocular pathologies. In particular, the administration of this compound permits to observe a clear and sustained reduction in the intraocular pressure. This is relevant fact since most of the treatments of glaucoma are based on a reduction in the ocular pressure. Another role of melatonin is the acceleration

of the corneal wound healing. When topically applied, melatonin can accelerate the rate of re-epithelialisation up to 165 %, therefore this compound may be used to facilitate corneal wound healing or as a complementary drug after ocular surgery.

**Key words:** Corneal wound healing.—Galucoma.—Melatonin.—Intraocular pressure.

La melatonina es una neurohormona que media en los procesos de luz y oscuridad para sincronizar la fisiología celular de todos los organismos con el fotoperiodo (Bartness y Goldman, 1989). Esta sustancia es capaz de desempeñar tareas muy diversas aparte de la anteriormente citada. De hecho, se ha podido comprobar que la melatonina puede alterar los procesos de proliferación y diferenciación celular, se comporta como sustancia promotora del sueño e incluso puede funcionar como molécula protectora frente a los radicales libres (Benitez-King y col., 1990)

Las funciones que desempeña la melatonina están mediadas a través de receptores de membrana que pueden ser de 3 tipos:  $MT_1$ ,  $MT_2$  y  $MT_3$  (Dubocovich, 1995). Desde el punto de vista bioquímico los dos primeros se encuentran acoplados negativamente a la adenilato ciclasa, mientras que el  $MT_3$  parece estar acoplado a la fosfolipasa C (Mullins y col., 1997). Los receptores  $MT_1$  y  $MT_2$  han sido clonados de varias especies, sin embargo, el receptor  $MT_3$  aun no ha sido clonado y es el receptor del que se posee menos información, tanto estructural como funcional. Los intentos de clonar este receptor han sido hasta la fecha infructuosos puesto que al intentarlo se ha clonado el enzima quinona reductasa 2 (QR2) (Nosjean y col., 2000).

La melatonina y sus receptores se han encontrado en diversas estructuras oculares entre las que se puede destacar la retina, en donde puede modificar la fisiología visual (Vanecek, 1998). Un buen ejemplo de ello es comprobar como la melatonina afecta a la liberación de dopamina de las células amacrinas de la retina en el proceso de adaptación a la oscuridad (Blazynski & Dubocovich, 1991). También se sabe que regula el funcionamiento de las células ganglionares ya que se han identificado receptores en estas células.

Además de la retina, otra zona ocular relevante es la córnea, donde se han descrito receptores recientemente, sugiriendo algún

papel para esta neurohormona (Wiechman et al., 2004). También se ha visto que existen receptores para la melatonina en el cuerpo ciliar, como demuestran los trabajos presentados por el grupo de Osborne, y que han sido corroborados en el modelo *Xenopus laevis*, en donde se ha descrito la presencia de un receptor  $MT_2$  en las células del epitelio no pigmentado (Osborne & Chidlow, 1994). La presencia de éstos receptores sugiere que la melatonina pueda participar en la formación del humor acuoso y que por consiguiente tenga un papel relevante en el control de la presión intraocular.

### LA MELATONINA CONTROLA LA PRESIÓN INTRAOCULAR

La presión intraocular (PIO) es un proceso fisiológico que depende de la producción del humor acuoso en los procesos ciliares y de su drenaje por la malla trabecular. La PIO cambia a lo largo del día, siendo más elevada durante el día y menor durante la noche. Este comportamiento, que sigue un patrón circadiano, está regulado por la melatonina como así ha sido descrito en diversos modelos animales (Liu & Dacus, 1991). La presión intraocular esta gobernada por el sistema nervioso simpático y parasimpático. Se acepta como norma que el sistema nervioso simpático, a través del neurotransmisor adrenalina, regula la producción del humor acuoso en el cuerpo ciliar. Por el contrario, el sistema nervioso parasimpático controla la dinámica del humor acuoso a nivel de la malla trabecular, es decir, en uno de los principales lugares por donde drena del humor acuoso.

En la actualidad, hemos investigado cual es el papel de la melatonina en la presión intraocular en conejos albinos de Nueva Zelanda (Pintor y col., 2001). En este modelo, la aplicación tópica en forma de colirio de esta neurohormona o alguno de sus análogos, produce una disminución de la presión intraocular que es dependiente de la concentración (Pintor y col., 2001). En particular el compuesto 5-metoxicarbonilamino-N-acetilriptamina (5-MCA-NAT), presenta un efecto muy notable sobre la presión intraocular reduciéndola hasta más de un 40% (figura 1). Uno de los rasgos más sobresalientes de la acción del 5-MCA-NAT no es solo su eficacia disminuyendo la presión intraocular, sino la larga duración que se

obtiene con tan sólo una aplicación. Tanto es así que el efecto es superior a 8 horas (figura 1B). Desde el punto de vista farmacológico, el 5-MCA-NAT es un agonista del receptor de melatonina del tipo  $MT_3$  (Dubocovich, 1995). Este compuesto presenta un efecto más sostenido que la propia melatonina, que como se puede ver en la figura 1B, presenta un comportamiento de tipo transitorio. Las características extraordinarias del 5-MCA-NAT sugieren a este com-

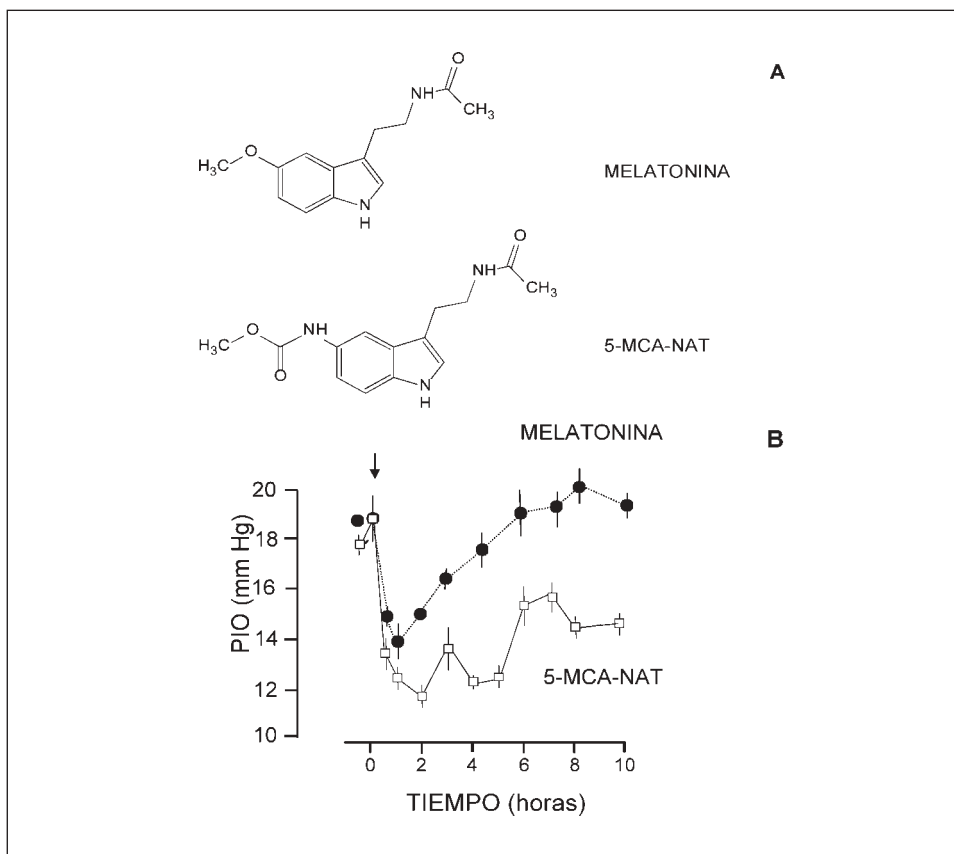


FIGURA 1. Efecto de la melatonina y el 5-MCA-NAT sobre la presión intraocular.

1A. Estructura de la melatonina y de su análogo el 5-MCA-NAT (5-metoxi carbonilamino N acetil triptamina).

1B. Efecto de la melatonina y el 5-MCA-NAT (100  $\mu$ M) sobre la presión intra-ocular (PIO) en conejos albinos. La flecha indica el momento en el que se aplica la correspondiente sustancia.

puesto como posible fármaco para el tratamiento de la hipertensión ocular, motivo por el cual hemos solicitado una patente nacional, otra USA y una tercera Internacional (PCT) sobre esta invención.

Durante los últimos años hemos podido estudiar no solamente el comportamiento de la melatonina y el 5-MCA-NAT sino que hemos estudiado todo el conjunto de análogos de la melatonina disponibles comercialmente (Pintor y col., 2001). Con todos estos estudios farmacológicos y con el empleo de antagonistas selectivos, ha sido posible determinar que el receptor encargado de reducir la presión intraocular es del tipo  $MT_3$  (Pintor y col., 2003). La conclusión general de nuestros experimentos es la existencia de un receptor del tipo  $MT_3$  que reduce la presión intraocular, sin embargo hasta la fecha se desconoce su ubicación y que proceso de la dinámica del humor acuoso controla, si bien la producción o drenaje.

Pese a desconocer en qué lugar actúa la melatonina, sí poseemos información preliminar sobre la relación entre la activación del receptor  $MT_3$  y las terminales nerviosas colinérgicas y noradrenérgicas que controlan la dinámica del humor acuoso.

La aplicación de antagonistas nicotínicos y muscarínicos, así como de antagonistas  $\alpha_2$  y  $\beta_2$ , producen un aumento de la presión intraocular en ausencia de melatonina o análogos. Cuando se combinan los mencionados antagonistas con los agonistas melatoninérgicos, se puede apreciar una disminución sustancial del efecto de la melatonina y del 5-MCA-NAT, que pueden oscilar entre un 12 y un 25 %. Este hecho sugiere la posible conexión entre el efecto de la melatonina y la inervación que controla la producción y/o drenaje del humor acuoso (Pintor y col., 2003).

Un punto en el cual puede estar actuando la melatonina son las terminales colinérgicas que facilitan la evacuación del humor acuoso, ya que la liberación de este neurotransmisor disminuye la presión intraocular. En este caso la melatonina facilitaría la liberación de más acetilcolina (ACh) de dichas terminales, tal y como sucede en otras áreas como en el *nucleus acumbens* donde los niveles de ACh aumentan tras la estimulación con melatonina. No obstante, no podemos olvidar que la melatonina podría actuar de manera semejante con el sistema nervioso simpático. En cualquier caso, el grado de inhibición obtenido con los antagonistas adrenérgicos y colinérgicos

gicos no es completo por lo que la melatonina probablemente este actuando también de manera directa sobre el mecanismo de producción o el de drenaje del humor acuoso.

Recientemente ha sido publicado un artículo en el cual se describe el efecto de la melatonina y sus análogos en un modelo más adaptado al tratamiento del glaucoma. En particular, los investigadores, trabajando con un modelo de mono glaucomatoso, demostraron que tanto la melatonina como el 5-MCA-NAT disminuían la presión intraocular en los mencionados monos. Este hecho es extraordinariamente relevante puesto que de un modo claro está poniendo de manifiesto la eficacia de estos compuestos en un modelo muy próximo al hombre (Serle y col., 2004).

### **LA MELATONINA ACELERA LA CICATRIZACIÓN CORNEAL**

El epitelio corneal, al ser la parte más superficial del ojo, se encuentra expuesto a muchas agresiones. Algunas de ellas son fortuitas, como la entrada en el ojo de un cuerpo extraño, o la lesión que puede producir una lente de contacto en mal estado. En otros casos las operaciones de cirugía refractiva, tan de moda en la actualidad, lesionan temporalmente la córnea. Sea cual sea el origen de la lesión, la córnea debe repararse rápidamente para que el ojo no tenga riesgo de contraer infecciones y para que igualmente el individuo afectado recupere su visión.

No existe en la actualidad ningún fármaco que tenga propiedades reepitelizantes. La mayoría de los preparados actuales se encargan de prevenir las posibles infecciones de la superficie ocular, pero no aceleran la velocidad con la que se repara el epitelio corneal después de una lesión.

Nuestros estudios realizados en conejos de albinos, muestran que cuando se realiza una lesión en la superficie y se instila la melatonina, la velocidad con la que cicatriza (se reepiteliza) la superficie corneal se acelera respecto al animal sin tratar. Así por ejemplo en los animales control, una herida de 3 mm de diámetro tarda en cicatrizar 29 horas, mientras que la herida tratada con melatonina (10 nmoles), cicatriza en tan sólo 20 horas. Tal diferen-

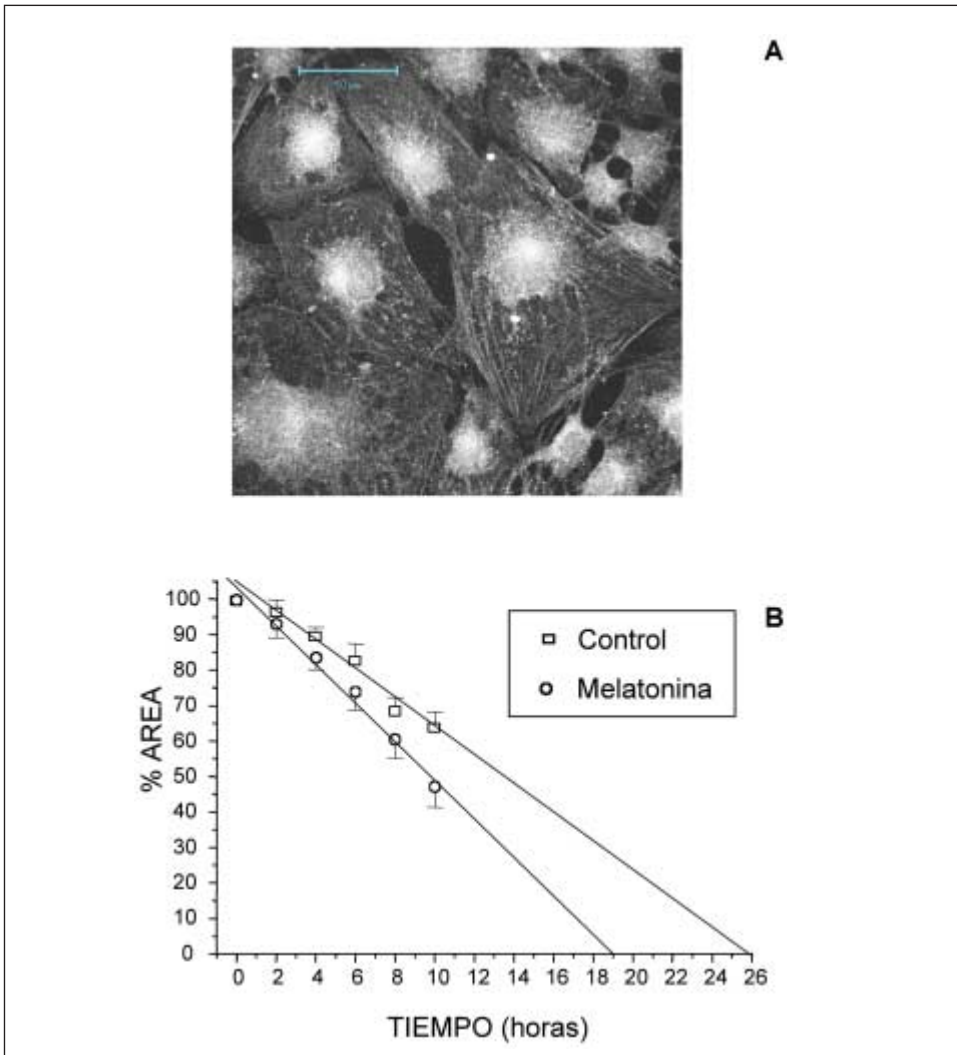


FIGURA 2. Efecto de la melatonina sobre las células del epitelio corneal.

2A. Identificación de las células del epitelio corneal en cultivo primario. El marcaje fue realizado incubando el anticuerpo frente a la citoqueratina 3, que es específico para el epitelio corneal. Esta imagen está tomada con un microscopio confocal Zeiss Axiovert 200, equipado con un modulo LSM Pascal y el objetivo 63x.

2B. Efecto de la melatonina sobre la velocidad de cicatrización corneal. Se puede observar como la velocidad de cicatrización en presencia de melatonina 100  $\mu\text{M}$  es superior a la que se obtiene en ausencia de la sustancia (control).

cia puede deberse a la activación de receptores de melatonina cuyo efecto fisiológico sea el aumento de la velocidad de migración celular en aquellas células que se encuentran en el entorno de la lesión. Una estimación de la velocidad con la que migran las células epiteliales corneales indica que en presencia de melatonina la velocidad es de unas 110  $\mu\text{m}/\text{hora}$ , mientras que en ausencia de esta sustancia (condiciones control) la velocidad de cicatrización corneal es de 75  $\mu\text{m}/\text{h}$ .

Un aspecto interesante ha sido comprobar cómo el antagonista de los receptores de melatonina, luzindol, puede abolir el efecto reepitelizador de la neurohormona, reduciendo la velocidad de cicatrización a 52  $\mu\text{m}/\text{h}$ . En la actualidad se ha descrito la presencia de alguno de los receptores de melatonina en el epitelio corneal. Estos estudios, que son todavía preliminares, no arrojan información sobre el papel fisiológico que podrían desempeñar los mismos sobre el funcionamiento de estas células. Tal vez la propiedad reepitelizadora de la melatonina aquí descrita sea uno de los efectos mediados por éstos receptores (Meyer y col., 2002).

Por medio de cultivos celulares primarios obtenidos a partir de córneas de conejos, hemos podido repetir estos experimentos *in vitro*. Este modelo experimental permite obtener cultivos monocapa que mantienen las principales características morfológicas de las células y que se pueden identificar como tales por medio del anticuerpo frente a la citoquetratina 3 (figura 2A). Cuando se repiten los experimentos de cicatrización en los cultivos, es posible observar un comportamiento similar al que se obtiene con el animal completo. Así, y tal y como se muestra en la figura 2B, la melatonina es capaz de acelerar la reepitelización hasta unas 7 horas cuando se compara con el control. Por consiguiente y como conclusión, podemos decir que la melatonina, tanto *in vivo* como *in vitro* es capaz de acelerar la migración celular y cicatrizar más rápidamente las lesiones corneales superficiales.

## CONCLUSIONES

Pese a que la melatonina es una neurohormona bien conocida por su papel en el control y regulación de los ciclos circadianos, se abre



una nueva perspectiva para la misma fundamentada en su utilización como agente farmacológico en determinadas patologías oculares. Ya bien sea la melatonina o alguno de sus análogos sintéticos como el 5-MCA-NAT, estas moléculas parecen muy efectivas en el tratamiento de la hipertensión ocular y el glaucoma por un lado y en la cicatrización corneal por otro. Queda un camino largo hasta que logremos comprender cuáles son los mecanismos moleculares que generan los efectos aquí descritos, las estructuras oculares en las cuales se encuentran sus receptores, así como el analizar si la melatonina puede tener alguna otra aplicación como agente terapéutico ocular.

Este trabajo ha sido financiado por un proyecto del Ministerio de Educación y Ciencia de referencia DGICYT SAF2004-06119-C02-01.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) BARTNESS, T. J.; GOLDMAN, B. D. (1989): Mammalian pineal melatonin: a clock for all seasons. *Experientia*; 45(10): 939-45.
- (2) BENITEZ-KING, G.; HUERTO-DELGADILLO, L.; ANTON-TAY, F. (1990): Melatonin effects on the cytoskeletal organization of MDCK and neuroblastoma N1E-115 cells. *J-Pineal-Res.*; 9(3): 209-20.
- (3) BLAZYNSKI, C. AND DUBOCOVICH, M. L. (1991): Localization of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in mammalian retina. *J. Neurochem*; 56, 1873-1880.
- (4) DUBOCOVICH, M. L. (1995): Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends-Pharmacol-Sci.* Feb; 16(2): 50-6.
- (5) LIU, J. H.; DACUS, A. C. (1991): Aqueous humor cyclic AMP and circadian elevation of intraocular pressure in rabbits. *Curr-Eye-Res.*; 10(12): 1175-1177.
- (6) MULLINS, U. L.; FERNANDES, P. B. & EISON, A. S. (1997): Melatonin agonist induce phosphoinositide hydrolysis in *Xenopus laevis* melanophores. *Cell Signal.*; 9, 169-173.
- (7) NOSJEAN, O.; FERRO, M.; COGE, F.; BEAUVERGER, P.; HENLIN, J. M.; LEFOULON, F.; FAUCHERE, J. L.; DELAGRANGE, P.; CANET, E.; BOUTIN, J. A. (2000): Identification of the melatonin-binding site MT<sub>3</sub> as the quinone reductase 2. *J-Biol-Chem.* 6; 275(40): 31311-31317.
- (8) OSBORNE, N. N. AND CHIDLOW, G. (1994): The presence of functional melatonin receptors in the iris-ciliary processes of the rabbit eye. *Exp.Eye.Res.* 59 (1), 3-9.
- (9) PINTOR, J.; MARTÍN, L.; PELÁEZ, T.; HOYLE, C. H. V. & PERAL, A. (2001): Involvement of melatonin MT<sub>3</sub> receptors in the regulation of intraocular pressure in rabbits. *Eur. J. Pharmacol.*; 416, 251-254.
- (10) PINTOR, J.; PELÁEZ, T.; HOYLE, C. H. V. AND PERAL, A. (2003): Ocular hypotensive effects of melatonin receptor agonists in the rabbit: further evidence for an MT<sub>3</sub> receptor. *Brit. J. Pharmacol.*, 138, 831-836.