

00346

10  
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**"Efecto de la melatonina en la  
expresión de tubulina en células  
de neuroblastoma NIE - 115"**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO  
ACADEMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS  
(BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A:

**JORGE MELENDEZ ZAJGLA**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

DIRECTOR DE TESIS: DR. ARTURO ORTEGA SOTO

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **AGRADECIMIENTOS:**

**Al Dr. Saúl Villa por todo su apoyo.**

**A los miembros del jurado del examen de grado, por su tiempo y sus  
valiosos comentarios.**

**Al Dr. Arturo Ortega Soto por su guía y apoyo.**

**A Vilma Maldonado.**

**A mis padres y hermanos.**

**Miembros del jurado para el examen de grado:**

**Dr. Víctor Manuel Valdés López.**

**Dr. Arturo Ortega Soto.**

**Dra. Gloria Benítez King.**

**Dr. Héctor Enrique Pérez Reyes.**

**Dr. Saúl Villa Treviño.**

**Dra. Annie Pardo Semo.**

**Dra. René de Jesús Cárdenas Vázquez.**

## INDICE:

### INTRODUCCION

Generalidades .....	1
Traducción del fotoperíodo a un mensajero químico.....	2
-La glándula pineal como un transductor neuroendócrino.....	2
-Síntesis de melatonina.....	4
Vía de síntesis de melatonina.....	4
Regulación de la síntesis de melatonina.....	5
A) Receptores adrenérgicos.....	5
B) Papel de los nucleótidos cíclicos en regulación.....	5
Sitios extrapineales de síntesis de melatonina.....	7
Transferencia de la expresión química del fotoperíodo al.....	8
organismo	
Distribución de la melatonina.....	8
Efectos fisiológicos de la melatonina.....	9
Mecanismo de acción de la hormona.....	10
Sitios de acción membranales.....	11
Sitios de acción citosólicos.....	13
Sitios de acción nucleares.....	17
Otros sitios de acción.....	18
Mecanismos de regulación de proteínas del citoesqueleto. ....	20
Regulación de la expresión de $\beta$ tubulina.....	20
Regulación de la expresión de MAP2.....	22
ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION.....	24
OBJETIVOS E HIPOTESIS.....	25-26
MATERIAL Y METODOS.....	27
Cultivo celular e inmunofluorescencia.....	27
Cuantificación de $\beta$ tubulina en diversas fracciones.....	28
Cuantificación del ARN mensajero de $\beta$ tubulina.....	34
Curvas de proliferación.....	36

RESULTADOS.....	38
DISCUSION.....	51
Expresión de $\beta$ tubulina.....	51
Expresión de MAP2.....	53
Efectos sobre la proliferación celular.....	56
CONCLUSION.....	58
BIBLIOGRAFIA.....	58

## RESUMEN.

Durante la evolución, los animales han adquirido mecanismos que aseguran su habilidad para sobrevivir bajo la mayor parte de los extremos climáticos y ambientales. Una de estas adaptaciones es aquella relacionada con los cambios cíclicos en la luz del ambiente, denominado fotoperiodo. Los animales fotoperiódicos utilizan sus retinas para proveer a sus cerebros con la información acerca de los cambios estacionales en la duración del día, mediante un sistema neuroendócrino altamente especializado. A partir de la retina se generan señales, por medio de fibras nerviosas, hasta una estructura diferenciada, la glándula pineal, situada en el sistema nervioso central. Esta glándula es la encargada de traducir el mensaje fotoperiódico a una señal química que pueda ser captada por el resto del organismo. De esta forma, un órgano específico puede iniciar ajustes fisiológicos de manera adelantada a cuando se requiera un cambio profundo. El mensajero químico capaz de realizar estas y otras muchas funciones acopladas con el fotoperiodo es la hormona melatonina (5-metoxi-N-acetilriptamina). Esta hormona es capaz de inducir la serie de cambios cíclicos requeridos en los animales durante el paso de las estaciones, e incluso se han descrito efectos sobre organismos que van desde vertebrados superiores a organismos unicelulares. Una vez que la glándula pineal ha producido melatonina, ésta es rápidamente liberada al torrente sanguíneo. La hormona es altamente lipofílica, por lo que todos los líquidos corporales la presentan y todas las células están expuestas al ritmo circadiano de la hormona. Varios sitios anatómicos y celulares se han propuesto como el blanco principal de la hormona, siendo el sistema nervioso central el más aceptado.

El área más oscura de la investigación sobre la melatonina es la manera en la cual la hormona actúa sobre las células expuestas a la misma. La mayor parte de los estudios parecen apuntar hacia la presencia de un receptor específico, probablemente membranal, que medía la acción de la hormona, aunque se ha sugerido que existan otros eventos no mediados por receptor. Recientemente ha sido clonado un posible receptor membranal para la hormona, el cual posee siete dominios hidrofóbicos transmembranales, y que pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G. Además, se ha establecido que la melatonina es capaz de unirse y activar a un receptor nuclear huérfano, perteneciente a la familia de los receptores para ácido retinóico, el RZR $\beta$ .

Más allá de la presencia y caracterización de receptores, poco se ha logrado en cuanto a su mecanismo de acción. La melatonina disminuye los niveles de AMP cíclico e incrementa los de GMP cíclico al administrarse a cultivos de hipotálamo de rata. Otro de los probables mecanismos de acción es el concerniente a la vía de transducción mediada por calcio. El calcio es un segundo mensajero que utiliza a la calmodulina como efector de su señal. Esta proteína sufre un cambio de conformación al unirse al calcio, lo que le permite efectuar una serie de interacciones directas sobre diversas enzimas y proteínas estructurales para modificar su actividad y/o estructura. La melatonina es capaz de asociarse a la calmodulina de manera específica, reversible y saturable, con una alta afinidad, lo cual hace pensar que esta proteína podría tratarse de un receptor a la hormona.

Otro de los efectos ampliamente estudiados de la melatonina es su acción

sobre el citoesqueleto celular, básicamente sobre el estado de polimerización de la tubulina. A este respecto, existen reportes contradictorios: una serie de publicaciones establecen que la melatonina es capaz de producir elongación de microtúbulos en diversos sistemas, mientras que algunos otros reportan lo contrario. Para explicar estas divergencias, se ha sugerido que los efectos observados de la hormona dependen de la concentración de la misma. En el caso de los efectos polimerizantes de la hormona, ésta fué utilizada a dosis bajas ( $10^{-11}$  a  $10^{-9}$  M), de manera más cercana a la concentración fisiológica de ella. Por el contrario, dosis farmacológicas elevadas ( $10^{-6}$  a  $10^{-4}$  M) produjeron los efectos despolimerizantes antes descritos. De esta manera, es posible pensar que el efecto polimerizante sea más importante en un contexto fisiológico, y sea muy probablemente dependiente de la presencia de uno o varios receptores específicos, mientras que dosis farmacológicas más elevadas induzcan efectos no dependientes de sitios de unión de alta afinidad, sino de interacciones poco específicas.

La tubulina es el principal componente de los microtúbulos, y existe formando un heterodímero de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que se encuentran en un equilibrio dinámico con su contraparte polimerizada. La síntesis de la tubulina se encuentra estrechamente acoplada al estado de polimerización del microtúbulo. Al aumentar la concentración de las subunidades de tubulina, por ejemplo, mediante despolimerización de los microtúbulos por diversas drogas, o mediante microinyección de subunidades de tubulina no ensambladas, lleva a una rápida y específica inhibición de la síntesis de tubulina  $\alpha$  y  $\beta$ , causada por una disminución en los niveles del ARN mensajero de tubulina. En un estudio realizado en 1990, se demostró que la administración de la hormona melatonina, a concentraciones fisiológicas, a un cultivo de células de neuroblastoma murino NIE-115, era capaz de inducir incremento de 100% en el número de células con neuritas, hacia el tercer día. Es generalmente aceptado que la elongación de neuritas es un proceso que se logra a través del crecimiento de microtúbulos, mediante la colaboración de una serie de proteínas asociadas a microtúbulos (MAP). Por otro lado, no se han efectuado estudios directos del efecto de la melatonina sobre el estado de polimerización de la tubulina, sino que únicamente se han relacionado procesos que se sabe son dependientes de esta o se ha visualizado la estructura microtubular en diversos modelos.

Dado a que se conoce que la administración de la hormona melatonina es capaz de inducir el crecimiento de neuritas en células NIE-115, y que, en otros modelos, este proceso se asocia a cambios en la expresión de  $\beta$  tubulina, el presente estudio se realizó con el fin de investigar la posibilidad de la existencia de cambios en la expresión de esta proteína durante la elongación de procesos celulares provocada por la hormona y si estos cambios podrían explicarse mediante el modelo propuesto de autoregulación cotraduccional, realizando, además, un primer intento de profundización en algunos de los posibles mecanismos mediante los cuales la tales efectos se realizan.

Hacia el tercer día en cultivo, las células tratadas con la hormona presentan microtúbulos más engrosados, al compararlas con su contraparte tratada

únicamente con vehículo. Se realizaron cursos temporales administrando la hormona; se estabilizaron los microtúbulos y se extrajo la fracción proteica soluble, los restos celulares remanentes, en los que se encuentra la fracción polimerizada, fueron solubilizados, para realizar un ensayo de inmunocuantificación ("Western Blot") relativo. Los niveles de  $\beta$ -tubulina polimerizada sufrieron un incremento en células tratadas con vehículo o con melatonina, con un pico máximo al segundo día de cultivo. Sin embargo, en el caso de las células tratadas con la hormona, este incremento fué mucho más notable, excediendo no sólo el nivel, sino la duración del aumento, presentándose el fenómeno hasta el tercer día. Los niveles de proteína soluble no sufrieron modificaciones importantes en el caso de las células tratadas con vehículo, permaneciendo constantes durante todo el curso temporal. En cambio, las células tratadas con la hormona presentaron un incremento gradual en estos niveles, con un máximo al cuarto día del cultivo .

Se ha propuesto un mecanismo autoregulatorio para la expresión de  $\beta$ -tubulina, en el que los niveles del ARN mensajero dependen de los cambios de concentración de las subunidades libres de tubulina, que a su vez determina la expresión última de la proteína. De ser así, se esperaría que existiera un incremento en esos niveles durante los primeros tiempos, dado a que en esos tiempos probablemente se presenta síntesis activa, hasta cierto umbral de concentración, a partir del cual los niveles disminuyeran de manera importante por el incremento en la cantidad de subunidades libres. Para analizar esta posibilidad, se procedió a realizar la cuantificación del ARN mensajero de  $\beta$ -tubulina, mediante la técnica de "Northern Blot". De manera no esperada, se presentaron cambios poco notables en la expresión. A continuación se procedió a analizar los niveles totales de la  $\beta$ -tubulina, mediante inmunocuantificación ("Western Blot"). Los niveles no sufren cambios dramáticos, pese a ello, se denota una diferencia de expresión final (72 a 120 horas) de esta proteína en el caso de las células tratadas con la hormona. En ambos casos (tratadas con melatonina y blanco) existió un incremento en la expresión total de la proteína, probablemente como reflejo del crecimiento de neuritas en ambos.

Dado a que se conoce que el proceso de elongación de dendritas depende de la polimerización de tubulina y que esta, a su vez, es dependiente de la función de proteínas asociadas a microtúbulos, particularmente de la MAP2, se procedió a analizar los niveles de esta. se procedió a analizar los niveles mediante un ensayo de inmunocuantificación ("Western Blot"). Mediante este ensayo, se observó un incremento pequeño en la expresión de esta proteína en las células tratadas con la hormona, durante los primeros tiempos, y, de manera más importante, la persistencia de la expresión en puntos temporales posteriores al descenso experimentado en los cultivos tratados con vehículo. Este efecto se hizo patente a partir de las 48 horas postratamiento, momento en que los niveles comienzan a disminuir en las células blanco.

De esta manera, podemos concluir que, en este modelo, la melatonina ejerce efectos polimerizantes sobre la  $\beta$  tubulina, que reflejan el mayor crecimiento de neuritas previamente reportado y que no existe una profunda participación del fenómeno de autorregulación cotraduccional,

probablemente como reflejo de un estrecha homeostasis del mismo de manera fisiológica. Estos efectos pueden ser debidos a los importantes cambios de expresión hallados en la MAP2, proteína estrechamente relacionada con el crecimiento de neuritas.

## INTRODUCCION

### Generalidades

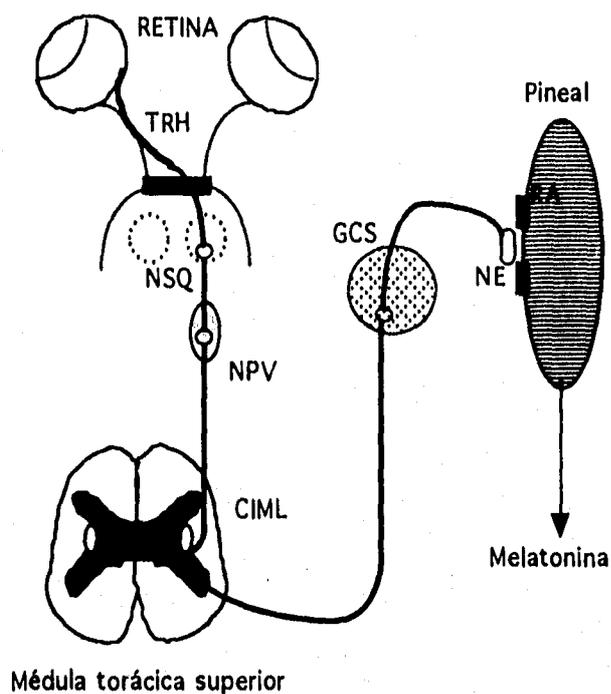
Durante la evolución, los animales han adquirido mecanismos para sobrevivir bajo la mayor parte de los extremos climáticos y ambientales. Una de las adaptaciones más importantes es aquella relacionada con los cambios cíclicos en la luz del ambiente, denominado fotoperíodo. La elección del fotoperíodo para este fin se debe al hecho de que se trata del parámetro que con mayor exactitud señala el paso de estaciones. Los mamíferos que utilizan este tipo de información para regular sus órganos internos son descritos como fotoperiódicos. La retina es uno de los elementos que mamíferos fotoperiódicos utilizan para informar a sus cerebros acerca de los cambios estacionales en la duración del día. A partir de este órgano se generan señales, por medio de fibras nerviosas, hasta una estructura diferenciada del sistema nervioso central, la glándula pineal (Moore y Klein, 1974). Esta glándula es la encargada de traducir el mensaje fotoperiódico a una señal química que pueda ser captada por el resto del organismo (Reiter, R.J., 1993b). En esencia, la glándula pineal es la intermediaria entre el fotoperíodo externo y el medio interno. Una pinealectomía quirúrgica es capaz de convertir a los mamíferos en animales que no responden ante el cambio de estaciones, situación que es revertida mediante la administración de melatonina (Warren, et al., 1993). La glándula pineal no solo debe proporcionar información acerca de la duración absoluta del día (o la noche), sino que también debe indicar a todos los órganos el cambio relativo de esta duración. De esta forma, un órgano específico puede iniciar ajustes fisiológicos de manera adelantada a cuando se requiera un cambio profundo. El mensajero químico que realiza estas y otras muchas funciones acopladas con el fotoperíodo es la hormona melatonina (5-metoxi-N-acetilriptamina), descubierta por Lerner y colaboradores en 1958 (Lerner, et al., 1958). Esta

hormona es capaz de inducir la serie de cambios cíclicos requeridos en los mamíferos durante el paso de las estaciones, e incluso se han descrito efectos sobre organismos que van desde vertebrados superiores a organismos unicelulares (Cardinalli, 1981, Vivien-Roels y Pévet, 1993, Hardeland, *et al.* 1993, 1994, Poeggeler, *et al.* 1994). Están descritos innumerables efectos del fotoperíodo sobre parámetros fisiológicos; por ejemplo, en muchos mamíferos, las fluctuaciones anuales en el potencial reproductivo y termoregulación están ligadas a la información fotoperiódica recibida y a los niveles de melatonina circulante (Saarela y Reiter, 1994; Eldon, 1993)

### **Traducción de la información del fotoperíodo a un mensajero químico.**

#### **LA GLANDULA PINEAL COMO UN TRANSDUCTOR NEUROENDOCRINO.**

La información de luz/oscuridad se traduce a un mensajero químico en la glándula pineal. Los núcleos supraquiasmáticos (NSQ), situados en el hipotálamo anterior, en la base del cerebro, envían fibras eferentes postganglionares adrenérgicas a la glándula pineal por medio de neuronas localizadas en los núcleos paraventriculares, la columna celular intermediolateral y en los ganglios cervicales superiores. (Reiter, 1981, Moore, 1974) (figura 1). Los NSQ poseen un reloj circadiano que genera un ritmo de síntesis de melatonina con una periodicidad de un poco más de 24 horas. Normalmente, en ausencia de luz, los NSQ envían señales que activan la síntesis de melatonina. Durante el día la luz percibida por los ojos llega, vía el tracto retinohipotalámico, a los NSQ, inhibiendo su acción (Reiter, 1993b). El tracto retinohipotalámico proviene de células ganglionares de la retina, pasando hacia los NSQ a través de los nervios ópticos. El neurotransmisor en la interface de ambas regiones es muy probablemente el glutamato (Reiter, 1993b).



**FIGURA 1.** Esquema simplificado de las conexiones neuronales entre la retina y la glándula pineal. TRH: Tracto retinohipotalámico. NSQ: Núcleo supraquiasmático. NPV: Núcleo paraventricular. CIML: Columna intermediolateral. GCS: Ganglio cervical superior. NE: norepinefrina. RA: Receptores adrenérgicos.

La actividad sintética y secretoria de la glándula pineal está determinada básicamente por la liberación de norepinefrina (Axelrod, 1974), de las fibras postganglionares descritas previamente. La liberación de norepinefrina está estrictamente asociada a la oscuridad, cuando el núcleo supraquiasmático es relevado de las señales inhibitorias percibidas por los

ojos, debido a la interacción de los fotones con la retina. Así como la liberación de norepinefrina hacia los pinealocitos ocurre exclusivamente de noche, la síntesis de melatonina ocurre primariamente durante la oscuridad. Esta expresión nocturna de la síntesis de melatonina es típica de los mamíferos e incluso de todos los vertebrados, sin importar su patrón de comportamiento locomotor y de alimentación (Gern y Nervina, 1986 ).

Recientemente se identificó un segundo reloj circadiano en retina de mamíferos (Tosini y Menaker, 1996). La retina posee un ritmo de secreción de melatonina, el cual es modificado por la incidencia de luz. Al parecer, la secreción de melatonina en este tejido podría regular funciones visuales como la regeneración de conos y bastones, de una manera local.

## SINTESIS DE MELATONINA

### Vía de síntesis de melatonina

La producción de la hormona surge a partir del precursor 5-hidroxitriptamina (serotonina), un neurotransmisor, el cual, mediante la enzima N-acetiltransferasa (NAT), es acetilada. Este sustrato es metilado por la enzima hidroxindol-O-metiltransferasa, para obtener finalmente a la melatonina (figura 2). La enzima limitante de esta reacción es la N-acetiltransferasa.

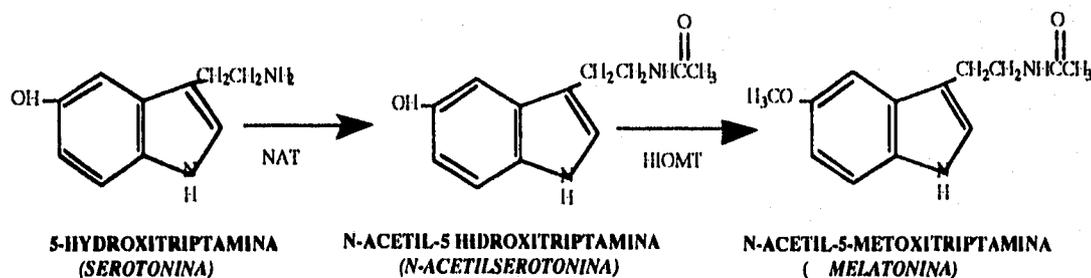


FIGURA 2: Vía de síntesis de la Melatonina.

## Regulación de la síntesis de melatonina

### A) Receptores adrenérgicos

Los mecanismos de traducción de la señal que gobiernan la producción de melatonina, involucran tanto receptores adrenérgicos  $\alpha$  como  $\beta$  de la membrana del pinealocito. La densidad de estos receptores presenta ritmos de 24 hr (Pangerl, *et al.*, 1990); se considera que estas fluctuaciones son determinadas por la misma norepinefrina, la cual, al liberarse, provoca la desensibilización o internalización de estos receptores (Romero, *et al.*, 1975; Gonzalez-Brito, *et al.*, 1988).

### B) Papel de los nucleótidos cíclicos en la regulación de la síntesis de melatonina.

La participación de dos receptores diferentes en la regulación de segundos mensajeros, como en este caso, es un fenómeno común en muchos tipos celulares. La activación de estos receptores produce un incremento de AMP cíclico en los pinealocitos, fenómeno requerido para el aumento de la producción nocturna de melatonina (Axelrod, 1974; Klein, *et al.*, 1981). Además, otro nucleótido cíclico, GMP, también se eleva en la glándula pineal de rata durante la noche, como consecuencia de la activación de receptores adrenérgicos (Klein, 1985), aunque su significado fisiológico permanece desconocido.

La importancia relativa de los mecanismos  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos sobre la estimulación de la producción de AMP cíclico ha sido investigada ampliamente. La estimulación  $\beta$  adrenérgica en el pinealocito provoca un aumento del AMP cíclico intracelular debido al incremento de la actividad de la adenilato ciclasa (O'Dea y Zatz, 1976). La activación de los receptores  $\beta$  adrenérgicos por separado induce un incremento de 10 veces del AMP

cíclico; sin embargo, la estimulación de los receptores  $\alpha$  adrenérgicos no produce ningún cambio en la acumulación de nucleótidos cíclicos. (Vanecek, *et al.*, 1985) Sin embargo, al activar ambos receptores por norepinefrina, la acumulación de AMP cíclico es potenciada hasta llegar a 100 veces el valor inicial (Klein, 1985). Por lo tanto, la activación de receptores  $\beta$  adrenérgicos es un requerimiento indispensable para la acumulación del nucleótido, siendo los receptores alfa amplificadores del efecto.

La regulación dual del AMPc por estos receptores también se traduce en una estimulación similar (por receptores  $\beta$  adrenérgicos) y una potenciación (por receptores alfa) sobre la actividad de la enzima NAT (Klein, *et al.*, 1981), así como de la misma melatonina (Santana, *et al.*, 1989).

Se ha demostrado que una proteína que une GTP (proteína G) también se encuentra involucrada en la estimulación adrenérgica de la adenilato ciclasa (Sugden, 1989, Ho, *et al.*, 1987). Algunos estudios han ayudado a clarificar los mecanismos mediante los cuales los receptores alfa adrenérgicos potencian la producción de AMP cíclico. La estimulación de los receptores alfa adrenérgicos incrementan tanto el diacilglicerol como el calcio intracelular; estos dos procesos, de una manera sinérgica, estimulan a la protein cinasa C (PKC) (Sugden, 1989). La activación resultante de la PKC aumenta a su vez la eficiencia de activación de la adenilato ciclasa, probablemente a través de su fosforilación.

Los mecanismos de aumento en la actividad de la NAT y de la melatonina, posteriores a este incremento de AMP cíclico, son menos conocidos. La rapidez con que estos procesos se presentan, varía grandemente entre diversas especies. En la glándula pineal de criceto sirio, el incremento nocturno de AMP cíclico y de la síntesis del ARN mensajero de NAT, precede, por varias horas, a la expresión máxima de la actividad de la enzima y del incremento de la melatonina intracelular. En este animal, la

melatonina pineal tiene su pico máximo de manera breve, ocurriendo de manera tardía en la fase oscura, aproximadamente 8 horas después del inicio de la noche. Sin embargo, el incremento del AMP cíclico y del ARN mensajero de la NAT ocurre durante las primeras 4 horas de la oscuridad, mucho antes de los picos de la enzima y hormona y en coincidencia con la liberación inicial de la norepinefrina (Reiter, 1990). Estos resultados obtenidos en el criceto sirio contrastan con los de otras especies, en donde la liberación de norepinefrina lleva a rápidos incrementos en el AMP cíclico, actividad de la enzima y producción de la hormona. Estas diferencias en la velocidad mediante la cual los eventos entre la estimulación por norepinefrina y el aumento de la melatonina parecen ser los determinantes de la diferencia entre los patrones de actividad de la enzima entre diversas especies. A pesar de esto, los niveles séricos de la hormona son muy parecidos, sin importar la especie en estudio.

La secreción de la melatonina por la glándula pineal parece seguir diversos patrones, de acuerdo a la especie, sin embargo, a pesar de estos patrones, el incremento en los niveles de la hormona siempre es nocturno. Más aún, la duración de la elevación es proporcional a la duración del periodo de oscuridad, así que las noches largas (fotoperíodos invernales) se reflejan sobre incrementos más pronunciados de la melatonina. Los mecanismos moleculares que permiten a la glándula pineal realizar ajustes de acuerdo a los periodos de luz y oscuridad son desconocidos.

#### Sitios extrapineales de síntesis de melatonina

Existen diversos sitios reportados, fuera de la glándula pineal, en donde existe síntesis de la hormona. Entre ellos se encuentra: la retina (Nowak, 1989), la cóclea (Biesalski, *et. al.*, 1988), y el intestino (Huether, 1993). De estos, el que produce una cantidad mayor es el intestino, cuyo

contenido es mayor que en otros órganos, incluyendo a la misma pineal. Se piensa que la melatonina producida por este órgano es la encargada de mantener los niveles séricos basales (Huether, 1993).

**Transferencia de la expresión química del fotoperíodo al organismo.**

#### DISTRIBUCION DE LA MELATONINA

La melatonina producida es rápidamente liberada al torrente sanguíneo. Además de una liberación circadiana (siguiendo directamente al fotoperíodo), se ha encontrado un ritmo ultradiano (de acuerdo a la estación) (Reiter, 1990) El significado funcional de la liberación episódica de la hormona no ha sido determinado, aunque estos cambios son importantes para sus efectos finales.

Como reflejo de su rápida liberación a partir de la glándula pineal, los niveles séricos de la melatonina siguen de manera estrecha su tasa de producción (Reiter, 1990). La hormona es altamente lipofílica, lo cual probablemente explique su rápida liberación y el hecho de que existe una transferencia veloz hacia otros flúidos; todos los líquidos corporales probados hasta la fecha han sido positivos para su presencia. De esta manera, su presencia se ha reportado en el líquido cefalorraquídeo (Hedlund, *et. al.*, 1976), saliva (Vakkuri, 1985), líquido folicular ovárico, (Brzezinski, *et. al.*, 1987) líquido seminal masculino, flúido de la cámara anterior del ojo (Yu, *et. al.*, 1990), leche y flúido amniótico (Kennaway y Hugel, 1992). Es típico que en cada compartimiento exista un ritmo circadiano en sus niveles, que es, a la vez, un reflejo exacto del encontrado en la sangre. Mientras que se piensa que la presencia de la hormona en líquidos diferentes a la sangre se debe a la transferencia pasiva por capilares del órgano en cuestión, los niveles en el

líquido folicular y ocasionalmente en el cefalorraquídeo exceden los niveles séricos. Los altos niveles en los folículos ováricos humanos sugieren un proceso activo de transporte, considerando que el ovario es incapaz de producir la hormona.

#### EFFECTOS FISIOLÓGICOS DE LA MELATONINA

Como resultado de la presencia de la melatonina en virtualmente todo compartimiento del organismo, esencialmente todas las células están expuestas al ritmo circadiano de la hormona. Dado a que la melatonina atraviesa rápidamente las membranas celulares, por su lipofiliidad, todos los organelos son rápidamente expuestos a la hormona. Es, por lo tanto, poco sorprendente que la supresión de la señal luminosa periódica induzca consecuencias fisiológicas marcadas, tanto en estudios experimentales, como clínicos. La melatonina se ha implicado en la regulación y sincronización de diversos procesos neurales y endócrinos que son modificados por el fotoperíodo. Entre estos tenemos la regulación estacional de la reproducción, peso corporal, metabolismo, y color del pelaje en mamíferos como la oveja y criceto (Tamarkin, *et. al.*, 1985), y el control del ritmo circadiano en pájaros y reptiles (Underwood y Harless, 1985). Además, la melatonina parece ser capaz de regular varias funciones neuroendócrinas complejas en seres humanos, como el sueño (Vriend, 1978), secreción de hormona tiroidea (Vriend, 1978) y de crecimiento (Smythe y Lazarus, 1973).

Actualmente no existe acuerdo sobre los órganos blanco para la función sincronizadora de la hormona. Varios sitios anatómicos y celulares se han propuesto (Stankov, *et. al.*, 1991). Dentro de los efectos más estudiados de la melatonina se encuentra el control estacional de la actividad reproductiva en diversas especies (Reiter, 1980). A este respecto, la interacción de la melatonina con el hipotálamo sería indispensable para la regulación de este

proceso fisiológico, dado a que los ciclos circadianos son regulados por este órgano. Este hecho que ha sido comprobado ampliamente (Reiter, 1980). En un estudio, Glass (Glass y Lynch, 1982) demostró que al inyectar melatonina en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, se presentaba regresión del estado proliferativo de las gónadas, mientras que inyecciones de la hormona en cualquier otro sitio del sistema nervioso central eran incapaces de producir este fenómeno. Otros autores (Cardinalli, *et. al.*, 1973; Anton-Tay, *et. al.*, 1988) han reportado que, posterior a la inyección de melatonina marcada radioactivamente, se presentan altas concentraciones de la misma en el hipotálamo. Ambos hechos apoyan la idea de que el efecto de la melatonina sobre la reproducción se debe, por lo menos en cierta medida, a su acción sobre el hipotálamo. Este, a su vez, regula la secreción de prolactina, que finalmente actúa sobre los órganos sexuales (Binkley, 1993). Sin embargo, dados los mecanismos múltiples de acción de la hormona y su distribución general en el organismo, no es posible descartar un posible efecto directo en los diversos órganos y sistemas periféricos.

#### Mecanismos de acción de la hormona.

La mayor parte de los estudios apuntan hacia la presencia de varios receptores y sitios de acción específicos, que median los efectos de la hormona. Estos los podemos clasificar, por su localización, en tres grandes grupos: membranales, citosólicos y nucleares (Dubocovich, 1995) (figura 3)

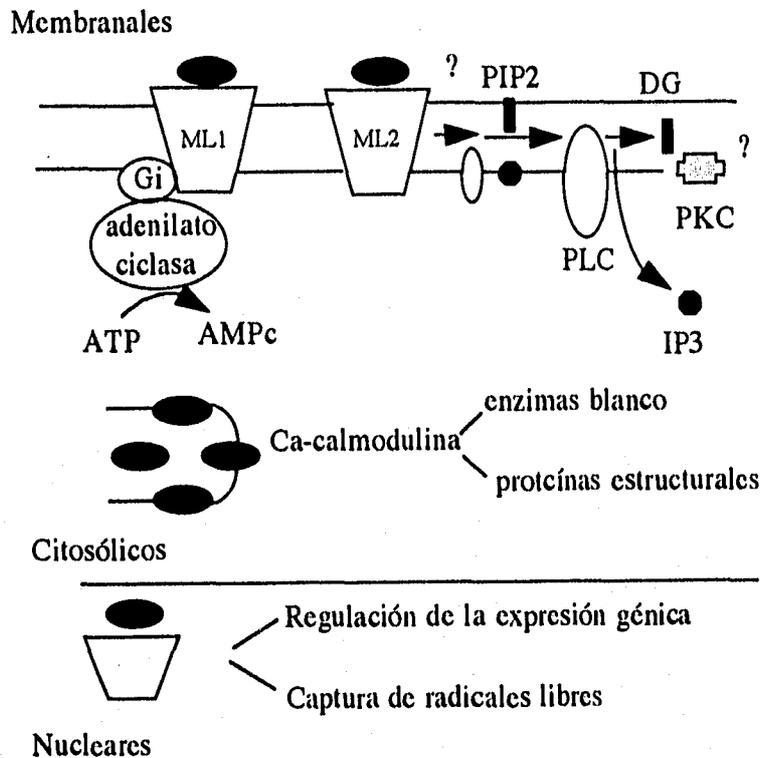


FIGURA 3. Sitios de acción de la melatonina. Tomado de Dubocovich, 1995.

### SITIOS DE ACCION MEMBRANALES

A pesar de que durante años ha estado disponible melatonina marcada con tritio, poco progreso se realizó en este campo, dada la dificultad de reproducir los primeros hallazgos de posibles receptores (Cohen, *et. al.*, 1978; Cardinalli, *et. al.*, 1979), probablemente a la pobre calidad e inestabilidad de este compuesto (Cardinalli, *et. al.*, 1985). El panorama se despejó al desarrollarse un agonista altamente purificado, marcado con una alta actividad específica, la  $[^{125}\text{I}]2$ -iodomelatonina (Vakuri, *et. al.*, 1984). Este compuesto ha permitido determinar sitios de unión saturables, con una cinética reversible de asociación y disociación, y una afinidad en el rango picomolar, en preparados de membrana provenientes de cerebro de una

gran variedad de especies (Kennaway y Hugel, 1992; Dubocovich, 1987; Zisapel, and Laudon, 1987), apoyando la noción de un receptor membranal. Sin embargo, en estos estudios existen ciertas inconsistencias en el perfil farmacológico y distribución de los sitios de unión, lo cual se explica mediante la propuesta de la existencia de dos receptores: ML-1, presente en retina, cerebro de pollo y pars tuberalis y el receptor ML-2, presente en el cerebro de hámster (Dubocovich, 1988, 1995). ML-1 está caracterizado por su unión con la [<sup>125</sup>I]2-iodomelatonina con una afinidad en el rango picomolar, de manera reversible y saturable, y con una cinética de asociación lenta (Chong y Sudgen, 1994). En cambio, ML-2 presenta baja afinidad de unión a la [<sup>125</sup>I]2-iodomelatonina, en el rango nanomolar, con una cinética rápida de asociación y disociación (Pickering y Niles, 1992).

El primer posible receptor membranal de alta afinidad (ML-1a) clonado, proviene de *Xenopus Laevis*, posee siete dominios hidrofóbicos transmembranales, y pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G (Ebisawa, et. al., 1994). Posteriormente fueron clonados receptores homólogos en humano y oveja (Reppert, et. al. 1994). Las regiones codificadoras de estos receptores muestran una similitud del 60% con el de *Xenopus Laevis*. Es importante destacar que la proteína recombinante de estos genes expresada transitoriamente presenta la farmacología del receptor ML-1 (Reppert, et. al. 1994). Recientemente, el mismo grupo clonó un nuevo subtipo de receptor, denominado ML-1b, proveniente de retina de humano (Reppert, et. al. 1995). Este receptor presenta las mismas características de unión a la [<sup>125</sup>I]2-iodomelatonina que ML-1a (Reppert, et. al. 1995a). De la misma manera, han sido clonados dos receptores provenientes de retina de pollo (Reppert, et. al. 1995b). En este caso, uno de ellos, con una similitud del 80% con el receptor de *Xenopus Laevis*, constituye probablemente un nuevo subtipo de receptor ML-1, el ML-1c

(Reppert, *et. al.* 1995b). Esta diversidad de subtipos señala la existencia de una familia de receptores membranales para la melatonina. Es de destacar que los tres receptores muestran afinidades similares para el ligando [<sup>125</sup>I]2-iodomelatonina (Reppert, *et. al.* 1995 a, b).

La vía de transducción principal de los receptores membranales de alta afinidad (ML-1) es la inhibición de la formación de AMP cíclico por la adenilato ciclasa a través de una proteína G inhibitoria (Ebisawa, *et. al.* 1994, Dubocovich, 1995) (figura 3). La melatonina disminuye los niveles de AMP cíclico e incrementa los de GMP cíclico al administrarse a cultivos de hipotálamo de rata (Vacas, *et. al.*, 1981, 1984). Más aún, la hormona es capaz de inhibir la activación de la síntesis de AMP cíclico en cultivos de astrogliá de rata, mediada por la activación de receptores  $\beta$  adrenérgicos (Vacas, *et. al.*, 1984).

Los receptores ML-2 no han sido clonados a la fecha. Pese a esto, se ha propuesto una vía de acción para ellos. Se ha demostrado que estos sitios de unión estimulan la hidrólisis de fosfatiditilinositol (Popova, 1995). Esta actividad parece estar ligada a la activación de la vía de fosfolipasas por medio de una proteína G (Popova, 1995) (figura 3).

#### SITIOS DE ACCION CITOSOLICOS

Otro de los probables mecanismos de acción es el concerniente a la vía de transducción mediada por calcio. El calcio es un segundo mensajero que utiliza a la calmodulina como efector de su señal. Esta proteína sufre un cambio de conformación al unirse al calcio, lo que le permite efectuar una serie de interacciones directas sobre diversas enzimas (adenilato ciclasa, fosfodiesterasa) y proteínas estructurales (tubulina, proteínas asociadas a microtúbulos) para modificar su actividad y/o estructura, además de interaccionar con otro tipo de enzimas clave de diversos procesos, las proteínas cinasas, que a su vez amplifican la señal primaria (figura 3). La melatonina

es capaz de asociarse a la calmodulina de manera específica, reversible y saturable, con una alta afinidad, en el orden picomolar (Benítez-King, *et. al.*, 1993). En un estudio utilizando células MDCK y NIE-115, la activación de la fosfodiesterasa por medio de la vía calcio-calmodulina fué inhibida por melatonina, de una manera dosis-dependiente, lo cual señala que esta hormona es un antagonista del sistema (Benítez-King, *et. al.*, 1991), dado a que no modificó la actividad basal de la enzima. Más aún, se conoce que la movilidad electroforética de la calmodulina es modificada al incubarse con calcio, y en este estudio, esta movilidad fué alterada al co-incubar al complejo calcio/calmodulina con concentraciones elevadas de la hormona ( $10^{-5}$  M), lo que apoya más esta idea.

Uno de los efectos más estudiados de la melatonina es su acción sobre el citoesqueleto celular, básicamente sobre el estado de polimerización de la tubulina. A este respecto, existen reportes contradictorios: una serie de publicaciones establecen que la melatonina es capaz de producir polimerización de microtúbulos en diversos sistemas, mientras que algunos otros reportan lo contrario. En el primer caso tenemos como ejemplos a la estimulación de agregación pigmentaria, un proceso dependiente de polimerización de tubulina, en una gran variedad de especies (Malawista, 1975; Messenger y Warner, 1977; Reed, *et. al.*, 1969), el incremento en el número de microtúbulos en glándula pineal de rata (Freire y Cardinalli, 1975) y el alargamiento de procesos celulares, como en el caso de las células MDCK y NIE-115, en donde se duplica su número (Benítez-King, *et. al.*, 1990). En sentido inverso, encontramos que la melatonina es capaz de inhibir el movimiento de gránulos (Funan, 1966), inducir la dispersión de gránulos de melanina (Reed, *et. al.*, 1969) e inducir la disrupción del aparato mitótico en las puntas de raíces de cebolla (Banerjee y Margulis, 1973); todos estos procesos dependientes de la polimerización de tubulina. Más aún la

melatonina es capaz de inhibir el repolimerización de microtúbulos en el nervio ciático de sapo (Piezzi y Cavicchia, 1981).

Para explicar estas divergencias, se ha sugerido que los efectos observados de la hormona dependen de la concentración de la misma (Benítez-King y Antón-Tay, 1993, Huerto-Delgadillo, *et. al.* 1994). En el caso de los efectos polimerizantes de la hormona, ésta fué utilizada a dosis bajas ( $10^{-11}$  a  $10^{-9}$  M) cercanas a su concentración fisiológica. Por el contrario, dosis farmacológicas elevadas ( $10^{-6}$  a  $10^{-4}$  M) produjeron los efectos despolimerizantes antes descritos. La polimerización de microtúbulos es un proceso dinámico en el que intervienen diversos factores, entre ellos, las proteínas asociadas a microtúbulos, diversas proteínas cinasas y el sistema calcio-calmodulina. (Jefferson y Schulman, 1991). La calmodulina, a bajas concentraciones, disocia e inhibe la polimerización de microtúbulos (Hinrichsen, 1993); de la misma manera, antagonistas de la calmodulina evitan este efecto y promueven el ensamblaje. En un estudio *in vitro* y en citoesqueletos *in situ*, se demostró que la melatonina, en concentraciones nanomolares, es capaz de evitar la inhibición de la polimerización de microtúbulos provocada por calcio-calmodulina, mientras que concentraciones mayores desensamblan los microtúbulos (Huerto-Delgadillo, *et. al.*, 1994). De esta manera, el efecto polimerizante, más importante en un contexto fisiológico, sería dependiente del antagonismo de la calmodulina antes mencionado, mientras que dosis farmacológicas más elevadas inducirían efectos no dependientes de sitios de unión de alta afinidad, sino de interacciones no específicas sobre la tubulina, que se sobrepondrían a la unión específica. (Huerto-Delgadillo, *et. al.*, 1994). Otros hechos que apoyan esta idea son el hecho de que la vía de calcio-calmodulina es capaz de generar los mismos cambios asociados a la administración de la hormona; la melatonina es capaz de asociarse y modificar su actividad; ambas colocalizan

y la melatonina es capaz de inducir cambios en la expresión de la calmodulina (Benítez-King, *et. al.*, 1991; Benítez-King, *et. al.*, 1991b; Benítez-King, *et. al.*, 1993; Benítez-King y Antón-Tay, 1993).

Es importante mencionar que en casi todos los casos, el efecto observado se ha presentado de manera tardía, como en el caso del alargamiento de neuritas en células NIE-115 (Benítez-King, *et. al.*, 1990), en el que el efecto máximo estuvo presente a los tres días de la incubación con la hormona. Este hecho podría señalar la existencia de uno o varios mecanismos indirectos que influenciarían la respuesta final del citoesqueleto a la hormona. A este respecto es importante señalar que la melatonina inhibe *in vitro* la actividad de la cinasa II dependiente de calcio-calmodulina (Benítez-King, *et. al.*, 1996). Esta enzima posee una gran variedad de funciones, entre las que se encuentran la regulación de la síntesis y liberación de neurotransmisores en el sistema nervioso, regulación de los canales de calcio y modulación de la actividad de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (Bronstein, *et. al.*, 1993). Una de las actividades reportadas de la enzima es la capacidad de fosforilar *in vitro* a la proteína asociada a microtúbulos MAP2, inhibiendo su capacidad para estimular la polimerización de microtúbulos (Yamamoto, *et. al.*, 1983). Por lo tanto, la habilidad de la melatonina para inhibir a la cinasa II dependiente de calcio-calmodulina podría colaborar con la polimerización de microtúbulos reportado.

Dado la infinidad de procesos fisiológicos regulados directa o indirectamente por la melatonina, se ha sugerido que esta hormona pueda influenciar diversas funciones celulares mediante su efecto sobre procesos dependientes del estado de la estructura microtubular (Cardinalli, 1981). Es reconocido que muchos procesos celulares dependen estrechamente de la formación de estructuras microtubulares y día a día se demuestran más (Biegel y Pachter, 1992).

## SITIOS NUCLEARES DE ACCION

Algunos estudios han demostrado la presencia melatonina en núcleos en diversos tipos celulares, sugiriendo que la hormona pueda tener alguna función a ese nivel (Anton-Tay, *et al.* 1988, Menendez-Pelaez, *et al.* 1993; Menendez-Pelaez y Reiter, 1993). Más aún, se han descrito y caracterizado sitios de unión específicos para la hormona en núcleos de hepatocitos de rata (Acuna-Castroviejo, *et al.*, 1994). Recientemente se ha establecido que la melatonina es capaz de unirse y activar a un receptor nuclear huérfano, perteneciente a la familia de los receptores para ácido retinóico, el RZR $\beta$ , con afinidades en el orden nanomolar (Becker-André, *et al.*, 1994). Además, se ha reportado que la melatonina también es un ligando específico de otras dos variantes de este receptor huérfano, RZR $\alpha$  y ROR $\beta$ , el primero de los cuales es un transinhibidor del gen de 5-lipooxigenasa, un mediador bioquímico de la inflamación (Steinhilber, *et al.* 1995, Wiesenberg, 1995), implicado en la producción de radicales libres (Lon, *et al.*, 1995). ROR $\beta$  se expresa en sitios anatómicos extraneurales, por lo que se acción podría mediar efectos sistémicos. Además de estos efectos directos, dados los blancos membranales y citosólicos, pueden esperarse diversas acciones indirectas sobre el núcleo. Por ejemplo, la cinasa II dependiente de calmodulina fosforila al factor de transcripción CREB, por lo que su inhibición podría regular la expresión génica regulada por calcio (Dash, *et al.*, 1991). Estos hallazgos apoyan la idea de la existencia de otros posibles efectos celulares de la hormona, a nivel nuclear, y abre una gran expectativa, dado a que este tipo de receptores se encuentran involucrados en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos, particularmente durante el crecimiento y desarrollo, por medio de su habilidad de activar o reprimir la transcripción de genes específicos (figura 3).

## OTROS SITIOS DE ACCION

Ha sido demostrado que la melatonina es un eficiente capturador de radicales libres (Reiter, 1995). Estas moléculas son capaces de dañar diversos componentes celulares, entre ellos membranas, diversas proteínas y, particularmente, el ADN. Existen diversos mecanismos que protegen a las células de estos daños, capturando a los radicales o evitando el daño de ellos. Entre ellos se encuentran enzimas como la superóxido dismutasa, la catalasa y glutatión peroxidasa y diversos compuestos, como la ácido ascórbico y el tocoferol. La melatonina es la sustancia con mayor poder de captura de radicales hidroxilo y uno de los mayores capturadores de radicales peróxido (Reiter, 1995). Dado a que la producción de radicales libres y su consecuente daño se han invocado como uno de los factores que llevan a la senescencia, se ha especulado que la melatonina podría tener un papel en este proceso (Pierpaoli, 1994). Se ha demostrado que el envejecimiento y el desarrollo están asociados con una caída substancial en la secreción nocturna de melatonina (Reiter, 1992). Además, la deficiencia de melatonina en organismos viejos está acompañada por una mayor sensibilidad al daño por radicales libres (Reiter, *et. al.*, 1993a). Se ha sugerido que la deficiencia del ritmo de secreción de la melatonina en organismos envejecidos puede contribuir al proceso de envejecimiento así como a las enfermedades asociadas a este (Reiter, *et. al.* 1993a), tales como el cáncer. Este grupo de patologías están causadas por alteraciones del ADN, y dado a que la melatonina es capaz de inhibir el daño genético por radicales libres, se ha postulado que puede actuar como un agente que previene la carcinogénesis (Tan, *et. al.*, 1994) e incluso como oncostático. Desde un punto de vista evolutivo, se ha postulado que la melatonina podría haber evolucionado desde el momento en que los organismos fotosintéticos comenzaron a

producir grandes cantidades de oxígeno y otras células comenzaron a utilizar este compuesto altamente reactivo para la respiración y metabolismo (Reiter, 1993b). Es interesante el hecho de que los radicales libres poseen actividad como segundos mensajeros, activando diversas vías de transducción (Kahn y Wilson, 1995). La vía principal utilizada por los radicales libres es la mediada por el factor de transcripción NFkB, (Los, *et al.*, 1995) involucrada en una gran variedad de eventos intracelulares, principalmente en células del sistema inmune y muy probablemente en el proceso de muerte celular por apoptosis. De esta manera, aunque aún no investigadas, estas vías podrían mediar acciones intracelulares de la hormona.

Por último, es necesario mencionar que la melatonina es capaz, en algunos tipos celulares, de inhibir la proliferación (Crespo y Fernandezviadero, 1994). Aunque no se conoce aún el mecanismo de este efecto, se han postulado diversas explicaciones. Entre ellas se encuentran las conocidas modificaciones sobre los microtúbulos que son requeridas para la transición de la fase G2/M de ciclo celular (Thibler, *et al.*, 1992), y fenómenos relacionados con la presencia de la melatonina en el núcleo, dado a que en el estudio mencionado (Crespo y Fernandezviadero, 1994) se encontró un antagonismo al administrarse estradiol de manera concomitante. Apoyando este hecho, un estudio ha demostrado incrementos e inhibiciones en diversos ARN mensajeros relacionados con el ciclo celular (Molis, T. M., *et al.* 1995). Otra vía por la cual se podría inhibir el crecimiento celular es el antagonismo sobre la calmodulina descrito previamente (Huerto-Delgadillo, *et al.*, 1994), dado a que los antagonistas de esta proteína son capaces de retardar el crecimiento celular (Hait, 1987). Además, en células NIE-115, la melatonina inhibe la proliferación celular, correlacionándose este hecho con una disminución de los niveles de la calmodulina, a los mismos tiempos (3 a

6 días de exposición) (Benítez-King, *et. al.*, 1994b)

### Mecanismos de regulación de proteínas del citoesqueleto.

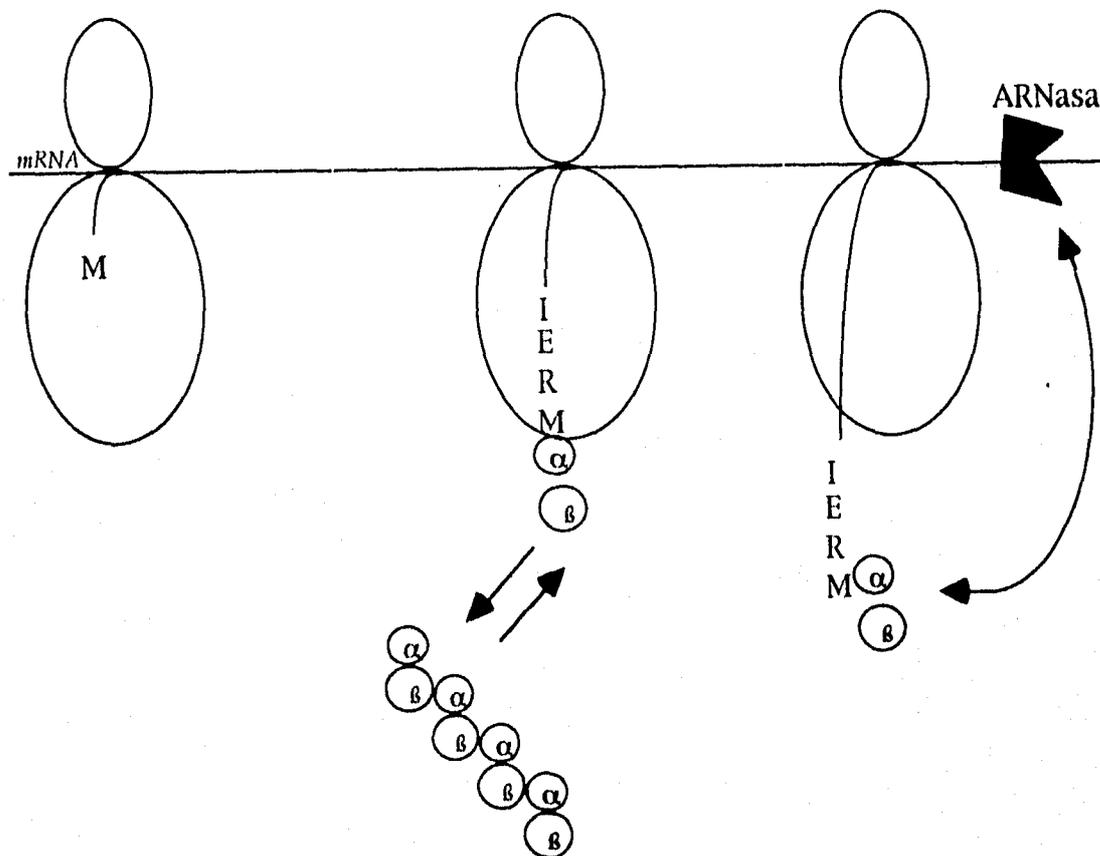
A continuación, dada la naturaleza del presente trabajo expondré los mecanismos de regulación de la expresión de dos proteínas del citoesqueleto, que representan blancos de la hormona: tubulina y MAP2.

#### Regulación de la expresión de $\beta$ tubulina.

La regulación de la expresión de la  $\beta$ -tubulina es un fenómeno complejo, en donde no sólo el control de la transcripción, de la estabilidad del mensajero y la vida media de la proteína se manifiestan como claves para ésta, sino que existe un acoplamiento entre la traducción de la misma y la estabilidad de su ARN mensajero, lo que se refleja en la expresión última de este gen.

La tubulina es el principal componente de los microtúbulos, y existe formando un heterodímero de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que se encuentran en un equilibrio dinámico con su contraparte polimerizada. La síntesis de la tubulina se encuentra estrechamente acoplada al estado de polimerización del microtúbulo. Al aumentar la concentración de las subunidades de tubulina, por ejemplo, mediante despolimerización de los microtúbulos por diversas drogas, (Ben Ze'ev, *et. al.*, 1979; Cleveland, 1988), o mediante microinyección de subunidades de tubulina no ensambladas (Cleveland, *et. al.*, 1983), lleva a una rápida y específica inhibición de la síntesis de tubulina  $\alpha$  y  $\beta$ , causada por una disminución en los niveles del ARN mensajero de tubulina (Cleveland, *et. al.*, 1981). Cierta número de observaciones ha llevado a la conclusión de que la modulación de la síntesis de tubulina en respuesta a

la concentración de subunidades de tubulina es un evento postranscripcional. Primero, experimentos de transcripción *in vitro* en núcleos aislados ("run-on") no revelan cambios en la tasa de síntesis de ARN mensajero de los genes de tubulina, al tratar a las células con colchicina, un agente que induce despolimerización de microtúbulos (Cleveland y Havercroft, 1983). En segundo lugar, la disminución en la tasa de síntesis de tubulina inducida por colchicina se manifiesta incluso en células anucleadas (Caron, *et. al.*, 1985; Pittenger y Cleveland, 1985). Finalmente, genes híbridos compuestos por secuencias que codifican para tubulina y promotores heterólogos continúan presentando cambios de expresión en respuesta a cambios en los niveles de subunidades de tubulina (Gay, *et. al.*, 1987). Existe otra serie de evidencias que indican que los niveles de ARN mensajero de  $\beta$ -tubulina se regulan de manera cotraduccional. Primero, solo los ARN mensajeros traducidos son regulados (Pachter, *et. al.*, 1987), además de que una señal de terminación de la traducción prematura hace que ese ARN no sea ya regulado. Segundo, todas las mutaciones que alteran la secuencia del ARN mensajero en el segundo o tercer codón, pero que aún codifican para polipéptidos idénticos, producen un ARN que sigue siendo regulado (Gay, *et. al.*, 1987). Tercero, para poder poseer una inestabilidad regulada, el dominio mínimo del ARN que especifica inestabilidad debe ser traducido en el orden correcto (Gay, *et. al.*, 1987). Estos datos, aunados a las observaciones de que cambios en la concentración de tubulina sin ensamblar inician la degradación del ARN mensajero de tubulina, sugieren un modelo en el que las subunidades no ensambladas de tubulina se unen cotraduccionalmente a los péptidos nascentes de tubulina, y de alguna manera inician la degradación del ARN mensajero unido al polisoma, modelo para el cual existe evidencia física (Theodorakis y Cleveland, 1992) (fig. 4).



**FIGURA 4 :** Modelo de autoregulación de la inestabilidad del ARN mensajero de  $\beta$  Tubulina (Cleveland, 1988). Las subunidades libres de alfa y beta tubulina se unen al tetrapéptido naciente de los ribosomas de la misma proteína (metionina, arginina, glutamina e isoleucina) de una manera cotraduccional. Esta unión se traduce en la reclutación de ARNasa (s) que degradan al ARN unido al polisoma. Este efecto, por ende, es directamente proporcional.

#### Regulación de la MAP2

El proceso de alargamiento de neuritas depende, entre otros mecanismos, de la estabilización de microtúbulos por las proteínas asociadas a estos (MAP). Dentro de estas la MAP2 es considerada como uno de los elementos más importantes en este proceso, que, mediante su participación

como enlace y estabilizante de la arquitectura dendrítica, mediante su habilidad de promover la polimerización microtubular (Freidrich y Aszódi, 1991) puede mediar el alargamiento de neuritas. *In vitro*, la habilidad de esta proteína para promover la polimerización de  $\beta$  tubulina, es inhibida por fosforilación vía la cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) y/o por la cinasa II dependiente de calmodulina (Yamauchi y Fijisawa, 1983; Selden y Pollard, 1983). Este efecto se presenta dada la presencia de 13 sitios fosforilables en su secuencia, que son consenso para la PKA (Jefferson y Schuman, 1991), además de la presencia de igual número de sitios para la cinasa dependiente de calmodulina (Vallano, *et. al.*, 1985). Está demostrado que existe un incremento en la fosforilación de esta proteína durante la extensión de dendritas (Diez-Guerra y Avila, 1995). Es importante destacar que en este estudio, el mapa fosfopeptídico de la MAP2 fosforilada coincide con el mapa obtenido al incubar a MAP2 *in vitro* con cinasa II dependiente de calmodulina, por lo que se sugiere que esta cinasa puede tener un papel en este proceso. El efecto de la fosforilación sobre la vida media de la MAP2 no ha sido estudiado. La proteína es rica en secuencias "PEST" (prolina (P), glutamina (E), serina (S) y treonina (T)), señales putativas para la rápida degradación proteolítica, por lo que ésta debe de encontrarse separada o protegida de proteasas intracelulares, para poder ejercer su función. De esta manera, se ha encontrado que es posible detectar MAP2 marcada varios días después de ser inyectadas a neuronas en cultivo (Okabe e Hirokawa, 1989). A este respecto, las secuencias "PEST" deben de encontrarse resguardadas de las proteasas, por medio de la interacción con otras proteínas y/o por modificaciones en su estructura secundaria, dado a que, *in vitro*, la MAP2 es degradada rápidamente por calpaína (Johnson, *et. al.*, 1991).

## ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION.

En un estudio realizado en 1990, se demostró que la hormona melatonina era capaz de inducir un incremento de 100% en el número de células NIE-115 con neuritas (Benítez-King, *et. al.*, 1990). Es generalmente aceptado que el crecimiento de neuritas es un proceso que se logra a través del alargamiento de microtúbulos, mediante la colaboración de una serie de proteínas asociadas a microtúbulos (MAP). En el estudio mencionado, las prolongaciones neuríticas se hicieron mucho más evidentes al teñir específicamente a la tubulina mediante inmunofluorescencia indirecta. En este mismo tipo celular es posible inducir un proceso de diferenciación mediante diversos estímulos (administración de dimetilsulfóxido, ausencia de suero en el cultivo); proceso que va asociado a un incremento dramático en la longitud y número de prolongaciones. Se ha demostrado que, durante el proceso de alargamiento, se incrementa la expresión de una de las isoformas de la  $\beta$  tubulina, la cual se presenta únicamente en la célula diferenciada con neuritas (Eddé, *et. al.*, 1981). Asimismo, se ha demostrado que durante la diferenciación, de las 5 isoformas expresadas en estas células, una de ellas sufre un proceso de fosforilación, el cual depende del estado de polimerización de la tubulina (Gard y Kirschner, 1985). Aunque no se ha corroborado, dada la dificultad que existe para correlacionar las movilidades electroforéticas con la secuencia específica de la proteína, es muy probable que se trate de la misma isoforma, dado a que ambas se presentan únicamente en el estado diferenciado de la célula y en estrecha relación con el crecimiento de neuritas y se sabe que este tipo de modificaciones postraduccionales son capaces de ejercer efectos profundos sobre las migraciones electroforéticas de las proteínas. Por otro lado, sólo se ha efectuado un estudio directo del efecto de la melatonina sobre el estado de polimerización de la tubulina, en un experimento *in vitro* (Huerto-Delgadillo,

et al. ,1994). En este estudio se demostró que la melatonina actúa como un antagonista de la calmodulina, eliminando el efecto inhibitorio que esta tiene sobre la polimerización de tubulina.

Dado a que se conoce que:

- 1) La administración de la hormona melatonina es capaz de inducir el crecimiento de neuritas en células NIE-115.
- 2) En otros modelos, este proceso se asocia a cambios en la expresión de  $\beta$  tubulina.
- 3) *In vitro*, y en citoesqueletos *in situ* es posible promover la polimerización de tubulina mediante esta hormona.

El presente estudio se realizó con el fin de investigar la posibilidad de la existencia de cambios en la expresión de esta proteína durante la alargamiento de procesos celulares provocada por la hormona, en un estudio en células vivas. Además se probó la hipótesis de si estos cambios podrían explicarse mediante el modelo propuesto de autoregulación cotraduccional, realizando, además, un primer intento de profundización en este tema, al analizar los niveles relativos de la MAP2, una proteína íntimamente ligada al proceso de alargamiento de neuritas.

## OBJETIVOS GENERALES.

-DETERMINAR EL EFECTO DE LA HORMONA MELATONINA SOBRE EL ESTADO DE POLIMERIZACION, EXPRESION Y NIVELES DE ARN MENSAJERO DE LA  $\beta$  TUBULINA EN CELULAS DE NEUROBLASTOMA MURINO NIE-115

-DETERMINAR EL EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA EXPRESION DE LA MAP2.

## OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Determinar los niveles relativos de  $\beta$  tubulina polimerizada y soluble durante un curso temporal en estas células tratadas con dosis fisiológicas de la hormona.
2. Determinar los niveles del ARN mensajero específico de  $\beta$  tubulina durante un curso temporal bajo tratamiento con melatonina.
3. Determinar los niveles totales de expresión de  $\beta$  tubulina durante un curso temporal en células NIE-115 tratadas con melatonina.
4. Determinar los niveles de expresión de una de la proteína asociada a microtúbulos MAP2 durante el tratamiento con la hormona.

## HIPOTESIS.

La administración de melatonina a células NIE-115 provocará un incremento en los niveles de  $\beta$  tubulina polimerizada.

Este incremento se acompañará de una elevación en los niveles del ARN mensajero de esta proteína.

Los niveles totales de  $\beta$  tubulina aumentarán de manera concordante al incremento de ARN mensajero.

La proteína asociada a microtúbulos, MAP2, aumentará sus niveles de manera previa a los cambios antes mencionados.

Los efectos de la melatonina sobre estos componentes del citoesqueleto se encontrarán relacionados de manera temporal.

## MATERIAL Y METODOS

### CULTIVO CELULAR.

Para todos los experimentos se utilizaron células de neuroblastoma murino NIE-115, cultivadas en medio mínimo esencial modificado por Dulbecco (DMEM) con 4.5 gr de glucosa, 15% (vol/vol) de suero fetal bovino, usando una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>, a una densidad de 7000 células por mm<sup>3</sup>. Esta última densidad fué elegida dado a que la respuesta máxima a la hormona, en este tipo celular, se presenta a baja confluencia (Benítez-King, *et. al.*, 1990). Después de sembradas, las células se dejaron una noche antes de iniciar los cursos temporales. La hormona (Sigma) fué disuelta en etanol (50 µl por cada mg) y diluída a una concentración de 10<sup>-6</sup> M en una solución amortiguadora con glicerol (solución de dilución, Lopata, *et. al.*, 1987). Esta solución fué esterilizada por filtración (0.22 µm) y aplicada directamente al medio, para obtener una concentración final de 10<sup>-9</sup> M. Para el testigo, se realizaron las mismas diluciones, sin agregar la melatonina. Durante los diversos cursos temporales, se realizaron cambios de medio diariamente, agregando melatonina diluida como se menciona o solución blanco. La hormona fué preparada siempre en fresco.

### INMUNOFLUORESCENCIA.

Las células fueron sembradas sobre cubreobjetos estériles, bajo las condiciones antes mencionadas, sobre cajas petri. A los tiempos señalados de tratamiento, con la hormona o vehículo, los cubreobjetos fueron incubados con solución estabilizadora (Lopata, *et. al.*, 1987) de microtúbulos, a 37°C, por 30 segundos, para posteriormente ser incubados con solución estabilizadora II, que incluye triton X-100, al 0.5% (vol/vol), también a 37°C,

por 50 segundos. Las laminillas se lavaron por última vez con solución estabilizadora para ser fijadas inmediatamente con metanol/acetona en una proporción de 3:1, a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos y secadas al aire (Lopata, *et. al.*, 1987). Los cubreobjetos en paralelo, fueron rehidratadas con 3 cambios de PBS de Dulbecco a temperatura ambiente; cada cambio de 5 minutos. Las muestras se bloquearon con PBS/albúmina al 3%, por 1 hora y se incubaron con un anticuerpo monoclonal (Boehringer Mannheim, clona KMX-1) a una dilución 1:20 en PBS/albúmina por 2 horas. Después de tres lavados con PBS, se incubaron con el anticuerpo secundario, acoplado con rodamina (Dako) a una dilución de 1:20 en PBS/albúmina al 3% por 1 hora. Finalmente se lavaron 5 veces con PBS (5 minutos cada vez), se montaron en medio acuoso para compuestos fluorescentes (Antifading, Dako) y se fotografiaron en un microscopio Olympus, mediante objetivo de inmersión (aumento de 100x), utilizando los mismos tiempos de exposición para cada muestra (45 segundos). La película utilizada fué Tri-X-Pan (Kodak) usando una velocidad de ASA 800. El revelado se realizó acorde con esta velocidad (Microdol, Kodak). Como control se realizó el mismo procedimiento, omitiendo el anticuerpo primario, en donde no se observó localización de estructura alguna.

#### CUANTIFICACION DE $\beta$ TUBULINA EN LAS DIVERSAS FRACCIONES.

##### EXTRACTO TOTAL.

Las células, cultivadas como se mencionó anteriormente, en cajas de  $100\text{ mm}^3$  se rasparon con un gendarme, se lavaron una vez con PBS y se lisaron en buffer de Laemmli (Laemmli, 1970), a razón de  $2\ \mu\text{l}$  por  $\text{mm}^3$  de superficie y hervidas por 5 minutos. El ADN fué degradado mediante paso por jeringa, y las muestras centrifugadas a  $15\ 000\ \text{x g}$  por 1 hr, a  $4^{\circ}\text{C}$

(Sambrook, 1989).

#### FRACCIONES SOLUBLE Y POLIMERIZADA.

Las células, cultivadas en cajas de 100 mm<sup>3</sup> utilizando las condiciones mencionadas anteriormente, fueron extraídas de acuerdo al método de Lopata (Lopata y Cleveland, 1987), como se describe a continuación: Las células se lavaron 2 veces con PBS a 37 °C y 2 veces con solución estabilizadora de microtúbulos A. El extracto celular soluble se obtuvo mediante extracción en 1 ml de solución estabilizadora A con 0.5% de tritón X-100 (vol/vol) por 5 minutos a 37°C. Esta solución fue removida de la caja y todo el material insoluble eliminado por centrifugación a 12 000 x g por 1 minuto, a 4°C, para llevarse al 1x de concentración en solución de Laemmli, agregando 280 µl de una preparación al 5x y 120 µl de mercaptoetanol. La fracción polimerizada de citoesqueleto remanente, incluyendo a la pastilla de la extracción anterior, fue solubilizada en 1.4 ml de solución de Laemmli 1x. Después de hervir por 3 minutos, el ADN se eliminó de la fracción polimerizada por centrifugación a 12 000 x g. Ambas fracciones se concentraron mediante precipitación con 9 volúmenes de metanol helado (-20°C), después de la adición de acarreador (ARN de transferencia (Sigma)) a una concentración final de 100 µg/ml. Después de una incubación por 2 horas a -70°C, la proteína precipitada se recuperó mediante centrifugación a 9000 x g por 20 minutos a 4°C. Ambas pastillas fueron secadas por vacío (speedvac) y resuspendidas en 200 µl de solución de Laemmli 1x, para conservarse en alícuotas a -70°C.

#### CUANTIFICACION DE PROTEINA.

Dado a que las muestras se encontraban en una solución con alto nivel de detergente, fue necesario utilizar un método para cuantificar de manera

exacta la cantidad de proteína. Para este fin se usó el método de Bradford (Bradford, 1976) modificado por Pande (Pande y Murthy, 1994), el cual permite realizar cuantificaciones exactas en extractos con alto contenido de detergente, sales y lípidos, en cantidades mínimas de muestra. 10  $\mu$ l de muestra de cada punto analizado se diluyeron con 190  $\mu$ l de agua desionizada, a los que se agregaron 10  $\mu$ l de una solución de 500 mM de fosfato de potasio (Sigma), pH 7.4, 10  $\mu$ l de cloruro de calcio (Sigma, grado biología molecular) y 1 ml de etanol absoluto (Baker, grado reactivo), agitándose por 2 minutos. Las muestras se centrifugaron a 7000 x g por 1 minuto y el sobrenadante se aspiró mediante vacío, agregándose 100  $\mu$ l de agua desionizada y 900  $\mu$ l de etanol a la pastilla. Después de resuspenderla mediante el uso de un vórtex, nuevamente se retiró el sobrenadante por aspiración, posterior a centrifugación a 7000 x g por 1 minuto. A la pastilla obtenida de esta manera, se le agregaron 100  $\mu$ l del concentrado de tinción (ver apéndice) y se dejó reposar por 5 minutos sin agitación. Finalmente se agregaron 400  $\mu$ l de agua y la concentración de proteína se determinó mediante la medición de la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro, a partir del sexto minuto posterior a la adición del agua. Para este último fin, se realizó una curva patrón con albúmina, sometida al mismo procedimiento descrito, utilizando también un blanco sin proteína. Las muestras se cuantificaron por triplicado. Para corroborar la lectura, 10  $\mu$ g de proteína determinada por el método anterior se sometieron a electroforesis desnaturizante en un gel de acrilamida al 10 %. Con el fin de realizar esto, se realizó densitometría de cada uno de los carriles. La variación entre cada uno fue menor de 2.5%.

#### PURIFICACION DE TUBULINA TOTAL DE CEREBRO.

Con el fin de comprobar la especificidad de los anticuerpos usados,

se procedió a purificar tubulina a partir de extractos de cerebro. Para este fin, se purificó tubulina a partir de cerebro de criceto sirio, utilizando el método de polimerización-despolimerización. Este método se basa en la facultad que posee la tubulina de ensamblarse *in vitro* en condiciones que favorecen este proceso, basándose en los requerimientos *in vivo*. Así, las subunidades de tubulina, en presencia de nucleótidos (GTP), osmolaridad y temperatura adecuada (37°C) son capaces de asociarse para formar microtúbulos. El proceso es acelerado por la presencia de altas concentraciones de glicerol. Los microtúbulos así formados son fácilmente aislados por centrifugación, dado su alto peso molecular, separándose así de otras proteínas no deseadas. Estos microtúbulos son despolimerizados al exponerse a temperaturas más bajas, repitiendo el proceso hasta obtener una preparación relativamente pura. Debido a que en este proceso de purificación se aprovecha la alta afinidad entre las subunidades de tubulina, cualquier otra proteína que presente esta misma característica copurificará con la misma. De esta manera, también se aíslan las proteínas asociadas a microtúbulos. Para este fin se utilizaron 3 cricetos sirios adultos, sacrificados por decapitación, adaptando el método de polimerización-despolimerización de Shelanski (Shelanski, *et. al.*, 1973). Los cerebros se removieron inmediatamente, y se cortaron en pequeños trozos dentro de solución de polimerización a 4°C. El tejido cortado fué lavado 2 veces y homogenizado en 1 ml de la solución descrita por gramo de tejido en un homogenizador de teflón en velocidad baja con 10 golpes. El homogenado se centrifugó a 100 000 x g por 1 hora a 4°C. La pastilla fué descartada y al sobrenadante se le agregó un volumen igual de glicerol al 8 M. La muestra se incubó por 1 hora a 37°C y se centrifugó por 1 hr a 100 000 x g a 25°C. El sobrenadante se descartó y la pastilla fué resolubilizada en solución de polimerización fría mediante homogenizador de cristal, para ser incubada en hielo por 30

minutos. Nuevamente la muestra se centrifugó a 100 000 g por 1 hr a 4°C. El sobrenadante se volvió a mezclar con un volumen de glicerol al 8 M, agregándose GTP hasta llegar a una concentración de 1 mM (a partir de un concentrado de 1 M en agua deionizada). La muestra se incubó a 37°C por 2 horas, para centrifugarse nuevamente a 100 000 x g por 1 hora a 25°C. La pastilla se resuspendió en buffer de polimerización y 4 M de glicerol para guardarse a -70°C. Para comprobar la purificación de tubulina, una alícuota, cuantificada mediante el método descrito anteriormente, se sometió a electroforesis en un gel desnaturizante de acrilamida al 10% que se tiñó con azul de Coomassie. La recuperación de proteína fue de aproximadamente el 5% del total, con una pureza del 93%, a juzgar por la relación con la cantidad de proteína del extracto total y por una densitometría del gel de tubulina purificada. Modificando las condiciones de la electroforesis (elevando el pH del gel separador a 9.5), fue posible separar las principales isoformas de la tubulina ( $\alpha$  y  $\beta$ ). De la misma manera, fue posible visualizar dos bandas de alto peso molecular correspondientes a proteínas asociadas a microtúbulos, una de las cuales se identificó como la proteína MAP2. La especificidad de los anticuerpos utilizados fue demostrada al transferir un gel desnaturizante al 6 y 10% con diversas concentraciones de tubulina purificada, a un filtro de nitrocelulosa, para ser incubado con los anticuerpos usados, comprobando la presencia de una sola banda en el peso molecular esperado. (ver inmunocuantificación).

#### INMUNOCUANTIFICACION

Para cuantificar los niveles relativos de  $\beta$  tubulina se utilizó la técnica de "Western blot".

A) Separación de proteínas en geles de poliacrilamida.

Diez  $\mu$ g de extracto total y extracto polimerizado y 30  $\mu$ g de extracto soluble,

de los diversos tiempos analizados en los experimentos fueron sometidos a electroforesis en un minigel desnaturalizante de acrilamida, con un gel concentrador al 2%, pH 6.8 y un gel separador al 10%, pH 9.5, utilizando una solución de corrida que contenía SDS (Laemmli, 1970). Las muestras se hirvieron por 3 minutos y el gel sometido a una corriente de 40 mAmp por 45 minutos, hasta la salida del frente de corrida.

#### B) Transferencia de proteínas a filtros de nylon.

Posteriormente los geles se equilibraron en solución de transferencia por 15 minutos y sometidos a una transferencia húmeda sobre un filtro de nylon (Zetaprobe, Biorad) toda la noche, en cuarto frío, con un corriente de 300 mAmp y recirculación de agua. Los filtros se secaron al aire y el gel remanente fue teñido con azul de Coomasie para corroborar la eficiencia de la transferencia.

#### C) Immunocuantificación.

A continuación los filtros se lavaron 3 veces en PBS (5 minutos cada vez) y los sitios reactivos se bloquearon con solución de bloqueo (Blotto) por 4 horas a temperatura ambiente, en agitación continua. Posteriormente los filtros fueron incubados con una dilución 1:20 de un anticuerpo monoclonal anti- $\beta$  tubulina (Boehringer Mannheim, clona KMX-1) en PBS/leche descremada al 5% con azida de sodio al 0.2%, por 2 horas. Después de tres lavados de 15 minutos en PBS y uno en TBS, los filtros se incubaron en una dilución 1:300 de un anticuerpo anti-IgG de ratón, manufacturado en cabra, acoplado a peroxidasa (Biorad), en una solución de leche al 5% en TBS por 2 horas. Posterior a 4 lavados de 20 minutos cada uno, en TBS, la cantidad relativa de anticuerpo secundario unida se determinó mediante quimioluminiscencia, utilizando como sustrato luminol y como potenciador un compuesto comercial (Boehringer Mannheim). Los filtros se expusieron a radiografías (X-Omat, Kodak), por tiempos equivalentes, revelándose

convencionalmente. La cuantificación relativa se realizó mediante densitometría por transmitancia utilizando un espectrofotómetro a 560 nm (Beckman).

En el caso de la cuantificación de la proteína MAP2, se utilizó extracto total de los diversos tiempos (30 µg), de acuerdo a lo mencionado anteriormente, con las siguientes modificaciones: la electroforesis desnaturalizante se realizó con un gel separador al 6%; la transferencia se efectuó en solución modificada de transferencia, (ver apéndice) con una corriente de 500 mAmp, por 24 horas y el anticuerpo monoclonal utilizado provino de la clona AP20 (Boehringer Mannheim), a una dilución de 0.1 µg/ml.

#### CUANTIFICACION DEL ARN MENSAJERO DE $\beta$ TUBULINA

Para este fin, se utilizó ARN total, aislado de acuerdo al método modificado de Chomzynski (Chomzynski y Sacchi, 1987). Las células NIE-115 se crecieron en las condiciones anteriormente mencionadas, en cajas de 500 mm<sup>3</sup>. A los tiempos señalados, el medio fue aspirado y las células raspadas con gendarme, lavadas una vez con PBS y lisadas en 150 µl de solución A (ver apéndice). A este volumen se le agregaron 15 µl de acetato de sodio 3 M, pH 4; 1 volumen de fenol saturado con agua y 30 µl de cloroformo y fueron incubadas 15 minutos en hielo. A continuación, las muestras se centrifugaron a 7000 x g por 30 minutos y la fase acuosa se separó, para ser precipitada con 0.1 volumen de NaCl 5 M y 1 volumen de isopropanol. Las muestras se centrifugaron a 12 000 x g por 20 minutos a 4°C y la pastilla se resuspendió en 50 µl de buffer A, repitiéndose el procedimiento anteriormente mencionado. La pastilla resultante se resuspendió en agua desionizada tratada previamente con dietilpirocarbonato y una alícuota se leyó a una longitud de onda de 260 y 280 nm, con el fin de cuantificar la

concentración y verificar la pureza. La relación de las lecturas a 260/280 fué siempre mayor a 1.9, comprobando la pureza de la extracción. A continuación, cantidades semejantes de ARN total (5  $\mu$ g) se sometieron a electroforesis en un gel de desnaturalizante de agarosa, utilizando una solución de corrida conteniendo MOPS por 2 horas a 40 volts, y el gel se tiñó con bromuro de etidio, con el fin de verificar la exactitud de la cuantificación o corregir las cantidades. Posteriormente 30  $\mu$ g de ARN total de cada tiempo en estudio se sometieron al mismo tipo de electroforesis, los geles se tiñeron para comprobar la cantidad de ARN cargado en cada carril y se transfirieron mediante capilaridad por 24 horas a filtros de nylon (Zetaprobe, Biorad). Los filtros se hibridaron a un ADN complementario del gen de  $\beta$  tubulina, marcado radioactivamente con  $^{32}$ P, (ver adelante) en condiciones estrictas, utilizando una solución comercial (Quikhyb, Stratagene), a 68°C por 2 horas. Los lavados, fueron, de la misma manera, estrictos: 2 lavados a temperatura ambiente con solución I y 4 lavados con solución II a 65°C por 15 minutos cada una. La membrana se expuso a radiografías (X-Omat, Kodak), utilizando intensificadores (Dupont) a -70°C por 12-24 hr, revelándose de manera convencional y realizando cuantificación relativa mediante densitometría por transmitancia (Beckman). Todos los reactivos utilizados tuvieron grado de biología molecular (Sigma)

#### ADN COMPLEMENTARIO

La sonda utilizada para la hibridación anteriormente descrita (Bond, *et. al.*, 1983) consistió en el ADN complementario al gen de  $\beta$  tubulina, proveniente de una biblioteca de ratón, clonado en el vector PBR322. El plásmido conteniendo la secuencia fué introducido a la cepa DH5 alfa de *Escherichia coli* por métodos convencionales (Sambrook, *et. al.*, 1989). La bacteria fué crecida en medio LB (ver apéndice), sembrada en cajas petri con

el mismo medio, tomándose 10 colonias para comprobación de la presencia de la secuencia utilizada, mediante técnicas usuales (Sambrook, *et. al.*, 1989), realizándose cortes específicos con enzimas de restricción (Eco RI, Bam HI, Hind III), para verificar el patrón de fragmentos esperados del plásmido. A continuación, la colonia comprobada fue crecida en 500 ml de medio LB y el plásmido purificado mediante lisis alcalina y colchón de cloruro de cesio (Sambrook, *et. al.*, 1989). 10  $\mu$ g del plásmido purificado fueron digeridos con la enzima de restricción EcoRI y 20 ng marcados radioactivamente con  $^{32}$ P por el método de "random primer" (Feinberg y Vogelstein, 1983) utilizando reactivos comerciales (RmT, Stratagene). Asimismo, se utilizó el cDNA aislado y purificado, con los mismos resultados. Para este fin se usó a la enzima BamHI para escindir el inserto (1.8 kb) del plásmido, el cual fué aislado después de correr en un gel de agarosa. El marcaje fue comprobado mediante conteo por centelleo antes de agregarse a la solución de hibridación (ver inciso anterior)

## CURVAS DE PROLIFERACION

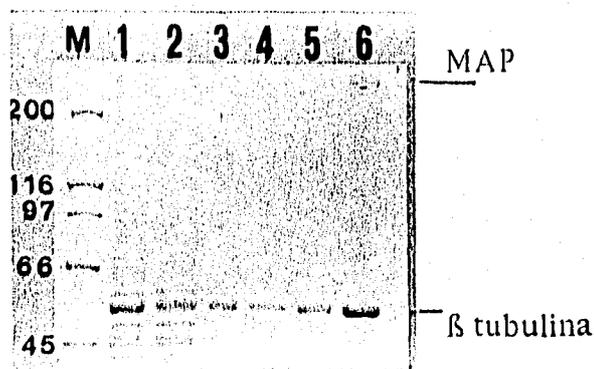
Para este fin, las células se sembraron en placas de 96 pozos y fueron tratadas como ya se ha descrito. Para este fin se utilizó la técnica de MTT (Tada, 1986). Esta técnica se basa en la capacidad de las células vivas para reducir la sal soluble de tetrazolio de color amarillo, a cristales de formazán púrpura por medio de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, los cuales son solubilizados y el color resultante medido por espectrofotometría. Diez  $\mu$ l de una solución de MTT (5 mg/ml)<sup>1</sup> (bromuro de

3,4,5 dimetiltizol 2,5 difeniltetrazolio, Sigma) se agregaron a cada pozo, incubándose por 4 horas a 37°C. A los tiempos señalados, se adicionaron 200  $\mu$ l de una solución de HCl al 0.04 N en isopropanol, resuspendiéndose vigorosamente con una micropipeta. El volumen se ajustó a 1 ml con la misma solución para ser leída en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570, con sustracción a 650 nm.

## RESULTADOS.

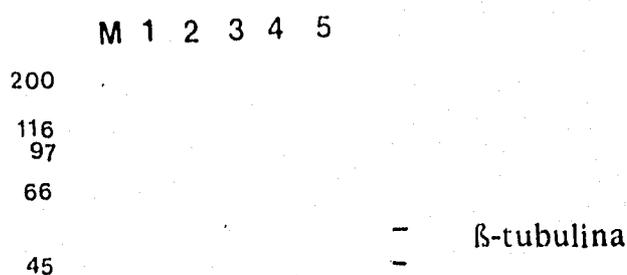
### Purificación de tubulina.

Como se observa en la figura 5, en un gel desnaturalizante de acrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie, se obtuvo una preparación de alta pureza, (alrededor de 93%), dado a que se presenta principalmente una banda del peso molecular esperado (carriles 4-6). De la misma manera, como se esperaba por la naturaleza del método empleado, al incrementar la carga de proteína, se observa la copurificación de proteínas de alto peso molecular, que, según reportes varios (Gard y Kirschner, 1985; Burgoyne, 1991), corresponden a proteínas asociadas a microtúbulos (carril 6).



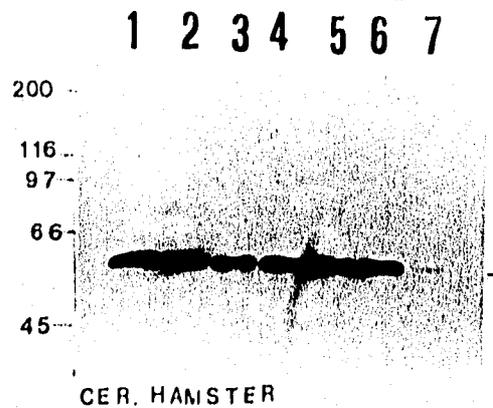
**FIGURA 5 :** Purificación de tubulina de cerebro de criceto sirio. Gel de acrilamida al 10% teñido con azul de coomassie. M: marcador de peso molecular. 1: Extracto crudo. 2 y 3: alícuota del primer y segundo ciclo de polimerización. 4,5,6: 0.25, 0.5 y 1 ug de proteína purificada, respectivamente.

La proteína más abundante en el cerebro de los mamíferos es la tubulina (alrededor del 15% de su peso total). Por ello, es fácilmente discernible en el extracto crudo de cerebro, en los carriles 1 y 2 de la figura 6, entre los marcadores de peso molecular correspondientes a 66 y 45 kilodaltones. Migrando a la misma altura se observa a la tubulina purificada. Como se ha reportado, es posible separar a las dos principales isoformas de tubulina alterando las condiciones de electroforesis, dado a la migración anómala de la  $\alpha$  tubulina.



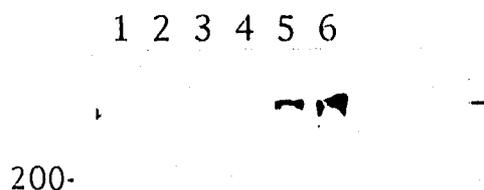
**Figura 6 :** Separación de isoformas de tubulina purificada de cerebro de criceto sirio. Gel de acrilamida al 10% pH 9.0 teñido con azul de coomasie. M: marcador de peso molecular. Carril 2 y 3: 2 y 4 ug de proteína purificada respectivamente.

Con esta preparación de tubulina, se probó la especificidad de los anticuerpo utilizados en este trabajo. Al realizar un inmunoensayo ("Western-blot"), se observa que el anticuerpo monoclonal anti- $\beta$  tubulina utilizado en los ensayos posteriores (clona KMX) revela una sola banda en los carriles en donde únicamente se colocó a la tubulina purificada, coincidiendo con el peso molecular esperado (carriles 5 y 6, figura 7). Las células NIE-115 expresan  $\beta$  tubulina en menor cantidad (carril 7, figura 7).



**Figura 7 :** Western Blot utilizando anticuerpo monoclonal anti  $\beta$  tubulina. Filtro revelado con quimioluminiscencia. A la izquierda se observan los pesos moleculares. Carril 1: 10 ug extracto total; 2 y 3: 5 ug del primer y segundo ciclo de polimerización. 5 y 6: 0.5 y 1 ug de proteína purificada. 7: 20 ug de extracto total de células NIE-115.

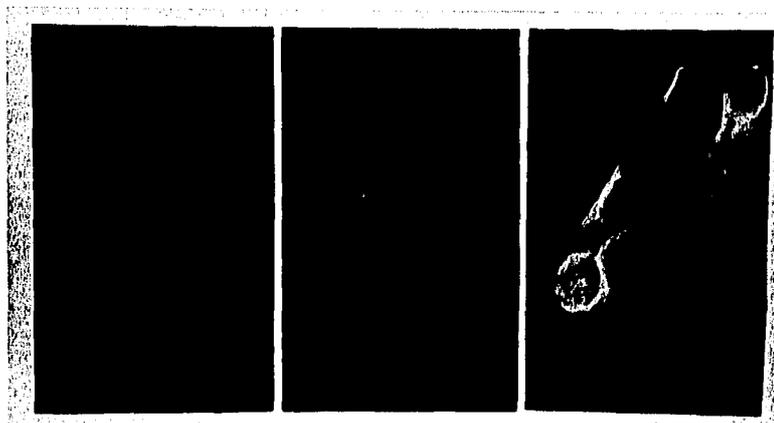
Dada la presencia de proteínas asociadas a microtúbulos, en esta misma preparación de tubulina, se realizó la comprobación del anticuerpo monoclonal anti-MAP2. Como se observa en la figura 8, el anticuerpo reconoce una sola banda del peso molecular esperado, presente tanto en el extracto total (carril 1) como en el carril de la tubulina purificada (carriles 4-6), con una mayor señal en esta última, por razones obvias.



**Figura 8 :** Western Blot utilizando anticuerpo monoclonal anti MAP2. El filtro fué revelado con quimioluminiscencia. 200: marcador de 200 kda 1 Extracto total de cerebro. 2 y 3: 5 ug del primer y segundo ciclo de polimerización y despolimerización. 4, 5 y 6: 0.25, 0.5 y 1 ug de proteína purificada.

De esta manera se corroboró la calidad y especificidad de los reactivos utilizados durante los procedimientos posteriores.

En un primer acercamiento al problema planteado en este trabajo, y con el fin de comprobar que, en nuestras manos, el efecto de la melatonina reportado es reproducible (Huerto-Delgadillo, *et. al.*, 1994), células de neuroblastoma murino NIE-115 cultivadas a baja confluencia sobre cubreobjetos, fueron tratadas con dosis fisiológicas de melatonina ( $10^{-9}$  M), durante un curso temporal de 5 días de duración. La técnica utilizada nos permitió observar únicamente la estructura microtubular *in situ*, con el fin de caracterizarla. Como se observa en la figura 9, al tercer día, las células tratadas con la hormona presentan microtúbulos más engrosados (panel derecho), al compararlas con su contraparte tratada únicamente con vehículo (panel central). En concordancia con estos resultados, es de importancia denotar que en estas células, la administración de melatonina induce un crecimiento de neuritas cuyo máximo se presenta al tercer día (Benítez-King, *et. al.*, 1990) (resultados no mostrados). De la misma manera, se corroboraron los resultados del estudio mencionado, al observarse prolongaciones neuríticas más largas (Fig. 9). Otra característica notoria de este experimento es la presencia de una mayor intensidad de tinción en las células tratadas, lo que apoya más la idea de un incremento en la cantidad de tubulina polimerizada.



**Figura 9** :Inmunofluorescencia localizando  $\beta$  tubulina polimerizada en células NIE-115 tratadas con melatonina. Izquierda: células al tiempo 0. Panel central: células tratadas con vehículo durante 72 horas. Derecha: células tratadas con melatonina por 72 horas.

A continuación se realizó una cuantificación de las fracciones soluble y polimerizada mediante inmunocuantificación (Western Blot), a partir de células tratadas *in vivo*. Como se observa en la figura 10, los niveles de  $\beta$ -tubulina polimerizada se incrementaron en células tratadas con vehículo o con melatonina, con un pico máximo al segundo día de cultivo. Sin embargo, en el caso de las células tratadas con la hormona, este incremento fue más notable, excediendo no sólo el nivel, sino la duración del aumento, presentándose el fenómeno hasta el tercer día. Es de denotar que, durante el cultivo, existe algún alargamiento de neuritas en las células blanco, aunque el nivel es menor que en las células tratadas, lo cual, de alguna manera, podría explicar este efecto.

Los niveles de proteína soluble no sufrieron modificaciones importantes en el caso de las células tratadas con vehículo, permaneciendo constantes durante todo el curso temporal. En cambio, las células tratadas con la hormona presentaron un incremento gradual en estos niveles, con un

máximo al cuarto día del cultivo (fig. 10).

Con el fin de observar de una manera más objetiva los cambios, se realizó una cuantificación relativa de los niveles, mediante densitometría por transmitancia. Los datos graficados se observan en la figura 10, en las que se observa el aumento relativo (en un porcentaje de incremento de unidades arbitrarias) en el eje de las ordenadas contra el tiempo en horas, en el eje de las abscisas. Los cambios son más notorios de esta manera, de un incremento, en los niveles de tubulina polimerizada en el blanco de aproximadamente 800% sobre los del día inicial, a un incremento de 1700% en las células tratadas, hacia el segundo día. Asimismo, se observa que este incremento permanece hasta el tercer día en las células en estudio.

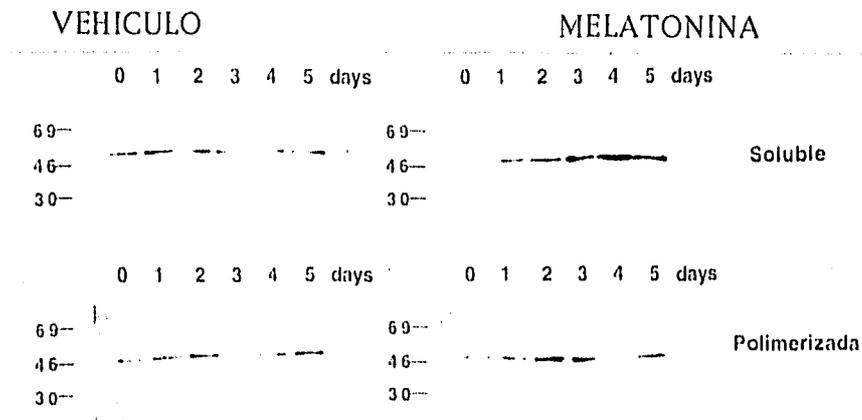


Figura 10 : Niveles relativos temporales de  $\beta$  tubulina polimerizada y soluble en células NIE-115. A la izquierda de cada panel se muestran pesos moleculares. Paneles izquierdos: células tratadas con vehículo. A la derecha células tratadas con melatonina.

### Niveles Sustraídos Fracciones B Tubulina

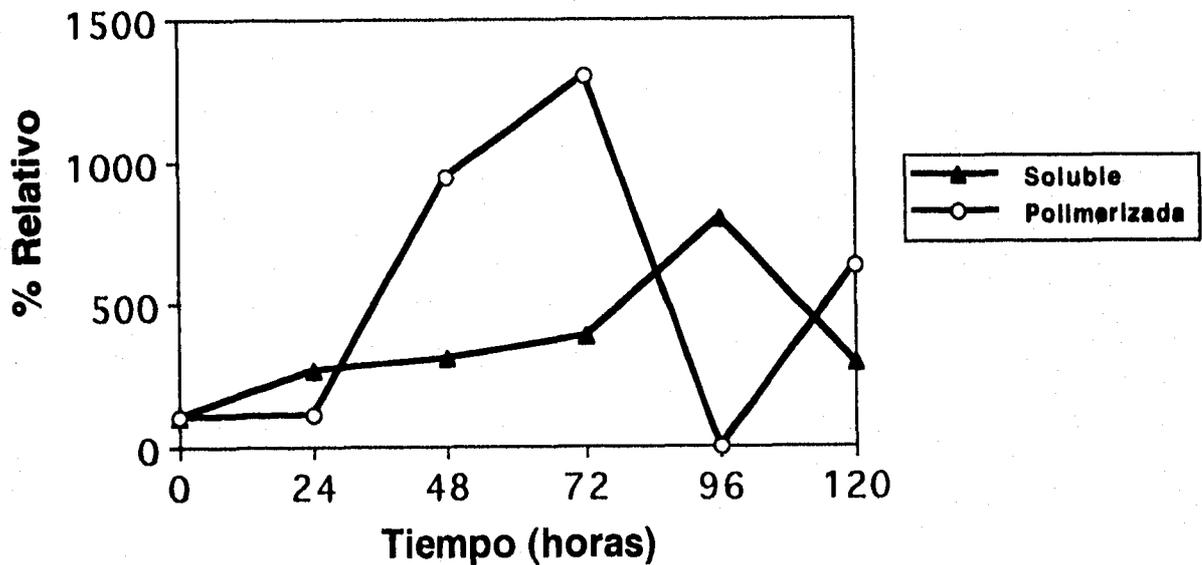
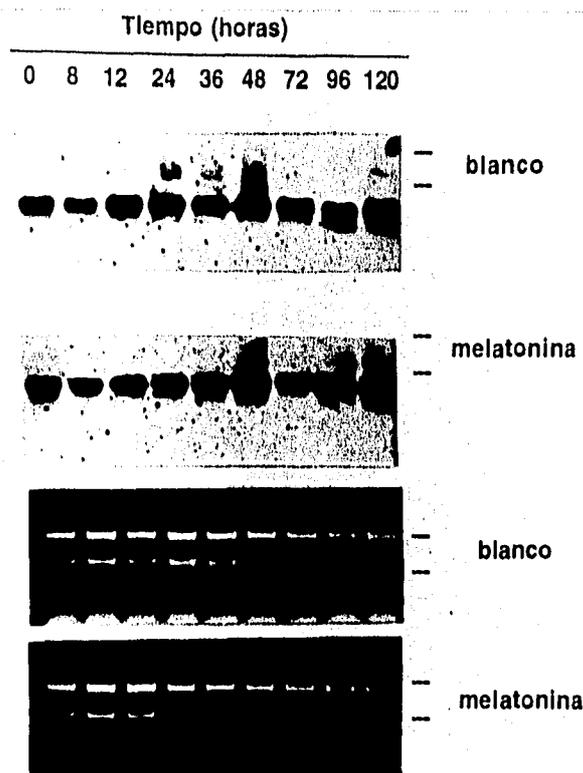


Figura 11. Curso temporal de expresión de  $\beta$  tubulina en fracciones soluble y polimerizada en células tratadas con melatonina. Las curvas que aparecen son sustracciones de los valores de la densitometría de la figura pasada, normalizando a 100% en el valor inicial.

Se ha propuesto un mecanismo autoregulatorio para la expresión de  $\beta$ -tubulina, en el que los niveles del ARN mensajero dependen de los cambios de concentración de las subunidades libres de tubulina, que a su vez determina la expresión última de la proteína. Para analizar esta posibilidad, se procedió a realizar la cuantificación del ARN mensajero de  $\beta$ -tubulina, mediante la técnica de "Northern Blot" (ver material y métodos). Como se observa en la figura 12, se presentan cambios poco notables en la expresión; pese a ello, es posible observar un incremento gradual y pequeño de la expresión hasta un pico presente a las 48 horas, en ambos cultivos, sin diferencias significativas entre células tratadas y células tratadas con vehículo.



**Figura 1 2:** Niveles de ARN mensajero de  $\beta$  tubulina en un ensayo de Northern Blot. Panel superior: células tratadas con vehículo. Siguiente panel: células tratadas con melatonina. Paneles inferiores: geles teñidos con bromuro de etidio previo a la transferencia para demostrar cantidades cargadas de ARN total. A la derecha se muestra las posiciones de los ARN ribosomales.

A continuación se procedió a analizar los niveles totales de la  $\beta$ -tubulina, mediante inmunocuantificación ("Western Blot"). Como se observa en la figura 13, los niveles no sufren cambios dramáticos, pese a ello, se denota una diferencia de expresión final (72 a 120 horas) de esta proteína en el caso de las células tratadas con la hormona. En ambos casos (tratadas con melatonina y blanco) existió un incremento en la expresión total de la proteína.

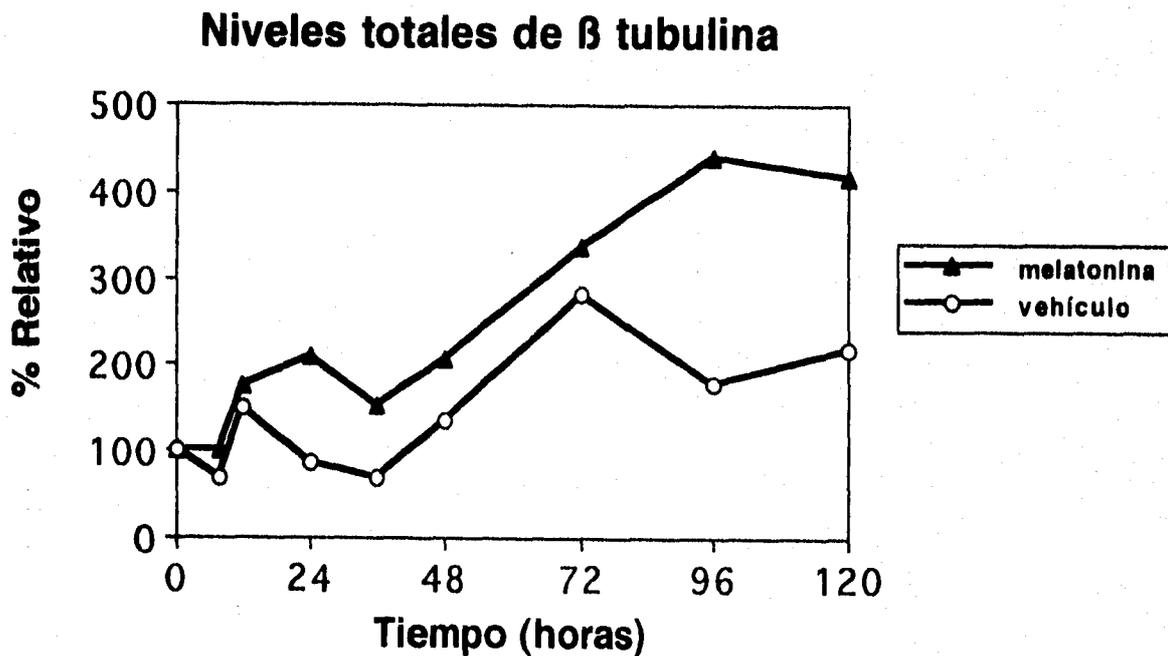
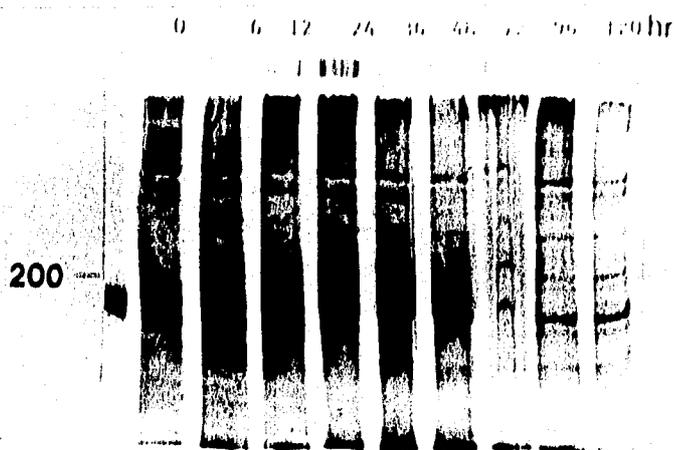


Figura 13: Niveles de expresión de  $\beta$  tubulina total en células NIE-115 tratadas con vehículo o melatonina. Los valores se encuentran normalizados con el punto inicial (0 horas)

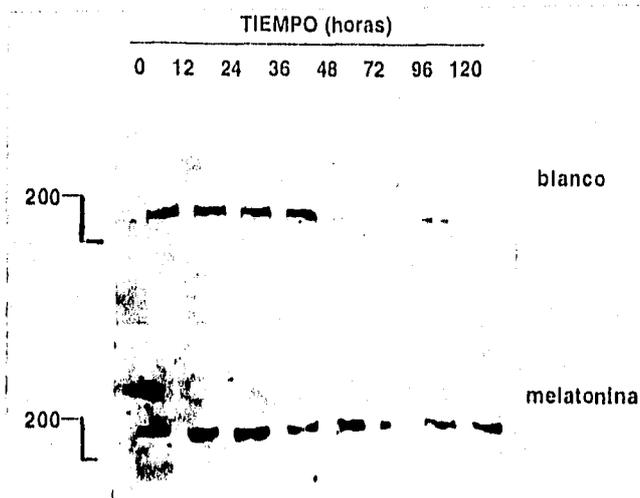
Dado a que se conoce que el proceso de alargamiento de dendritas depende de la polimerización de tubulina y que esta, a su vez, es dependiente de la función de proteínas asociadas a microtúbulos, particularmente de la MAP2, se procedió a analizar los niveles de esta. Debido a que es posible la visualización directa de esta proteína en extractos crudos de cerebro de diversas especies, se efectuó un curso temporal como los descritos anteriormente y las proteínas fueron analizadas mediante geles desnaturizantes de acrilamida al 10%, teñidos con plata (Fig. 14).



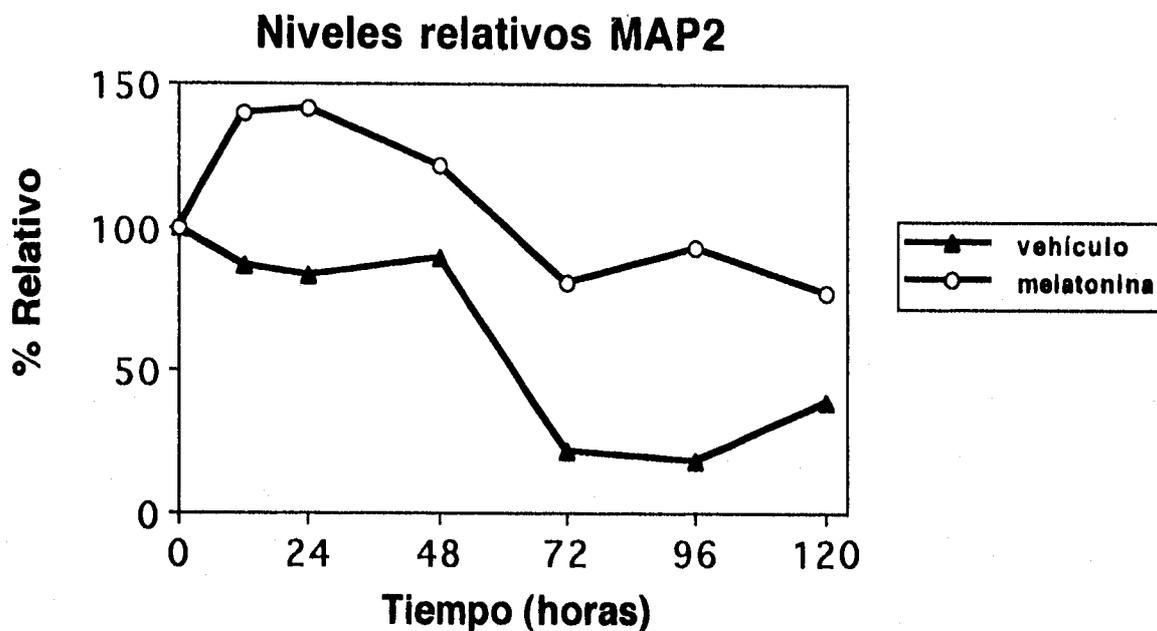
**Figura 14:** Curso temporal de células NIE-115 tratadas con melatonina. Gel de acrilamida teñido con plata.

Como se observa en esta figura, no obstante a probar varios modificaciones del método, no fué posible aislar la banda en cuestión, por lo que se procedió a analizar los niveles mediante un ensayo de inmunocuantificación ("Western Blot"). Mediante este ensayo, se observó un incremento pequeño en la expresión de esta proteína en las células tratadas con la hormona, durante los primeros tiempos (hasta las 48 horas) y, de

manera más importante, la persistencia de la expresión posterior al descenso experimentado en los cultivos tratados con vehículo (Fig. 15 y 16). Este efecto se presenta a partir de las 48 horas después de la exposición a la hormona, momento en que los niveles comienzan a disminuir en las células blanco.

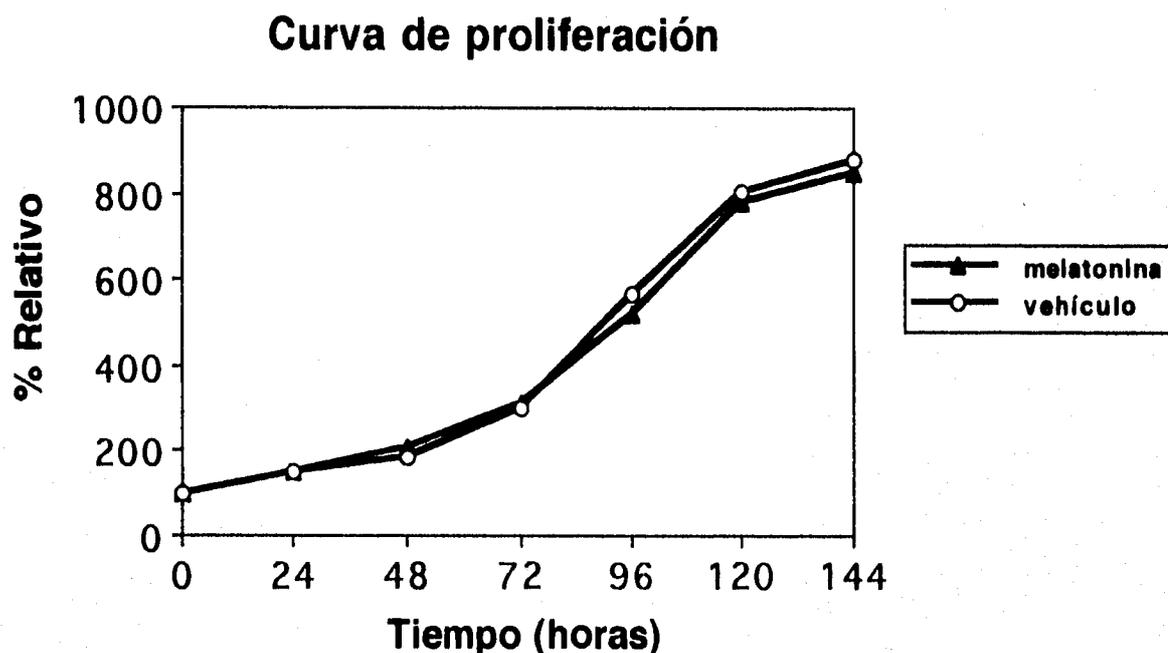


**Figura 15:** Expresión de MAP2 en células NIE-115 durante un curso temporal, revelado mediante Western Blot. A la izquierda el marcador de peso molecular (200 kda). En el panel superior: células tratadas con vehículo. Panel inferior: células tratadas con melatonina.



**Figura 16:** Niveles relativos de expresión de MAP2 durante un curso temporal, en células NIE-115, tratadas con vehículo o melatonina. La gráfica muestra la densitometría de la figura anterior, normalizada al tiempo inicial (0 horas)

Finalmente, dado a que se conoce que la melatonina es capaz de inducir un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular, y se conoce que durante este participa otro tipo de fenómenos de regulación de la expresión de  $\beta$ -tubulina (Ball, *et. al.*, 1992), se realizó una curva de proliferación. Como se muestra en la figura 17, no existieron cambios en el patrón de proliferación entre células tratadas con la hormona o con vehículo, mostrándose únicamente la curva esperada, dada las condiciones de baja confluencia al inicio del cultivo. Esto rechaza la posible intervención de este fenómeno en los resultados antes descritos.



**Figura 17:** Crecimiento de células NIE-115 en cultivo, tratadas con vehículo o melatonina, mediante la técnica de MTT. Los resultados se encuentran normalizados con respecto al tiempo inicial (0 horas).

## DISCUSION.

### Expresión de $\beta$ tubulina

En el presente trabajo, la administración de melatonina tuvo un efecto polimerizante sobre la tubulina, como se demuestra por la inmunofluorescencia y la inmunocuantificación. Este resultado era el esperado, dado los antecedentes (Benítez-King, *et. al.*, 1990, Huerto-

Delgadillo, et. al., 1994) de que la administración de la hormona produce un incremento en el número de células NIE-115 con prolongaciones neuríticas y que, *in vitro* y en citoesqueletos *in situ* tiene efectos polimerizantes sobre la tubulina. El presente estudio corrobora estos resultados utilizando células vivas, en donde diversos constituyentes difusibles (p.e. AMPc, diacilglicerol, óxido nítrico) se encuentran presentes y podrían modificar la respuesta final de sistemas *in vitro* e *in situ*. Además se evaluaron los dos componentes estructurales del sistema de ensamblaje de microtúbulos: la tubulina soluble y la polimerizada. Es interesante destacar que el incremento temprano en los niveles de proteína polimerizada no es a expensas de la  $\beta$ -tubulina soluble, lo que se puede observar claramente en las figuras 10 y 11, del punto inicial hasta las 48 horas. Posterior a este momento, los niveles de ambas fracciones de  $\beta$ -tubulina son concordantes, con cambios inversamente proporcionales. Este fenómeno temprano puede deberse a la presencia coincidente de síntesis activa de la proteína seguida de una rápida polimerización, lo cual evitaría la disminución de los niveles de  $\beta$ -tubulina soluble. Como se ha mencionado, existen reportes en donde la administración de melatonina provoca el efecto contrario (Piezzi y Cavicchia, 1981; Reed, et. al., 1969) en algunos otros modelos. La discrepancia puede explicarse por las diferentes condiciones experimentales utilizadas, entre ellas, la concentración de la hormona, que, a diferencia de la dosis fisiológica del presente estudio, en aquellos fué mayor ( $10^{-4}$  a  $10^{-6}$  M); esta explicación ya ha sido propuesta anteriormente (Benítez-King y Antón-Tay, 1993). El efecto obtenido no tuvo repercusiones sobre la expresión de  $\beta$  tubulina, de manera discordante con el modelo de autoregulación propuesto por Cleveland (Cleveland, 1988). En la serie de estudios que llevaron a la conclusión de la existencia de este mecanismo, se utilizó la sobreexpresión de la  $\beta$  tubulina de manera no fisiológica, ya sea por transfecciones o mediante el uso de drogas

despolimerizantes para demostrar la variación en los niveles del ARN mensajero de esta proteína (Cleveland, 1988; Gay, *et. al.*, 1987; Theodorakis y Cleveland, 1992). Estas condiciones permitieron la sobreexpresión de  $\beta$  tubulina a muy altos niveles, con los consecuentes cambios en la expresión del ARN mensajero, también de carácter profundo. A diferencia de esos reportes, en el presente estudio, los cambios en los niveles del ARN mensajero no fueron dramáticos, lo cual puede ser debido a que se analizó un proceso, dentro de lo posible, fisiológico, en el cual no era posible esperar cambios más allá de un límite permisible para la economía celular. Es probable que el mecanismo se establezca para mantener la homeostasis, en condiciones normales, de la estructura de los microtúbulos y que se deba mantener un nivel mínimo de expresión del mensajero de  $\beta$  tubulina, hasta la superación de un umbral, a partir del cual el mecanismo se inicie, sin que se puedan excluir la participación de otros fenómenos no estudiados (transcripción, estabilidad de la proteína, etc), por alejados que se encuentren de los antecedentes existentes. Además, existen diversas isoformas de  $\beta$ -tubulina (Eddem 1981, Gard, 1985), por lo que la sonda utilizada podría no haber detectado los cambios en la isoforma específica involucrada en el fenómeno. Es necesario considerar que el fenómeno dista mucho de ser entendido por completo, dado a que los estudios han sido a nivel básico, y poco fisiológico, por lo que este estudio, aunque descriptivo, provee información al respecto.

#### Expresión de MAP2.

El proceso de alargamiento de neuritas depende, entre otros procesos, de la estabilización de microtúbulos por las proteínas asociadas a estos (MAP). Dentro de estas la MAP2 es considerada como uno de los elementos más importantes en este proceso, que, mediante su participación como enlace

y estabilizante de la arquitectura dendrítica, mediante su habilidad de promover la polimerización microtubular (Freidrich y Aszódi, 1991) podría mediar los efectos descritos en el presente estudio. *In vitro*, la habilidad de esta proteína para promover la polimerización de  $\beta$  tubulina, es inhibida por fosforilación vía la cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) y/o por la cinasa II dependiente de calmodulina (Yamauchi y Fijisawa, 1983; Selden y Pollard, 1983). Este efecto se presenta dada la presencia de 13 sitios fosforilables en su secuencia, que son consenso para la PKA (Jefferson y Schuman, 1991), además de la presencia de igual número de sitios para la cinasa dependiente de calmodulina (Vallano, *et. al.*, 1985). Dado a que la melatonina es un antagonista de la calmodulina, la administración de ella podría evitar la fosforilación de la MAP2 por esta vía, promoviendo así la polimerización. Más aún, la melatonina inhibe la activación de la cinasa II dependiente de calmodulina (Huerto-Delgadillo, *et. al.*, 1994), un efecto que sumado al antagonismo de la calmodulina, colaboraría en la polimerización. El efecto de la fosforilación sobre la vida media de la MAP2 no ha sido estudiado. La proteína es rica en secuencias "PEST" (prolina (P), glutamina (E), serina (S) y treonina (T)), señales putativas para la rápida degradación proteolítica, por lo que ésta debe de encontrarse separada o protegida de proteasas intracelulares, para poder ejercer su función. De esta manera, se ha encontrado que es posible detectar MAP2 marcada varios días después de ser inyectadas a neuronas en cultivo (Okabe e Hirokawa, 1989). A este respecto, las secuencias "PEST" deben de encontrarse resguardadas de las proteasas, por medio de la interacción con otras proteínas y/o por modificaciones en su estructura secundaria, dado a que, *in vitro*, la MAP2 es degradada rápidamente por calpaína (Johnson, *et. al.*, 1991). Así, la melatonina podría provocar un cambio estructural en esta proteína por medio de una disminución en su fosforilación, permitiendo así la asociación a

otras proteínas, lo que mantendría a las secuencias "PEST" inaccesibles, incrementando así la vida media, para poder continuar con el proceso de polimerización durante el alargamiento de neuritas. Este esquema puede ser compatible con los resultados anteriormente expuestos: el inicio de la polimerización se presenta antes de las 48 horas, momento en el que no se revelaría cambio en los niveles de la MAP2, siendo únicamente las modificaciones postraduccionales la razón de este incremento. A partir de este momento, en las células tratadas con melatonina, la vida media de la proteína se modificaría por las razones antes mencionadas, permaneciendo constante su expresión. De la misma manera, no debe de excluirse la posible participación de otros mecanismos transcripcionales o postranscripcionales que incrementen la expresión de MAP2.

A este respecto es importante denotar el hecho de que la melatonina se ha localizado al núcleo de diferentes tipos celulares y que recientemente se ha descrito que es capaz de unirse y activar a varios miembros de la familia de receptores nucleares para el ácido retinóico, huérfanos hasta el momento: RZR $\beta$ , RZR alfa y ROR $\beta$  (Becker-André, *et. al.*, 1994, Steinhilber, *et. al.* 1995, Wiesenberg, 1995). Dado a que se demostró un retraso en la presentación de los efectos de la hormona (el efecto máximo fué al tercer día), no puede excluirse una regulación transcripcional directa de proteínas reguladoras o participantes en este fenómeno (MAP2, tubulina) de existir este tipo de receptores en las células NIE-115.

Por otro lado, es interesante destacar la reciente clonación de un receptor de membrana para la melatonina (Ebisawa, *et. al.*, 1994), que posee siete dominios hidrofóbicos transmembranales y que pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteínas unidoras de nucleótidos de guanina. Esta proteína es capaz de inhibir a la adenilato ciclasa, dado a que la unión del receptor con la melatonina inhibe la acumulación de AMP cíclico inducida

por forskolina. De existir estos receptores en las células que se estudiaron estos podrían colaborar con los efectos reportados en el presente trabajo.

#### Efectos sobre la proliferación celular.

En el presente estudio no observamos cambios en la proliferación celular. Esto está en desacuerdo con un reporte previo (Benítez-King, *et. al.*, 1994b). En este estudio se demostró que la melatonina, en células NIE-115, inhibe la proliferación, un hecho que se correlaciona con la vida media de la calmodulina. La discordancia puede deberse a diferencias en el pase celular, dado a que las células que utilizamos provienen de un pase más avanzado al del estudio referido, además de que las condiciones experimentales son diferentes.

De esta manera, los resultados se podrían incluir en el modelo propuesto por diversos autores (Dubocovich, 1995, Huerto-Delgadillo, *et. al.*, 1994) (Fig. 18). La melatonina, podría unirse e inhibir a la calmodulina y a la cinasa II dependiente de la misma y por medio de estas propiciar la polimerización de tubulina. A la vez, estos mismos efectos podrían tener como blanco a la MAP2, fosforilándola e incrementando su vida media, sin excluir un posible incremento de su expresión a nivel transcripcional. Esta, a su vez, colaboraría con el fenómeno establecido de antagonismo del sistema calcio-calmodulina, de una manera sinérgica. Estos cambios no producen alteraciones significativas en los niveles del ARN mensajero, por las razones antes mencionadas. Por último, aunque no existe actualmente evidencia, la melatonina podría unirse al receptor membranal en estas células, inhibiendo así a la adenilato ciclasa, y, por ende a la producción de AMP cíclico, disminuyendo la actividad de la PKA. Este efecto, por sí mismo, podría inhibir la fosforilación de la MAP2, colaborando con los cambios reportados

en este y otros trabajos. La recientemente descubierta interacción y activación de los factores de transcripción relacionados con el ácido retinóico podría modificar la respuesta final de la hormona sobre la polimerización de  $\beta$  tubulina, y sobre la expresión de MAP2 mediante la activación o represión de la transcripción de estos u otros genes. Este último hecho puede ser la clave en los resultados presentados en este trabajo, dado a que el ARN mensajero de MAP2 sufre modificaciones en paralelo a la expresión de la proteína, señalando la existencia de regulación transcripcional o postranscripcional (Meléndez, resultados preliminares).

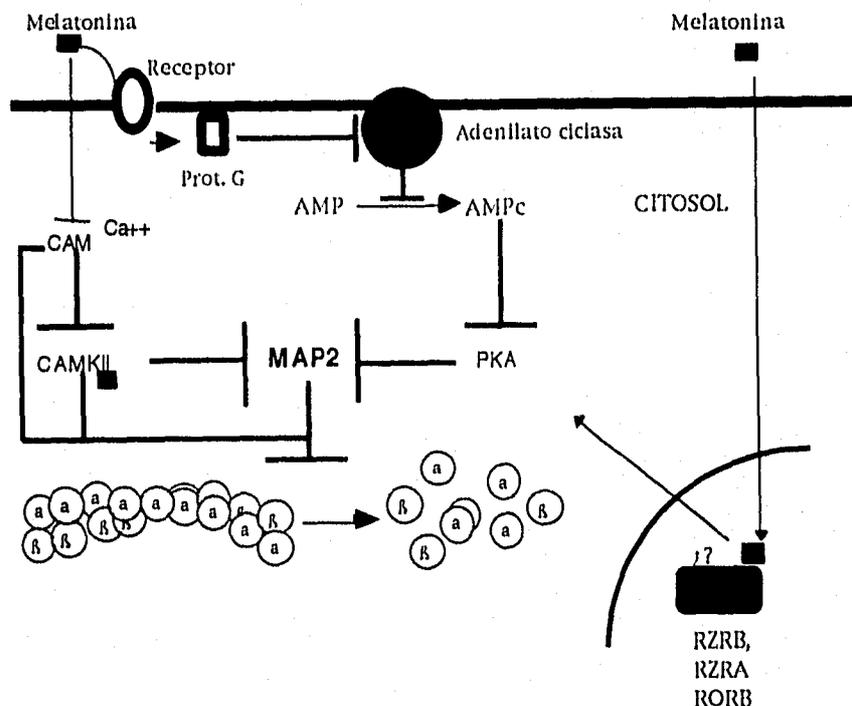


Figura 18

Finalmente, como vías a seguir, se puede proponer una serie de experimentos encaminados a analizar de manera más profunda los resultados antes mencionados, entre los que se podría incluir la medición de la vida media y de las modificaciones postraduccionales de la MAP2, en un curso temporal, con el fin de asociar estos cambios a los ya expuestos; la

medición de los niveles de su ARN mensajero y/o transcripción; la inhibición específica del antagonismo sobre la vía AMP cíclico y calcio/calmodulina dependiente, con el fin de establecer si ambas participan, y, por último, el uso de los receptores recientemente identificados para establecer el nexo entre ellos y los resultados presentados en este trabajo, mediante técnicas moleculares más avanzadas.

## CONCLUSION.

La administración de melatonina induce cambios de importancia sobre la expresión de  $\beta$  tubulina, debidos, principalmente, al efecto polimerizante de la misma sobre los microtúbulos. Estos cambios no son debidos al efecto que tiene la hormona sobre la proliferación celular, sino muy probablemente sobre las proteínas reguladoras del proceso de alargamiento de neuritas y de polimerización de tubulina (MAPs), entre las que destaca, por los resultados obtenidos, la MAP2. Es importante denotar el hecho de que los niveles de ARN mensajero de tubulina, no correlacionan con el modelo de autorregulación propuesto por otros autores, un hecho que pudiera deberse al carácter fisiológico de los experimentos realizados en esta tesis.

## BIBLIOGRAFIA

- Acuna-Castroviejo, D., Reiter, R.J., Menendez-Pelaez, A., Pablos, M.I., and Burgos, A. (1994) Characterization of high-affinity binding sites in purified nuclei of rat liver. *J. Pineal Res.* 16: 100-112.
- Antón-Tay, F., Forray, C. and Ortega-Corona, B.G., (1988) Subneural fate of intracerebroventricular injected  $^3\text{H}$ -melatonin. *J. Pineal Res.* 5 : 125-133.
- Antón-Tay, F., Huerto-Delgadillo, L., Ortega-Corona, B.G., and Benitez-King, G. (1993) Melatonin antagonism to calmodulin may modulate multiple

- cellular functions, in : Melatonin and the Pineal Gland from basic science to clinical application. pp 41-46. Eds Y. Touitou, J. Arendt and P. Pevet. Elsevier, Amsterdam.
- Axelrod, J. (1974) The pineal gland: a neurochemical transducer *Science* 184:1341-1348.
- Ball, R.L., Albrecht, T., Thompson, W.C., James, O., Carnery, D.H. (1992) Thrombin, Epidermal Growth Factor, and Phorbol Myristate Acetate Stimulate Tubulin Polymerization in Quiescent Cells - A Potential Link to Mitogenesis-. *Cell Mot. Cytosk.* 23: 265-278.
- Banerjee, S., Keer, V., Winston, M., Kelleher, K. J., and Margulis, L., (1972). Melatonin inhibitor of microtubule based oral morphogenesis in *Stentor coeruleus*. *J. Protozool.* 19:108-113.
- Banerjee, S., Margulis, L., (1973) Mitotic arrest by melatonin. *Exp. Cell Res.* 78:314-318.
- Ben Ze'ev, A., Farmer, S. R. and Penman, S. (1979) Mechanisms of regulating tubulin synthesis in culture mammalian cells. *Cell* 17: 3119-325.
- Benitez-King, G., Huerto-Delgadillo, L., and Anton-Tay, F. (1990) Melatonin effects on the cytoskeletal organization of MDCK and neuroblastoma NIE-115 cells. *J. Pineal Res.* 9: 209-220.
- Benitez-King, G., Huerto-Delgadillo, L., and Anton-Tay, F. (1991) Melatonin modifies calmodulin cell levels in MDCK and NIE-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity in vitro. *Brain Res.* 557: 289-292.
- Benitez-King, G., Huerto-Delgadillo, L., and Anton-Tay, F. (1991) Changes in calmodulin compartmentalization in MDCK cells induced by melatonin. *Proc. Neurosci. Soc.* 17:1193 Abstr. 473.19.
- Benitez-King, G., Huerto-Delgadillo, L., and Anton-Tay, F. (1991) Melatonin modifies calmodulin cell levels in MDCK and NIE-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity in vitro. *Brain Res.* 557:289-292.
- Benitez-King, G. and Anton-Tay, F. (1993) Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia.* 49: 635-641.
- Benitez-King, G., Huerto-Delgadillo, L., and Anton-Tay, F. (1993) Binding of <sup>3</sup>H-melatonin to calmodulin. *Life Sci.* 53:201-207.
- Benítez-King, G., Ríos, A., Martínez, A., and Antón-Tay, F. (1996) In vitro inhibition of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochim Biophys Acta*
- Becker-André, M., Wiesenberg, I., Schaeren-Wiemers, N., André, E., Missbach, M., Saurat, J.H., and Carlberg, C. (1994) Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem* 269: 28531-28534.
- Biegel, D., and Pachter, J.S., (1992) mRNA association with the cytoskeletal framework likely represents a physiological binding event. *J. Cell. Biochem.* 48: 98-106.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Biesalski, H.K., Welker, H.A., Thalmann, R., and Vollrath, L. (1988) Melatonin and other serotonin derivatives in the guinea pig membranous cochlea. *Neurosci Lett.* 91: 41-46.
- Binkley, S. (1993) Structures and molecules involved in generation and regulation of biological rhythms in vertebrates and invertebrates. *Experientia* 49: 643-653.
- Bollag, D.M., and Edelman, S.J. (1991). *Protein Methods*. New York, Wiley-Liss, Inc.
- Bond, and Farmer. (1983) Regulation of tubulin mRNA production in rat brain: expression of a new tubulin mRNA with development. *Mol. Cell. Biol.* 3: 1313-1342
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bronstein, J.M., Farber, D.B., and Wasterlain, C.G. (1993). Regulation of type-II calmodulin kinase: functional implications. *Brain Res. Rev.* 18: 135-147.
- Burgoyne, R.D. (1991) High Molecular Weight Microtubule-Associated Proteins of Brain. de The Neuronal Cytoskeleton. pp 75-91. Wiley-Liss, Inc.
- Brzesinski, A., Seibel, M.M., Lynch, H.J., Deng, M.H. and Wurtman, R.J. (1987) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64: 865-870.
- Cardinalli, D.P., Hyypya, M.T., and Wurtman, R.J. (1973) Fate of Intracisternally injected Melatonin in the rat brain. *Neuroendocrinology.* 12; 30-40.
- Cardinalli, D.P., Vacas, M.I., and Boyer, E. E. (1979) Specific binding of melatonin in bovine brain. *Endocrinology.* 103: 437-441.
- Cardinali, D.P. (1981) Melatonin a mammalian pineal hormone. *Endocr. Rev.* 2:327-354.
- Cardinalli, D. P. Vacas, M.I., and Lowenstein, P.R. (1985) en The Pineal Gland; Current State of Pineal research (Mess, B., Ruzasz, C., Tima, L. and Pevet, P., eds, pp. 273-289, Akademia Kiado, Budapest.
- Caron, J. M., Jones, A.L, Ball, L.B., and Kirschner. (1985) Autoregulation of tubulin synthesis in enucleated cells. *Nature (London)* 317: 648-651.
- Cleveland, D. W., Hughes, S. H., Stubblefield, E., Kirschner, W., and Varmus, H.E. (1981) Multiple  $\alpha$  and  $\beta$  tubulin genes represent unlinked and dispersed gene families. *J. Biol. Chem.* 256: 3130-3134.
- Cleveland, D. W., Lopata, M. A., Sherline, P., and Kirschner, (1981) Unpolymerized tubulin modulates the level of tubulin mRNAs. *Cell.* 25: 537-546.
- Cleveland, D. W., Pittenger, M. F., and Feramisco, J. R. (1983) Elevation of tubulin levels by microinjection suppresses new tubulin synthesis. *Nature (London)* 305: 738-740.
- Cleveland, D. W., and Havercroft, J.C. (1983) Is apparent autoregulatory control of tubulin synthesis nontranscriptionally controlled? *J. Cell Biol.* 97:

- 919-924.
- Cleveland, D. W. (1988) Autoregulated instability of tubulin mRNAs : a novel eukaryotic regulatory mechanism. *Trends Biochem. Sci.* 13: 339-343.
- Cohen, M., Roselle, D., Chabner, B., Schmidt, T. J., and Lippman, M., (1978) Evidence for a cytoplasmic melatonin receptor. *Nature (London)*. 274: 894-895.
- Crespo, D., Fernandezviadero, C., Verduga, R., Ovejero, V., Cos, S. (1994). Interaction between melatonin and estradiol on morphological and morphometric features of MCF-7 human breast cancer cells. *J Pineal Res* 16: 215-222.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- Chong, N.W.S. and Sudgen, D. (1994) Thermodynamic analysis of agonist and antagonist binding to the chicken brain melatonin receptor. *Br. J. Pharmacol.* 111: 295-301.
- Dash, P.K., Karl, K.A., Colicos, M.A., Prywes, R. and Kandel, E.R., (1991) cAMP response element-binding protein is activated by  $Ca^{2+}$ /calmodulin as well as cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 5061-5065.
- Diez-Guerra, F.J., Avila, J., (1995) An increase in phosphorylation of microtubule-associated protein 2 accompanies dendrite extension during the differentiation of cultured hippocampal neurons. *Eur. J. Biochem.* 227: 68-77.
- Dubocovich, M. L. (1987). Luzindole (N-0774): A competitive melatonin receptor antagonist. *Pro. Xth Int. Congr. Pharmacol.* abstr. 0348.
- Dubocovich, M. L. (1988) Pharmacology and function of melatonin receptors. *FASEB. J.* 2: 2765-2773.
- Dubocovich, M.L. (1995) Melatonin receptors: are there multiple subtypes?. *Trends. Pharmacol. Sci.* 16: 50-56.
- Edde, B., Jeantet, C., and Gros, F. (1981) One  $\beta$ -Tubulin subunit accumulates during neurite outgrowth in mouse neuroblastoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 103(3): 1035-1043.
- Ebisawa, T., Karne, S., Lerner, M. R., and Reppert, S. M. (1994) Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 6133-6137.
- Eldon, J. Effect of exogenous melatonin and exposure to a ram on the time of onset and duration of the breeding season in Icelandic Sheep. (1993). *J. Reprod Fertil.* 99:1-6.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132:6
- Friedrich, P., and Aszódi, A. (1991) MAP2: a sensitive cross-linker and

- adjustable spacer in dendritic architecture. *FEBS. lett* 295: 5-9.
- Freire, F., and Cardinalli, D. P. (1975). Effects of melatonin treatment and environmental lighting on the ultrastructural microtubule protein content of the rat pineal gland. *J. Neural Transm.* 37: 237-257.
- Funan, H., (1966) The influence of certain hormones and chemicals on mammalian pigment cells. *J Invest. Derm.* 46: 117-124.
- Gard, D. L., and Kirschner, M. W. (1985) A polymer-dependent increase in phosphorylation of  $\beta$ -Tubulin accompanies differentiation of a mouse neuroblastoma cell line. *J. Cell Biol.* 100: 764-774.
- Gay, D. A., Yen, T. J. Lau, J. T., and Cleveland, D. W. (1987) Sequences that confer  $\beta$ -Tubulin autoregulation through modulated mRNA stability reside within exon 1 of a  $\beta$ -Tubulin mRNA. *Cell.* 50: 671-679.
- Glass, J. D. and Lynch, G. R. (1982) Melatonin: Identification of site of antigonadal action mouse brain. *Neuroendocrinology*, 35: 117-122
- Gern, W. A. and Nervina, J. M. (1986) en Pineal and Retinal Relationships (O'Brien, P.J., and Klein, D.C., eds.), p. 119-132, Academic Press, New York.
- Gonzalez-Brito, A., Reiter, R. J., Menendez-Pelaez, A., Guerrero, J. M., Jones, D. L. and Santana, C. (1988) Darkness-induced changes in noradrenergic input determine the 24 hour variation in beta-adrenergic receptor density in the rat pineal gland: in vivo physiological and pharmacological evidence. *Life Sci.* 47:707-714.
- Hardeland, R (1993) The presence and function of melatonin and structurally related indoleamines in a dinoflagellate, and a hypothesis on the evolutionary significance of these tryptophan metabolites in unicellulars. *Experientia* 49: 614-622
- Hardeland, R, and Fuhrberg, B. (1994) On the pleiotropy of indoleamine actions in a dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra* - Comparison of 5-methoxytryptamine with 5-fluorotryptamines and 6-fluorotryptamines. *Comp. Biochem. Physiol.- Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 107: 331-336.
- Hedlund, L., Lischko, M.M., Rollag, M.D. and Niswender, G.D. (1976) *Science* 195: 686-687.
- Ho, A. K., Chick, C. L. and Klein, D. C. (1987) Protein Kinase C is involved in adrenergic stimulation of pineal cGMP accumulation. *J. Biol. Chem.* 262:10059-10064.
- Huerto-Delgado, L., Antón-Tay, F., and Benítez-King, G. (1994) Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: rate of melatonin as a calmodulin antagonist. *J. Pineal. Res.* 17: 55-62.
- Huether, G. (1993) The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. *Experientia* 49: 665-670.
- Jefferson, A. B., and Schulman, H. (1991) Phosphorylation of microtubule-associated protein-2 in GH3 cells. *J Biol Chem* 266: 346-354.
- Johnson, G. V. W., Kittersky, J. M., and Jope, R. S. (1991) Degradation of

- microtubule-associated protein 2 and brain spectrin by calpain: a comparative study. *J. Neurochem.* 56: 1630-1639.
- Kennaway, D.J., Hugel, H.M. (1992) At the cutting edge. Melatonin binding sites: Are they receptors? *Mol. Cell Endocrinol.* 88:C1-9.
- Khan, A.V. and Wilson, T. (1995) Reactive oxygen species as cellular messengers. *Chem. Biol.* 2: 437-445.
- Klein, D.C., Auerbach, D., Namboodiri, M.A.A. and Wheler, G.H.T., (1981) in *The Pineal Gland. Vol. 1, Anatomy and Biochemistry* (Reiter, R.J., ed.), pp. 199-227, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Klein, D.C., Melatonin and the pineal. in D. Evered and S. Clark (Eds) *Photoperiodism, CIBA Foundation Symposium 117*, Pitman, London, (1985.) pp 38-56.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)* 227: 680-685.
- Lerner, A. B., Case, J. D., Takahashi, Y., Lee, T. H., and Mori, W., (1958) Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightness melanocytes. *J. Am Chem. Soc.* 80:2587-2591.
- Los, M., Schenk, H., Hexel, K., Baeuerle, P.A., Droge, W. and Schulze-Osthoff, K. (1995) IL-2 gene expression and NF-kB activation through CD28 requires reactive oxygen production by 5-lipoxygenase. *EMBO J.* 14: 3731-3740.
- Lopata, M. A., and Cleveland, D. W. (1987) In vivo microtubules are copolymers of available  $\beta$ -tubulin isotypes: localization of each of six vertebrate  $\beta$ -tubulin isotypes using polyclonal antibodies elicited by synthetic peptide antigens. *J. Cell Biol.* 105: 1707-1720.
- Malawista, S. E., (1975) Microtubules and the movement of melatonin granules in frog dermal melanocytes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 253: 702-754.
- Menendez-Pelaez, A., Poeggeler, B., Reiter, R. J., Barlow-Walden, L., Pablos M. L., and Tan, D.-X. (1993) Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissue: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J. Cell. Biochem.* 53: 373-382.
- Menendez-Pelaez, A., and Reiter, R. (1993) Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J. Pineal. Res.* 15: 59-69
- Messenger, E. A., and Warner, A. E., (1977) The action of melatonin on single amphibian pigment cells in tissue culture. *Br J. Pharmac.* 61: 607-614.
- Molis, T. M., L. L. Spriggs, Y. Jupiter, and S. M. Hill. 1995. Melatonin modulation of estrogen-regulated proteins, growth factors, and proto-oncogenes in human breast cancer. *J Pineal Res.* 18: 93-103
- Moore, R., and Klein, D. (1974) Visual pathways and central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase. *Brain Res.* 71: 17-33.
- Nowak, J.Z., Zurawska, E., and Zawilska, J. (1989) Melatonin and its generating system in vertebrate retina: circadian rhythm, effect of environmental

- lighting and interaction with dopamine. *Neurochem Int.* 14: 397-406.
- Okabe, S., and Hirokawa, N. (1989) Rapid turnover of microtubule-associated-protein MAP2 in the axon revealed by microinjection of biotinylated MAP2 into cultured neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 4127-4131.
- O'Dea, R. F. and Zatz, M. (1976) Catecholamine-stimulated cyclic GMP accumulation in the rat pineal: Apparent presynaptic site of action *Proc. Acad. Sci. USA.* 73,3398-3402.
- Pachter, J. S., Yen, T. J., and Cleveland, D. W. (1987) Autoregulation of tubulin expression is achieved through specific degradation of polysomal tubulin mRNAs. *Cell.* 51: 283-292.
- Pande, S. V., and Murthy, M. S. R. (1994) A modified micro-Bradford procedure for elimination of interference from sodium dodecyl sulfate, other detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 220: 424-426.
- Pangerl, B., Pangerl, A. and Reiter, R. J. (1990) Circadian variations of adrenergic receptors in the mammalian pineal gland: a review. *J. Neural Transm.* 81, 17-30.
- Pierpaoli, W., Regelson, W., (1994) Pineal control of aging: effect of melatonin and pineal grafting on aging mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91:787-791.
- Pickering, D.S. and Niles, L.P. (1990) Pharmacological characterization of melatonin binding sites in Syrian hamster hypothalamus. *Eur. J. Pharmacol.* 175: 71-77
- Pittenger, M. F., and Cleveland, D. W., (1985) Retention of autoregulatory control of tubulin synthesis in cytoplasts: demonstration of a cytoplasmic mechanism that regulates the level of tubulin expression. *J. Cell. Biol.* 101:1941-1952.
- Piezzi, R. S., and Cavicchia, J. C. (1981) Effects of cold and melatonin on the microtubules of the toad sciatic nerve. *Anat. Rec.* 200:115-120.
- Poeggeler, B, and Hardeland, R. (1994) Detection and quantification of melatonin in a dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra*: Solutions to the problem of methoxyindole destruction in non-vertebrate material. *J Pineal Res.* 17: 1-10.
- Popova, J. S. and Dubocovich, M. L. (1995) Melatonin receptor-mediated stimulation of phosphoinositide breakdown in chick brain slices. *J. Neurochem.* 64: 130-138.
- Reed, B. L., Finnin, B. C., and Riffin, N. E., (1969) The effect of melatonin and epinephrine on the melanophores of freshwater teleosts. *Life Sci.* 8 113-120.
- Reiter, R. J. (1981) The mammalian pineal gland: structure and function. *Am. J. Anat.* 162: 287-313.
- Reiter, R.J. (1990) en *Advances in Pineal Research*, Vol. 4 (Reiter, R.J. and Lukaszyk, A., eds.), pp.27777-37, John Libbey, London.
- Reiter, R.J. (1992) The ageing pineal gland and its physiological

- consequences. *Bioessays* 14: 169-175.
- Reiter, R.J., Poeggeler, B., Tan, D.-X., Chen, L.-D. and Manchester, L.C., (1993a) Antioxidant capacity of melatonin: a novel action not requiring a receptor. *Neuroendocrinol. Lett.* 15: 103-116
- Reiter, R.J. (1993b) The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 49: 654-664.
- Reiter, R.J. (1995). Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J.* 9: 526-533
- Reppert, S. M., Godson, C, Mahle, C. D., Weaver, D. R., Slaugenhaupt, S. A. and Gusella, J. F. (1995a) Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 8734-8738
- Reppert, S. M., Weaver, D. R., Cassone, V. M., Godson, C. and Kolakowski, L. F. J. (1995b) Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *Neuron.* 15: 1003-1015
- Romero, J. A., Zatz, M., Kebejian, J. W., and Axelrod, J. (1975) Circadian cycles in binding of <sup>3</sup>H-alprenolol to beta-adrenergic receptor sites in rat pineal. *Nature (London)* 258: 435-436.
- Saarela, S., Reiter, R. J. Function of melatonin in thermoregulatory processes. (1994) *Life Sci.*, 54: 295-311.
- Santana, C., Guerrero, J. M., Reiter, R. J., Gonzalez-Brito, A., and Menendez-Pelaez, A. (1989) *J. Pineal Res.* 7: 17-22.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press .
- Selden, S. C., and Pollard, T. D. (1983) Phosphorylation of microtubule-associated proteins regulates its interaction with actin filaments. *J. Biol. Chem.* 258, 7064-7071.
- Shelanski, M. L., Gaskin, F., and Cantor, Ch. R. (1973). Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 70: 765-768.
- Smythe, G.A., Lazarus, L. (1973) Growth hormone regulation by melatonin and serotonin. *Nature (London)* 244: 230-231
- Stankov, B., and Reiter, R. J. (1990) Melatonin receptors: current status, facts and hypotheses. *Life Sci.* 46, 971-982.
- Steinhilber, D., M. Brungs, O. Werz, I. Wiesenberg, C. Danielsson, J. P. Kahlen, S. Nayeri, M. Schrader, and C. Carlberg. (1995). The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J Biol Chem.* 270: 7037-7040
- Sugden, D. (1989) Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia* 45, 922-930.
- Tamarkin, L., Baird, C. J., and Almeida, O. F. X. (1985) Melatonin: a coordinating signal for mammalian reproduction. *Science.* 227: 714-720.

- Tada, H., Shino, O., Kuroshima, K., Koyama, M., Tsukamoto, K. (1986) An improved colorimetric assay for interleukine. *J. Immunol. Methods* 93: 157-165.
- Tan, D., Reiter, R.J., Chen, L.D, Poeggeler B., Manchester, L.C., Barlow-Walden, L.R. (1994) Both physiological and pharmacological levels of melatonin reduce DNA adduct formation induced by the carcinogen safrole. *Carcinogenesis*.15: 215-218.
- Theodorakis, N. G., and Cleveland, D. W. (1992) Physical evidence for cotranslational regulation of  $\beta$ -tubulin mRNA degradation. *Mol. Cell. Biol.* 12(2): 791-799.
- Thibier, C., Denoulet, P., Jessus, C., and Ozon, R. (1992). A predominant basic alpha-tubulin isoform present in prophase *Xenopus* Oocytes decreases during meiotic maturation. *Biol. Cell.* 75: 3
- Tosini, G. and Menaker, M. (1996) Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science*. 272: 419-421.
- Underwood, H., Harless, M. Entrainment of the circadian activity rhythm of a lizard to melatonin injections. (1985) *Physiol. Behav.* 35: 267-270
- Vacas, M. I., Keller Sarmiento, M. I., and Cardinalli, D.P. (1981) Melatonin increases cGMP and decreases cAMP levels in rat medial basal hypothalamus in vitro. *Brain Res.* 225: 207-211.
- Vacas, M. I., Berría, M. I., Cardinalli, D. P., and Lascano, E. F. (1984). Melatonin inhibits  $\beta$ -adrenoreceptor-stimulated cyclic AMP accumulation in rat astroglial cell cultures. *Neuroendocrinology*. 38: 176-181.
- Vakkuri, O., Lanasa, E., Rahkamaa, F., Ruotsalainen, H. and Leppäluoto, J. (1984) Iodinated melatonin: preparation and characterization of the molecular structure by mass and IH NMR spectroscopy *Anat. Biochem.* 142: 284-289.
- Vakkuri, O. (1985) *Acta Physiol. Scand.* 23: 151-156.
- Vallano, M. L., Goldenring, J.R., Buckholz, T.M., Larson, R.E., and DeLorenzo, R.J. (1985) Separation of endogenous calmodulin- and cAMP-dependent kinases from microtubule preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 3202-3206.
- Vanecek, J., Sugden, D., Weller, J. L., and Klein, D. C. (1985) Atypical synergistic  $\alpha_1$  and  $\beta$  adrenergic regulation of adenosine 3,5 monophosphate and guanosine 3,5 monophosphate in rat pinealocytes. *Endocrinology* 116: 2167-2173.
- Vivien-Roels, B. and Pévet, P. (1993) Melatonin: presence and formation in invertebrates. *Experientia* 49: 642-647.
- Vriend, J. Testing the TRH hypothesis of pineal function. (1978) *Med. Hypothesis* 4: 376-387.
- Wiesenberg, I., M. Missbach, J. P. Kahlen, M. Schrader, and C. Carlberg. (1995) Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic

- ligand. *Nucleic Acids Res.* 23: 327-333
- Yamamoto, H., Fukunaga, K., and Tanaka, E. (1983) Calcium and calmodulin-dependent phosphorylation of microtubule associated protein 2 and tau factor and inhibition of microtubular assembly. *J. Neurochem.*, 41: 119-125.
- Yamauchi, I., and Fujisawa, H. (1983) Disassembly of microtubules by the action of calmodulin-dependent protein kinase (kinase II) which occurs only in the brain tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110: 287-291.
- Yu, H.S., Yee, R.W., Howes, K.A., and Reiter, R.J. (1990) *Neurosci. Lett.* 116: 309-312.
- Zisapel, H., and Laudon, M. (1987) A novel melatonin antagonist affects melatonin-mediated processes in vitro and in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* 136: 259-260.

**Abreviaturas utilizadas:**

SDS: Sodio dodecil sulfato

ADN: Acido desoxirribonucleico

ARN: Acido ribonucleico

TRH: Tracto retinohipotalamico

NSQ: Núcleo supraquiasmático

NPV: Núcleo paraventricular

NE: Noradrenalina

RA: Receptores adrenérgicos

GCS: Ganglio cervical superior

NAT: N-acetil transferasa

AMP: Adenosín monofosfato

AMPC: Adenosín monofosfato cíclico

GMP: Guanosín monofosfato

GTP: Guanosín trifosfato

PKC: Proteín cinasa C

MAP: Proteínas asociadas a microtúbulos

PBS: Buffer de fosfatos de Dulbecco

TBS: Buffer de fosfatos y sal (NaCl)

PKA: Proteín cinasa A