



11281
L
29

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION

**INTERACCION MELATONINA-CALMODULINA:
MODULACION DE LA DISTRIBUCION INTRACELULAR
DE CALMODULINA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS
BIOMEDICAS (FISIOLOGIA)**

P R E S E N T A

FERNANDO AGUSTIN / ANTON TAY

DIRECTOR DE TESIS:

DR. FLAVIO MENA JARA



CIUDAD UNIVERSITARIA, JUNIO DE 1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**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 está 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.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**INTERACCIÓN MELATONINA-CALMODULINA:
MODULACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN INTRACELULAR
DE CALMODULINA**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS (FISIOLOGÍA)
PRESENTA
FERNANDO AGUSTÍN ANTÓN TAY**

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. FLAVIO MENA JARA**

CIUDAD UNIVERSITARIA, JUNIO DE 1996



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
COORDINACION DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

ALUMNO FERNANDO ANTON TAY
PRESENTE.

Me permito informarle que el Comité Académico acordó designar el siguiente Jurado para su examen de grado como Doctor en Ciencias Biomédicas, área Fisiología, donde defenderá su tesis: "INTERACCION MELATONINA-CALMODULINA: MODULACION DE LA DISTRIBUCION INTRACELULAR DE CALMODULINA".

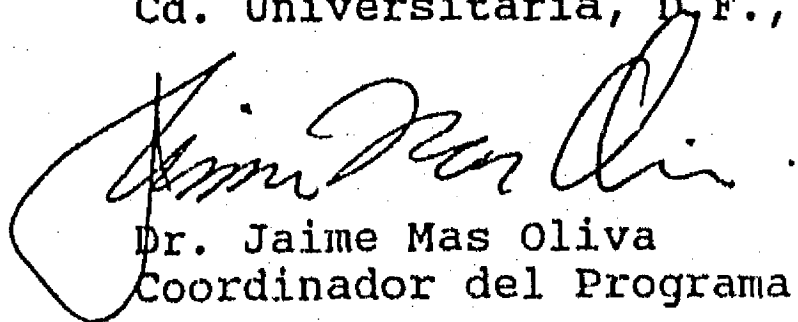
PRESIDENTE:	DRA. HERMINIA PASANTES
SECRETARIO:	DR. GONZALO MARTINEZ DE LA ESCALERA
PRIMER VOCAL:	DR. FLAVIO MENA JARA
SEGUNDO VOCAL:	DR. RAUL AGUILAR ROBLERO
TERCER VOCAL:	DRA. ISAURA MEZA
SUPLENTE:	DR. HUGO SOLIS ORTIZ
SUPLENTE:	DR. CARLOS ARAMBURO DE LA HOZ

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cd. Universitaria, D.F., a 7 de junio de 1995.


Dr. Jaime Mas Oliva
Coordinador del Programa

C.c.p. Dr. Flavio Mena Jara.-Tutor.-Presente.

RESUMEN

La melatonina (5-metoxi-N-acetilriptamina) (MEL) es una hormona cuya estructura se ha conservado durante la evolución. Aunque la MEL causa múltiples efectos metabólicos y fisiológicos en organismos unicelulares, plantas y vertebrados, no se conoce el mecanismo de acción que subyace en cada respuesta celular. Actualmente se acepta que los efectos de MEL pueden ser mediados por su unión a receptores membranales específicos; por unión a calmodulina (CaM) y a proteínas nucleares; y como un captador de radicales libres. En el presente trabajo de tesis se presenta la evidencia acerca de la interacción de la MEL con la CaM, así como los datos experimentales que apoyan que esta interacción ocurre en el interior de la célula. Con el método de inmunofluorescencia de doble marcaje se demostró que en las células MDCK incubadas con melatonina, la hormona se localiza debajo de la membrana plasmática, en el citoplasma y en el núcleo. La tinción simultánea de las células MDCK con anticuerpos específicos contra CaM y MEL demostraron que la hormona y la proteína se encuentran localizadas en los mismos sitios subcelulares. La CaM en las células MDCK y N1E-115 incubadas con vehículo se distribuye en la periferia de las células. En cambio, en las células incubadas con MEL 1 nM durante 6, 12, 24 hrs y 4 días la CaM se distribuye en el citoplasma y el núcleo. Seis horas después de retirar a la MEL del medio, la CaM mostró un patrón de distribución semejante al de las células control. La cuantificación de CaM por RIA, en células incubadas con 1 nM de MEL confirmó que el contenido de CaM unida a membranas se incrementó (40%) a expensas del contenido citosólico. Estos resultados indican que la MEL penetra a la célula, y se distribuye en los mismos compartimentos subcelulares que la CaM. También que la MEL modifica la distribución subcelular de la CaM de manera reversible. Por último, los resultados apoyan la hipótesis de que todas las células son blancos potenciales de la hormona y sugieren que además de las respuestas tempranas inducidas por el antagonismo de CaM por melatonina, la hormona puede también inducir respuestas celulares a largo plazo a través de la concentración de CaM en compartimentos celulares específicos.



SUMMARY

Melatonin (5-methoxy-N-acetyltryptamine) (MEL), is an evolutionary highly conserved molecule which occurs in organisms as different as algae and humans. It is known that MEL causes a broad spectrum of metabolic and physiological effects from unicellular organisms to higher vertebrates. However, the precise mechanism of action by which MEL elicits each cellular response remain to be defined. Current studies suggest that the effects of MEL can be mediated by several mechanisms. MEL can act by binding to neural and non-neural membranal receptors; by binding to calmodulin (CaM) and nuclear proteins, and as a free radical scavenger. In the present thesis the current evidence about MEL-CaM interactions as well as the experimental data about this interaction within the cell, are presented. Double staining immunofluorescence method showed that early as 3 hrs after MDCK cell incubation with MEL, the hormone was detected as fluorescent spots beneath the plasma cell membrane, all over the cytoplasm and the nucleus. Simultaneous labeling of MDCK cells with specific antibodies against CaM and MEL showed that the hormone and the protein are located at the same subcellular sites. CaM in control MDCK cells appeared as fluorescent spots at cell periphery. In contrast, MDCK cells cultured during 6, 12, 24 hrs or 4 days with MEL showed that CaM fluorescent spots were distributed both all over the cytoplasm and the nucleus. Similar results were obtained when NIE-115 cells were treated with MEL. These CaM rearrangements, were reverted 6 hrs after MEL withdrawal. Moreover, RIA CaM measurement showed that in 10^{-9} M MEL treated cells, membrane bound CaM content was increased by 40%, while cytosolic CaM decreased by 40%. These results show that both MEL enters the cell, and is distributed at the same CaM subcellular compartments and that there, MEL changes CaM intracellular distribution, reversibly. Finally, the results presented here support the notion that all cell types are potential MEL targets, and suggest that besides the early responses induced by the MEL-CaM antagonism, the hormone may also induce long term cellular responses through CaM concentration in specific cellular compartments.

INDICE

RESUMEN.....	4
SUMMARY.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
La glándula pineal y melatonina.....	8
Calmodulina.....	13
Las células blanco de la melatonina.....	16
Interacción melatonina-calmodulina.....	18
Antagonismo de calmodulina por melatonina	
Efectos sobre el citoesqueleto.....	22
Planteamiento del problema e hipótesis.....	25
Objetivo y metas.....	26
MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
Materiales.....	27
Cultivo de células.....	27
Preparación de la melatonina e indoles.....	28
Purificación de calmodulina.....	28
Preparación del anticuerpo anti-calmodulina.....	29
Electroforesis.....	29
Inmunodetección.....	30
Inmunofluorescencia de doble marcaje.....	31
Fraccionamiento celular.....	32
Radioinmunoensayo.....	33
Marcaje de las células con ³⁵ S-metionina e inmunoprecipitación.....	33
Análisis estadístico.....	34
RESULTADOS.....	35
Caracterización del anticuerpo anti-calmodulina.....	35
Efecto de la melatonina sobre la distribución de calmodulina.....	35
Efecto de la melatonina sobre el contenido de calmodulina en	
la fracción citosólica y membranal.....	38
Efecto de los análogos de la melatonina sobre la	
distribución de calmodulina.....	38

Reversibilidad de los efectos de la melatonina sobre la distribución de calmodulina.	41
Colocalización de la melatonina y calmodulina	41
DISCUSIÓN.....	44
CONCLUSIONES.....	47
BIBLIOGRAFÍA.....	48

RESUMEN

La melatonina (5-metoxi-N-acetilriptamina) (MEL) es una hormona cuya estructura se ha conservado durante la evolución. Aunque la MEL causa múltiples efectos metabólicos y fisiológicos en organismos unicelulares, plantas y vertebrados, no se conoce el mecanismo de acción que subyace en cada respuesta celular. Actualmente se acepta que los efectos de MEL pueden ser mediados por su unión a receptores membranales específicos; por unión a calmodulina (CaM) y a proteínas nucleares; y como un captador de radicales libres. En el presente trabajo de tesis se presenta la evidencia acerca de la interacción de la MEL con la CaM, así como los datos experimentales que apoyan que esta interacción ocurre en el interior de la célula. Con el método de inmunofluorescencia de doble marcaje se demostró que en las células MDCK incubadas con melatonina, la hormona se localiza debajo de la membrana plasmática, en el citoplasma y en el núcleo. La tinción simultánea de las células MDCK con anticuerpos específicos contra CaM y MEL demostraron que la hormona y la proteína se encuentran localizadas en los mismos sitios subcelulares. La CaM en las células MDCK y N1E-115 incubadas con vehículo se distribuye en la periferia de las células. En cambio, en las células incubadas con MEL 1 nM durante 6, 12, 24 hrs y 4 días la CaM se distribuye en el citoplasma y el núcleo. Seis horas después de retirar a la MEL del medio, la CaM mostró un patrón de distribución semejante al de las células control. La cuantificación de CaM por RIA, en células incubadas con 1 nM de MEL confirmó que el contenido de CaM unida a membranas se incrementó (40%) a expensas del contenido citosólico. Estos resultados indican que la MEL penetra a la célula, y se distribuye en los mismos compartimentos subcelulares que la CaM. También que la MEL modifica la distribución subcelular de la CaM de manera reversible. Por último, los resultados apoyan la hipótesis de que todas las células son blancos potenciales de la hormona y sugieren que además de las respuestas tempranas inducidas por el antagonismo de CaM por melatonina, la hormona puede también inducir respuestas celulares a largo plazo a través de la concentración de CaM en compartimentos celulares específicos.

SUMMARY

Melatonin (5-methoxy-N-acetyltryptamine) (MEL), is an evolutionary highly conserved molecule which occurs in organisms as different as algae and humans. It is known that MEL causes a broad spectrum of metabolic and physiological effects from unicellular organisms to higher vertebrates. However, the precise mechanism of action by which MEL elicits each cellular response remain to be defined. Current studies suggest that the effects of MEL can be mediated by several mechanisms. MEL can act by binding to neural and non-neural membranal receptors; by binding to calmodulin (CaM) and nuclear proteins, and as a free radical scavenger. In the present thesis the current evidence about MEL-CaM interactions as well as the experimental data about this interaction within the cell, are presented. Double staining immunofluorescence method showed that early as 3 hrs after MDCK cell incubation with MEL, the hormone was detected as fluorescent spots beneath the plasma cell membrane, all over the cytoplasm and the nucleus. Simultaneous labeling of MDCK cells with specific antibodies against CaM and MEL showed that the hormone and the protein are located at the same subcellular sites. CaM in control MDCK cells appeared as fluorescent spots at cell periphery. In contrast MDCK cells cultured during 6, 12, 24 hrs or 4 days with MEL showed that CaM fluorescent spots were distributed both all over the cytoplasm and the nucleus. Similar results were obtained when NIE-115 cells were treated with MEL. These CaM rearrangements, were reverted 6 hrs after MEL withdrawal. Moreover, RIA CaM measurement showed that in 10^{-9} M MEL treated cells, membrane bound CaM content was increased by 40%, while cytosolic CaM decreased by 40%. These results show that both MEL enters the cell, and is distributed at the same CaM subcellular compartments and that there, MEL changes CaM intracellular distribution, reversibly. Finally, the results presented here support the notion that all cell types are potential MEL targets, and suggest that besides the early responses induced by the MEL-CaM antagonism, the hormone may also induce long term cellular responses through CaM concentration in specific cellular compartments.

INTRODUCCIÓN

La evidencia acumulada sobre la fisiología y la farmacología de la melatonina (MEL), así como aquella que indica que esta hormona puede tener utilidad terapéutica y un papel relevante en la fisiopatología, hace que el conocimiento del mecanismo de acción de la MEL se torne en una pieza de información clave, no sólo desde el punto de vista teórico, sino también para el diseño de nuevas estrategias de investigación.

De la información actual sobre la MEL, resaltan tres evidencias fundamentales. Uno, que la hormona es biosintetizada en todas las especies animales y vegetales estudiadas (Balzer y Hardeland, 1991; Cardinali, 1981; Reiter, 1991). Dos, que en todos los organismos estudiados, el papel fisiológico de la hormona es el de proveer una señal química que permite sincronizar la actividad del organismo con el fotoperiodo (Hardeland y col, 1995; Arnold y col, 1969; Cassone, 1990). Tres, que la administración de MEL se acompaña de múltiples respuestas celulares y metabólicas en organismos que van desde las plantas y eucariontes unicelulares hasta los vertebrados superiores (Arnold y col, 1969; Hardeland y col, 1995; Cassone, 1990; Cardinali, 1981). La variedad de respuestas que causa la hormona pueden ser interpretadas como que algunas de ellas no son específicas o como que el mecanismo de acción de la MEL es muy antiguo, filogenéticamente bien conservado y que por lo tanto es común a todas sus células blanco, independientemente de la respuesta observada. Existe evidencia experimental que apoya la última observación, que en el caso de ser correcta implica que de necesidad, deben ser identificados uno o varios elementos comunes que participen en la respuesta, independientemente que esta sea muy variada y dependiente de la estirpe celular estudiada.

Actualmente se considera que los efectos de la MEL pueden ser mediados por varios mecanismos. La hormona podría actuar a través de la unión a receptores

membranales específicos (Stankov y col, 1991; Dubocovich, 1995; Reppert y col, 1994), o por su unión a la calmodulina (CaM) (Benítez-King y Antón-Tay, 1993) y a proteínas nucleares (Carlberg y Wiessenberg, 1995), o como un captador de radicales libres (Reiter y col, 1993). En el caso de los vertebrados, los efectos de la MEL son probablemente mediados por la combinación de los mecanismos mencionados. En todos los casos se desconoce el mecanismo molecular que subyace a cada respuesta celular desencadenada por la hormona y es motivo de discusión cuales son sus células blanco.

Uno de los elementos comunes que aparece dentro de los múltiples efectos de la MEL descritos a nivel celular, son las modificaciones del citoesqueleto. Estas han sido descritas en todas las especies estudiadas y debido a que el citoesqueleto juega un papel definitivo en la fisiología celular (participa en dar forma a la célula, en la división celular, la exocitosis, la endocitosis, el movimiento citoplasmático, la polaridad celular, la locomoción, el movimiento de organelos, etc.) a través de su arreglo dinámico (Bershadsky y Vasilev, 1988; Gratzer y Baines, 1988) es probable que participe de manera importante en las respuestas celulares a la MEL. El estudio de los cambios que produce la MEL sobre el citoesqueleto, originó la hipótesis de que uno de los mecanismos de acción de la hormona es por unión intracelular a CaM. Según esta hipótesis, los niveles circulantes de MEL sincronizan la actividad celular a través de la modulación cíclica de la CaM, una de cuyas consecuencias más claras es el rearrreglo del citoesqueleto. En el presente trabajo de tesis se revisarán los datos más importantes que apoyan la hipótesis de que la MEL actúa por unión a CaM a nivel intracelular. Además, se presentarán los datos experimentales que contribuyen a explicar la interacción de la MEL con esta proteína y en consecuencia el posible mecanismo que subyace a los efectos pleiotrópicos ejercidos por la hormona.

LA GLÁNDULA PINEAL Y LA MELATONINA

Las primeras referencias a la glándula pineal o *epifisis cerebri* se encuentran en la cultura india (2000 años a.C.) en donde se la consideraba como un órgano de clarividencia. Más tarde, los griegos debido a la posición anatómica de la glándula creyeron que su función era regular el flujo de los espíritus animales a través de los ventrículos cerebrales. Los espíritus animales eran considerados como el sustrato para el desarrollo del conocimiento (Kappers, 1969).

En el siglo XVII, Descartes la consideró “el asiento del alma” e influyó para que durante mucho tiempo se considerara a la pineal en el plano filosófico científico; este concepto prevaleció hasta el siglo XIX en donde se obtuvieron algunos datos de su participación como glándula endocrina (Kappers, 1969).

A pesar de la intensa investigación que se desarrolló en la primera mitad de este siglo, los escasos resultados obtenidos llevaron a la comunidad científica a considerar que la pineal era un órgano vestigial y atrófico. Fue en 1958 cuando se inició la etapa actual de nuestro conocimiento. En ese año, A.B. Lerner interesado en la búsqueda de una cura para el vitiligo, basándose en las experiencias efectuadas en 1936 por Mc Cord y Allen, aisló e identificó en la glándula pineal de los bovinos el factor que produce la contracción de los melanóforos y por lo tanto el aclaramiento de la piel de los batracios (Lerner y col, 1958). Este factor es un metoxindol al que denominó melatonina y es considerado aún como el prototipo de las hormonas producidas por la glándula pineal. Aún cuando a la fecha es el compuesto más potente para contraer a los melanóforos de la piel de la rana (Abe y col, 1969), debido a las características anatómicas de la piel humana, la MEL resultó inútil en el tratamiento del vitiligo. Sin embargo, la disposición para la comunidad científica de la hormona pura, permitió que esta se convirtiera en una poderosa herramienta para el estudio de la fisiología de la glándula pineal.

A lo largo de la evolución pocas estructuras muestran cambios histológicos y morfológicos tan marcados como los “órganos pineales”. Estos son formaciones saculares del diencéfalo que en los vertebrados inferiores comprenden además de la epífisis o pineal propiamente dicha a la parafisis, al órgano parapineal y al ojo parietal (Kappers, 1969; Kappers y Shade, 1965). En general, estas estructuras están colocadas superficialmente en el cráneo y tienen función de fotorrecepción, información que mandan a través de fibras nerviosas al cerebro; por ello también se les conoce como “ojo pineal”, “tercer ojo”, “ojo parietal”, etc. A medida que se asciende en la escala animal, los elementos fotorreceptores desaparecen y son sustituidos por células parenquimatosas con capacidad secretora, de modo que en los vertebrados superiores incluyendo al hombre, sólo persiste la función de secreción interna (Kappers, 1969; Kappers y Shade, 1965). La glándula pineal de los mamíferos es considerada como un “transductor neuroendócrino” ya que el pinealocito recibe información de tipo nervioso, la cual una vez decifrada es “traducida” a una señal hormonal (Axelrod, 1974; Wurtman y Antón-Tay, 1969). De manera esquemática, la entrada de la información al pinealocito está constituida por la liberación de noradrenalina, al nivel de las terminales postsinápticas del ganglio cervical superior. Estas fibras constituyen la etapa final de una cadena multisináptica originada en la retina, y conducen la información de las condiciones ambientales de la luz. El proceso de traducción está representado por la biosíntesis de la MEL y quizá de otros metoxindoles. Finalmente, la salida, está constituida por la secreción de estos compuestos al líquido cefalorraquídeo y a la sangre.

Diversos factores hormonales y físicos modifican la síntesis de MEL; sin embargo, el elemento más importante que controla la producción de la hormona por la glándula pineal es la información luminosa. La síntesis y liberación de la MEL es circádica. La producción rítmica de MEL en los mamíferos es la salida de un sistema

que comprende a la retina, al núcleo supraquiasmático y a la glándula pineal (Moore, 1983). La biosíntesis de la MEL se inicia a partir del triptófano circulante captado por el pinealocito, este aminoácido es hidroxilado en la posición cinco del anillo indólico, por la triptófano hidroxilasa formando 5-hidroxitriptofano, el que al ser descarboxilado en la cadena lateral forma la 5-hidroxitriptamina o serotonina (5HT). Esta es vía común a todos los tejidos que sintetizan serotonina. En la pineal el destino metabólico de la 5HT, es además del descrito en otros tejidos (catabolismo a ácido 5-hidroxiindolacético, captación por la terminal nerviosa, etc.), entrar a la síntesis de MEL. La formación de MEL a partir de 5HT implica dos transformaciones enzimáticas, que son prácticamente privativas de la glándula. Primero la N-acetiltransferasa, transfiere un grupo acetilo de la acetil-coenzima A, a la 5HT formando la N-acetilserotonina (NAS). Después este compuesto a su vez, es transformado por la acción de la hidroxindol-O-metiltransferasa a 5-metoxi-N-acetilriptamina o melatonina (Fig 1). Esta enzima transfiere un grupo metilo de la S-adenosilmetionina, a la posición cinco de la NAS. La MEL sintetizada es vertida a la circulación general (Reiter, 1991).

Los niveles circulantes de la hormona constituyen una señal sincronizada al fotoperíodo que tiene un papel central en la regulación de los ritmos circadianos de muchas especies de reptiles, aves y mamíferos (Cassone, 1990). La MEL exógena es capaz de reajustar varios ritmos en vertebrados y de modificar actividades circadianas en plantas (Balzer y Hardeland, 1991) y en organismos unicelulares (Arnold, 1969).

Aunque existe controversia, cada vez es mayor la evidencia de que en el hombre, la organización de la actividad circádica es sensible a la MEL. La administración oral de la hormona en el humano produce el avance de fase de varios ritmos circádicos como el de la vigilia, el sueño, los niveles circulantes de cortisol, la temperatura corporal y el de la secreción de MEL misma (Cassone, 1990; Wetteberg, 1978). Estas observaciones han sido útiles para corregir las manifestaciones clínicas cuando hay

ruptura de ritmos circadianos, tales como los efectos psicológicos y fisiológicos del cambio rápido de varios husos horarios (Jet-Lag) (Arendt y col, 1987), los patrones de sueño de los ciegos (Arendt y col, 1971) y en la inversión de ritmos en los trabajadores nocturnos (Sack y col, 1992). Además, existe información que indica que la hormona en los seres humanos induce sueño (Antón-Tay y col, 1971; Fernandez-Guardiola y Antón-Tay, 1974; Zhdanova y col, 1995), y que está involucrada en los desórdenes afectivos (Rosenthal y col, 1986), en el envejecimiento (Pierpaoli y Maestroni, 1987) y en la historia natural de algunos tumores malignos (Lissoni y col, 1987).

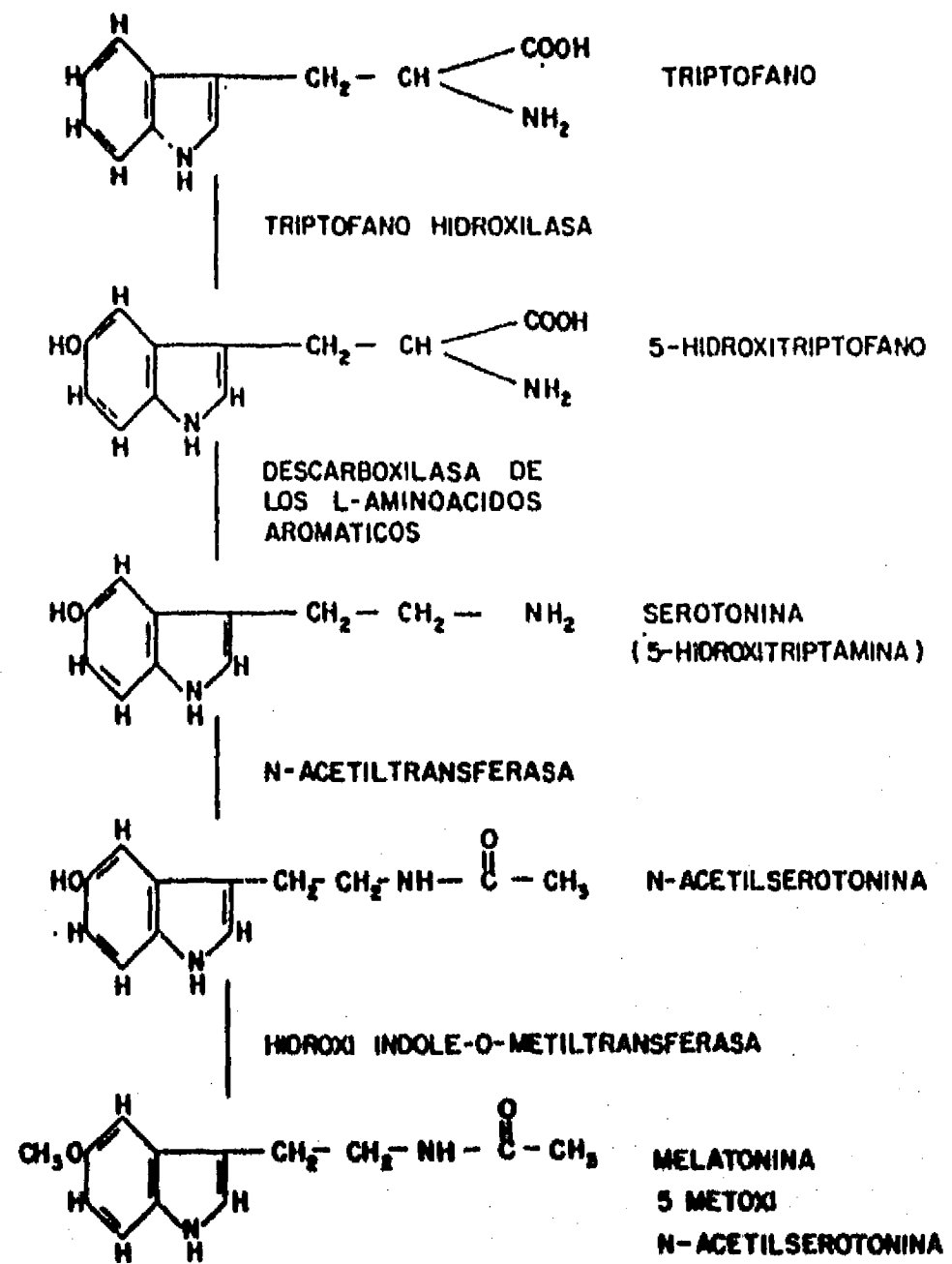


Fig. 1 Biosíntesis de la melatonina .

CALMODULINA

La CaM es una proteína multifuncional y ubicua que une calcio (Stoclet y col, 1987). Los cambios transitorios en las concentraciones de calcio citosólicos funcionan como señales reguladoras en las células y la CaM lleva la señal del calcio a una gran variedad de proteínas blanco (Stoclet y col, 1987). La CaM se encuentra en todos los eucariontes y su estructura primaria se ha conservado a través de la escala filogenética (Stoclet y col, 1987). Es una proteína de 17 000 daltones de peso molecular, ácida, y formada por una sola cadena polipeptídica de 148 aminoácidos. La CaM tiene cuatro sitios de unión a calcio: dos en el dominio N-terminal y dos en el C-terminal. En ausencia de calcio la cadena polipeptídica de la CaM tiene una estructura al azar (Fig. 2). En presencia de calcio, la CaM sufre un cambio conformacional y adopta una estructura terciaria estable, que es su forma activa (Babu y col, 1985). Estudios con cristalografía de rayos X han demostrado que la CaM tiene una estructura semejante a una doble campana con dos sitios de unión a calcio en cada extremo. Las dos campanas están conectadas por una alfa hélice central (Stoclet y col, 1987; Cheung, 1980). No se conoce con exactitud la naturaleza de la interacción de la CaM activada por calcio y sus proteínas blanco. La CaM tiene dos sitios de interacción a los que se unen ligandos tales como péptidos anfífilos y compuestos hidrofóbicos (Tanaka y Hidaka, 1980). La CaM activada por el calcio expone regiones hidrofóbicas en cada uno de los dominios que pueden ocupar las proteínas blanco de CaM. Los inhibidores de CaM se unen a los sitios cercanos o directamente en los sitios de unión de las enzimas blanco impidiendo la formación de los complejos CaM-proteína sustrato (Tanaka y col, 1983).

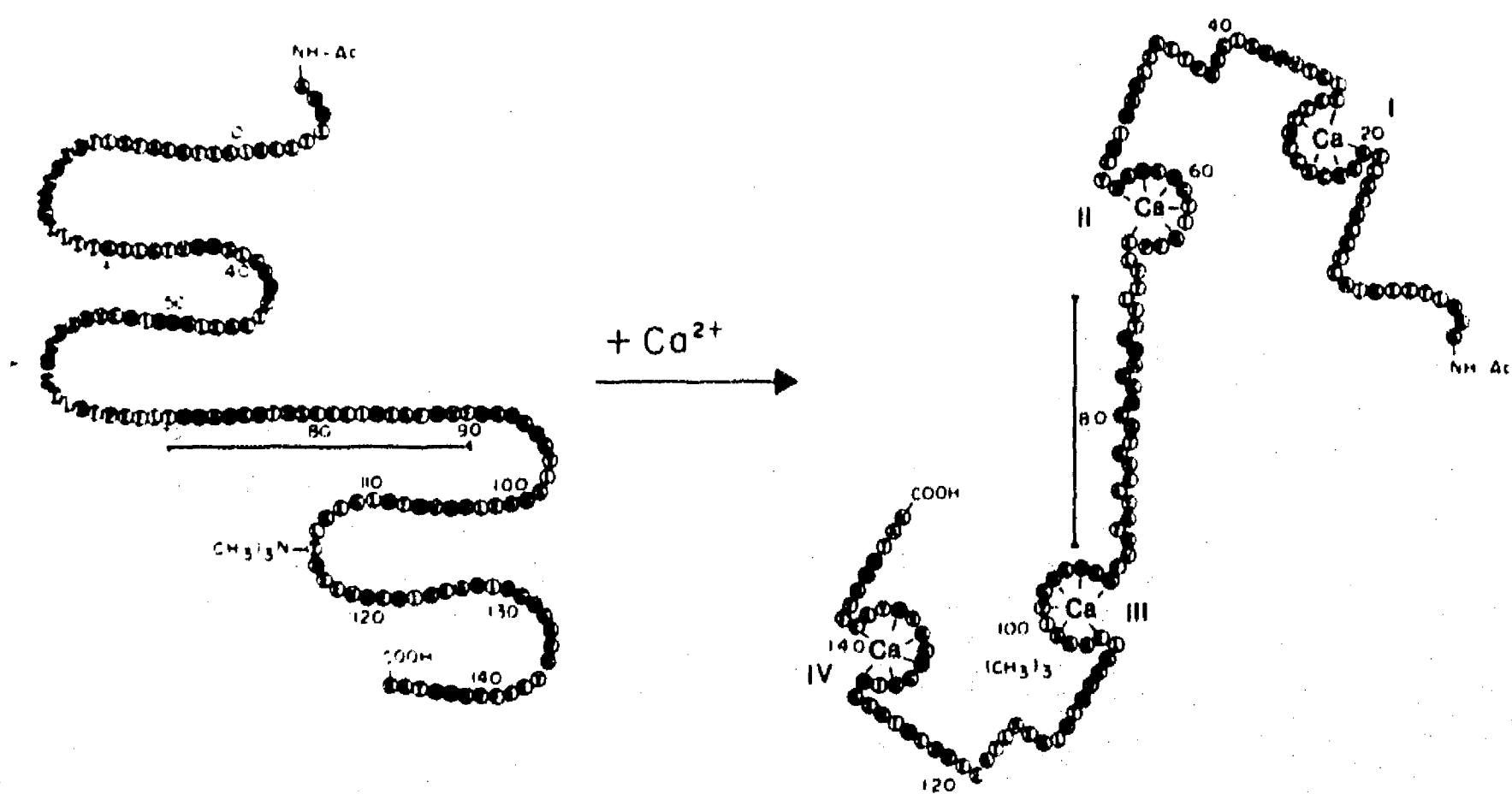


Fig. 2 Estructura de la calmodulina al azar y activada por calcio.

Los antagonistas de la CaM se unen a esta proteína con moderada o alta afinidad (usualmente en el rango micromolar). Algunos son péptidos naturales que incluyen venenos de insectos como melitina, cabrolina y mastoparans; a ciertas hormonas (ACTH, VIP, GIP, secretina, glucagon, y sustancia P), y a ciertos opioides como la beta-endorfina y la dinorfina. Otros antagonistas de CaM son de origen sintético, como las fenotiazinas, las butirofenonas, las naftalensulfonamidas, algunos agentes anti-tumorales y neuropéptidos sintéticos. Estos péptidos y drogas tienen efectos farmacológicos específicos y muchos de ellos actúan *in vivo* a través de la unión a CaM (Tanaka y col, 1983).

La CaM activada por calcio puede actuar sobre la fisiología de la célula de manera directa estimulando las enzimas blanco claves y por interacción con proteínas estructurales, o de manera indirecta a través de cinasas específicas (Cheung, 1980). La CaM estimula cuando menos a cinco diferentes proteína cinasas y a una fosfatasa, la calcineurina, y por esto puede regular la actividad de los múltiples substratos de estas enzimas (Klee, 1991). Los procesos celulares principales regulados por CaM incluyen: la fosforilación de proteínas y su desfosforilación (Klee, 1991), el metabolismo de nucleótidos cíclicos (Sharma y Wang, 1986; Salter y col, 1981; Huang y col, 1981), el transporte de calcio (Yazawa, 1992), la síntesis del óxido nítrico (Klatt y col, 1992) y la regulación de la organización del citoesqueleto (Gratzer y Baines, 1988; Keith y col, 1986).

LAS CÉLULAS BLANCO DE LA MELATONINA.

El primer paso para que cualquier hormona actúe, es el acceso de la misma a sus células blanco y en particular a los elementos celulares que desencadenan la cascada metabólica que culmina en una respuesta celular específica. En el caso de la MEL no existe acuerdo sobre los tipos celulares que son blancos de la misma. Hasta 1987, se consideraba que las células blanco de la hormona eran sólo aquellas que tienen receptores membranales específicos. Este concepto no consideraba mucha de la evidencia experimental existente, ni que debido a su estructura química la hormona tiene acceso a muchos tipos de células. La MEL es una molécula pequeña, altamente lipofílica, que por sus características fisicoquímicas se puede predecir que atraviesa la bicapa lipídica de las membranas celulares (Antón-Tay y Wurtman, 1969; Wurtman y col, 1964; Cardinali y col, 1973). En este sentido, uno esperaría que la MEL se comporte de manera semejante a las hormonas esteroideas, y no como las proteínas y péptidos que son hidrofílicas. La evidencia acumulada apoya esta hipótesis. Experimentos con MEL radioactiva (marcada con tritio o con 14-carbono), demuestran que después de su administración sistémica en el ratón, a pesar de su rápida velocidad de desaparición de la sangre, de alrededor de 2 min, la hormona se localiza en todos los tejidos. Algunos de ellos, como la glándula suprarrenal y el intestino delgado, retienen la hormona en una concentración mayor que el plasma, aún 30 min después de su administración (Kopin y col, 1961). Debido a los notables efectos de la MEL sobre el Sistema Nervioso Central (SNC), actualmente la distribución regional y el destino de la MEL tritiada en el cerebro es bien conocida. Después de la administración intraperitoneal, intravenosa, intracerebroventricular, o intracisternal de MEL tritiada en la rata (Antón-Tay y Wurtman, 1969; Cardinali y col, 1973; Wurtman y col, 1964), la hormona se encuentra en todas las regiones cerebrales, y en mayores concentraciones

en el mesencéfalo y el hipotálamo. La evidencia de que la MEL penetra a la neurona se obtuvo mediante el estudio de la distribución subcelular después de la administración de la ^3H -MEL intracerebroventricularmente (Antón-Tay y col, 1988). En todos los tiempos estudiados, desde 1 min hasta 48 hrs, la mayor proporción del isótopo radioactivo se encontró en el citosol, y en proporciones decrecientes en la fracción nuclear, mitocondrial y en los microsomas. Más aún, la MEL no metabolizada se encontró asociada a una proteína citosólica con un peso molecular menor a 29,000 daltones. Estos resultados están de acuerdo con los estudios de unión de MEL en diferentes fracciones subcelulares. Cardinali (Cardinali y col, 1979) demostró que en el SNC de la rata, la MEL tritiada se une con alta afinidad a las fracciones nuclear, mitocondrial y microsomal. También están de acuerdo con los reportados por Cohen (Cohen y col, 1978) y Niles (Niles y col, 1979). Estos trabajos señalan la unión específica de la MEL tritiada al citosol de varios tejidos en diferentes especies de mamíferos. Con métodos inmunohistológicos, se ha demostrado que la hormona puede ser detectada en las glándulas salivales de la rata (Bubenik, 1980), la retina, el cerebelo (Bubenik y col, 1974), y el sistema digestivo de la rata (Bubenik y col, 1977). Aún cuando el mecanismo que explica la presencia de la MEL en estas células no está claro, la captación de la hormona ocurre, puesto que el contenido en estos tejidos aumenta después de la administración de la hormona. En conclusión, podemos decir que por su carácter lipofílico, la MEL tiene acceso a diferentes tipos de células, y que cruza la membrana celular hacia el espacio intracelular desde donde es distribuida a diferentes compartimientos celulares.

INTERACCIÓN MELATONINA-CALMODULINA

Aún cuando la MEL entra al espacio intracelular, la célula debe reconocer su presencia y traducir la señal en eventos metabólicos que resulten en una respuesta biológica. La interacción de MEL con CaM se dedujo a partir de las siguientes observaciones. 1) Tanto las células MDCK como las células de neuroblastoma NIE-115 incubadas con MEL, muestran respuestas biológicas relacionadas con cambios en la distribución de microfilamentos y microtúbulos, respectivamente. Los efectos sobre el citoesqueleto de ambas líneas celulares son compatibles con los cambios que se observan en la actividad intracelular de la CaM (Benítez King y col, 1990). 2) En el cerebro de la rata, la hormona se encuentra unida a una proteína citosólica con un peso molecular menor a 29, 000 daltones (Antón-Tay y col, 1988). 3) En un gran número de estirpes celulares la MEL inhibe la proliferación celular (Blask, 1984) que es un efecto compatible con la inhibición de la actividad de la CaM (Ramussen y Means, 1989; Benítez-King y col, 1994). Estas observaciones propiciaron el estudio de la posible interacción de la MEL con la CaM. En el momento actual, la evidencia sobre la interacción de la hormona con la proteína proviene de estudios efectuados tanto *in vitro* como *in vivo*.

La información fundamental para ahondar en el conocimiento de la interacción entre MEL y CaM es demostrar directamente su unión, y conocer las constantes cinéticas de la misma. La evidencia de que la MEL se une a la CaM se obtuvo mediante la separación electroforética de los productos de incubación de ³H-MEL con CaM. En estas condiciones la MEL radiactiva coemigró con la CaM solamente si hay calcio en la mezcla de incubación (Benítez-King y col, 1991). En estas mismas condiciones si se incubaba un exceso de MEL (10⁻⁵ M) con CaM en presencia de calcio se observa el cambio en la movilidad relativa del complejo Ca⁺⁺/CaM (Benítez-King y col, 1991).

El método más usado para conocer las constantes cinéticas de unión de un ligando a CaM es a través de la diálisis al equilibrio (Levin y Weiss, 1977). Con este método las constantes son difíciles de obtener por la baja relación entre la señal y los valores basales del método. En el caso de la MEL los resultados obtenidos con este método son poco reproducibles. En años recientes, esta limitación se ha superado al incorporar la CaM a liposomas y separar el ligando libre del unido por ultrafiltración rápida (Morgan y col, 1987). Los estudios de unión de ^3H -MEL con este método demostraron que la unión es saturable, reversible, dependiente de calcio, y de alta afinidad (Benítez King y col, 1993). Los estudios de saturación y asociación-disociación, señalan que la MEL se une en un solo sitio con una K_d de 188 pM y una B_{max} de 35 pM/ μg de CaM (Benítez-King y col, 1993). La capacidad relativa de algunos de los análogos de MEL para desplazar la unión de la hormona es la siguiente: MEL > 6Cl-MEL > 6OH-MEL > Luzindol > trifluoperazina (TFP). El orden de desplazamiento, corresponde a las potencias relativas de los compuestos (Benítez-King y col, 1993). En particular es importante señalar, que la potencia relativa de la TFP para inducir cambios en la estructura del citoesqueleto es similar a la K_i reportada (Perrino y Chou, 1989). Entre otras proteínas estudiadas (fosfatasa de creatina, tubulina, albúmina) solamente CaM exhibe un sitio de alta afinidad a MEL dependiente de calcio. A diferencia de los antagonistas conocidos de CaM, que se unen a esta proteína en el rango de concentración micromolar, la MEL se une en el rango picomolar.

Los antagonistas de CaM como las fenotiazinas y particularmente la TFP son muy estudiados y han sido muy útiles para dilucidar tanto el mecanismo de interacción con CaM como la actividad fisiológica de la misma. Estos compuestos son hidrofóbicos e interactúan con el segmento de la alfa hélice de la Ca^{++} /CaM (Levin y Weiss, 1977; Tanaka y col, 1983) y muestran una buena correlación entre la afinidad por la CaM y su capacidad para inhibir las enzimas dependientes de CaM.

Se considera que el efecto farmacológico de las fenotiazinas es mediado por su unión a los receptores D2 ya que tienen acceso limitado al interior de la célula (Seeman, 1980). Es probable que el grupo 5-metoxi, que hace a la MEL hidrofóbica, pueda interactuar con el segmento de alfa hélice de la Ca^{++}/CaM como lo hacen las fenotiazinas.

La inhibición de la actividad de varias enzimas dependientes de CaM por concentraciones fisiológicas de MEL confirma que la hormona es un antagonista de CaM. La MEL inhibe la actividad de la fosfodiesterasa de AMPc (Benítez-King y col, 1991), la Ca^{++}/Mg^{++} ATPasa (Antón-Tay y col, 1993), y la sintetasa del óxido nítrico (Pozo y col, 1994). Recientemente, demostramos que la MEL inhibe a la multiproteína cinasa II dependiente de CaM *in vitro*. La inhibición fue competitiva con respecto a la CaM con una K_i de 16 nM (Benítez-King y col, 1996). La hormona también inhibió la autofosforilación de esta enzima (Benítez-King y col, 1996).

Existe evidencia que apoya la interacción de MEL con CaM en la célula *in vivo*. En las células MDCK y N1E-115 la hormona incrementa la proliferación celular y los niveles de CaM en la fase logarítmica de crecimiento (Benítez-King y col, 1991; Benítez-King y col, 1994). En la fase estacionaria, la concentración de CaM disminuye 40% y el crecimiento celular se inhibe en un 50%. La concentración de CaM en un tiempo dado depende de la relación entre su síntesis y degradación. Experimentos de recambio realizados en las células MDCK incubadas hasta por seis días con MEL, han sugerido que tanto la síntesis como la degradación de CaM se modifican (Benítez-King y col, 1994). Se ha demostrado que los niveles de mRNA específicos de CaM se incrementan dos veces en la fase logarítmica y regresan a niveles normales en la fase estacionaria tanto en las células MDCK como en las N1E-115 (Ortega y col, 1993). Estos resultados sugieren que la MEL podría incrementar los niveles de mRNA de CaM modulando la expresión del gen de CaM. Recientemente, encontramos que la MEL en

las células MDCK y NIE-115 incrementa la unión de AP-1 al DNA. Lo que sugiere que la hormona, además de cambiar los niveles de CaM puede actuar a nivel nuclear modificando la expresión genética.

**ANTAGONISMO DE CALMODULINA POR MELATONINA:
EFECTOS SOBRE EL CITOESQUELETO.**

Los cambios estructurales inducidos por MEL están relacionados con el efecto antagonista de la hormona sobre CaM. En las células MDCK y N1E-115, la MEL produce cambios en la forma celular y en el arreglo del citoesqueleto (Benítez-King y col, 1990). Ambas líneas celulares, en presencia de concentraciones fisiológicas de la hormona crecen formando una red fina. En las células MDCK incubadas con MEL, se forman prolongaciones citoplasmáticas y los microfilamentos de actina localizados en la periferia se tornan más gruesos (Benítez-King y col, 1990). En las células de neuroblastoma la MEL actúa como un factor de diferenciación. En las células N1E-115 cultivadas con la hormona, se incrementa significativamente el número de células con neuritas y los microtúbulos se alargan formando redes muy largas (Benítez-King y col, 1990).

Estudios realizados en un sistema reconstituido de polimerización de tubulina *in vitro*, han sido útiles para entender el mecanismo por el cual la MEL causa cambios en el citoesqueleto. La polimerización de tubulina *in vitro* depende de GTP (Shelanski y col, 1973). En presencia de las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs), el efecto inhibitor del calcio sobre la polimerización de los microtúbulos se incrementa por la adición de CaM (Berkowitz y Wolff, 1981; Kumagai y col, 1986). La MEL previene este efecto inhibitor de CaM a concentraciones fisiológicas, causando un alargamiento de los microtúbulos (Huerto-Delgadillo y col, 1994). Este efecto es muy semejante al producido por la TFP a una concentración de 10 μ M, y por el compuesto 48/80 (30 μ g/ml) (Perrino y col, 1989; Huerto-Delgadillo y col, 1994). El alargamiento de los microtúbulos también se observa en una preparación de citoesqueletos *in situ* de células N1E-115 incubados con 10⁻⁹ M de MEL (Huerto-Delgadillo y col, 1994). La hormona

protege a la red de microtúbulos del efecto despolimerizante de $\text{Ca}^{++}/\text{CaM}$. Los microtúbulos en los citoesqueletos *in situ* tratados con MEL, son más largos y gruesos que los de los citoesqueletos controles despolimerizados por la activación de la CaM endógena por Ca^{++} (Huerto-Delgadillo y col, 1994). En ausencia de una CaM activa, la MEL con concentraciones farmacológicas (10^{-5} M) inhibe la polimerización de microtúbulos tanto *in vitro* como en los citoesqueletos *in situ* (Huerto-Delgadillo y col, 1994).

Estos resultados sugieren que los efectos de MEL sobre los microtúbulos dependen de la concentración de la hormona y de la presencia de CaM. A concentraciones fisiológicas (10^{-9} M) la MEL se une a la CaM y bloquea la formación de los complejos MAPs/CaM y tubulina/CaM y se incrementa el tamaño de los microtúbulos. En ausencia de CaM o a concentraciones farmacológicas de la hormona (10^{-5} M), la MEL se une a la tubulina, altera su estructura secundaria y previene el ensamble de la tubulina favoreciendo la ruptura de los microtúbulos. Los efectos contradictorios de MEL sobre el citoesqueleto microtubular descritos en diferentes especies y bajo diferentes condiciones experimentales (Tabla I), pueden ser explicados con esta hipótesis ya que si los resultados se agrupan de acuerdo a las concentraciones de melatonina usadas se observa que a bajas concentraciones de MEL se produce un alargamiento de los microtúbulos y con altas concentraciones, la despolimerización de los mismos (Benítez-King y Antón-Tay, 1993).

Tabla I. Efectos de melatonina sobre procesos celulares dependientes de microtúbulos.

Efecto	Especie	Autor
Aumento en la birrefringencia del huso mitótico	Melanocitos de rana Células vegetales	Jackson, 1969.
Agregación de pigmentos	Células epiteliales de retina de hámster	Pang y col, 1978
	Células embrionarias de Xenopus	Messenger y col, 1977
	Melanocitos de la piel del sapo	Malawista, 1975
	Melanóforos de peces	Reed y col, 1969
Antagonismo de los efectos de la colchicina sobre la dispersión de pigmentos	Melanocitos de la piel de rana	Malawista, 1973
Aumento del número de microtúbulos	Glándula pineal de rata	Freire y col, 1975
Antagonismo del paro de la mitosis inducido por colchicina	Células Hela	Fitzgerald y col, 1976
Crecimiento de neuritas	Células N1E-115	Benítez-King y col, 1990
Paro del movimiento de gránulos	Células de melanoma B6	Funan, 1966
Inhibición del ensamble de microtúbulos	Nervio ciático de sapo	Piezzi y col, 1981
Inhibición de la unión de colchicina a tubulina, aumento de la unión de GTP a tubulina	Cerebro de bovino	Pheng y col, 1975
Dispersión de gránulos de melanina	Melanóforos de peces	Reed y col, 1969
Ruptura del aparato mitótico	Células de cebolla	Banerjee y col, 1973
Regeneración de bandas orales	Stentor coeruleus	Banerjee y col, 1972
Formación de cristales microtubulares e Inhibición del flujo axoplásmico	Eminencia media de rata	Cardinali y col, 1975

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS

Dado que la CaM es una proteína ubicua que modula un amplio espectro de funciones celulares, el mecanismo de acción de la MEL a través del antagonismo de CaM, constituye un modelo plausible que puede explicar los efectos pleiotrópicos que la hormona produce en diferentes tipos celulares.

La especificidad de la respuesta celular a la MEL depende tanto del acceso de la hormona a la célula y de su interacción con la CaM como de la concentración y localización intracelular de la CaM, de los incrementos transitorios de calcio y de la coexistencia de las enzimas blanco de la CaM y sus sustratos en un compartimiento específico celular a un tiempo dado.

La MEL podría modular a la CaM no solamente por unión directa antagonizando su actividad, sino también regulando los niveles de esta proteína en la célula y concentrándola en compartimientos celulares específicos al modificar su distribución subcelular. Estos cambios representan importantes mecanismos reguladores que gobiernan las funciones activadas por CaM.

OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es estudiar los efectos de la MEL sobre la distribución subcelular de la CaM y determinar si la concentra en compartimientos celulares específicos.

METAS

1. Estudiar los efectos de la MEL sobre la distribución subcelular de la CaM en las células MDCK y N1E-115 incubadas durante tres días con concentraciones fisiológicas de la hormona.
2. Determinar el curso temporal de los efectos de la MEL sobre la distribución subcelular de CaM en las células MDCK.
3. Determinar si el efecto de la MEL sobre la distribución subcelular de la CaM en las células MDCK es un proceso reversible.
4. Comparar los efectos producidos por MEL con los producidos por otros antagonistas de CaM y por análogos de la MEL.
5. Estudiar la distribución subcelular de la MEL en relación a la localización de CaM.
6. Determinar los niveles de CaM en fracciones subcelulares (núcleo, citosol y membranas) en células cultivadas en presencia o en ausencia de MEL.

MATERIAL Y MÉTODOS

Materiales

Las células MDCK se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). El medio de cultivo, el suero de bovino, la MEL y los reactivos de grado analítico se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St Louis MO, USA). Los reactivos para electroforesis e inmunotransferencia fueron de BIO-RAD (Richmond CA, USA). Los anticuerpos anti-borrego con fluoresceína acoplada y anti-conejo con rodamina acoplada se obtuvieron de ICN Biomedicals (Costa Mesa CA, USA). El anticuerpo anti-MEL se obtuvo de CIDtech Research INC. (Toronto, Canada). El estuche con los reactivos para el radioinmunoensayo de CaM y la ³⁵S-metionina (11 Ci/mole) de DUPONT NEN Research Products (Boston, MA, USA).

Cultivo de Células

Las células MDCK (pasaje 90-110) y N1E-115 se cultivaron en DMEM suplementado con 10 % de suero de bovino, 100 U.I./ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 25 mM HEPES según los métodos descritos (Cereijido y col, 1978; Snider y col, 1986). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en atmósfera de 95% aire y 5 % CO₂. Las células se cultivaron en botellas falcon de 75 cm². Cuando alcanzaron la confluencia se lavaron dos veces con PBS (0.128 M NaCl, 0.010 M Na₂HPO₄, 0.005M KH₂PO₄ pH 7.4). Posteriormente, se levantaron del sustrato con una solución de tripsina 0.05% (1:250), EDTA 2 mM en PBS y se sembraron a subconfluencia sobre cubreobjetos de vidrio o cajas de Petri de diámetro variable a una densidad de 25 000-

50 000 células/cm².

Preparación de la melatonina e indoles.

Las células sembradas a subconfluencia se cultivaron durante dos días antes de agregar la MEL o el vehículo. Se preparó una solución de MEL concentrada (10^{-3} M). La hormona se disolvió en 50 μ l de etanol y se aforó al volumen deseado con la solución del vehículo (50 mM tris pH 7.6, 20% glicerol). A partir de la solución concentrada de MEL (10^{-3} M) se hicieron diluciones 1:10 con el vehículo diluido 10 veces. Las células controles se incubaron con el vehículo diluido 1:10. La concentración final de etanol en el medio de cultivo fue del 0.01%. Los análogos de MEL y el antagonista de CaM, TFP fueron disueltos con el mismo procedimiento descrito para la MEL.

Purificación de calmodulina

La CaM se obtuvo de cerebro de rata y se purificó de acuerdo al método de Gopalakrishna y Andersen (1982). Los cerebros de rata se obtuvieron por decapitación y se homogeneizaron en frío en dos volúmenes (2 ml/g) de una solución que contenía 50 mM tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM 2-mercaptoetanol, 0.5 mM PMSF). El homogeneizado se centrifugó a 15 000 x g durante 30 min. El sobrenadante se colectó y la pastilla se extrajo con un volumen igual de la solución amortiguadora de homogeneización y se centrifugó nuevamente a 15 000 xg durante 30 min. Los sobrenadantes se filtraron por fibra de vidrio para deslipidizarlos. El sobrenadante filtrado se precipitó a 4 °C con ácido acético (16.9 N) hasta alcanzar un pH de 4.3. Se agitó durante una hora a 4 °C y posteriormente se centrifugó 30 min a 15 000 x g. La

pastilla se resuspendió en el mínimo volumen de solución de homogeneización con una relación de 0.3 a 0.4 ml/mg de cerebro. El pH se ajustó a 7.5 con tris 1 M. La solución se centrifugó a baja velocidad para remover partículas insolubles y el sobrenadante se pasó por una columna con fenil-sepharosa. La columna se equilibró con una solución de 50 mM tris pH 7.5, 1 mM de 2-mercaptoetanol, y 0.1 mM de CaCl₂. La muestra se llevó a 5 mM de CaCl₂ y se aplicó a la columna. Posteriormente se lavó con 10 volúmenes de la solución de equilibrio y 10 volúmenes de la solución de equilibrio + 0.5 M de NaCl. Finalmente, se eluyó con una solución de 50 mM tris pH 7.5, 1 mM de 2-mercaptoetanol y 1 mM de EGTA. La CaM eluida de la columna se concentró por liofilización y se comprobó su pureza por electroforesis. Se determinó la concentración de CaM por el método de Lowry (1951).

Preparación del anticuerpo anti-calmodulina

El anticuerpo anti-CaM se obtuvo inyectando un borrego con 1 mg de la CaM de cerebro de rata mezclada con 1 ml de adyuvante completo de Freund. El borrego fue inyectado por vía subcutánea cada 7 días durante 6 semanas con 1 ml de la mezcla de Freund. El título del anticuerpo se determinó por ELISA (Koertge y Butler, 1983) un mes después de la última inyección. El borrego se sangró y se obtuvo el suero por centrifugación a 3000 rpm/min durante 5 min.

Electroforesis

La CaM comercial o extractos termoestables de células MDCK se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% según el método de Laemmli (1970). Las concentraciones finales de los geles fueron: Gel concentrador; 5% de

acrilamida, 0.08% bisacrilamida, 125 mM tris pH 6.8, 0.1% SDS. La composición del gel separador fue, 15% de acrilamida, 0.8% de bisacrilamida, 0.375 M de tris-base pH 8.8, 0.1% SDS. Para catalizar la polimerización del gel se adicionaron por cada 10 ml de mezcla, 100 μ l de persulfato de amonio al 12.5% y 50 μ l de TEMED al 10%.

Los geles se corrieron a temperatura ambiente en una solución electrolítica que contenía 25 mM de tris pH 8.3, 192 mM glicina, 0.1% SDS a 125 V durante 1 hora. A las muestras que se iban a separar por electroforesis se les adicionó 1/3 de volumen de una solución 3X. La concentración final de las muestras fue 0.625 M tris pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol y azul de bromofenol 0.005%. A las muestras se les añadió, además, 5 μ l de 2-mercaptoetanol por cada 50 μ l de muestra. Posteriormente se calentaron a ebullición durante 3 min.

Para detectar las proteínas separadas por electroforesis, los geles se tiñeron durante una hora con una solución de azul de Coomassie al 0.25% en ácido acético al 10%, metanol al 50%. Los geles se destiñeron en la solución de acético-metanol sin colorante.

Immunodetección

La especificidad del anticuerpo anti-CaM se probó por su capacidad de reconocer al antígeno específico inmovilizado en papel de nitrocelulosa. La CaM o las proteínas de un extracto termoestable obtenido de un homogeneizado de células MDCK se separaron por electroforesis. Posteriormente se transfirieron del gel a papel de nitrocelulosa (Towbin y col, 1979) en una solución de fosfatos que contenía 25 mM de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7.0. Se aplicó durante toda la noche una corriente variable con una diferencia de potencial de 20 V. Posteriormente, la membrana de nitrocelulosa con las proteínas transferidas, se fijó en una solución de glutaraldehído al 0.2% en solución de

fosfatos durante 45 min a temperatura ambiente (Hulen y col, 1991). La membrana se lavó en la solución de fosfatos durante 15 min y se bloqueó en una solución de leche descremada al 0.1% en solución TBS (20 mM tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7.2) toda la noche a 4 °C. Posteriormente el papel de nitrocelulosa se incubó con el anticuerpo anti-CaM diluido 1:100 seguido del segundo anticuerpo anti-borrego con peroxidasa acoplada diluido 1:1000. Las incubaciones con cada anticuerpo fueron de 1 hr a 37 °C. Entre cada incubación con los anticuerpos, la membrana de nitrocelulosa se lavó con la solución TBS que contenía tritón X-100 al 1% (solución TTBS). La reacción del primer anticuerpo con el antígeno inmovilizado en el papel de nitrocelulosa se detectó con 1,4 cloronaftol que es sustrato de la peroxidasa acoplada al segundo anticuerpo y origina un producto colorido.

Immunofluorescencia de doble marcaje

Las células MDCK sembradas sobre cubreobjetos de vidrio se lavaron dos veces con PBS y se fijaron durante 15 min a 37 °C en 0.2% de glutaraldehído y 1.8% formaldehído en PBS. Las células fijadas se lavaron con PBS tres veces y se incubaron con glicina 1 M durante 15 min a 37 °C. Posteriormente, se permeabilizaron durante 10 min a temperatura ambiente con tritón x-100 al 0.01% en PBS. Los cultivos se lavaron dos veces con PBS y se incubaron durante 1 hr a 37 °C con el anticuerpo anti-CaM diluido 1:20. Después de tres lavados con PBS, las células se incubaron con un anticuerpo anti-borrego con fluoresceína acoplada durante 1 hora a 37 °C diluido 1:100. Finalmente las células se lavaron con PBS 5 veces y se montaron sobre portaobjetos de vidrio en una solución de PBS: glicerol 1:9, v/v. Las preparaciones se observaron en un microscopio de epifluorescencia Olympus y se fotografiaron con una cámara fotográfica utilizando un rollo Tmax de Kodak, 400 asa.

Para los estudios de colocación, las células se incubaron 12 hrs con MEL 10^{-9} M o con el vehículo durante 12 hrs. Posteriormente, se fijaron y permeabilizaron como se describió y se incubaron secuencialmente durante 1 hr a 37°C con el anticuerpo anti-CaM seguido del anticuerpo anti-borrego-FITC. Después de un lavado exhaustivo con PBS, las preparaciones se incubaron con el anticuerpo anti-MEL desarrollado en conejo, seguido de un anticuerpo anti-conejo con rodamina acoplada. Se descartaron reacciones cruzadas entre los anticuerpos incubando las células MDCK con el anticuerpo anti-CaM seguido del anticuerpo anti-conejo-RITC y con el anticuerpo anti-MEL seguido del anticuerpo anti-borrego-FITC. Las células no se tiñeron con estos tratamientos.

Fraccionamiento celular

Las células MDCK que fueron sembradas a subconfluencia ($50\,000$ células/cm²) se incubaron con el vehículo o con MEL 10^{-9} M durante 4 días. Posteriormente, los cultivos se lavaron con PBS y se desprendieron del sustrato con un gendarme en 50 mM tris, sacarosa 0.32 M pH 7.4 . Las células se homogeneizaron con un equipo de Teckman (30 Hz durante 60 segundos). Las fracciones nuclear, citosólica y membranal se separaron por centrifugación diferencial como está descrito (Blaustein y Feder, 1980). Brevemente, los homogeneizados fueron centrifugados a 900 x g durante 5 min. La pastilla se resuspendió en la solución amortiguadora de homogeneización y después de tres lavados se mezcló con 2.15 M de sacarosa, 1 mM KH_2PO_4 , 1 mM MgCl_2 , 10% glicerol pH 7.2 en una relación $1:9$ y se centrifugó a $25\,000$ x g durante 20 min. La pastilla nuclear purificada se resuspendió en una solución para radioinmunoensayo de CaM que contenía 50 mM tris pH 7.4 , 1 mM ditiotreitól, 3 mM MgSO_4 y 1 mM EGTA.

Para obtener la fracción membranal, el sobrenadante de 900 x g, se centrifugó a $12\,000$ x g durante 10 min. La pastilla se resuspendió y se centrifugó a $35\,000$ x g

durante 30 min. La pastilla membranal se resuspendió en la solución para el radioinmunoensayo de CaM . La fracción citosólica se obtuvo después de centrifugar durante 2 hrs el sobrenadante de 12 000 x g. Se determinó la concentración de proteína en cada fracción por el método de Lowry (1951).

Radioinmunoensayo

A las fracciones subcelulares se les ajustaron las concentraciones de la solución de radioinmunoensayo (50 mM tris pH 7.4, 1 mM ditionitrol, 3 mM MgSO₄ y 1 mM EGTA). La cantidad de CaM se determinó por radioinmunoensayo (Chafouleas, 1979) utilizando un estuche comercial de NEN/Dupont.

Marcaje de las células con ³⁵S-metionina e inmunoprecipitación de calmodulina

Las células MDCK se sembraron como se describió y se incubaron con vehículo o MEL 10⁻⁹ M durante 4 días y se marcaron con 10 µCi/ml de ³⁵S-metionina durante 48 hrs. Al final del tiempo de incubación las células se lavaron 3 veces con un PBS que contenía 1 mM de metionina fría y se obtuvieron las fracciones citosólica, nuclear y membranal. La CaM marcada con ³⁵S-metionina se inmunoprecipitó de las fracciones nuclear, citosólica y membranal utilizando el anticuerpo anti-CaM . Las mezclas de reacción se incubaron 20 hrs a 4 °C. El complejo ³⁵S-CaM -anti-CaM se precipitó con un segundo anticuerpo anti-borrego. El precipitado se centrifugó 2 hrs a 3000 rpm, y la pastilla se resuspendió en NaOH 0.1M. Finalmente, se contó en un contador de centelleo líquido (Beckman).

Análisis Estadístico

Los resultados se analizaron con la prueba de t de Student impareada. Se consideraron diferencias significativas con una $p < 0.05$.

RESULTADOS

Caracterización del anticuerpo anti-calmodulina

El anticuerpo anti-CaM desarrollado en borrego se caracterizó por inmunotransferencia. El anticuerpo reconoció a una CaM de cerebro de bovino obtenida comercialmente (Fig 3A). El anticuerpo también reconoció una sola banda en un sobrenadante termoestable obtenido de células MDCK (Fig 3B) y de células NIE-115. El suero preinmune no reconoció a ninguna proteína (Fig 3C).

Efecto de la melatonina sobre la distribución de calmodulina

Como se muestra en la Fig 4, la MEL a una concentración de 10^{-9} M produjo un cambio en la distribución subcelular de la CaM. La CaM accesible al anticuerpo anti-CaM, se tiñó en las células tratadas con el vehículo como puntos fluorescentes localizados en la periferia de las células (Fig 4A, 4E). En las células tratadas con MEL, se observó un cambio gradual y dependiente del tiempo, en la distribución de CaM. Después de tres horas de incubación con la hormona, se incrementó el tamaño de los puntos fluorescentes localizados en la periferia de las células MDCK (Fig 4B). Las células MDCK tratadas durante 6 horas con MEL mostraron además de estos cambios, fluorescencia difusa en el citoplasma (Fig 4C). Después de 12 hrs de tratamiento con MEL, los cambios en la distribución de CaM fueron más pronunciados (Fig 4D). La CaM se observó distribuida en toda la célula como una fina red de puntos fluorescentes. También se observó más intensa la fluorescencia (Fig 4D). Las células MDCK que se incubaron con MEL por periodos más prolongados (4 días) mostraron un patrón de distribución de fluorescencia semejante al de las células MDCK incubadas

con MEL durante 12 hrs (Fig 4F).

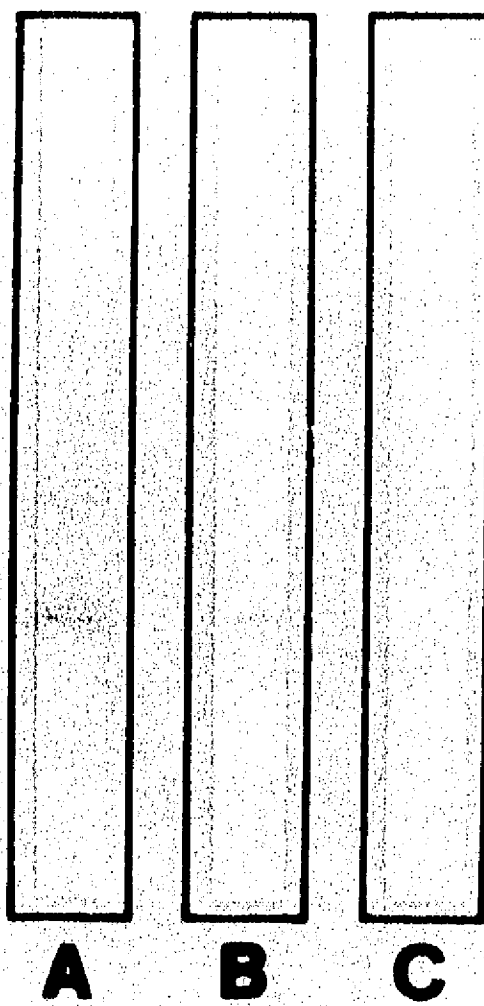


Fig 3. Caracterización del anticuerpo anti-calmodulina. Una calmodulina comercial o las proteínas de un sobrenadante termoestable de células MDCK se separaron por electroforesis unidimensional y se transfirieron a papel de nitrocelulosa. Las proteínas transferidas se identificaron con el anticuerpo anti-calmodulina preparado en borrego. A) calmodulina comercial, B) calmodulina de células MDCK, C) suero preinmune incubado con calmodulina comercial.

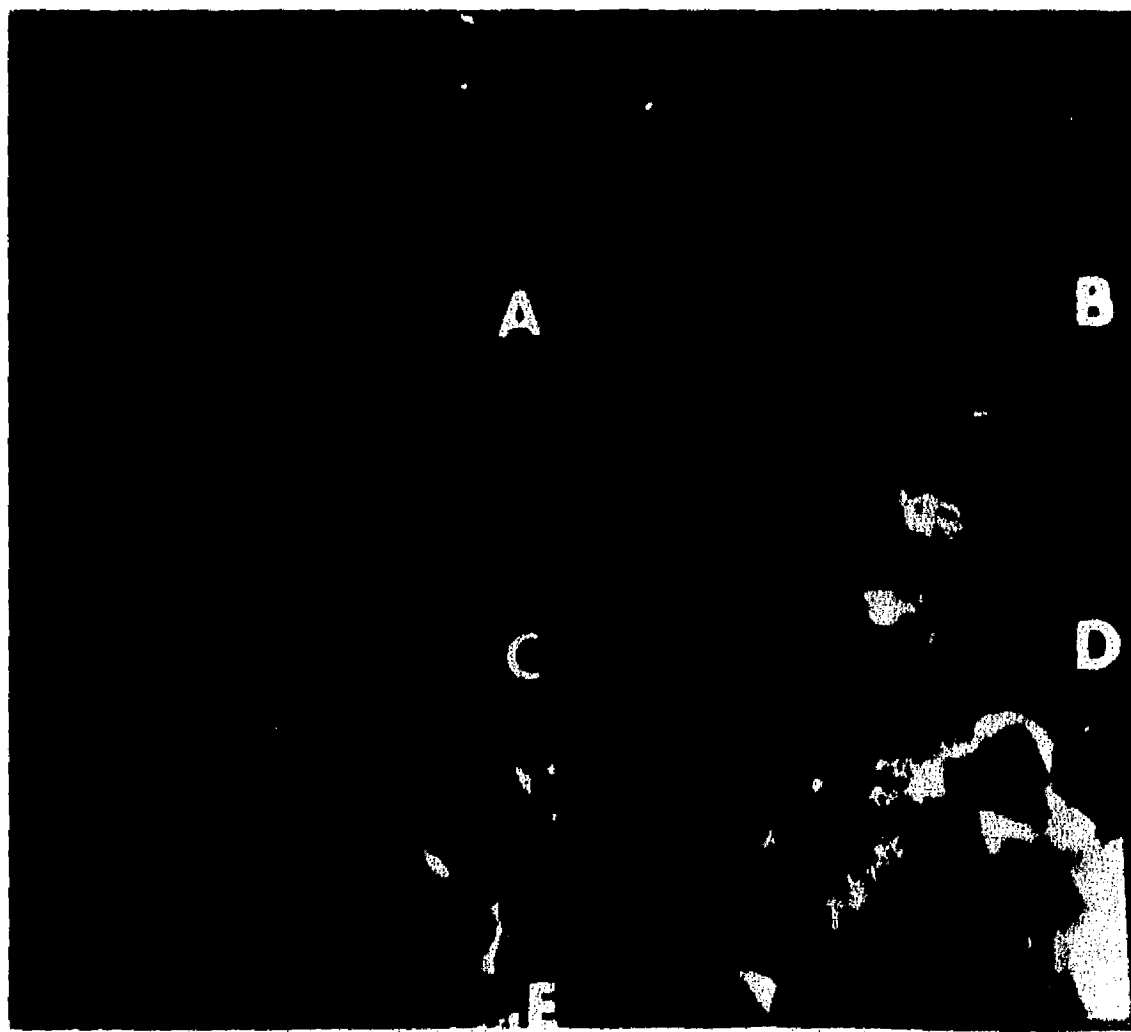


Fig 4. Efecto de la melatonina sobre la distribución de la calmodulina en las células MDCK. Las células MDCK crecidas en cubreobjetos de vidrio se incubaron con vehículo durante 12 hrs (A) o 4 días (E); o con MEL 10^{-9} M por 3 hrs (B), 6 hrs (C), 12 hrs (D), o 4 días (F). Las células se fijaron y se tiñeron con el anticuerpo anti-CaM y con un segundo anticuerpo anti-borrego con fluoresceína acoplada. Amplificación (1000 X).

Se obtuvieron resultados semejantes cuando se incubaron las células NIE-115 con 10^{-9} M de MEL durante 30 min, 3 hrs, 6 hrs y 12 hrs (Fig 5B-5F). La hormona produjo un cambio en la distribución de CaM en las células de neuroblastoma y la proteína se observó como puntos fluorescentes gruesos localizados en el citoplasma.

Efecto de la melatonina sobre el contenido de calmodulina en la fracción citosólica y membranal

Los cambios en la distribución de CaM causados por MEL fueron confirmados midiendo la cantidad de CaM en diferentes fracciones subcelulares. Las células MDCK tratadas durante 4 días con MEL 10^{-9} M mostraron un incremento de 78% en el contenido de CaM unido a membranas (Fig 6A). En tanto que los niveles de CaM citosólica disminuyeron un 60% (Fig 6A). No se observaron cambios en la fracción nuclear. Además, se encontró que la CaM sintetizada *di novo* (CaM marcada con ^{35}S -metionina) en presencia de 10^{-9} M de MEL se incorporó a la fracción membranal y se observó un incremento del 44% con respecto a la ^{35}S -CaM incorporada en presencia del vehículo (Fig 6B).

Efecto de los análogos de la melatonina sobre la distribución de la calmodulina

La especificidad de los efectos de MEL sobre la distribución de CaM se probó incubando a las células MDCK con el catabolito de MEL, 6OH-MEL, con sus precursores 5HT y NAS, con el agonista de MEL 6Cl-MEL o con el antagonista de MEL, luzindol. Ninguno de estos compuestos probados a una concentración de 10^{-9} o 10^{-5} M causaron una redistribución de CaM en las células MDCK.

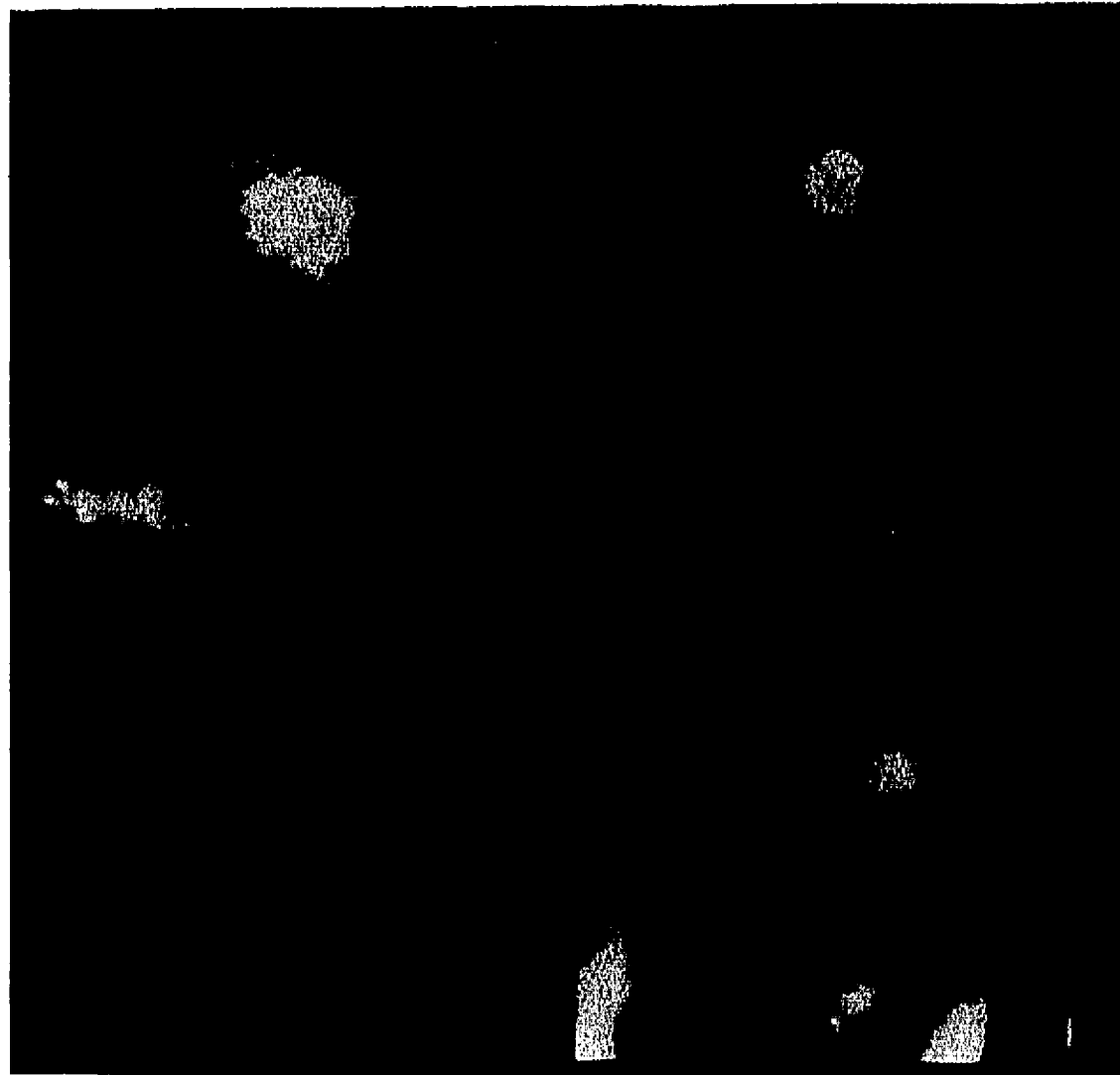


Fig 5. Efecto de la melatonina sobre la distribución de la calmodulina en las células N1E-115. Las células N1E-115 crecidas en cubreobjetos de vidrio se incubaron con vehículo durante 12 hrs (A) o con MEL 10^{-9} M por 5 min (B), 30 min (C), 3 hrs (D), 6 hrs (E), o 12 hrs (F). Las células se fijaron y se tiñeron con el anticuerpo anti-CaM y con un segundo anticuerpo anti-borrego con fluoresceína acoplada. Amplificación (1000 X).

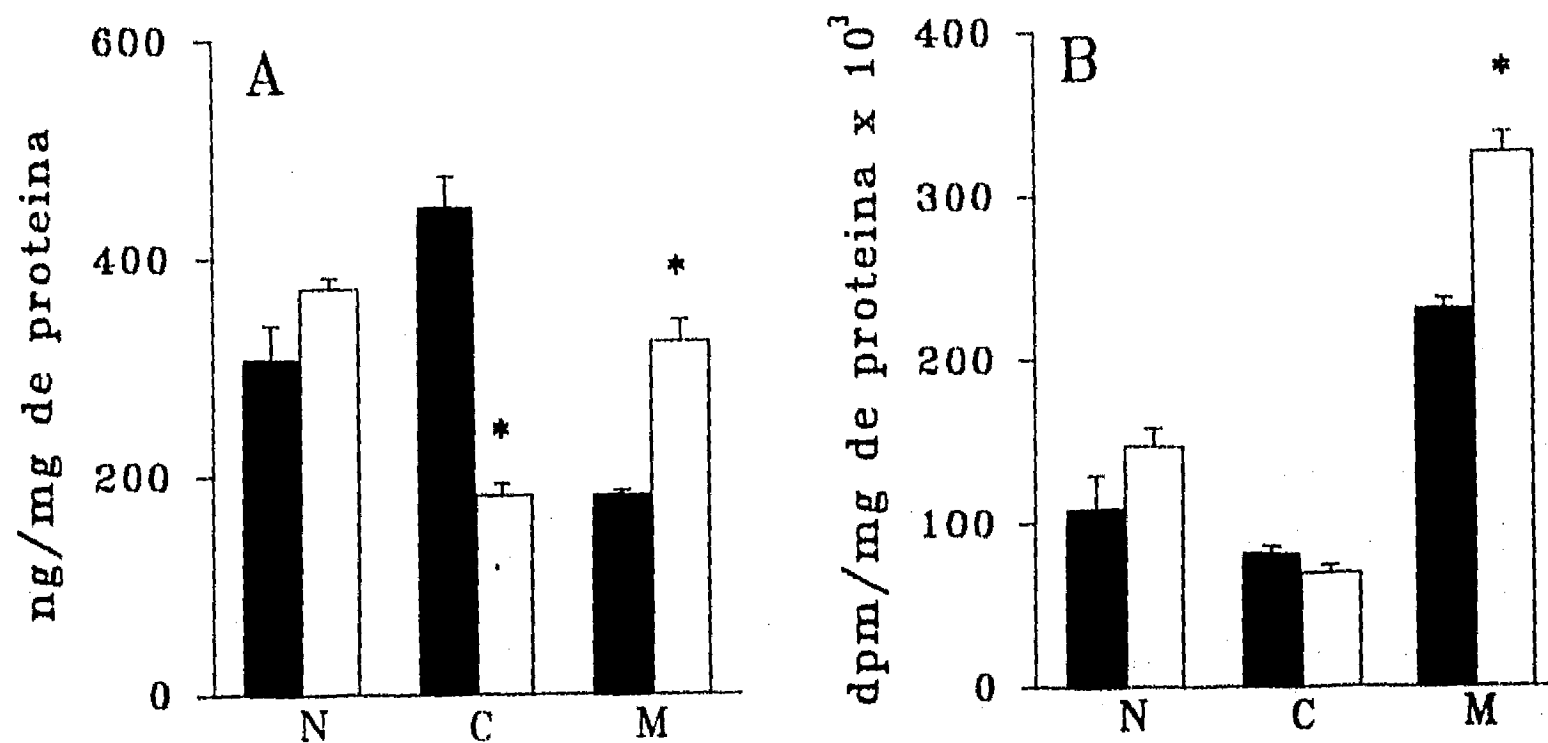


Fig 6. Efecto de la melatonina sobre el contenido de calmodulina en las fracciones nuclear, citosólica y membranal. Los histogramas en el panel A muestran la cantidad de calmodulina determinada por radioinmunoensayo, en la fracción nuclear (N), citosólica (C) y membranal (M) obtenidas de células MDCK cultivadas con vehículo (■) o con 10^{-9} M de MEL (□). En el panel B se muestra la cantidad de calmodulina marcada con ^{35}S -metionina e inmunoprecipitada con un anticuerpo anti-calmodulina. Los resultados representan la media \pm SEM de un experimento representativo. Las muestras se ensayaron por cuadruplicado y se hicieron tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias con una $p < 0.001$.

Reversibilidad de los efectos de la melatonina sobre la distribución de calmodulina

Los cambios en la distribución subcelular de CaM causados por MEL 10^{-9} M se revirtieron después de retirar la MEL del medio de cultivo (Fig 7). Los puntos fluorescentes observados en el citoplasma de las células MDCK incubadas 12 hrs con MEL, disminuyeron 3 y 6 hrs después de retirar a la MEL del medio (Fig 7C y 7D). Doce y 24 hrs después de retirar la MEL e incubar a las células en medio normal, el patrón de fluorescencia fue semejante al de las células control incubadas 12 hrs con vehículo y 12 ó 24 hrs en medio normal. Sin embargo, se observó menos intensa la fluorescencia (Fig 7A, 7E, 7F).

Colocalización de la melatonina y la calmodulina

En la Fig 8 se muestra que la MEL y CaM se localizan en los mismos sitios subcelulares. Tanto el anticuerpo anti-MEL como el anticuerpo anti-CaM tiñeron los mismos sitios en el citoplasma y en la región perinuclear de las células MDCK incubadas con 10^{-9} M de MEL durante 12 hrs (Fig 8C,8D). En las células incubadas con el vehículo durante 12 hrs, el anticuerpo anti-MEL no tiñó ningún sitio subcelular (Fig 8B). Sin embargo, el anticuerpo anti-CaM detectó a la CaM en la periferia de las células como puntos fluorescentes.

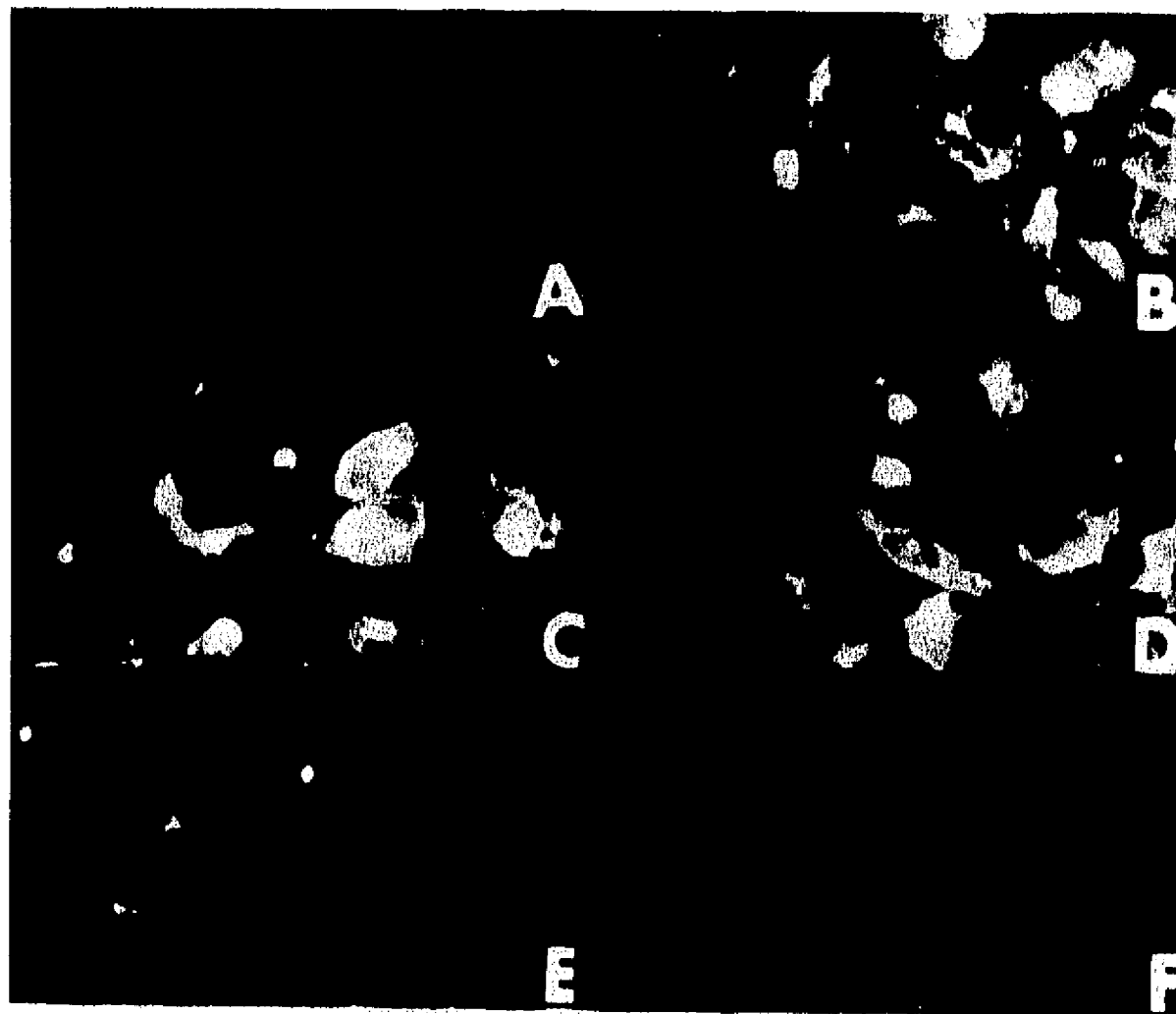


Fig 7. Reversibilidad del efecto de melatonina sobre la distribución de calmodulina. Las células MDCK se incubaron con vehículo (A), o con MEL 10^{-9} M durante 12 hrs (B). Al cumplirse el tiempo de incubación, se reemplazó el medio de cultivo que contenía la hormona por medio normal y las células se incubaron por 3 hrs (C), 6 hrs (D), 12 hrs (E), o 24 hrs (F). Las células se fijaron y se tiñeron con el anticuerpo anti-CaM desarrollado en borrego y con un segundo anticuerpo anti-borrego con fluoresceína acoplada. Amplificación (1000 X).

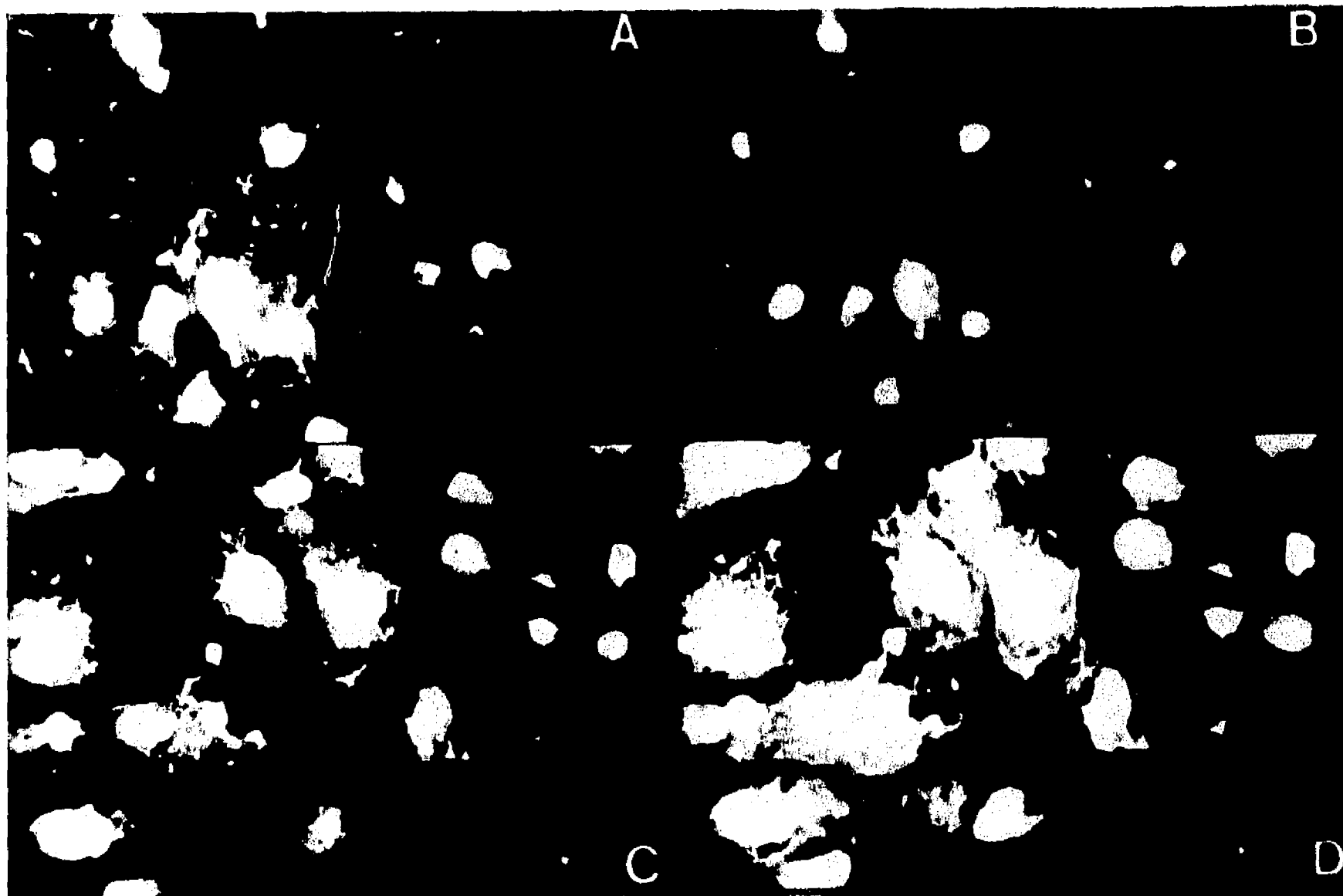


Fig 8. Colocalización de la melatonina y la calmodulina. Las células MDCK se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio y se incubaron con vehículo (A,B) o con MEL 10^{-9} M (C,D) durante 12 hrs. Las células se fijaron y se tiñeron secuencialmente con un anticuerpo anti-calmodulina (A,C) y con un anticuerpo anti-MEL (B,D) como esta descrito en métodos. Amplificación (2500 X).

DISCUSIÓN

Estudios previos han demostrado que la MEL antagoniza el complejo $\text{Ca}^{++}/\text{CaM}$ (Antón-Tay y col, 1993; Benítez-King y Antón-Tay, 1993). Los resultados aquí descritos indican que la hormona, además, cambia la distribución subcelular de CaM; que la concentra en la fracción membranal y que la hormona se encuentra posiblemente en los mismos sitios subcelulares en donde se encuentra la CaM.

El método de inmunofluorescencia de doble marcaje empleado para estudiar la presencia de MEL en las células, solo permite saber que la MEL entra en las células y se distribuye en el citoplasma, pero no da información precisa sobre la localización de la hormona en los diferentes compartimientos intracelulares. La presencia de MEL en el interior de las células MDCK se detectó desde las primeras tres horas de incubación y el patrón de distribución fue estable a las doce horas. Estos datos, junto con los descritos en la literatura sobre la distribución subneuronal de la MEL (Antón-Tay y col, 1988) y la unión de la hormona a proteínas obtenidas de diferentes fracciones subcelulares (Cohen, 1978; Cardinali y col, 1979; Niles y col, 1979), confirman que dada su alta lipofiliidad, la MEL entra a las células, cruza la membrana plasmática hacia el espacio intracelular, de donde se distribuye a los diferentes compartimientos subcelulares. De aquí que sea posible asumir que todas las células son blancos potenciales de la hormona.

Los cambios inducidos por la MEL en la distribución subcelular de CaM, se observaron cuando las células se incubaron con concentraciones nanomolares de MEL. Esta concentración corresponde a los niveles circulantes de la hormona que se alcanzan durante el pico nocturno tanto en el humano como en las diferentes especies de mamíferos estudiados (Reiter, 1991). Los cambios en la distribución de CaM son específicos ya que los precursores metabólicos de la MEL o su catabolito principal no

causan ningún efecto. Este dato concuerda con los descritos en la literatura de que 5HT, NAS, 6OH-MEL y análogos como el luzindol, no tienen efecto antagonista sobre CaM en este margen de concentraciones (Benítez-King y col, 1993; Benítez-King y col, 1996).

En las células tratadas con MEL, además del traslado de la CaM del citosol a la membrana, se observó un aumento en la intensidad de la fluorescencia de la CaM detectada con el anticuerpo específico. Aún cuando este incremento puede ser debido al desenmascaramiento de los epítopes inmunoreactivos, por cambios conformacionales de la CaM inducidos por la unión de MEL, es más probable que el incremento de la fluorescencia corresponda a un incremento en la concentración de CaM (Benítez-King y col, 1991). En las células MDCK incubadas durante 3 días con 1 nM de MEL, el contenido de CaM se duplica junto con un aumento de la síntesis de CaM y los niveles del mRNA específico para CaM (Benítez-King y col, 1991; Benítez-King y col, 1994; Ortega y col, 1993).

Además, en los resultados aquí descritos se confirmó que la síntesis de CaM está aumentada en presencia de MEL y se demostró que la CaM recién sintetizada ingresa a la poza de CaM y también se traslada a la membrana.

El mecanismo molecular por el cual la MEL causa la redistribución de la CaM, no se conoce y debe ser motivo de estudio. Las posibilidades son que la unión de la MEL a la CaM favorezca las interacciones hidrofóbicas entre el complejo MEL-CaM y los lípidos de la membrana. Otra posibilidad es que el traslado de CaM sea una consecuencia del rearrreglo del citoesqueleto inducido por la hormona como ocurre en las células SK-N-SH (Bennet y col, 1988). Una tercera posibilidad es que a semejanza de como sucede con otras hormonas lipofílicas, que también modifican la distribución subcelular de CaM, el efecto de la MEL sea a través de estimular la actividad de la proteína cinasa C (PKC) (Estep y col, 1990; De Boland y col, 1988; Simmen y col,

1984). Estudios preliminares realizados por nuestro grupo apoyan esta última posibilidad, ya que la MEL activa a la PKC tanto *in vivo* como *in vitro* (Benítez-King y Antón-Tay, 1996a; Benítez-King y Antón-Tay, 1996b).

Aún cuando el que la MEL se encuentre localizada en los mismos sitios subcelulares en los que se encuentra la CaM confirma la accesibilidad de la MEL a la CaM *in vivo*, el hecho de que se movilice el complejo MEL-CaM es difícil de interpretar. El que se encuentren localizadas en los mismos sitios subcelulares no necesariamente significa que estén unidas. Pueden coexistir en un compartimiento celular específico a un tiempo dado. El factor que haría que la MEL se una a CaM sería la elevación transitoria de calcio. La respuesta biológica se produciría si en el mismo compartimiento intracelular existen las enzimas blanco de la CaM y los sustratos. Hasta ahora solamente se ha podido demostrar que esas condiciones se cumplen para el alargamiento de los microtúbulos y la formación de neuritas, (Benítez-King, 1990; Huerto-Delgadillo, 1994) y recientemente para la sintetasa del óxido nítrico en el cerebelo en donde la MEL inhibe a esta enzima y disminuye los niveles de oxido nítrico (Guerrero y col, 1996) .

Finalmente los resultados indican que además del efecto antagonista de CaM, la MEL puede concentrar a la CaM en compartimientos celulares selectivos y apoyan la hipótesis que a través de estos mecanismos, la MEL puede sincronizar la actividad celular mediada por CaM.

CONCLUSIONES.

1. La observación de que la MEL tiene acceso al interior de las células MDCK y N1E-115, junto con los datos pertinentes aquí discutidos, permiten postular que todas las estirpes celulares son blancos potenciales de la hormona.

2. En el interior de la célula, la MEL se distribuye con un patrón semejante al de la CaM. Por lo anterior, es posible que, dependiendo de las concentraciones intracelulares de calcio, la hormona se unirá a la CaM.

3. La MEL cambia la distribución subcelular de la CaM y la traslada de la fracción citosólica a la membranal. Por lo tanto, además de los efectos inmediatos de antagonismo de CaM, la hormona tiene un mecanismo agregado de modulación de CaM a tiempos más largos de exposición.

4. Los cambios observados en la CaM en presencia de MEL son semejantes, independientemente de la estirpe celular estudiada (MDCK y N1E-115). Se presentan a concentraciones nanomolares de MEL y son reversibles. La concentración de MEL empleada está en el margen de las concentraciones sanguíneas durante la fase de secreción de la hormona. Estas características sugieren que los efectos descritos tienen un papel relevante en la fisiología de la célula.

5. En general, tomando los datos en conjunto, es posible concluir que la MEL constituya una señal hormonal con capacidad para sincronizar la actividad de todas las células del organismo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe, K.G., Robinson, A., Liddle, G.W., Butcher, R.W., Nicholson, W.E., y Baird, C.E. (1969). Role of cyclic AMP in mediating the effects of MSH, norepinephrine, and melatonin on frog skin color. *Endocrinology*, 85: 674-682.
- Antón-Tay, F., y Wurtman, R.J. (1969). Regional uptake of ^3H -melatonin from blood or cerebrospinal fluid by rat brain. *Nature (Lond)* 221: 474-475.
- Antón-Tay, F., Díaz, J.L., y Fernández-Guardiola, A. (1971). On the effect of melatonin upon human brains: Its possible therapeutic implications. *Life Sci.* 10: 841-850.
- Antón-Tay, F., Forray, C., y Ortega-Corona, B.G. (1988). Subneuronal fate of intracerebroventricular injected ^3H -Melatonin. *J. Pineal Res.* 5 : 125-133.
- Antón-Tay, F., Huerto-Delgadillo, L., Ortega-Corona, B.G., y Benítez-King, G. (1993). Melatonin antagonism to calmodulin may modulate multiple cellular functions. *Melatonin and the Pineal Gland From Basic Science to Clinical Application*. Editado por Y. Toitou, J. Arendt, y P. Pevet, pp. 41-46. Elsevier, Amsterdam.
- Arendt, J., Aldhous, M., y English, J. (1987). The effects of jet-lag and their alleviation by melatonin. *Ergonomics* 30: 1379-1393.
- Arendt, J., Aldhous, M., y Wright, J. (1988). Synchronization of a disturbed sleep-wake cycle in a blind man by melatonin treatment. *Lancet* 1:772-773.
- Arnold, J.D., Berger, A.E., y Martin, D.C. (1969). Chemical agents effective in mediating control of growth and division synchrony of plasmodium berghei in pinealectomized mice. *J. Parasitol.* 55: 617-625.
- Axelrod, J. (1974). The pineal gland a neurochemical transducer. *Science* 184: 1341-1348.
- Babu, Y.S., Sack, J.S., Greenhough, T.V., Bugg, C.E., Means, A.R., y Cook, W.J. (1985). Three dimensional structure of calmodulin. *Nature* 315: 37-40.
- Balzer, I., y Hardeland, R. (1991). Photoperiodism and effects of indoleamines in a unicellular alga, *Gonyaulax polyedra*. *Science* (1991) 253: 795-797.
- Banerjee, S., Keer, V., Winston, M., Kelleher, K.J., y Margulis, L. (1972). Melatonin inhibitor of microtubule based oral morphogenesis in *Stentor coeruleus*. *J. Protozool* 19: 108-113.
- Banerjee, S., y Margulis, L. (1973). Mitotic arrest by melatonin. *Exp. Cell Res.* 78:314-318.

- Benítez-King, G., Huerto-Delgadillo, L., y Antón-Tay F. (1990). Melatonin effects on the cytoskeletal organization of MDCK and neuroblastoma NIE-115 cells. *J. Pineal Res.* 9: 209-220.
- Benítez-King, G., Huerto-Delgadillo, L., y Antón-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.
- Benítez-King, G., Huerto-Delgadillo, L., y Antón-Tay, F. (1993). Binding of ^3H -Melatonin to calmodulin. *Life Sci.* 53: 201-207.
- Benítez-King G., y Antón-Tay F. (1993). Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia* 49: 635-641.
- Benítez-King, G., Huerto-Delgadillo, L., Sámano-Coronel L., y Antón-Tay, F. (1994). Melatonin effects on cell growth and calmodulin synthesis in MDCK and NIE-115 cell lines. *Adv. Pineal Res.* 7: 57-61.
- Benítez-King G., Ríos A., Martínez A., y Antón-Tay F. (1996). In vitro inhibition of Ca^{++} /calmodulin dependent protein kinase II activity. *Biochem. Biophys. Acta.* En prensa.
- Benítez-King G. y Antón-Tay F. (1996). The role of melatonin in cytoskeletal remodeling is mediated by calmodulin and protein kinase C. *Front. Horm. Res.* En prensa.
- Benítez-King G. y Antón-Tay F. (1996). Calmodulin and protein kinase C α are two Ca^{++} binding proteins that mediate intracellular melatonin signaling. *Pineal gland update:1996 From molecular mechanisms to clinical implications.* En prensa.
- Bennet, V., Gardner, K., Steiner, J. P. (1988). Brain adducin: a protein kinase C substrate that may mediate site-directed assembly at the spectrin-actin junction. *J. Biol. Chem.* 263-5860-5869.
- Berkowitz, S.A., y Wolff, J. (1981). Intrinsic calcium sensitivity of tubulin polymerization. *J. Biol. Chem.* 256: 11216.
- Bershadsky, A.D., y Vasilev, J.M. (1988). En: *Cytoskeleton*, Plenum Press, New York.
- Bikle, D.D., Munson, S., Chafouleas, J. (1984). Calmodulin may mediate 1, 25-dihydroxyvitamin D-stimulated intestinal calcium transport. *FEBS lett.* 174:30-33.
- Blaustein J.D., y Feder, H.H. (1980). Nuclear progesterin receptors in guinea pig brain measured by an in vitro exchange assay after hormonal treatments that affect lordosis. *Endocrinology* 106: 1061-1066.
- Blask, D.E. (1984). The pineal an oncostatic gland? En: *The Pineal Gland.* Editado por J. Reiter, pp. 253-284, Raven Press, New York.

- Bubenik, G.A., Brown, G.M., Uhler, I., y Grota, L.J. (1974). Immunohistological localization of N-acetylindole-alkylamines in pineal gland, retina and cerebellum. *Brain. Res.* 81: 233-242.
- Bubenik, G.A., Brown, G.M., y Grota, L.J. (1977). Immunohistological localization of melatonin in the rat digestive system. *Experientia*, 33: 662-663.
- Bubenik, G.A. (1980). Immunohistological localization of melatonin in the salivary gland of the rat, en: *Advances in the Biosciences: Melatonin Current Status and Perspectives*, vol. 29 pp. 391-395. Editado por N., Birau, and W., Schloot, Pergamon Press, Oxford, Nueva York,
- Cardinali, D.P., Hyppa, M.T., y Wurtman, R.J. (1973). Fate of intracisternally injected melatonin in rat brain. *Neuroendocrinology* 12: 30-40.
- Cardinali D.P. (1981). Melatonin a mammalian pineal hormone. *Endocr. Rev.* 2: 327-354.
- Cardinali, D.P., y Freire, F. (1975). Melatonin effects on brain. Interaction with microtubule protein, inhibition of fast axoplasmic flow and induction of crystalloid and tubular formation in the hypothalamus. *Mol. Cell Endocrinol.* 2: 317-330.
- Cardinali, D.P., Vacas, M.I., y Boyer, E.E. (1979). Specific binding of melatonin in bovine brain. *Endocrinology* 103: 437-441.
- Carlberg, C., y Wiessenberg, I. (1995). The orphan receptor family RZR/ROR melatonin and 5-lipoxygenase: An unexpected relationship. *J. Pineal Res.* 18: 171-178.
- Cassone, V.M. (1990). Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. *Trends Neurosci.* 13: 457-463.
- Cereijido, M., Robbins, E.S., Dolan, W.J., Rotunno C.A., y Sabatini, D.D. (1978). Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J. Cell Biol.* 77: 853-880.
- Chafouleas, J.G., Dedman, J.R., Munjaal, R.P., y Means, A.R. (1979). Calmodulin: Development and application of a sensitive radioimmunoassay. *J. Biol. Chem.* 254: 10262-10267.
- Cheung, W.Y. (1980). Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* 207: 19-27.
- Cohen, M., Roselle, D., Chabner, B., Schmidt, T.J., y Lippman, M. (1978). Evidence for a cytoplasmic melatonin receptor. *Nature* 274: 894-895.
- De Boland, A.R., Massheimer, V., Fernandez, L.M., (1988). 1,25 Dihydroxivitamin D3 affects calmodulin distribution among subcellular fractions of skeletal muscle. *Calcif. Tissue Int.* 43:370-375.

- Dubocovich, M.L. (1995). Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Tips* 16: 50-56.
- Estep, R.P., Alexander, K.A., y Storm, D.R. (1990). Regulation of free calmodulin levels in neurons by neuromodulin: Relationship to neuronal growth and regeneration. *Curr. Top. Cell. Reg.* 31: 161-179.
- Fernández-Guardiola, A., y Antón-Tay, F. (1974). Modulation of subcortical inhibitory mechanisms by melatonin, en: *Neurohumoral coding of brain function*, pp. 121-135. Eds. R.D. Myers, y R. Drucker-Colín, Plenum Press, New York.
- Fitzgerald, T.J., y Veal, A. (1976). Melatonin antagonizes colchicine induced mitotic arrest. *Experientia* 32: 372-373.
- Freire, F., y Cardinali, D.P. (1975). Effects of melatonin treatment and environmental lighting on the ultrastructural appearance, melatonin synthesis, norepinephrine turnover and microtubule protein content of the rat pineal gland. *J. Neural Trans.* 37: 237-257.
- Funan, H. (1966). The influence of certain hormones and chemicals on mammalian pigment cells. *J. Invest. Dermatol.* 46: 117-124.
- Gopalakrishna, R., y Anderson, W.R. (1982). Ca^{++} induced hydrophobic site on calmodulin: Application for purification of calmodulin by phenyl-sepharose affinity chromatography. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 104: 830-836.
- Gratzer, W.B., y Baines, A.J. (1988). Calmodulin and cytoskeletal function. en: *Molecular aspects of cellular regulation: Calmodulin vol 5* pp. 357-364. Eds. P. Cohen, y C.B. Klee, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford.
- Guerrero, J.M., Pozo, D., Osuna C., y Calvo, J.R. (1996). Inhibition of nitric oxide synthase and cyclic GMP production by physiological concentrations of melatonin in the rat cerebellum: A calmodulin mediated mechanism. *Proc. 7th Euro. Pineal Soc. Colloq. Abstr.* 24.
- Hardeland, R., Balzer, I., Poeggeler, B., Fuhrberg, B., Uría H., Behmann, G., Wolf, R., Meyer, T.J., y Reiter, R.J. (1995). On the primary functions of melatonin in evolution: Mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation, and scavenging of free radicals. *J. Pineal Res.* 18:104-111.
- Huang, C.Y., Chau, V., Chock, P.B., Wang, J.H., y Sharma, R.K. (1981). Mechanism of activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase: requirement of the binding of four Ca^{2+} to calmodulin for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 871-874.
- Huerto-Delgadillo, L., Antón-Tay, F., y Benítez-King, G. (1994). Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: Role of melatonin as a calmodulin antagonist. *J. Pineal Res.* 17: 55-62.

- Hulen, D., Baron, A., Salisbury, J., y Clarke M. (1991). Production and specificity of monoclonal antibodies against calmodulin from *Dictyostelium discoideum*. *Cell Motil. Cytoskel.* 18: 113-122.
- Jackson, W.T. (1969). Regulation of mitosis II. Interaction of isopropyl N-phenyl-carbamate and melatonin. *J. Cell Sci.* 5: 745-755.
- Kappers, J.A., Shade, J.P. (1965). Structure and function of *Epiphysis Cerebri*, p. 3, Elsevier, Amsterdam.
- Kappers, J.A. (1969). The mammalian pineal organ. *J. Neurovic. Relat. Supl.* IX: 140.
- Keith, C.H., Bajer, A.S., Ratan. R., Maxfield, F.R., y Shelanski, M.L. (1986). Calcium and calmodulin in the regulation of microtubular cytoskeleton. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 466: 375-378.
- Klatt, P., Heinzl, B., Jhon, M., Kastners, M., Bohme, K., Mayer, B.(1992). Ca^{++} /calmodulin-dependent cytochrome c reductase activity of brain nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 267: 11374-11378.
- Klee, C.B. (1991). Concerted regulation of protein phosphorylation dephosphorylation by calmodulin. *Neurochem. Res.* 16: 1059-1065.
- Kopin, I.J., Pare, C.M., Axelrod, J., y Weissbach, H. (1961). The fate of melatonin in animals. *J. Biol. Chem.* 236: 3072-3075.
- Koertge, T.E., y Butler, J.E. (1983). The relationship between the binding of primary antibody to solid-phase antigen in microtiter plates and its detection by the ELISA. *J. Immunol. Meth.* 63: 263-299.
- Kumagai, H.E., Nishida, E., Kotani, S., y Sakai, H. (1986). On the mechanism of calmodulin-induced inhibition of microtubule assembly in vitro. *J. Biochem.* 99: 521-525.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature (London)* 227: 680-685.
- Lerner, A.B., Case, J.D., Takahashi, Y., Lee, T.H., y Mori, W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightness melanocytes. *J. Amer. Chem. Soc.* 80: 2587.
- Levin, R.M., y Weiss, B. (1977). Binding of trifluoperazine to the calcium dependent activator of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Mol. Pharmacol.* 13: 690-697.
- Lissoni, P., Barni, S., Tancini, G., Crispino, S., Paolorosi, F., Lucini, V., Mariani, M., Cattaneo, G., Esposti, D., Esposti, G., y Frascini, F. (1987). Clinical study of melatonin in untreatable advanced cancer patients. *Tumori*, 73: 475-480.
- Lowry O.H., Rosenbrough, H.J., Farr, A.L., y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the pholin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.

- Malawista, S.E. (1973). The effects of colchicine and cytochalasin B on the hormone-induced movement of melanin granules in frog dermal melanocytes, en: *Endocrinology* p. 288 Ed. R.O. Scow, F.J.G., Ebling, y I.W., Henderson. Excerpta Amsterdam.
- Malawista, S.E. (1975). Microtubules and the movement of melanin granules in frog dermal melanocytes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 253: 702-710.
- Messenger, E.A., y Warner, A.E. (1977). The action of melatonin on single amphibian pigment cells in tissue culture. *Br. J. Pharmac.* 61: 607-614.
- Moore, R.Y. (1983). Organization and function of a Central Nervous System circadian oscillator. *Fed. Proc.* 42: 2783-2789.
- Morgan, P.F., Patel, J., y Marangos, P.J. (1987). Characterization of [³H]RO 5-4864 binding to calmodulin using a rapid ultrafiltration technique. *Biochem. Pharmacol.* 36: 4257-4262.
- Niles, L.P., Wong, Y.W., Mishra, R.K., y Brown, G.M. (1979). Melatonin receptors in brain. *Eur. J. Pharmacol.* 55: 219-221.
- Ortega, A., López, I., Benítez-King, G., y Antón-Tay, F. (1993). Melatonin increases calmodulin mRNA levels in MDCK and N1E-115 cell lines. 1st Locarno International Meeting on Neuroendocrinology. *The Pineal Gland in Relation with the Immune System and Cancer. Abstr.*
- Pang, S.F., y Yew, D.T. (1978). Pigment aggregation by melatonin in the retinal pigment epithelium and choroid of guinea-pigs, *Cavia porcellus*. *Experientia* 35: 231-233.
- Perrino, B.A., y Chou, I.N. (1989). Calmodulin modulation of adverse effects of Cd²⁺ on microtubules and tubulin polymerization in vitro. *In vitro* 3: 227-234.
- Pheng, L., y Lagnado, J.R. (1975). Effects of indole alkaloids and related compounds on the properties of brain microtubular protein. *Biochem. Soc. Trans.* 3: 121-124.
- Pierpaoli, W., y Maesstroni, G.J.N. (1987). Melatonin: A principal neuroimmunoregulatory and anti-stress hormone: its antiageing effects. *Immuno. Lett.* 16 (1987) 355.
- Piezzi, R.S., y Cavicchia, J.C. (1981). Effects of cold and melatonin on the microtubules of the toad sciatic nerve. *Anat. Rec.* 200: 115-120.
- Pozo, D., Reiter, R.J., Calvo, J.R., y Guerrero J.M. (1994). Physiological concentrations of melatonin inhibit oxide nitric synthase in rat cerebellum. *Life Sci.* 55: 455-460.
- Ramussen, C.D., y Means, A.R. (1989). Calmodulin is required for cell progression during G1 and mitosis. *EMBO J.* 8: 73-82.

- Reed, B.L., Finnin, B.C., y Ruffin, N.E. (1969). The effect of melatonin and epinephrine on the melanophores of freshwater teleosts. *Life Sci.* 8: 113-120.
- Reiter, R.J. (1991). Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr. Rev.* 12:151-180.
- Reiter, R.J., Poeggeler, B., Tan, D.X., Chen, L.D., Manchester, L.C. y Guerrero, J.M. (1993). Antioxidant capacity of melatonin: A novel action not requiring a receptor. *Neuroendocrinol. Letts.* 15: 103-116.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R., Ebisawa, T. (1994). Cloning and characterization of a mammalian receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13: 1177-1185.
- Rosenthal, N.E., Sack, D.A., Jacobsen, F.M., James, S.P., Parry, B.L., Arendt, J., Tamarkin, L., y Wehr, T.A. (1986). Melatonin in seasonal affective disorder and phototherapy. *J. Neural Transm. [suppl]* 21: 257-268.
- Sack, R.L., Blood, M.L., y Lewy, A. (1992). Melatonin rhythms in night shift workers. *Sleep* 15: 434-441.
- Salter, R.S., Krincks, M.H., Klee, C.B., y Neer, E.J. (1981). Calmodulin activates the isolated catalytic unit of brain adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 256: 9830-9833.
- Seeman, P. (1980). Brain dopamine receptors. *Pharmacol. Rev.* 32: 229-313.
- Sharma, R.K., y Wang, J.H. (1986). Regulation of cAMP concentration by Calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem. Cell. Biol.* 64: 1072-1080.
- Shelanski, M.L., Gaskin, F., y Cantor, R., (1973). Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 765-768.
- Simmen, R.C., Dunbar, B.S., Guerreiro, V., Chafouleas, J.G., y Clark, J.H. (1984). Estrogen stimulates the transient association of calmodulin and myosin light chain kinase with the chicken liver nuclear matrix. *J. Cell Biol.* 99:588-593.
- Snider, R.M., Forray, C., Pfenning, M., y Richelson, E. (1986). Neurotensin stimulates inositol phospholipid metabolism and calcium mobilization in murine neuroblastoma clone N1E-115. *J. Neurochem.* 47:1214-1218.
- Stankov, B., Fraschini, F., y Reiter, R.J. (1991). Melatonin binding sites in the central nervous system. *Brain Res. Rev.* 16: 245-246.
- Stoclet, J.C., Gerard, D., Kilhoffer, M.C., Lugnier, C., Miller, R., y Schaeffer, P. (1987). Calmodulin and its role in intracellular calcium regulation. *Progr. Neurobiol.* 29: 321-364.

- Tanaka, T., y Hidaka, H. (1980). Hydrophobic regions function in calmodulin enzyme(s) interactions. *J. Biol. Chem* 255: 11078-11080.
- Tanaka, T., Inagaki, M., y Hidaka, H. (1983). Hydrophobic interaction of the Ca^{2++} -calmodulin complex with calmodulin antagonists. Naphthalensulfonamide derivatives. *Molec. Pharmac.* 22: 403-407.
- Towbin, H., Staehelin, T., y Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354.
- Wetteberg, L. (1978). Melatonin in humans. Physiological and clinical studies. *J. Neural Trans. (Suppl)* 13: 289-310.
- Wurtman, R.J., Axelrod, J., y Phillips, L.S. (1964). The uptake of ^3H -Melatonin in endocrine and nervous tissues and the effects of constant light exposure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 143: 314-318.
- Wurtman, R.J., y Antón-Tay, F. (1969). The mammalian pineal as a neuroendocrine transducer. *Rec. Progr, Horm. Res.* 25: 493-514.
- Yazawa, M., Vorherr, T., James, P., Carafoli, E., y Yagi, K. (1992). Binding of calcium by calmodulin: influence of the calmodulin binding domain of the plasma membrane calcium pump. *Biochem.* 31: 3171-3176.
- Zhdanova, V.I., Wurtman, R., y Lynch, H.J. (1995). Sleep inducing effects of low doses of melatonin ingested in the evening. *Clin. Pharmacol. Therap.* 57: 552-558.