



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

EFFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA FORMACIÓN
DE AXONES EN NEURONAS HUMANAS
TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:
TANIA CITLALLI GALVÁN ARRIETA

TUTORA PRINCIPAL
DRA. GLORIA ACACIA BENÍTEZ KING
INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES
FACULTAD DE MEDICINA

DR. FRANCISCO R. FERNÁNDEZ DE MIGUEL
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Neurofarmacología del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”, bajo la dirección de la Dra. Gloria A. Benítez King, a quien le agradezco su tutoría.

Agradezco con mucho cariño a mi comité tutorial conformado por la Dra. Carolina Escobar Briones y al Dr. Francisco R. Fernández de Miguel, por su apoyo y sus valiosos comentarios sobre mi trabajo de investigación.

A mis revisores de tesis: la Dra. Marcela Valdés, el Dr. Rafael Salín, el Dr. Gabriel Roldán y el Dr. Julio Moran gracias por su tiempo y sus valiosas observaciones.

El proyecto de doctorado fue financiado por una beca CONACyT con clave 261700 y por Productos Medix® S.A. de C.V.

Al Posgrado en Ciencias Biomédicas por su apoyo y paciencia, en especial a Eva... gracias por todo

DEDICATORIAS

A mi madre “María” por estar en todo momento, por no dejarme vencer nunca y por confiar en mí siempre, a mi abuela “Mamá Lupe” por esos apapachos que curan el alma, a mi Viejo, mi angelito que me guía desde allá y quien me enseñó a ser valiente y siempre ver lo mejor de las personas (sé que estas orgulloso). Gracias por su amor.

A este par Silvia y Mel, gracias por estar siempre, por escucharme, por apoyarme en todo momento, por reír, gritar y llorar conmigo en los momentos felices y en los no tanto. No sé qué haría sin ustedes...

A mi familia por elección: Silvia, Mel, Pam, Karla, Tuch, Pato, Mike, Sol, Abraham, Osezno y Adrián, gracias por estar en las buenas, en las malas y en las peores. Los quiero tanto.

A mi club de Bobby: Fede, Toño y Oscar, por todos los momentos mágicos y por los que nos faltan... nos queda una pelea pendiente.

A los doctores Marcela Valdés, Héctor Chagoyán y Jesús Argueta, por estar conmigo en los momentos más complicados, por todo lo que me enseñaron durante mi estancia, por la confianza y sobre todo por su amistad (gracias por las horas chela y mezcal). Gracias Marce por enseñarme a no usar gerundios...

Al Dr. Miguel Asay, por sus consejos, por su sabiduría compartida y por esas charlas de cigarro que me llenaban de historias.

Y a todos aquellos que no mencioné pero que siempre están en mi corazón.
¡Gracias por hacerlo posible!



Louis Wain

Las neuronas son células de formas delicadas y elegantes, las misteriosas mariposas del alma, cuyo batir de alas quién sabe si esclarecerá algún día el secreto de la vida mental. Santiago Ramón y Cajal

The pineal, is proposed to be a “tranquilizing organ” that promotes homeostatic equilibrium... Samir Malhotra

ÍNDICE

RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	9
Esquizofrenia	9
<i>La hipótesis del neurodesarrollo en la fisiopatología de la esquizofrenia.</i>	12
<i>La hipótesis cronobiológica de la esquizofrenia</i>	13
Melatonina	15
<i>Mecanismos de acción</i>	17
<i>Receptores a melatonina MT1 y MT2</i>	19
<i>Melatonina y desarrollo neuronal</i>	20
Axonogénesis	22
Sinapsis y secreción	28
El epitelio olfatorio como modelo del neurodesarrollo	30
Planteamiento del problema	30
Hipótesis	31
Objetivo general	32
Objetivos Particulares	32
Cultivo Celular	33
Tratamientos farmacológicos	35
Inmunofluorescencia	38
Tinción de Inmunoperoxidasa	39
Análisis Morfométrico	39
Evaluación de la secreción por medio del colorante lipofílico FM1-43	40
Electrotransferencia o Western Blot	42
Análisis Estadístico	44
Resultados	44
Efecto de la melatonina en la formación de axones en la clona de precursores neuronales obtenidos del epitelio olfatorio	44
Curso temporal del efecto de la melatonina sobre la formación de axones	47
La melatonina estimula la fosforilación de la Glucógeno Sintasa Cinasa 3 Beta (GSK3β) en una clona de precursores neuronales humanos	49
Efecto de la melatonina sobre la formación de las sinapsis	51
Efecto de la melatonina sobre la secreción axonal y somática medida con FM1-43 en los precursores neuronales olfatorios	52
La participación de los receptores a melatonina en la formación de axones en la clona de precursores neuronales	60
La melatonina favorece la formación de axones en precursores neuronales del paciente con esquizofrenia.	65
Efecto de la melatonina sobre la fosforilación de la GSK3β en los cultivos primarios PNEOs sujeto control y un paciente con esquizofrenia	68
Receptores a melatonina MT1 y MT2 en precursores neuronales obtenidos de un paciente diagnosticado con esquizofrenia y un sujeto control.	71
Discusión	74
El efecto de la melatonina sobre la formación de axones	75

Los Receptores a melatonina MT1 y MT2 están implicados en la formación de axones en los precursores neuronales del epitelio olfatorio	76
Participación de la Glucógeno Sintasa Cinasa 3 Beta fosforilada en la formación de axones en los precursores neuronales del epitelio olfatorio	77
Funcionalidad de los precursores neuronales del epitelio olfatorio tratados con melatonina medida por el incremento en la fluorescencia del FM1-43	78

RESUMEN

La esquizofrenia (EZ) es una enfermedad neuropsiquiátrica que afecta al 1% de la población mundial. Una de las alteraciones que se pueden encontrar en la fisiopatología de la EZ es la desregulación en la secreción de neurotransmisores y hormonas, la cual desempeña un papel clave para el desarrollo neuronal. Una hormona que se encuentra alterada en la EZ es la melatonina (MEL). La MEL es una indolamina secretada por la glándula pineal que actúa de manera autócrina, parácrina y endócrina. Participa en diversos procesos fisiológicos como la regulación del ciclo circadiano, la modulación del sistema inmune, como agente antioxidante y estimula la formación de nuevas neuronas en el cerebro adulto. Sin embargo, poco se sabe acerca de su papel en el desarrollo del cerebro fetal humano y su papel en la EZ. Los precursores neuronales del epitelio olfatorio (PNEOs) son útiles para estudiar la fisiopatología de las enfermedades neuropsiquiátricas. En este trabajo estudiamos el efecto de la melatonina sobre la formación de axones en PNEOs. Para ello utilizamos una clona obtenida por dilución limitada a partir de PNEOs de un sujeto adulto. Posteriormente se evaluaron los efectos de la MEL en cultivos primarios de PNEOs derivados de un paciente diagnosticado con esquizofrenia (EZ) y un sujeto control (SC) de la misma edad y género. La formación de axones se demostró a través de la inmunotinción de tau que es un marcador axonal y la fosforilación de la GSK3 β que es una enzima clave en la señalización para la formación de los axones. La funcionalidad de los axones se analizó midiendo el incremento en la fluorescencia del colorante FM1-43 a través de un estímulo de alto potasio. Por otra parte se demostró la presencia de los receptores

membranales de MEL MT1 y MT2 en los PNEOs. Los resultados mostraron que hubo una reducción en la formación de axones, en la fosforilación de la GSK3 β y en la cantidad relativa de los receptores MT1/2 en los PNEOs del sujeto con EZ en comparación con los PNEOs del SC. La MEL contrarrestó estas reducciones en las células del paciente.

Concluimos que la MEL participa en la diferenciación neuronal de los PNEOs y que la carencia de MEL podría contribuir a que se presenten alteraciones en el neurodesarrollo el cual está asociado con la EZ.

INTRODUCCIÓN

Esquizofrenia

La esquizofrenia (EZ) es una enfermedad neuropsiquiátrica compleja, su origen es multifactorial que afecta principalmente a adolescentes y adultos jóvenes (Arnold and Rioux 2001). Las características clínicas se han clasificado en tres categorías: los síntomas positivos que se refieren a las alucinaciones, delirios y trastornos del pensamiento; los síntomas negativos como la incapacidad de sentir placer (anhedonia) o expresar las emociones y los síntomas cognitivos es decir los problemas de memoria de trabajo y la falta de atención (Racki et al. 2016, Woo 2014). Estudios epidemiológicos han reportado que durante la niñez se presentan deficiencias en la atención, en la adquisición del lenguaje. Además, los niños son propensos a jugar solos y durante la adolescencia, muestran una falta de confianza y tendencia al retiro social (Dazzan and Murray 1999). Esto ha llevado a suponer que la conjunción de diversos factores que participan en el desarrollo de la EZ.

Los elementos de riesgo para desarrollar la enfermedad son genéticos y ambientales, la interacción de ambos provocan alteraciones durante el desarrollo embrionario asociadas a la EZ (Figura 1). Dentro de los componentes ambientales asociados con este padecimiento podemos mencionar hipoxia perinatal, sangrados de la madre durante el embarazo, desnutrición, nacimiento prematuro, infecciones virales durante el primero y segundo semestre de la gestación (Meyer-Lindenberg and Tost 2014). o bien

alteraciones en la ciclo circádico (Tsuang, Stone, and Faraone 2000), lo que podría afectar el desarrollo, la citoarquitectura neuronal y la funcionalidad cerebral de los pacientes con EZ.

En ese sentido, se han observado cambios o alteraciones estructurales en el cerebro de pacientes con EZ. Entre los que podemos mencionar, pérdida de la materia gris en el hipocampo izquierdo y el giro fusiforme. Por otro lado, hay un incremento en la materia gris de la amígdala (Yasuhiro Matsuda, MD). Otras zonas afectadas son la corteza entorrinal, el hipocampo y en general se observa una reducción en el volumen cerebral. Asimismo, las arborizaciones dendríticas y axonales se encuentran reducidas en los pacientes (Bakhshi and Chance 2015), lo que provoca deficiencias en las conexiones neuronales (Woo 2014).

Con base en la evidencia acumulada por medio de imágenes de resonancia como las anomalías estructurales en el cerebro, se ha formulado diversas hipótesis de la etiología de la EZ como la hipótesis del neurodesarrollo (Pilowsky, Kerwin, and Murray 1993, Alexander-Bloch et al. 2014).

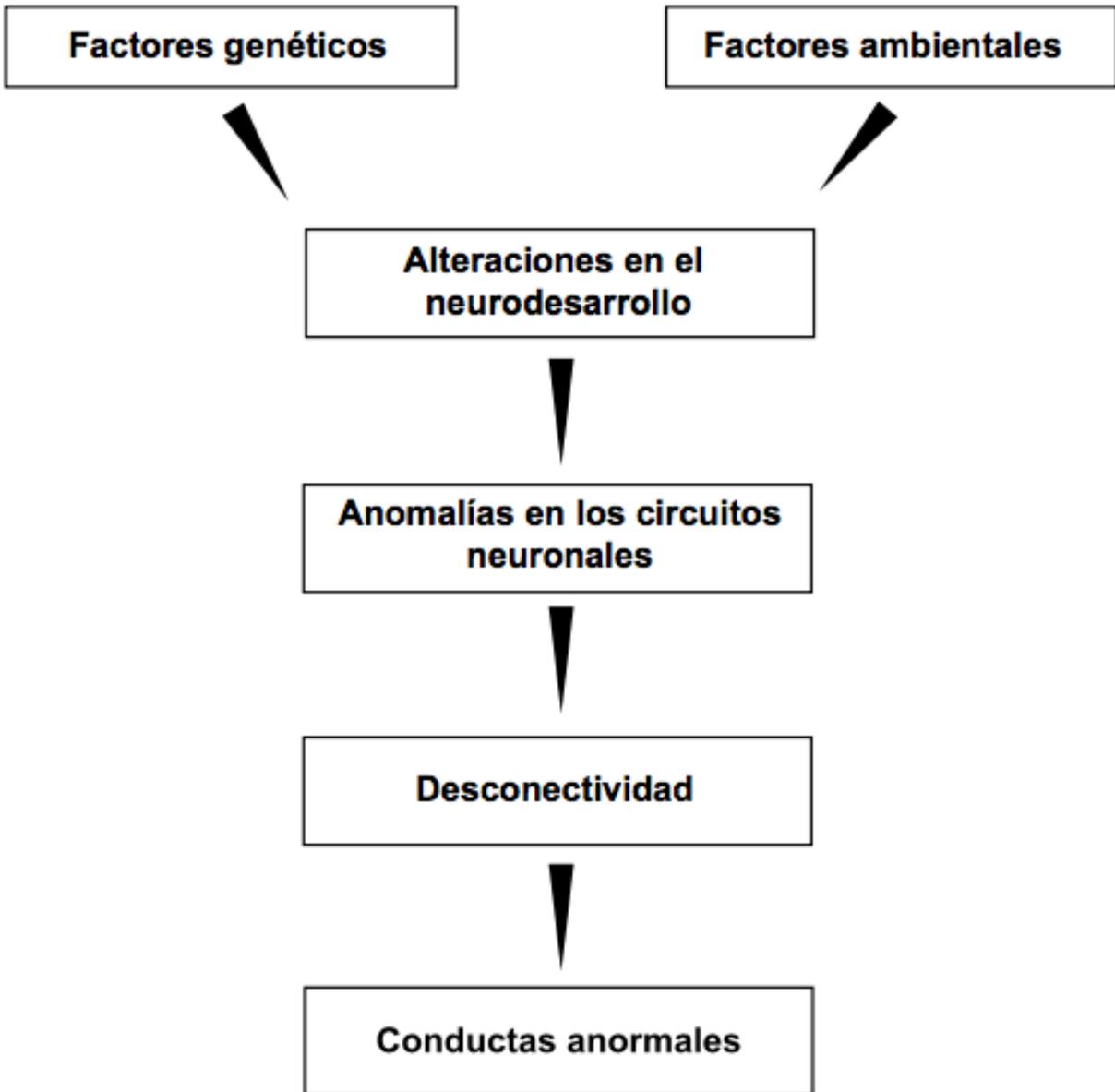


Figura 1. Factores implicados en la fisiopatología de la esquizofrenia de acuerdo con la hipótesis del neurodesarrollo. La interacción de los factores genéticos y ambientales son los elementos que dan lugar a la enfermedad. La interacción de estos factores puede provocar que los circuitos neuronales se desconecten dando como resultado cambios en la conducta de los individuos, como es el aislamiento social.

La hipótesis del neurodesarrollo en la fisiopatología de la esquizofrenia.

La hipótesis de que la esquizofrenia se origina en el neurodesarrollo fue propuesta por primera vez en 1987. Weinberger sugiere que hay un defecto en el desarrollo del cerebro el cual predispone al sujeto a manifestar la enfermedad (Weinberger 1987, Selemon 2014) (Figura 2). Las modificaciones producidas durante el neurodesarrollo ocurren a partir del segundo trimestre, periodo en el cual se lleva a cabo la formación de las llamadas zonas de proliferación celular que se encuentran cercanas a los ventrículos (Lenroot and Giedd 2006). Esta alteración regularmente se manifiesta hasta la adolescencia (Powell et al. 1997) sugiriendo que un evento traumático durante ese periodo desencadena la manifestación tardía de los síntomas. Evidencia acumulada de estudios epidemiológicos indica diversos factores prenatales y perinatales como las infecciones virales (Keshavan, Anderson, and Pettegrew 1994) incrementan el riesgo de desarrollar esquizofrenia. Además, procesos como la proliferación neuronal y glial así como la migración y la maduración neuronal y glial presentan cambios en la vía de señalización (Ashe, Berry, and Boulton 2001). Por otra parte se han asociado las afecciones del neurodesarrollo durante el embarazo con el cambio estacional marcado.

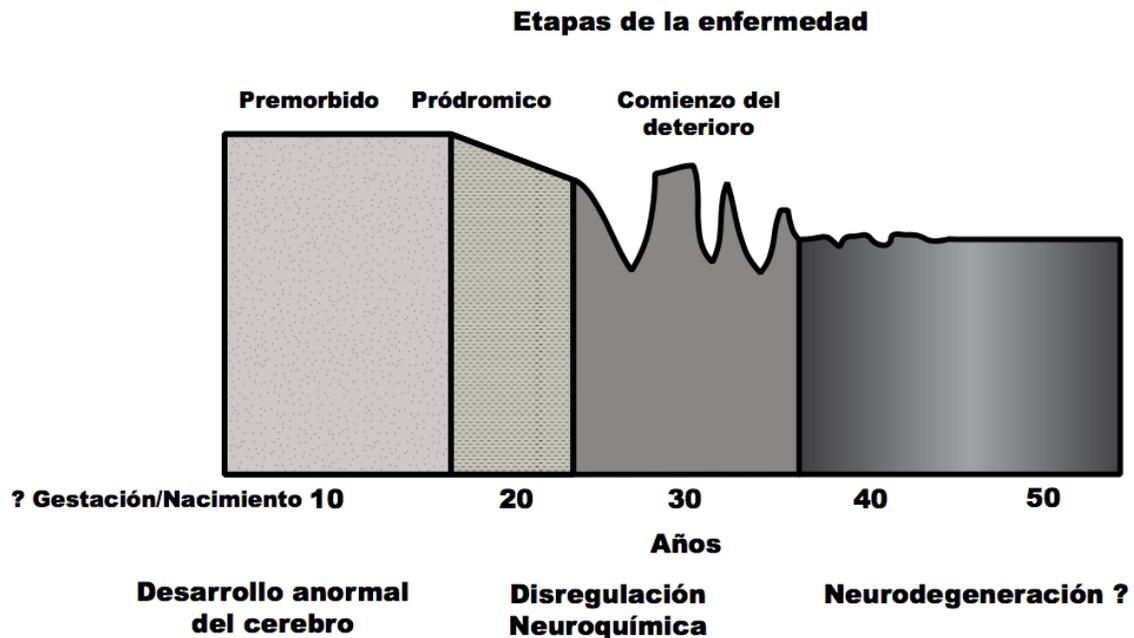


Figura 2. Esquema de la fisiopatología de la esquizofrenia. Se muestran las etapas de la enfermedad a través de los años. Tomado y modificado de Gordon Frankle (Frankle, Lerma, and Laruelle 2003)

La hipótesis cronobiológica de la esquizofrenia

Esta hipótesis ha tomado fuerza debido a diversos estudios epidemiológicos que relacionan al solsticio de invierno con la EZ. Se sabe que mujeres embarazadas cuyo segundo trimestre de gestación coincidió con el solsticio de invierno en latitudes septentrionales, un alto porcentaje de los niños nacidos 3 meses después desarrollaron EZ (Schwartz 2011, 2014). Desde la década de los 20's se han hecho estudios los cuales encuentran una relación entre los meses más oscuros (diciembre-enero) y la probabilidad de desarrollar EZ (Torrey et al. 1997). Además, se sabe que la

disminución en la iluminación solar tiene efectos en la madre que afectan al feto. La concentración de melatonina plasmática disminuye debido a que se reduce la amplitud de secreción, esto provoca que la temperatura de la madre incremente lo que daña el termostato fetal y da como resultado que la temperatura del cerebro del feto incremente y dañe el hipocampo (Figura 3). Cabe señalar que durante el segundo trimestre el hipocampo llega a su volumen total, por lo que cualquier perturbación durante este periodo podría afectar el desarrollo del feto y dar como consecuencia diversas enfermedades del neurodesarrollo como la parálisis cerebral o la esquizofrenia. (Schwartz 2011, 2014)

Un gran número de estudios reportan que una baja en la melatonina materna podría afectar la neurogénesis hipocampal. Se sabe que los niveles de melatonina están disminuidos en pacientes con esquizofrenia (CITAS)

Durante muchos años se ha sugerido que existe una relación entre el ciclo circadiano y las enfermedades mentales (Watterberg 1985). Diversos estudios han asociado a la MEL con múltiples enfermedades psiquiátricas. Se ha reportado que los pacientes con EZ presentan disminución en los niveles plasmáticos de MEL, además de que la glándula pineal de estos pacientes es de un tamaño menor al de los sujetos control (Findikli et al. 2015) o se encuentra calcificada (Sandyk R & Kay SR 1991 Y 1992). La reducción en el volumen de la glándula se ha asociado a algún tipo de retraso en el desarrollo neuronal en los pacientes con EZ (Gupta & Kulhara 2010).

El 80% de los pacientes con esquizofrenia presentan modificaciones en el ciclo del sueño, debido a que la secreción de la MEL disminuye, lo que influye en la estabilidad mental o el estado de ánimo (Anderson and Maes 2012).

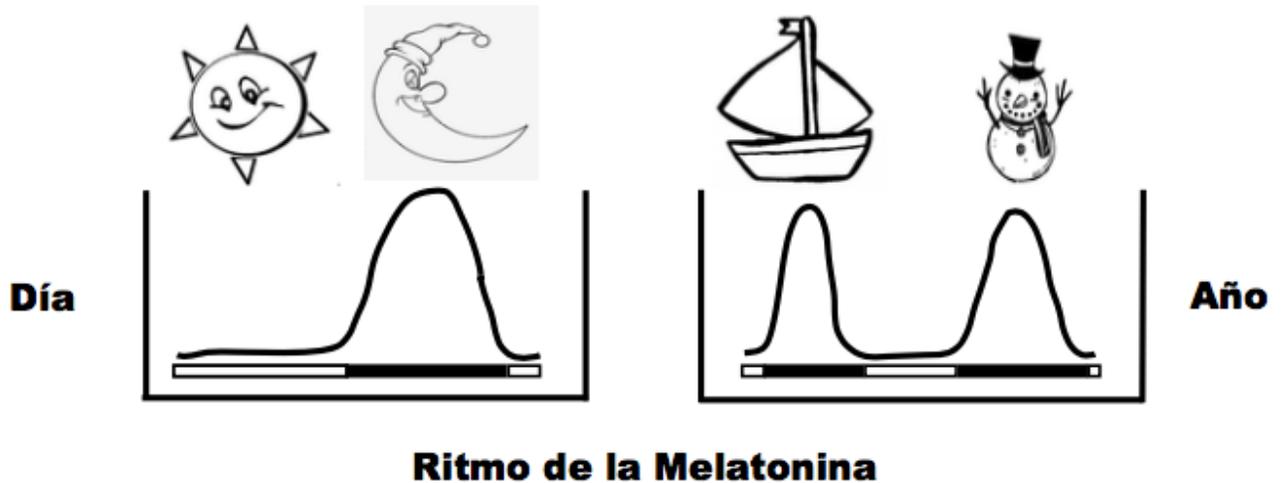


Figura 3. Esquema de la secreción de la melatonina a lo largo del día y durante las estaciones del año. El pico más alto de secreción de la MEL es durante la noche. Durante el día no hay secreción de la MEL. En el invierno el tiempo de secreción aumenta pero la amplitud disminuye. Tomado y modificado de Reiter 1993

Melatonina

La MEL (N-acetil-5-metoxitriptamina), es el principal producto de la glándula pineal. Se sintetiza a partir de la serotonina. La síntesis se lleva a cabo a través de dos pasos enzimáticos principales, una N-acetilación y una O-metilación (Cardinali et al. 1998) (Figura 4). La MEL se sintetiza en bacterias, invertebrados, plantas y vertebrados (Harderland R, 2003). La MEL se secreta a lo largo de la vida (Cardinali et al. 1997), en el humano la MEL se sintetiza a partir de la 7 u 8 semanas de nacido (Serron-Ferre

2001). Su pico más alto de secreción ocurre durante la noche entre las 2 y 4 am y el metabolito principal de la melatonina es 6-sulfato- hydroxymelatonina el cual es excretado en la orina.

Es una hormona anfifílica por lo que tienen la capacidad de cruzar las membranas por difusión pasiva, además cruza la barrera hematoencefálica así como la hemato-placentaria (Tamura et al. 2008, Torres-Farfan et al. 2008). Se ha reportado que esta hormona se sintetiza en diversos órganos y tejidos periféricos como la retina, el tracto intestinal, leucocitos y la piel.

También se sintetiza en diversas áreas del cerebro PONER CUALES ÁREAS (Hardeland 2009); además se sabe que es sintetizada en los astrocitos (Liu et al. 2007). La MEL está involucrada en diversos procesos neurofisiológicas como es la ritmicidad circádica, el sueño, tiene efectos metabólicos y antiinflamatorios, es la reguladora del ánimo COMO (Lacoste et al. 2015).

La melatonina promueve la neurogénesis en el giro dentado de ratones C3H/HeN (Liu et al. 2013), regula la formación de neuritas a través de la reorganización de los filamentos de actina en las células N1E-115 (Bellon et al. 2007); además promueve la formación de nuevas dendritas en rebanadas de hipocampo de rata adulta (Dominguez-Alonso, Ramirez-Rodriguez, and Benitez-King 2012).

Por otra parte la MEL regula la proliferación y diferenciación neuronal en células madre embrionarias (Moriya et al. 2007).

La MEL inhibe la liberación de dopamina dependiente de calcio provocada por la estimulación eléctrica o el alto potasio a través de la activación del receptor (Dubocovich 1988). Regula diversas procesos fisiológicas a través de la activación de

sus receptores de membrana MT1 y MT2 (Liu et al. 2013, Zlotos et al. 2014). Los receptores MT1 y MT2 tienen siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (Dubocovich et al. 2003, Hardeland 2009). A parte de actuar a través sus receptores de membrana, se han propuesto diversos mecanismos de acción de la MEL.

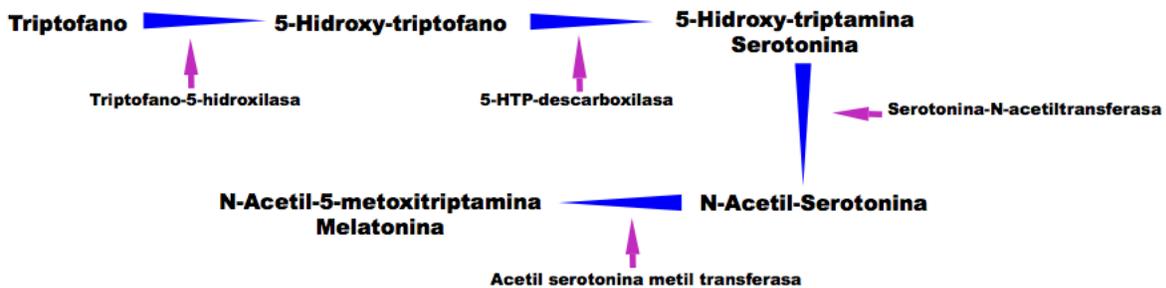


Figura 4. Representación esquemática de la síntesis de la melatonina a partir del aminoácido triptófano. Modificado de Reiter 2013

Mecanismos de acción

La MEL actúa de diversas maneras. Actúa a través de los receptores nucleares RZR/ROR

(Maldonado, Reiter, and Perez-San-Gregorio 2009). Con respecto a sus numerosas funciones y debido a su propiedad anfifílica es capaz de atravesar las membranas celulares fácilmente y de esta manera interactuar con diversas proteínas como las cinasas y otras enzimas. Se sabe que la MEL se une a la calmodulina (CaM) por medio

del grupo metoxi de la MEL, con alta afinidad y por medio del antagonismo de la CaM incrementa la polimerización de los microtúbulos (Benitez-King, Huerto-Delgadillo, and Anton-Tay 1993). Otra proteína a la que la MEL se une es la calreticulina. La unión de la MEL con la CaM y la calreticulina es solo en presencia de calcio (Macias et al. 2003). La MEL tiene la capacidad de inducir cambios en la proteína cinasa C (PKC) dando como resultado el incremento de la actividad y la fosforilación de la PKC (Anton-Tay et al. 1998). Puede estimular a los receptores MT1 y MT2 acoplados a proteínas G (Figura 5).

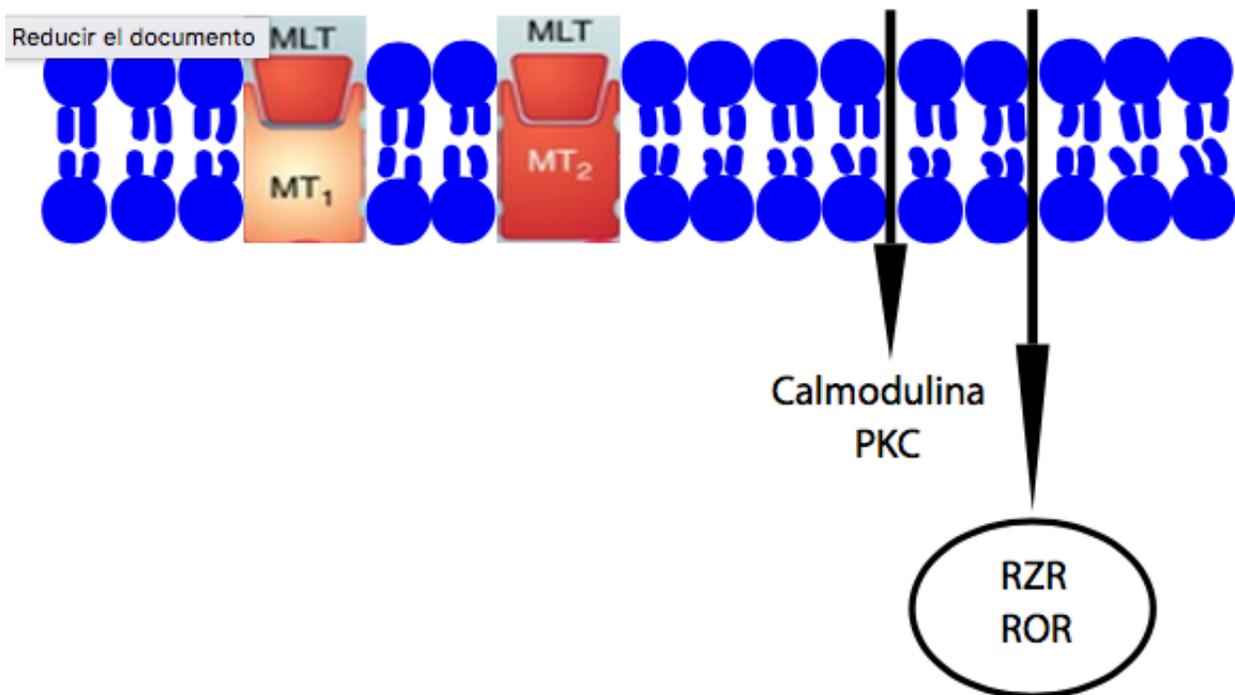


Figura 5. Mecanismos de acción de la melatonina. La melatonina actúa a través de los receptores MT1 y MT2. Puede atravesar membranas y actuar por medio de proteínas como la calmodulina, la calreticulina o la PKC. Otro mecanismo de acción es por medio de receptores nucleares como son el RZR y ROR.

Receptores a melatonina MT1 y MT2

En la década de los 80's se descubrió el primer receptor a MEL en tejido neuronal de mamífero (Dubocovich 1984). Existen tres tipos de receptores dos de ellos el MT1 y MT2 se identificaron en los melanocitos de *Xenopus*, y el MT3 que es de baja afinidad y pertenece a la familia de las quinonas reductasas (Zlotos et al. 2014).

Los receptores MT1 y MT2 tienen 350 y 362 aminoácidos respectivamente y se expresan en diversos tejidos corazón, hígado, pulmón y riñón. Su activación depende de la función que se llevará a cabo y transmiten la señal de MEL al interior de la célula a través de efectores secundarios o segundos mensajeros, entre los que podemos mencionar a la DAG, IP3, PLC. Fueron identificados por autoradiografía utilizando un agonista activo como la iodomelatonina (¹²⁵I-Mel) (Ebisawa et al. 1994, Reppert, Weaver, and Ebisawa 1994) La activación de los receptores depende de diversos factores como el ciclo de luz-oscuridad, o bien de la misma MEL (Witt-Enderby et al. 2003).

La activación de los receptores a MEL en el sistema nervioso central regula la liberación de neurotransmisores y hormonas (Dubocovich 1988). La vía de señalización más conocida para ambos receptores es la inhibición de la formación del AMPc (Dubocovich et al. 2010). El receptor MT1 se expresa en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (SCN), los vasos cardíacos y está involucrado en la modulación de los ritmos circadianos y la constricción de los vasos cardíacos. Además de estas regiones específicas, el MT1 se expresa en otras regiones del cerebro y tejidos periféricos. El receptor MT2 es más restringido en su localización, se distribuye en el cerebelo el SCN

del hipotálamo, retina, ovario entre otros. En ese contexto ambos receptores se han encontrado en el desarrollo fetal del cerebro en ratas Wistar, lo que sugiere que la melatonina tiene un papel importante en el desarrollo fetal embrionario (Jimenez-Jorge et al. 2007).

Melatonina y desarrollo neuronal

Dentro de las diversas funciones en las que interviene la MEL, está en el embarazo y en el parto, a pesar de los reportes no se conoce la función que tiene durante el desarrollo del feto, en específico, la formación del cerebro.

Esta hormona parece ser esencial para la gestación exitosa y tiene un papel importante en el desarrollo embrio-fetal (Nakamura et al. 2001). Además, se ha demostrado que el tratamiento con MEL reduce el estrés oxidativo placentario en las complicaciones asociadas con la insuficiencia placentaria.

Se ha encontrado que durante la gestación ocurre un incremento gradual de MEL materna y que ésta regresa a sus niveles normales después del parto (Tamura et al. 2008, Chen et al. 2013, Sagrillo-Fagundes et al. 2016) (Figura 6). Se ha demostrado que en diversas áreas del feto humano se expresan los receptores a MEL (Torres-Farfan et al. 2008). La MEL materna en circulación entra al feto a través de la placenta lo que permite que se sincronice al fotoperiodo de la madre. Se ha reportado que en embriones de ratón cultivados en un medio con MEL incrementaron el desarrollo de blastocitos (Voiculescu et al. 2014). Por otra parte, se sabe que la MEL ayuda a la

formación de axones en cultivo de hipocampo extraído de embriones de rata (Liu et al. 2015).

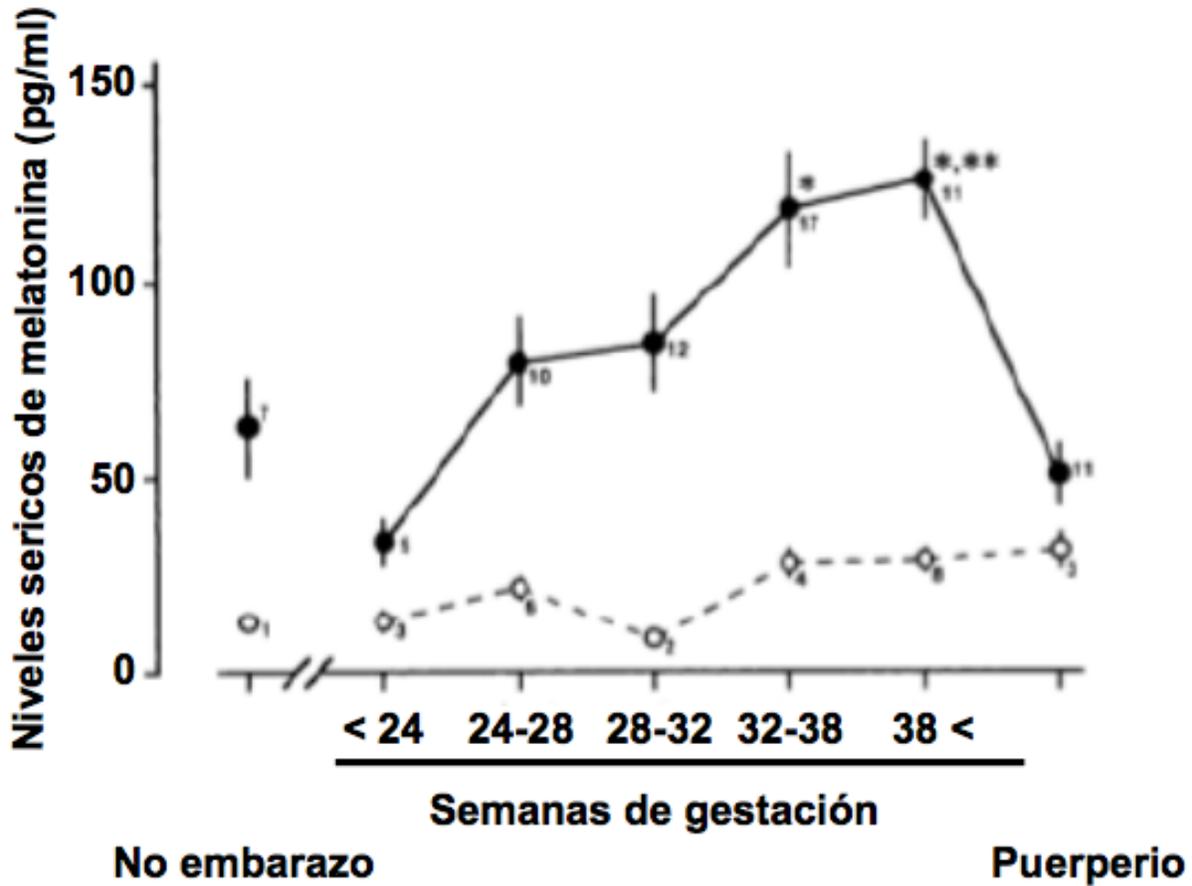


Figura 6. Esquema de secreción de la melatonina en las diferentes semanas de gestación. En la figura se muestra los niveles de MEL durante el embarazo, tanto de día (líneas punteadas) en donde los niveles de melatonina circulante es mínima con respecto a noche (líneas sólidas) que hay un incremento en la concentración de MEL materna circulante. Tomado y modificado de (Nakamura et al. 2001)

Axonogénesis

La formación del axón es parte de polaridad neuronal es decir, cuando las neuronas adoptan los dominios somato-dendrítico y axonal. La polaridad neuronal comienza a partir de que una célula forma múltiples neuritas de las cuales una de ellas formará el axón y las restantes darán lugar a las dendritas. El alargamiento del axón depende del cono de crecimiento que es una estructura motil y dinámica que se encuentra en la punta de la neurita (Geraldo and Gordon-Weeks 2009, Stuessi and Bradke 2011). Para que el axón se forme se requiere de la participación de los componentes del citoesqueleto como son los microtúbulos, los filamentos de actina y los neurofilamentos. Los microtúbulos son los que le dan la estructura y permiten que se alargue el axón (Dent and Gertler 2003) ya que forma el andamiaje estructural y da forma a la neurona. Los microtúbulos organizan el espacio intracelular para que el transporte se lleve a cabo (Stuessi and Bradke 2011). El ensamblaje de los microtúbulos comienza desde el cuerpo celular hasta el cono de crecimiento, este proceso se lleva a cabo a través de dos mecanismos; el primero, transporta los polímeros de microtúbulos y el segundo ensambla los polímeros en la región *plus end* (van Beuningen and Hoogenraad 2016). En el axón la orientación de los microtúbulos es end-plus distal, mientras que en las dendritas es mixto (Mandell and Banker 1995).

Los filamentos de actina se encuentran principalmente en el cono de crecimiento, tanto en el filopodio como en el lamelipodio. El acomodo de estos filamentos es diferente en cada una de estas estructuras del cono de crecimiento en el filopodio los filamentos de

actina están agrupados en paquetes delgados y en el lamelipodio forman una red desarreglada (Dent and Gertler 2003) (Figura 7). Se han descrito 5 a 6 etapas de diferenciación y depende del tipo celular, y este proceso se ha caracterizado en diversos tipos neuronales como en las células del hipocampo de rata o bien en las células granulares del cerebelo (Tahirovic and Bradke 2009, Witte and Bradke 2008, Yoshimura et al. 2005). Los filamentos intermedios o neurofilamentos proveen de soporte estructural a las células.

En la primera etapa las células presentan una morfología redondeada, y tienen un lamelipodio y un filopodio. Durante la segunda etapa se observa el crecimiento de diversas neuritas y conos de crecimiento el cual será la guía para el crecimiento axonal. En la tercera etapa una de las neuritas comienza a alargarse rápidamente, esta neurita es la que se convertirá en el axón mientras que las otras disminuyen su velocidad de crecimiento para evitar que se forme otro axón que en la cuarta etapa se diferenciaran en dendritas. En la última se forman las espinas dendríticas y ocurre la polarización funcional como la sinapsis (Mandell and Banker 1995, Tahirovic and Bradke 2009, Fukata, Kimura, and Kaibuchi 2002).

El axón se empieza a formar a partir de la segunda etapa de la polaridad neuronal (Conde and Caceres 2009) y este proceso se lleva a cabo en tres fases (“*la saliente*” “*engullimiento*” y la “*consolidación*”) que fueron descritas en 1986 por Golsberg y Burmeister. Durante la *saliente* el filopodio y el lamelipodio se alargan a través de la polimerización de los filamentos de actina. Posteriormente los microtúbulos entran en la zona del filopodio sirviendo como andamiaje para los organelos y vesículas, este

proceso ocurre en la etapa de *engullimiento*. Finalmente la *consolidación* se refiere al proceso en que los filamentos de actina se despolimerizan del cono de crecimiento y los microtúbulos dan lugar al axón (Dent and Gertler 2003). Durante este periodo se ha observado que hay una acumulación de vesículas en el cono de crecimiento que dará lugar al axón, además se sabe que hay exocitosis en el cono de crecimiento que formará al axón (Andersen and Bi 2000).

Hay diversas moléculas que participan en la formación del axón, estas moléculas son la CRMP-2, el complejo par3/par6/aPKC, algunas GTPasas pequeñas, CDC42 y Rap1B, las cuales están participando en el establecimiento de la polaridad neuronal. Sin embargo, la vía principal para el establecimiento de la polaridad neuronal es la de IPI3K/AKT/GSK3 β , en la que la GSK3 β es la reguladora principal (Jiang et al. 2005); para la formación del axón la cinasa debe estar inhibida (Figura 8) que es la forma fosforilada, puesto que en su forma activa dar lugar a las dendritas.

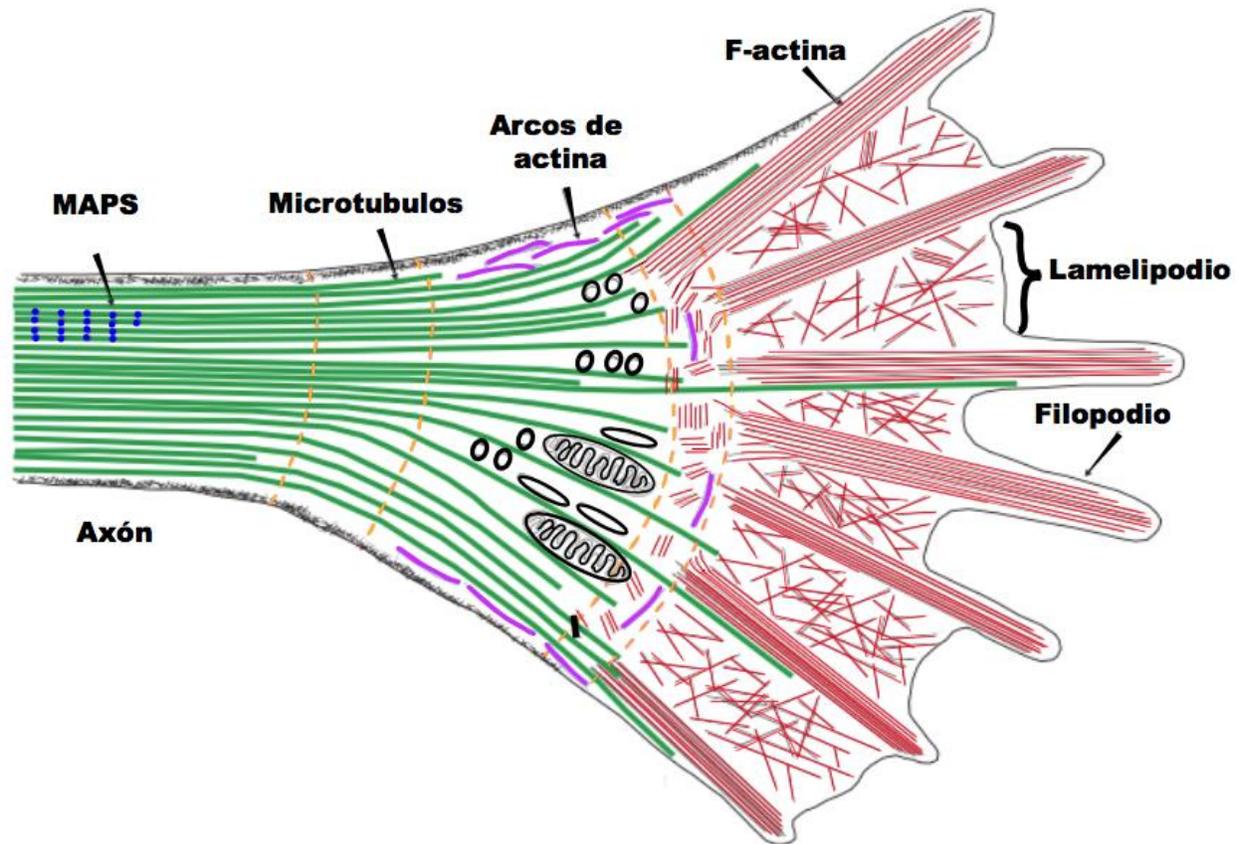


Figura 7. Esquema representativo del axón y cono de crecimiento. En verde se observan los microtúbulos los cuales le darán la estabilidad al axón. En rojo los filamentos de actina, en azul proteínas asociadas a los microtúbulos MAP por sus siglas en inglés. Tomado y modificado de (Geraldo and Gordon-Weeks 2009)

La dendritogénesis al igual que la axonogénesis es un proceso que es parte de la polaridad neuronal. La formación de las dendritas inicia cuando una nueva neurona comienza a polarizarse (Penazzi, Bakota, and Brandt 2016). Las dendritas son extensiones largas y altamente ramificadas que pueden llegar a medir cientos de micras (Konietzny A). La posición y el número de las dendritas puede determinar el tipo y el número de sinapsis que tendrá una neurona (Lefebvre, Sanes, and Kay 2015).

El citoesqueleto es fundamental para la formación de las dendritas ya que es el encargado de estabilizarlas y remodelarlas durante el desarrollo; sin embargo los microtúbulos de las dendritas a diferencia de los axones presentan una bidireccionalidad (Sweet and Firestein 2008).

Los filamentos de actina están ordenados de una forma lineal o bien en el eje principal de las dendritas y se pueden encontrar en un arreglo en forma de parche o de anillo (Konietzny, Bar, and Mikhaylova 2017). Por otra parte, estudios de ultraestructura demuestran que hay organelos en las dendritas, en particular la presencia de ribosomas que pueden indicar que hay síntesis de proteínas. (Prochiantz 1995). La formación de las dendritas comienza a partir de la etapa 3 de la polaridad neuronal, que es cuando el axón ya esta definido. Para que se formen las dendritas se requiere de la activación de la GSK3 β .

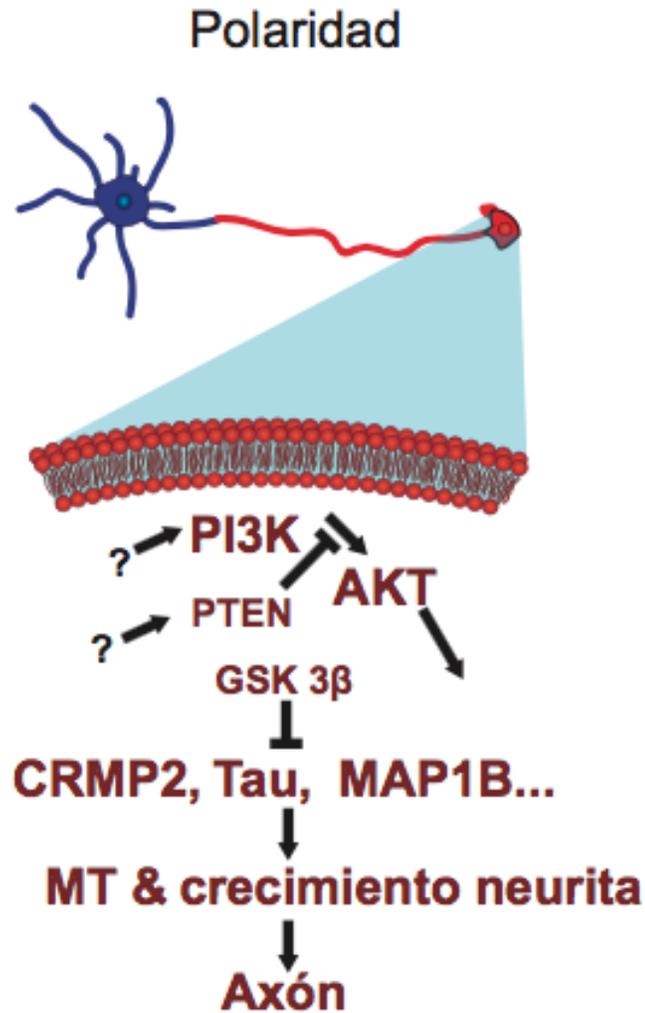


Figura 8. **Vía de señalización involucrada en la formación de axones y dendritas.** El diagrama muestra la vía implicada en la formación de los axones. La fosfoinositol 3 cinasa (PI3K) fosforila a la proteína cinasa B (AKT), al estar activa esta cinasa fosforila a la GSK3 β en la serina 9 lo cual la inhibe. La GSK3 β inactiva permite que tau o MAP1B estén activos y promueva el montaje de los microtúbulos y de esta manera la elongación del axón. Tomado y modificado (Jiang et al. 2005)

Sinapsis y secreción

Una sinapsis se puede definir como una comunicación interneuronal, y cualquier modificación debida a la actividad neuronal puede alterar las propiedades del sistema nervioso (Okabe 2002). Cada neurona en el cerebro puede formar un gran número de sinapsis, en donde puede ocurrir transmisión eléctrica y química. La formación de las sinapsis depende la distribución equitativa de proteínas entre dos compartimentos funcional y estructuralmente distintos que son las terminaciones pre y post- sinápticas (Martin 2002). En las terminales presinápticas los neurotransmisores se almacenan en organelos membranosos llamados vesículas sinápticas. La exocitosis y endocitosis así como el reuso de las vesículas sinápticas se llevan a cabo en la presinapsis. En las estructuras postsinápticas los neurotransmisores son liberados en respuesta al potencial de acción pre-sináptico, se difunden a través de la hendidura sináptica y activan o inhiben a los receptores que están localizados en la membrana post-sináptica (Li and Kavalali 2017).

De esta manera, la transferencia de información en la sinapsis es por medio de la fusión de las vesículas a la membrana plasmática permitiendo que los neurotransmisores sean liberados (Figura 9). Las vesículas que se encuentran en la pre-sinapsis se movilizan hacia una zona llamada zona activa que es una región rica en actina donde se ensamblan y se fusionan con la membrana para liberar su contenido, este proceso se lleva a cabo gracias a la entrada de calcio a la terminal axónica (Li and Kavalali 2017). En la zona activa ocurren múltiples procesos que controlan la velocidad y la probabilidad de fusión de las vesículas sinápticas.

El patrón de estimulación define características importantes del proceso de secreción en neuronas y células neuroendocrinas, que incluye el grupo de vesículas secretoras que se movilizan y se reclutan para su posterior fusión en la membrana plasmática, y los mecanismos asociados con la reposición de vesículas. Sin embargo hay evidencia de secreción en la periferia, debido a la ausencia de la terminal post-sináptica, lo que sugiere que hay secreción extrasináptica (Trueta and De-Miguel 2012).

La secreción extrasináptica es la que regula la mayor parte de la comunicación parácrina entre las neuronas. La liberación extrasináptica de los neurotransmisores puede darse a través de diferentes mecanismos; la exocitosis a través de la fusión de las vesículas con la membrana plasmática.

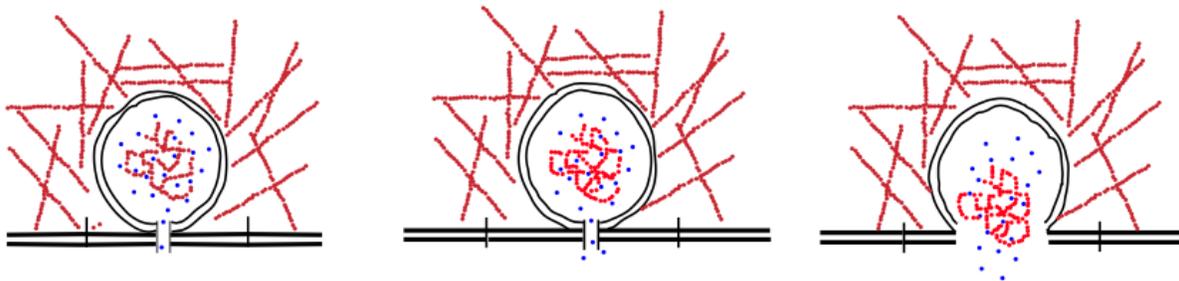


Figura 9. Esquema representativo de la fusión de vesículas a la membrana plasmática. La fusión de las vesículas se produce en respuesta a la despolarización de la membrana presináptica. La información se transfiere por la fusión de vesículas sinápticas con la membrana plasmática, permitiendo la liberación de neurotransmisores y la activación de los receptores postsinápticos. Tomado y modificado de (Cardenas and Marengo 2016).

El epitelio olfatorio como modelo del neurodesarrollo

El epitelio olfatorio es un tejido que está continuamente regenerando desde la etapa embrionaria hasta la etapa adulta. Se localiza en el cornete medio de la cavidad nasal y es un tejido heterogéneo, conformado por células sustentaculares, basales y las neuronas olfatorias sensoriales, además de que es considerado un tejido de linaje neuronal (Mumm, Shou, and Calof 1996). El EO presenta una estructura no muy diferente a la que se observa en el tubo neural embrionario (Calof et al. 2002).

Dado que tienen un origen análogo al SNC y que conserva muchas características del sistema nervioso central (SNC) se ha sugerido que este tejido puede ser utilizado para el estudio del desarrollo y diferenciación de las neuronas (Sawa and Cascella 2009)(Whitlock, 2004; Sawa). Recientemente se demostró que estas células tienen un perfil genético similar a las células mesenquimales (Horiuchi et al. 2013).

La vía neuronal olfativa está asociada a regiones del cerebro involucradas en la etiología de la EZ, estas regiones son la corteza frontal y temporal. Recientemente se ha propuesto al epitelio olfatorio como un modelo para estudiar la fisiopatología de enfermedades neuropsiquiátricas, como es caso de la esquizofrenia. Por otra parte la vía olfatoria está asociada a regiones del cerebro (frontal y temporal) que se sabe que están asociadas a la etiología de la EZ y el trastorno bipolar.

Planteamiento del problema

El estudio de enfermedades mentales como la EZ ha sido limitado debido a que no se tiene acceso a las neuronas de los pacientes en vida, de tal forma que se ha utilizado tejidos *post mortem* o bien en modelos animales. Sin embargo los antecedentes

muestran que es una enfermedad que podría tener su origen durante el desarrollo embrionario. Los pacientes diagnosticados con EZ presentan diversas alteraciones fisiológicas como la secreción de MEL o de diversas moléculas como la GSK3 β que está implicada en la formación de axones proceso que en estos pacientes esta dañado, lo que podría estar provocando defectos en la conectividad neuronal y por lo tanto en la liberación de neurotransmisores. Dado las limitantes para el estudio de la patofisiología de la esquizofrenia, en este trabajo estudiamos el efecto de la melatonina en la formación de axones en una clona de neuronas olfatorias obtenidas de un sujeto control, así como en cultivos primarios obtenidos de un sujeto control y un sujeto diagnosticado con esquizofrenia pareados por edad y género. Además se estudió el efecto de la melatonina sobre la fosforilación de la GSK3 β y la participación de los receptores en la formación de axones. Así mismo evaluamos si los axones formados por el efecto de la melatonina eran funcionales.

Hipótesis

La melatonina estimula la formación de axones así como la polarización morfofuncional en los precursores neuronales olfatorios de sujetos sanos y sujetos diagnosticados con esquizofrenia, quienes presentan alteraciones en el neurodesarrollo y una disminución en la secreción de melatonina

Objetivo general

Conocer si la formación de axones de los precursores neuronales olfatorios esta estimulada por la melatonina y mediada a través de los receptores a melatonina y la fosforilación de la GSK3 β

Objetivos Particulares

- Caracterizar la formación de axones como un índice de diferenciación neuronal en una clona de PNEOS obtenida de un sujeto control.
- Estudiar el efecto dosis-respuesta de la MEL sobre la formación de axones en los PNEOs de una clona obtenida de un sujeto control.
- Estudiar el curso temporal del efecto de la MEL sobre la formación de axones en los PNEOs de una clona.
- Determinar los niveles de fosfo- GSK3 β (inactiva), GSK3 β total en los PNEOs de una clona, de un paciente con EZ y un SC.
- Conocer si la formación de axones está mediada por los receptores a MEL en los PNEOs de una clona, de un paciente con EZ y un SC.
- Estudiar el curso temporal del efecto de la MEL sobre la formación de axones en los PNEOs de un paciente con EZ y de un SC sin antecedentes psiquiátricos.
- Conocer si la MEL estimula la funcionalidad de los axones tanto en la clona como en los cultivos primarios.

Material y Métodos

Obtención de los cultivos primarios del bulbo olfatorio de rata.

Para obtener cultivos primarios de rata se utilizaron ratas de 7 días de nacidas. Las ratas fueron decapitadas y los bulbos olfatorios se diseccionaron. Los bulbos se colocaron en una caja de Petri de 1mm con solución amortiguadora Hanks (D-glucosa 5.5mM, KH_2PO_4 0.44mM, Na_2HPO_4 1.33mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.26mM, KCl 5.36mM, NaCl 137mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.09mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.81mM, NaHCO_3 4.2mM). Posteriormente se llevaron a la campana de flujo laminar. El tejido se disgregó con unas tijeras, después con una punta de 1ml, para finalizar con una jeringa de insulina. El tejido disgregado se colocó en un tubo junto con la solución amortiguadora en la que se disgregó. Se centrifugó a 1000 rpm por 5 minutos dos veces, se retiró el sobrenadante. Se le añadió tripsina 500uL por 5 minutos. Posteriormente se le colocó medio DMEM F12 2ml y se centrifugó 1000 rpm por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se añadió medio para suspender la pastilla y se colocó en cajas de Petri de 35mm. Las cajas se colocaron en la incubadora a 37°.

Cultivo Celular

Las células del epitelio olfatorio fueron colectadas por medio de una exfoliación en el cornete medio de la cavidad nasal. Se obtuvo una clona de células colectadas de un sujeto femenino de 52 años sin antecedentes psiquiátricos. La clona se obtuvo mediante el procedimiento de ensayo de dilución limitada descrita anteriormente (Solís-Chagoyán H 2016). Los cultivos primarios se colectaron de un sujeto masculino de 29

años de edad que se utilizó como sujeto control y de un sujeto de 28 masculino diagnosticado con esquizofrenia paranoide sin tratamiento farmacológico al momento de la toma de la muestra (Figura 10).

La clona de los precursores neuronales (pasajes 30-42) o los cultivos primarios (pasajes 5-9) fueron cultivados en botellas para cultivo celular marca Falcon de 25cm² (250,000 células/botella) y se dejaron crecer al 90% de confluencia en medio Dulbecco's modified Eagle y F12 (DMEM/F12) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 4mM de l-glutamina, 100µg/ml y 100IU/ml de penicilina-estreptomicina. Las células fueron despegadas con tripsina 0.075% en EDTA 0.03%. El conteo de las células se llevo a cabo por medio de una cámara de Neubauer. Se sembraron sobre cubre objetos redondos de 1.2 cm² o sobre botellas de cultivo marca Falcon a una densidad de 10,000 células/cm² y se cultivaron por 4 días.

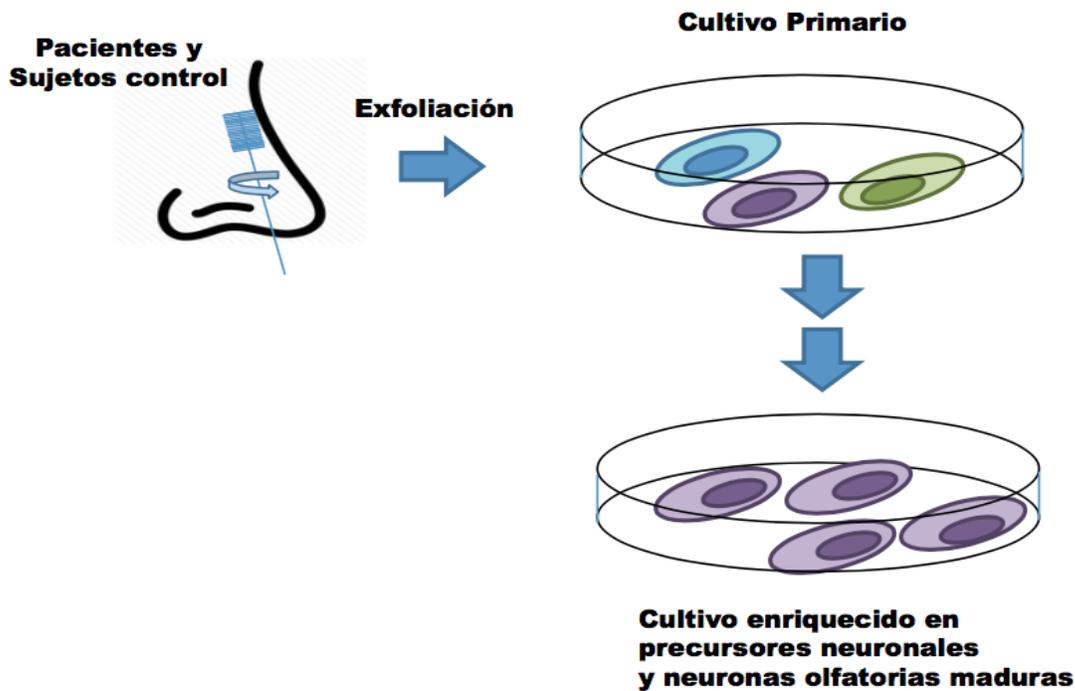


Figura 10. Esquema del método de obtención de los precursores neuronales olfatorios. Los PNEOs se obtienen a partir de un exfoliado en la cavidad nasal. Las células obtenidas se depositan en cajas de Petri con medio de cultivo para seleccionar los precursores neuronales. Los precursores son utilizados a partir del pasaje 4.

Tratamientos farmacológicos

Melatonina

Los cultivos fueron incubados con el vehículo (VEH) o con 10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} y 10^{-5} M de melatonina (MEL) durante 6 horas. También, se realizó un curso temporal para determinar el tiempo óptimo de los efectos de la MEL sobre la formación de axones en los precursores neuronales. Las células se incubaron con el VEH o con 10^{-7} M de MEL durante 3, 6, 9 y 12 horas y en los cultivos primarios del sujeto control y del paciente

con esquizofrenia se incubaron con el VEH o con 10^{-7} y 10^{-5} M de MEL por 3, 6 y 12 horas. Para conocer si la melatonina actúa a través de los receptores MT1 y MT2, se hizo una curva dosis respuesta con luzindol, que es un antagonista de los receptores MT1 y MT2. El cultivo de precursores neuronales se incubó por 4 días, posteriormente se les retiró el medio de cultivo y se incubaron con vehículo o melatonina a una concentración de 10^{-7} M, y con luzindol a concentraciones de 1, 10 y 100 μ M más melatonina 10^{-7} M por 6 horas. Después de las 6 horas Las células se lavaron dos veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (0.128M NaCl, 0.010M Na₂HPO₄, 0.005M KH₂PO₄ pH de 7.1). Las células fijadas se lavaron con PBS 3 veces por 2min con agitación continua y se permeabilizaron con 0.5% Triton X-100 en PBS por 30 minutos. Se bloqueó con BSA 1% y 0.3% de Triton X-100 en PBS. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo anti-tau1, faloidina rodaminada y DAPI como se reporta previamente (Figura 11). La melatonina se disolvió en 60 μ l de etanol, la concentración final de etanol en el medio fue de 0.001%.

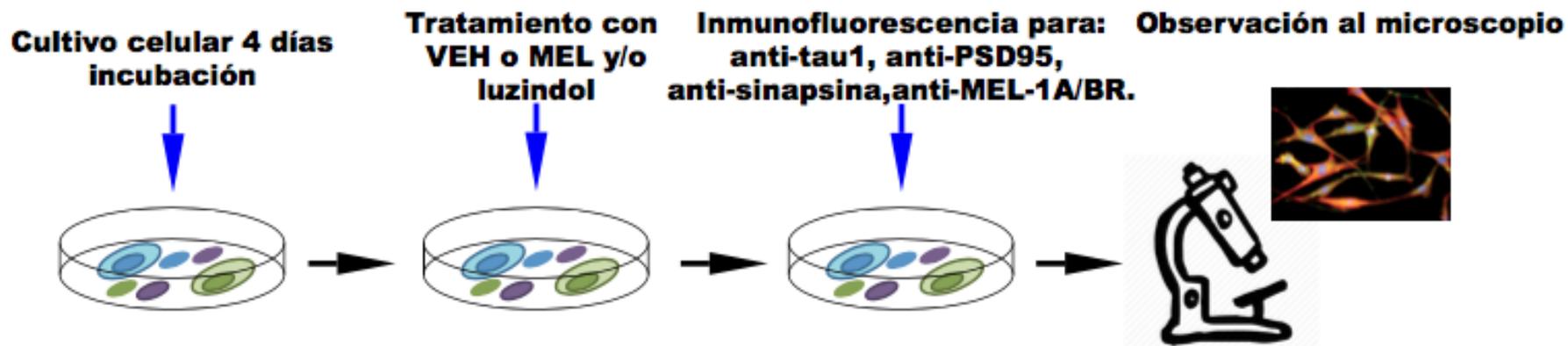


Figura 11. Estrategia experimental utilizada para los tratamientos farmacológicos en los cultivos celulares de precursores neuronales del epitelio olfatorio. Los PNEOs, después de cuatro días de incubación, se les retiró el medio de cultivo y se les aplicó VEH, MEL o luzindol. Posteriormente se les retiró el tratamiento y se procesaron para inmunodetección. Se observaron al microscopio y se adquirieron las imágenes y se realizó el análisis estadístico.

Inmunofluorescencia

Una vez realizados los tratamientos farmacológicos, las células se lavaron dos veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (0.128M NaCl, 0.010M Na₂HPO₄, 0.005M KH₂PO₄ pH de 7.1. Posteriormente las células se fijaron con paraformaldehído 4% en solución amortiguadora de citoesqueleto (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.1 mM Na₂HPO₄, 0.4 mM KH₂ HPO₄, NaHCO₃, MgCl₂, 2 mM EGTA, 50 mM glucosa, 5 mM PIPES, pH 6.0) por 15 min a temperatura ambiente. Las células fijadas se lavaron con PBS 3 veces por 2min con agitación continua y se permeabilizaron con 0.5% Triton X-100 en PBS por 20 minutos. Se bloqueó con BSA 1% y 0.3% de Triton X-100 en PBS. Las células se incubaron con el anticuerpo anti-tau1 (Millipore, Tamecula, CA, USA) (1:200) toda la noche a 4°C. Como anticuerpo secundario se utilizaron IGgs dirigidas contra IGgs de ratón acopladas a fluoresceína-5-isotiocianato FITC por sus siglas en inglés (Jackson ImmunoResearch) y las células se incubaron por 2h a temperatura ambiente. Los microfilamentos se tiñeron con faloidina rodaminada (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) por 45 minutos a una concentración de 200nM. Finalmente los núcleos se tiñeron con 4',6'-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) por 8 minutos a una concentración de 300nM.

Los sitios de presinapsis y postsinapsis fueron identificadas por medio de una tinción secuencial con los anticuerpos anti sinapsina-1 (Calbiochem 574777, policlonal) y anti PSD95, clona K28/43 (Millipore MABN68, monoclonal), respectivamente. Para observar la distribución de los receptores a melatonina se utilizó en anticuerpo anti-MEL-1A/B-R (H-120) (Santa Cruz Biotechnology, INC. sc-30017), las células se fijaron por 10 min y

se permeabilizaron con TBS-tween 0.2% (Tris-HCL 20mM, NaCl 137 mM) por 20 min, el anticuerpo primario se utilizó en una concentración 1:50 y se incubó toda la noche a 4°C. Todos los cubre objetos se montaron con medio de montaje PVA-DABCO.

Tinción de Inmunoperoxidasa

Para conocer si en los PNEOs podíamos encontrar vesículas secretorias, las células después de 4 días de cultivo en cubreobjetos de vidrio se lavaron tres veces con TBS (Tris 20 mmol / L, NaCl 137 mmol / L, pH 7,5) y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos. El procedimiento de recuperación de antígeno inducido por calor se realizó con una solución de citrato caliente a 10 mmol / l, pH 6,0, durante 20 minutos. A continuación, las células se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,25% en TBS durante 30 minutos y las peroxidasas endógenas se agotaron con H₂O₂ al 0,6%. Se incubó durante la noche a 4 ° C con un anticuerpo anti-sinaptofisina policlonal de conejo (1:50) (DAKO, Sta. Clara, CA, EE.UU.) seguido de la incubación con un anticuerpo anti-conejo secundario biotinilado (1: 250). Los cubreobjetos fueron procesados con Vectastain ABC kit Elite Standard y revelado con DAB / Ni kit (ambos de Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.). Finalmente, se montaron cubreobjetos con glicerol: agua 9: 1 y se adquirieron microfotografías de campo claro.

Análisis Morfométrico

Las preparaciones se observaron en un microscopio invertido Nikon de epifluorescencia equipado con una cámara digital Nikon OS-2Mu. Los criterios utilizados para los axones fueron: una prolongación dos veces mayores al soma y que

estuvieran teñidos con anti-tau-1. El conteo se realizó en 10 campos y fue por cuadruplicado. Se utilizó el software NIS-Elements (Nikon, Melville, NY, USA).

Evaluación de la secreción por medio del colorante lipofílico FM1-43

Para los experimentos con FM1-43 se utilizaron células previamente incubadas con melatonina o VEH 10⁻⁵ por 12 horas. El medio de cultivo con melatonina se retiró y fue remplazado por 1ml de solución amortiguadora de Hanks que contenía: (D-glucosa 5.5mM, KH₂PO₄ 0.44mM, Na₂HPO₄ 1.33mM, CaCl₂·2H₂O 1.26mM, KCl 5.36mM, NaCl 137mM, MgCl₂·6H₂O 1.09mM, MgSO₄·7H₂O 0.81mM, NaHCO₃ 4.2mM) al cual se le agregó 2ul de FM1-43. Después de 2 minutos de incubación con esa solución, las células se despolarizaron incrementando la concentración de potasio extracelular a 33mM. Se añadieron 333ul de solución amortiguadora de Hanks modificada con alto potasio (22 mM NaCl, 120 mM KCl, 1.26 mM CaCl₂·2H₂O, 1.09 mM MgCl₂·6H₂O, 0.81 mM MgSO₄·7H₂O, 4.2 mM NaHCO₃, 0.44 mM KH₂PO₄, 1.33 mM Na₂HPO₄, 5.5 mM D-glucosa). Se adquirió una secuencia de imágenes con una cámara CCD (Nikon Digital Sight-2MB) acoplada a un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000-U con un objetivo de inmersión 40X. Como control se utilizó EGTA a una concentración de 200uM disuelto en la solución de Hanks (Figura 12)

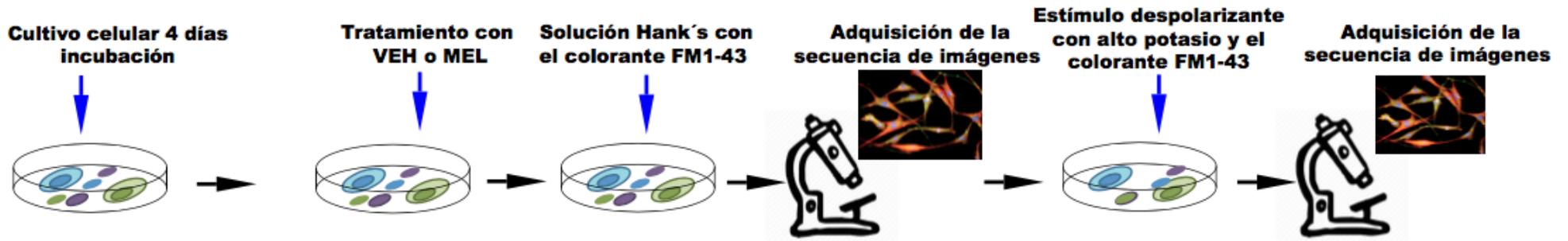


Figura 12. Estrategia experimental para el uso del colorante lipofílico FM1-43, para evaluar secreción en los precursores neuronales obtenidos del epitelio olfatorio. Los cultivos celulares se dejaron por cuatro días en la incubadora, posteriormente se incubaron con el VEH o la MEL por 12 horas. El tratamiento fue retirado y se bañó el cultivo con solución fisiológica de Hank, se dio un estímulo con alto potasio y se adquirieron las imágenes. Se realizó el análisis correspondiente.

Electrotransferencia o *Western Blot*

Para conocer la cantidad relativa de las proteínas de interés se llevaron a cabo los Western Blot para la determinación.

Obtención de los extractos de proteína

Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento con el VEH o la MEL, las células se lavaron dos veces con PBS luego se incubaron durante 5 minutos con una solución RIPA que contenía (en mM): 50 Tris pH 7.5, 0.5 EDTA, 1 EGTA, 5 DTT, 1 PMSF; 0.25% deoxicolato, 1% Nonidet P40, 1% Triton X-100; inhibidores de proteasas 20 μ g/ml: aprotinina, leupeptina, pepstatina. Posteriormente las células se desprendieron del sustrato raspando la superficie de la botella de cultivo con un gendarme para obtener el extracto de proteínas. Las células se lisaron con 3 pulsos de sonicación (40 Hz, 30 s) y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se recuperó y se almacenó a -70°C.

Determinación de la concentración total de proteínas

La concentración total de las proteínas de los extractos obtenidos como se mencionó arriba, se cuantificó con el método descrito por Lowry (1951). Se hizo una curva de calibración la cual se obtuvo con albúmina de suero bovino y se varió su concentración de 5 a 100 μ g/mL. A los valores de absorbancia se les aplicó una regresión lineal con el método de los cuadrados mínimos para ajustarlos a una función lineal. Para medir la concentración de las proteínas contenidas en las muestras se tomaron 10 μ L para

cuantificar su absorbancia por duplicado.

Separación de proteínas

Las proteínas de los extractos obtenidos de los cultivos primarios de la clona se separaron por medio de la técnica de electroforesis unidimensional con el sistema SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) de Laemmli (Laemmli 1970). Las muestras se mezclaron con el buffer de muestra (Laemmli) (0.312M Tris-HCL (pH 6.8) SDS 2%, β -mercaptoetanol 5%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.01%, 6x). Posteriormente se calentaron a 95° por 5 minutos y se separaron en un gel 10% acrilamida. Se colocaron 10 ug de la muestra en los carriles de los geles de acrilamida.

Detección de las proteínas por Western blot

Una vez separadas las proteínas por SDS-PAGE, éstas se transfirieron del gel de acrilamida a una membrana de fluoruro de polivinilideno PVDF (por sus siglas en inglés) mediante un sistema de transferencia en cámara húmeda por 1.5 horas a 120V. Posteriormente la membrana se bloqueó con 5% de leche (Svelty) por una hora a temperatura ambiente. Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios anti-phosphoGSK3 β 1:1500, anti-GSK3 β 1:100, anti-MEL 1A/B (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) 1:600 toda la noche a 4°C en agitación. Posteriormente las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa-conjugada (Jackson) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las bandas se detectaron por medio de la técnica de quimioluminiscencia (ECL por su nombre en

inglés, “enhanced chemiluminescence”) (Millipore). Las imágenes se adquirieron por medio de un densitómetro (GS-800 calibrated densitometer Bio Rad). Se cuantificó la densidad óptica Cada muestra se procesó por cuadruplicado y se calculó la media \pm el error estándar de la densidad óptica. Los fluorogramas se analizaron con un densitómetro GS800 y el software Quantity-One (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.)

Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software Sigma Stat 3.1 (San José, CA, EE.UU.). Los resultados se presentan como media \pm error estándar de la media (SEM). Se aplicó una prueba de ANOVA seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Dunn la cual se utilizó para las curvas dosis-respuesta y los experimentos de curso temporal. Las comparaciones entre dos tratamientos se realizaron mediante la prueba t de Student. Para todos los análisis se consideró una $P < 0,05$ como significativa.

Resultados

Efecto de la melatonina en la formación de axones en la clona de precursores neuronales obtenidos del epitelio olfatorio

La melatonina estimula la formación de axones en precursores neuronales de humano. Las células incubadas con el vehículo o melatonina a una concentración de 10^{-11} (Fig 13 A, B) muestran una morfología extendida y algunas células bipolares (dos neuritas en cada polo del soma que están teñidas con un anticuerpo anti-Tau-1) extendidas. Las

neuronas con una prolongación dos veces mayor al soma y tau positivas se observan con una concentración de 10^{-9} M (Fig. 13C). A una concentración de 10^{-7} M y 10^{-5} M se observa un mayor número de células con un axón largo (Fig. 13D, E), mientras que el mayor número de ramificaciones se observaron a una concentración de 10^{-5} M (Fig 13E). En el panel F y G se observa que en presencia de melatonina a 10^{-7} M y 10^{-5} M la cantidad de células con axón fueron el doble en relación de las células que fueron incubadas con el VEH. En tanto que la cantidad de células con ramificaciones incrementaron al triple en relación a las incubadas con el VEH.

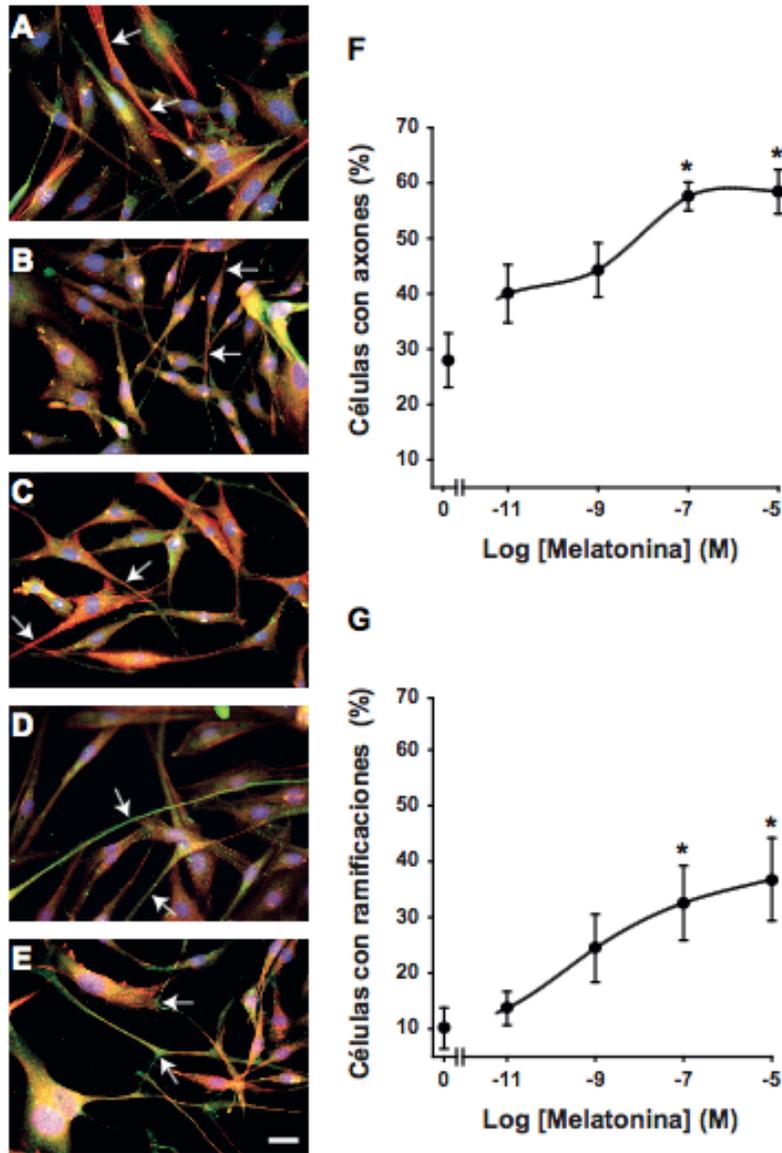


Figura 13. Efecto de la melatonina sobre la formación de axones en los precursores neuronales del epitelio olfatorio. De A-E se muestran las imágenes de inmunofluorescencia obtenidas de los precursores neuronales olfatorios. Las células se incubaron por 6 horas con el vehículo (A), o 10^{-11} M (B), 10^{-9} M (C), 10^{-7} M (D), 10^{-5} M (E) de melatonina. Las flechas nos muestran células con neuritas en ambos lados de los somas (A, B); neuritas largas opuestas a neuritas cortas (C); neuritas largas (axones) (D); y ramificaciones axonales (E). En F y G se muestran las curvas dosis respuesta del efecto de la melatonina en la formación de axones y de las

ramificaciones axonales. Barra escala 20 μm . Los resultados representan la media \pm error estándar de la media (SEM) de 10 campos seleccionados en 6 pozos para cada condición experimentos. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con las células incubadas en el vehículo ($P < 0,05$)

Curso temporal del efecto de la melatonina sobre la formación de axones.

En la figura 14 se muestra el curso temporal de la melatonina sobre la formación de axones y ramificaciones. Las células se incubaron con VEH o MEL a una concentración de 10^{-7}M por 3, 6, 9 y 12 horas. En el panel A se observa que a partir de las tres horas la cantidad de células que forman axones es el doble en relación a las células que se incubaron con el vehículo. En el panel B las células se observa que la cantidad de células con ramificaciones axonales incrementaron de forma gradual a partir de las 6 horas de incubación en presencia de melatonina. En contraste las células incubadas con el vehículo no se formaron ramificaciones.

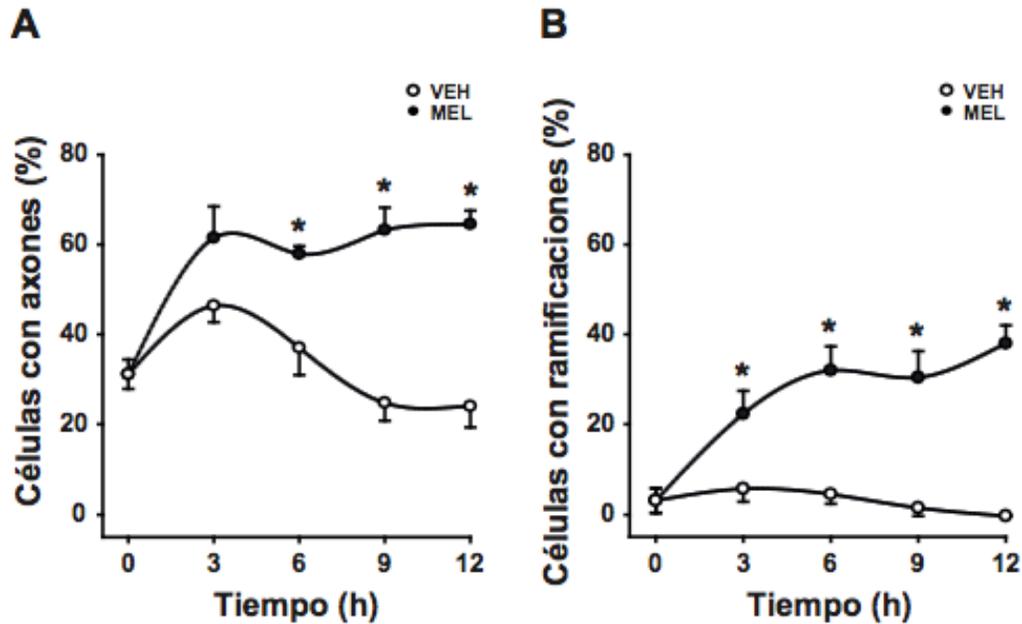


Figura 14. Curso temporal del efecto de la melatonina en la formación de axones y ramificaciones axonales. Los precursores neuronales se obtuvieron y se clonaron como esta descrito en la sección de métodos. Los axones se identificaron con un anticuerpo anti-tau 1 que reconoció una proyección de un tamaño mayor a dos veces el soma. En el panel A se muestra el número de axones y en B el número de ramificaciones axonales en los PNEOs incubados con el vehículo o la melatonina 10^{-7} por 3, 6, 9, o 12 h. Los resultados representan la media \pm error estándar de la media (SEM) de 10 campos seleccionados en 6 pozos para cada condición experimentos. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con las células incubadas en el vehículo ($P < 0,05$)

La melatonina estimula la fosforilación de la Glucógeno Sintasa Cinasa 3 Beta (GSK3 β) en una clona de precursores neuronales humanos

La fosforilación de la GSK3 β en la serina 9 participa en la formación de axones en progenitores neuronales del hipocampo de rata (Jiang 2005). Para conocer si la melatonina estimula la fosforilación de esta cinasa en los PNEOs se midieron los niveles relativos de p-GSK3 β por medio de *Western blot*. Los PNEOs se incubaron con VEH o MEL por 6 horas a una concentración de 10^{-7} M. En la figura 15A se muestran las bandas de proteína identificadas con los anticuerpos anti-GAPDH, anti-GSK3 β , y anti p-GSK3 β . Se observa un incremento del 15.5% en la intensidad de la banda de la células que fueron incubadas con MEL, el incremento es de normalizando a la Phospho- GSK3 β con la GSK3 β total, sin embargo no hay cambios en la banda de las células que fueron incubadas con el VEH. Se utilizó GAPDH como control de carga y no se observaron cambios. En la figura 15B se muestra la cantidad relativa de p-GSK3 β normalizada entre la cantidad GSK3 β total obtenida de la determinación de la densidad óptica de las bandas.

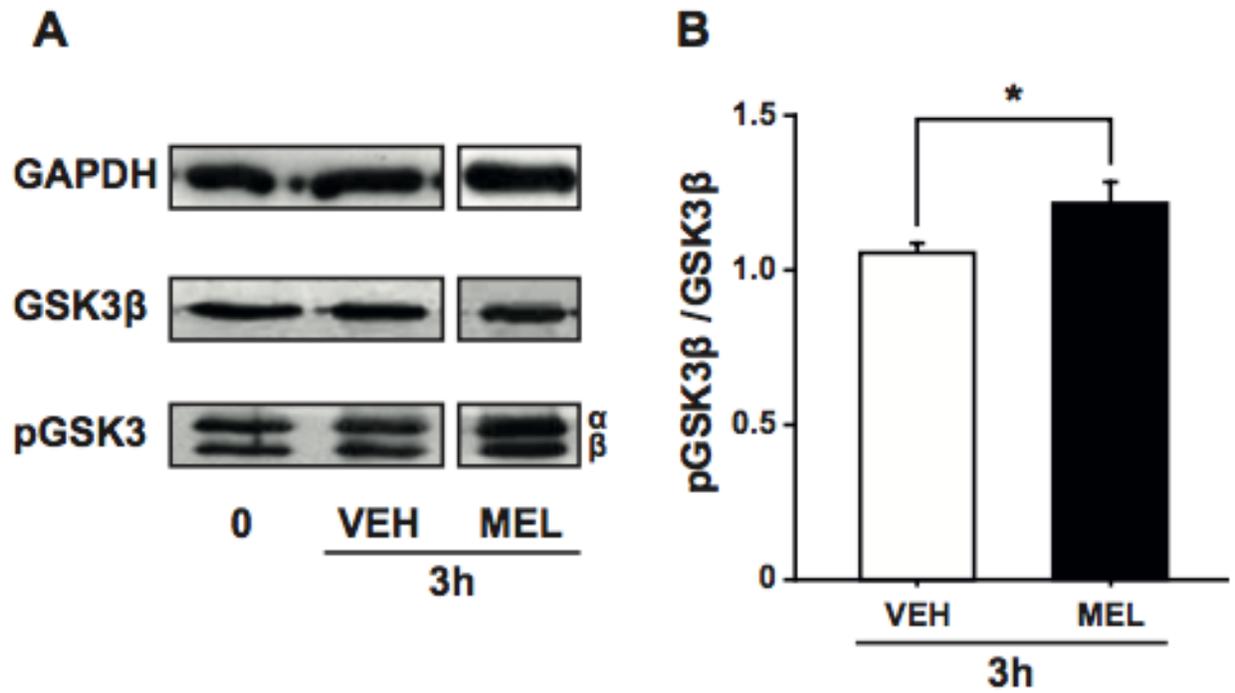


Figura 15. Efecto de la melatonina sobre la fosforilación de GSK3β en la clona de precursores neuronales olfatorios. Los PNEOs se incubaron con el VEH o la MEL a una concentración de 10^{-7} M por 3 h. En el panel A se muestra las bandas de las proteínas con el anticuerpo anti-phospho-GSK3β a las isoformas alpha y beta (p-GSK3β) y con el anticuerpo anti- GSK3β a la total. Se utilizó GAPDH como control de carga. En el panel D se muestra una gráfica de barras con la cantidad relativa de la p-GSK3β normalizada entre la cantidad de GSK3β total obtenida de la determinación de la densidad óptica de las bandas. Los resultados representan la media \pm error estándar de la media (SEM) de 8 repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

Efecto de la melatonina sobre la formación de las sinapsis.

Para conocer si los axones formados en presencia de la melatonina eran capaces de formar sinapsis, se utilizaron dos proteínas marcadoras de sinapsis; la proteína presináptica sinapsina-I y la proteína PSD-95 (densidad postsináptica-95). En la figura 16A se muestra una imagen donde podemos observar las áreas de marcaje con los anticuerpos específicos. La tinción se observó como pequeños puntos verdes y rojos que fueron teñidos con los anticuerpos anti-sinapsina I y anti-PSD-95, respectivamente. En la imagen 16B se observan puntos amarillos que indican que ambos anticuerpos tiñeron las proteínas localizadas en sitios cercanos (co-localización). En la grafica se muestra una curva dosis-respuesta de MEL. En presencia de una concentración de 10^{-5} M de MEL la cantidad de sitios de colocación de los anticuerpos que reconocen a la sinapsina 1 y a la PSD95 incrementa a 6 por cm^2 , a diferencia de los PNEOs incubados con el VEH en donde no se observaron puntos de co-localización (Figura 16C).

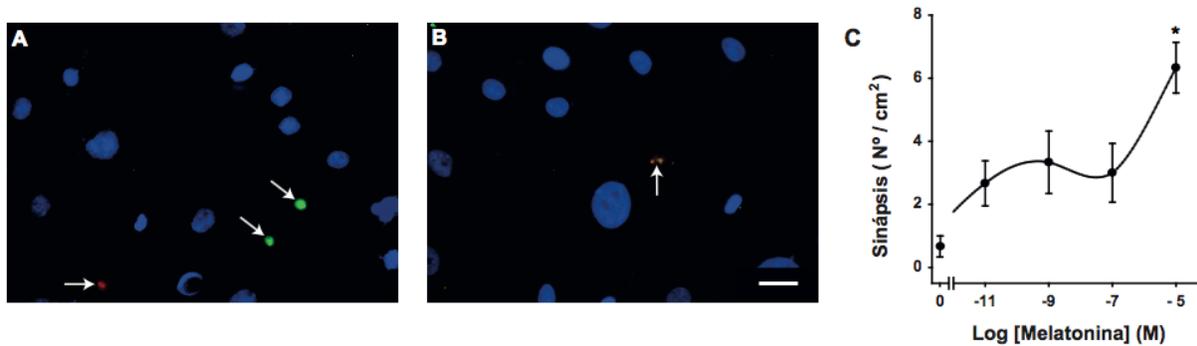


Figura 16. Efecto de la melatonina sobre la formación de sinapsis en la clona de precursores neuronales olfatorios. Las células se incubaron por 6 h con el VEH o MEL a 10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} , o 10^{-5} M. En el panel A se puede observar puntos positivos a sinapsina (verde) y a PSD95 (rojo) en B se observan puntos de colocalización de ambos anticuerpos. A y B corresponden a los PNEOs incubados con 10^{-5} M de melatonina. En C se muestra la curva de concentración respuesta de los efectos de la melatonina. Barra escala 20 μ m. Los resultados representan la media \pm error estándar de la media (SEM) de 10 campos seleccionados en 6 pozos para cada condición experimentos. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con las células incubadas en el vehículo ($P < 0,05$).

Efecto de la melatonina sobre la secreción axonal y somática medida con FM1-43 en los precursores neuronales olfatorios

Para estudiar la funcionalidad de los PNEOs y el efecto de la melatonina, se midió la exocitosis en los precursores y neuronas sensoriales olfativas maduras que se identificadas por su morfología previamente. Para medir exocitosis se utilizó el colorante lipofílico FM1-43. Primero se realizó una inmunodetección con el anticuerpo anti-sinaptofisina, la cual es una proteína integral de membrana de las vesículas secretoras que se observan en el soma y los axones de los PNEOs (Figura 17A). En la figura 17B se muestran las diferentes regiones que se analizaron los somas (sb) y

axones (a) de las neuronas bipolares, los somas de las neuronas sensoriales (so) y las ramificaciones (ra).

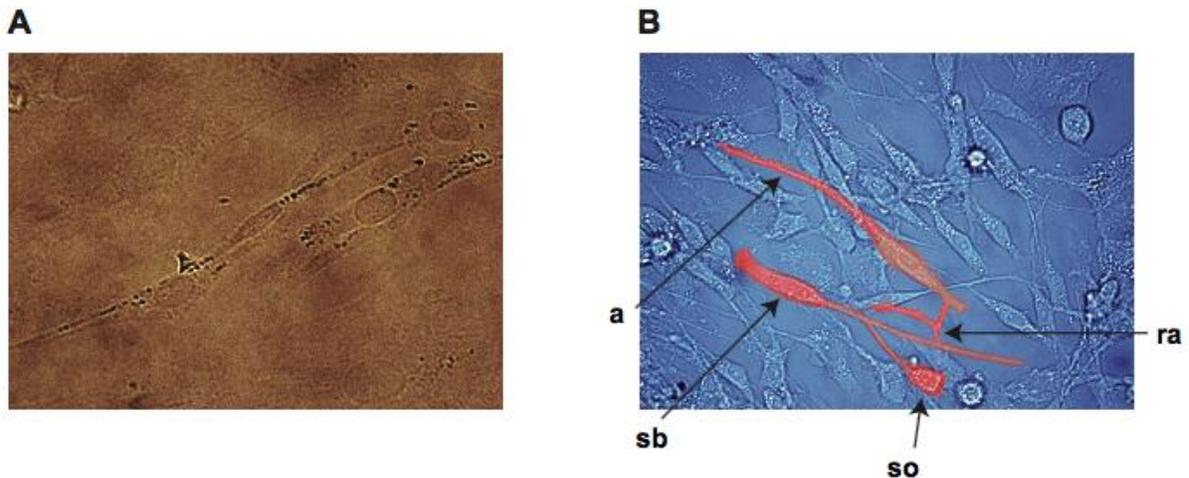


Figura 17. Los precursores neuronales olfatorios presentan vesículas secretoras en el soma y axones. En el panel A se muestra una micrografía de luz con tinción de inmunoperoxidasa con el anticuerpo anti-sinaptofisina. Las marcas oscuras muestran la presencia de sinaptofisina en la clona de PNEOs. En el panel B se muestra una micrografía de contraste de interferencia diferencial (DIC) de los precursores neuronales. Se observan tres neuronas con una pseudo coloración en rojo, las cuales indican las regiones en las cuales se analizó la secreción. Las regiones están señaladas por flechas: a = eje del axón; sb = soma de la célula bipolar; so = soma de la neurona olfativa; ra = ramificación axonal

Por otra parte, la despolarización con alto potasio incremento la fluorescencia del FM1-43 en las diferentes regiones analizadas. La figura 18A muestra los trazos representativos de la cinética de fluorescencia antes y después de la despolarización con alto potasio tanto para los somas de las neuronas bipolares y los somas de las neuronas olfatorias sensoriales así como de los axones y en las ramificaciones axonales (figura 18A) de los cultivos tratados durante 12 horas con 10^{-5} M de Melatonina (MEL, trazos morados) o con el vehículo (VEH, trazos negros). En la figura 18B se muestra una gráfica de barras con el promedio de las amplitudes al pico de los somas de las neuronas bipolares (izquierda) y las neuronas olfatorias maduras (derecha) en ambos casos se observa que la MEL incrementa la amplitud de secreción en comparación con el VEH. En la figura 18C se muestran las gráficas de barras con la velocidad máxima de secreción tanto para los somas bipolares y los somas de las neuronas olfatorias maduras. Este incremento en la velocidad de secreción fue de 1-65 segundos.

La figura 19A muestra los trazos representativos de la cinética de fluorescencia registrada en los axones y en las ramificaciones de los PNEOs tratados durante 12 horas con 10^{-5} M de MEL (trazos morados) o con el VEH (trazos negros). En la figura 17B se muestra una gráfica de barras con el promedio de las amplitudes al pico de los somas de los axones (izquierda) y de las ramificaciones axonales (derecha). Como se observa la MEL incrementa la amplitud de secreción en comparación con el VEH tanto en los axones como en las ramificaciones axonales. En la figura 19C se muestran las graficas de barras de la velocidad de la secreción para ambas regiones.

La media de la amplitud del incremento de la fluorescencia fue de 60 a 150% y la velocidad de secreción fue de 2 a 5 veces más rápida en las neuronas tratadas con melatonina que en las neuronas tratadas con vehículo para las regiones analizadas.

La respuesta de exocitosis a la despolarización muestra que las células eran viables y funcionales.

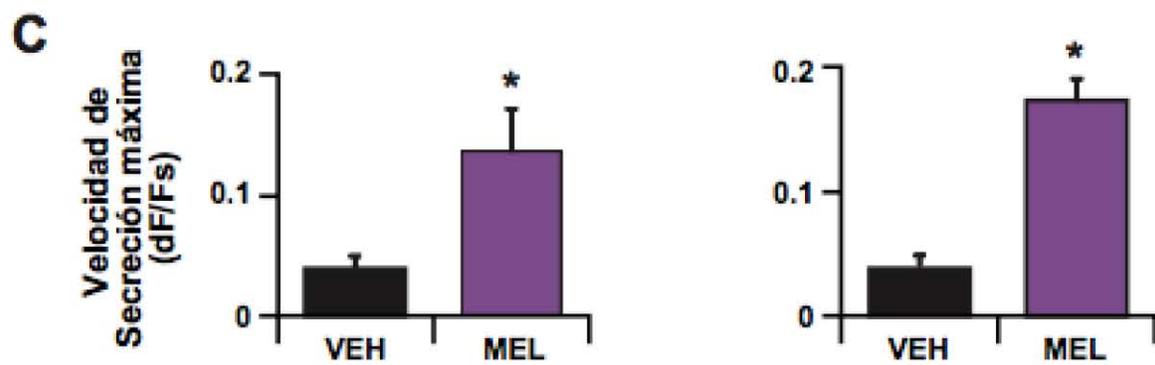
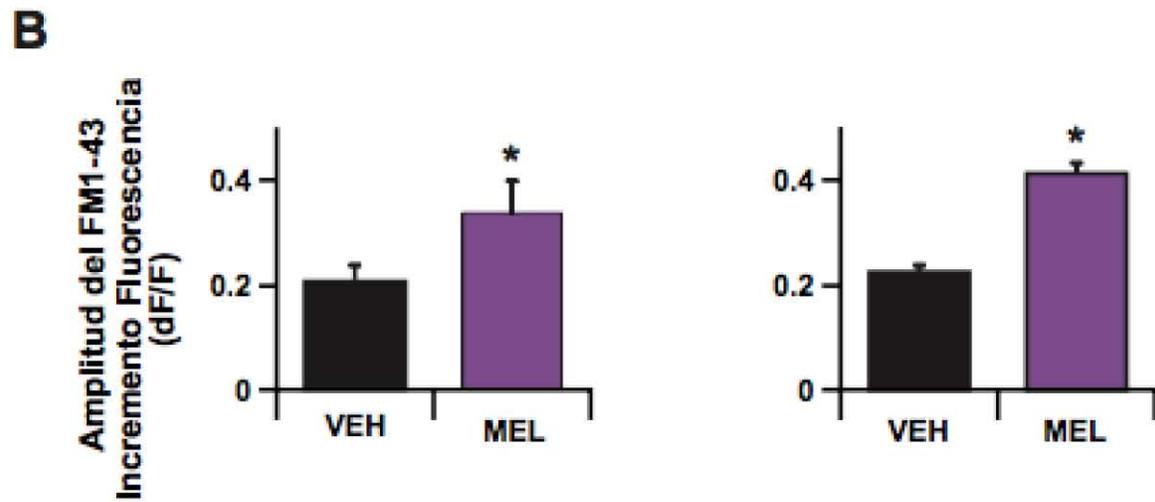
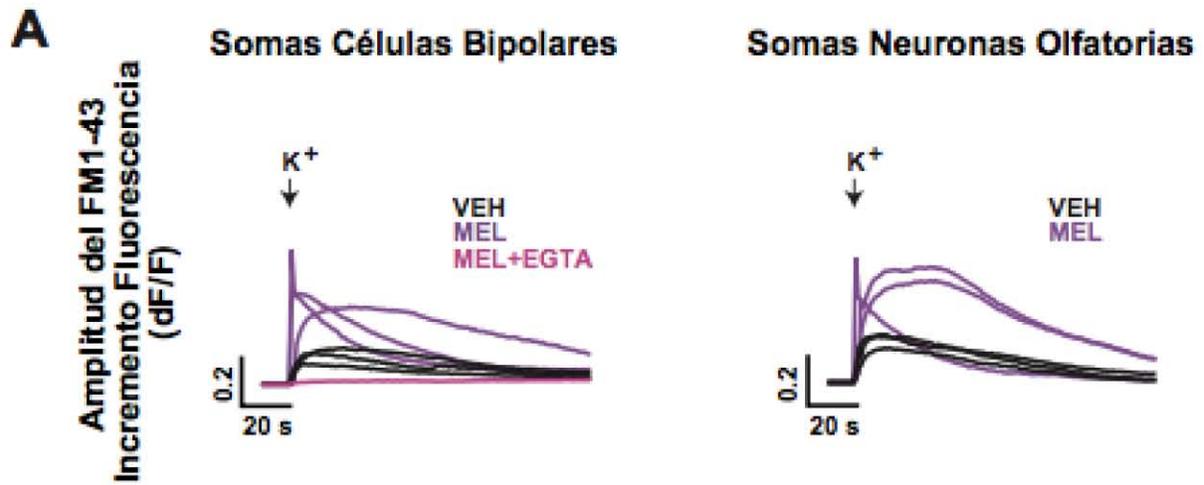
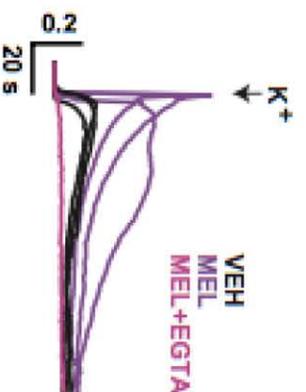


Figura 18. Trazos representativos del cambio en la fluorescencia emitida por el FM1-43 en los somas de células bipolares y en los somas de las neuronas olfatorias maduras de los precursores neuronales. Los PNEOs se trataron previamente con MEL 10^{-7} M (púrpura y rosa) o con el VEH (negro) durante 12 horas. Se despolarizó con alto potasio. Los trazos rosados representan la respuesta de células tratadas con melatonina pero despolarizadas en presencia del quelante de calcio EGTA. (A) Las gráficas de las barras muestran la amplitud máxima del aumento de la fluorescencia FM1-43 (B). Mientras que en C se muestra la velocidad máxima de secreción obtenida a partir del máximo de la primera derivada del aumento de fluorescencia, para los PNEOs tratados con MEL y/o VEH. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el vehículo y la melatonina para cada región.

A

Axones

Amplitud del FM1-43
Incremento Fluorescencia
(dF/F)

Ramificaciones Axonales

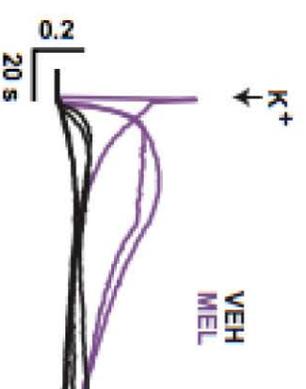
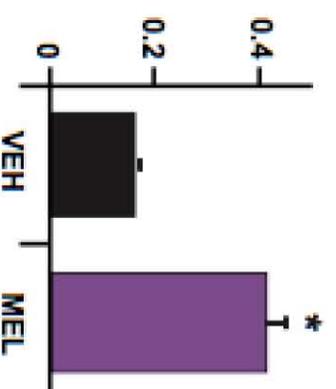
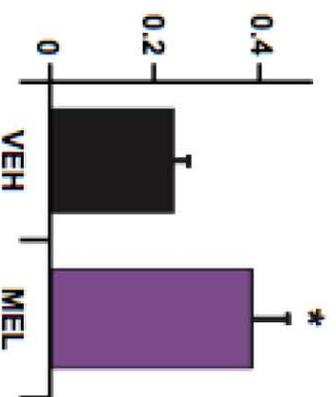
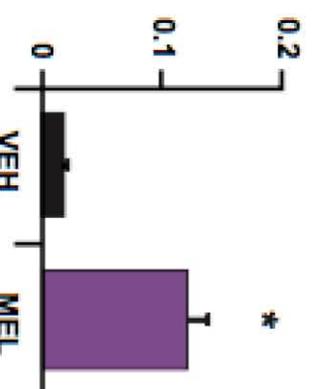
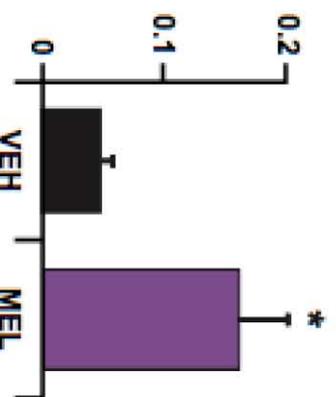
**B**Amplitud del FM1-43
Incremento Fluorescencia
(dF/F)**C**Velocidad de
Secreción máxima
(dF/Fs)

Figura 19. Trazos representativos del cambio en la fluorescencia de FM1-43 en los axones y ramificaciones axonales de los precursores neuronales. Los PNEOs se trataron previamente con MEL $10^{-7}M$ (púrpura y rosa) o con el VEH (negro) durante 12 horas. Se despolarizó con alto potasio. Los trazos rosados representan la respuesta de células tratadas con melatonina pero despolarizadas con alto potasio en presencia del quelante de calcio EGTA. (A) Las gráficas de las barras muestran la amplitud máxima del aumento de la fluorescencia FM1-43 (B). Mientras que en C se muestra la velocidad máxima de secreción obtenida a partir del máximo de la primera derivada del aumento de fluorescencia, para los PNEOs tratados con MEL y/o VEH. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el VEH y la MEL para cada región.

Para saber si la melatonina incrementó la amplitud y la velocidad de secreción debida a la despolarización con alto potasio, se utilizó como control negativo no dar el estímulo con alto potasio y poner EGTA a la solución de baño del cultivo.

Los PNEOs se estimularon añadiendo la misma solución de Hank en la que se bañó el cultivo, con la concentración fisiológica de potasio en lugar de la solución despolarizante con alto contenido de potasio. Esto representó un leve estímulo mecánico, pero no despolariza las células. En estas condiciones, hubo un pequeño aumento de la fluorescencia del FM1-43 5-8% por encima del nivel de fluorescencia basal, que fue sólo 20-27% de la observada cuando las células fueron despolarizadas. Sin embargo en presencia del EGTA no se observó incremento de la fluorescencia tanto con MEL (barras rosas) o el VEH (barras verdes). La amplitud máxima de las respuestas a la concentración fisiológica de potasio se muestra en la Figura 20.

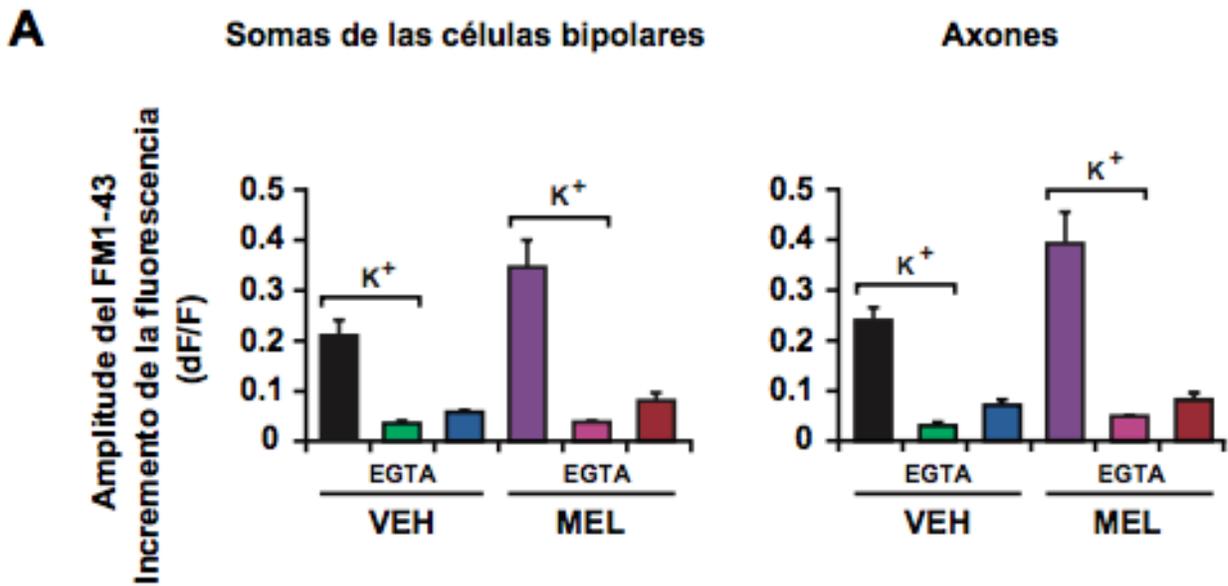


Figura 20. Secreción en los precursores neuronales olfatorios en ausencia de alto potasio o en presencia de EGTA como controles negativos. Las células se estimularon con alto contenido de potasio en presencia de EGTA (verde y rosa) o con una solución fisiológica de Hanks (sin alto potasio, azul y rojo). En A se muestra la amplitud máxima del incremento en la fluorescencia FM1-43 para cada una de las condiciones mencionadas (media \pm SEM de 16 somas y 16 axones en cuatro cultivos diferentes). Los asteriscos indican diferencias significativas $p < 0,05$. La amplitud máxima para las neuronas estimuladas con alto potasio (negro y púrpura) se muestra sólo para destacar la diferencia con los grupos del control negativo.

La participación de los receptores a melatonina en la formación de axones en la clona de precursores neuronales

Los receptores a melatonina participan en la axogénesis de células de hipocampo en rata, sin embargo no se sabe si los PNEOs expresan receptores y si estos están involucrados en la axogénesis. Para conocer si la melatonina está actuando a través de

los receptores a membrana MT1 y MT2, las células se incubaron con luzindol en concentraciones crecientes (10^{-6}M , 10^{-5}M y 10^{-4}M) y melatonina a 10^{-5}M por 6 horas. Las células incubadas solo con melatonina desarrollaron un axon en un 60%, mientras que las que se incubaron con 1uM de luzindol el 40% de las células presentó axón (Figura 21A), a una concentración de 10 uM el número de células con axón disminuyó a un 35% (Figura 21B) y con 100 uM el solo el 25% de la células tienen un axón (Figura 21C). La Figura 21D muestra la curva dosis respuesta del efecto del antagonismo del luzindol sobre la formación de axones inducida por la melatonina a una concentración de 10^{-5}M .

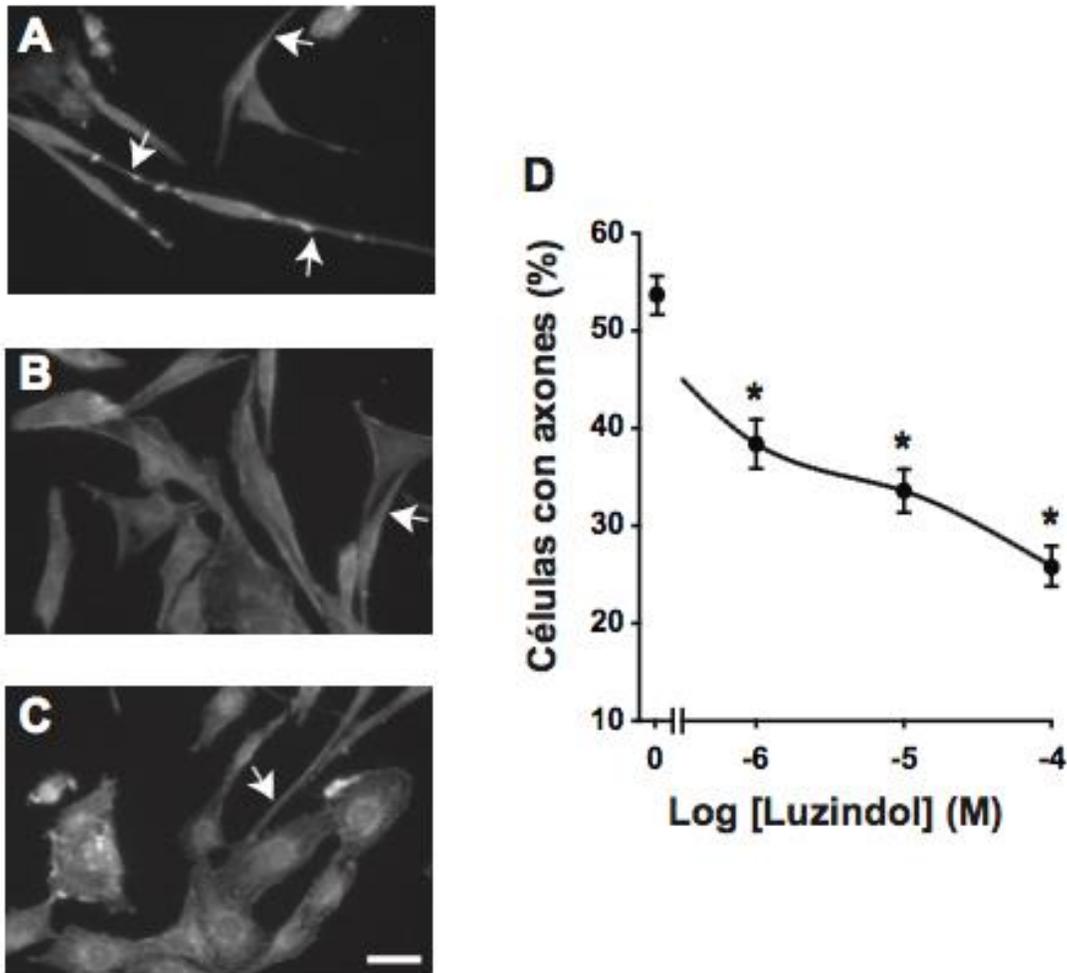


Figura 21. Curva concentración-respuesta del efecto del luzindol antagonista de los receptores MT1/2 sobre la formación de axones inducida por la melatonina. En el panel A, B y C se muestran las imágenes representativas de los PNEOs incubados con las concentraciones crecientes de luzindol $10^{-6}M$, $10^{-5}M$ y $10^{-4}M$ incubados durante 6 horas. En D se muestra la gráfica con el porcentaje de células con un axón con respecto al número total de células identificadas por tinción con DAPI. Los resultados representan la media \pm error estándar de la media (SEM) de 10 campos seleccionados en 6 pozos para cada condición experimentos. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con las células incubadas en el vehículo ($P < 0,05$)

En la figura 22 A y B se muestra la tinción de los receptores MT1 y MT2 con el anticuerpo anti-MEL-1A/B-R. La clona de los PNEOs se incubaron con VEH o MEL 10^{-5} M por 6 horas. Se observó que el anticuerpo reconoció puntos definidos en la zona perinuclear así como en algunas de las prolongaciones tanto en las células tratadas con el VEH o la MEL.

La expresión relativa de los receptores MT1/2 en los PNEOs se determinó por medio de la técnica de *western blot*. El anticuerpo dirigido contra los receptores MT1/2 reconoció tres bandas de proteína de 36, 37 y 60 Kda que corresponden a los receptores MT1, MT2 y la forma glicosilada respectivamente (Figura 22 C). Las figuras 6D-F muestran las densidades ópticas (OD) de las bandas, normalizadas con el control de carga (GAPDH). La incubación con 10^{-5} M de melatonina durante 6 horas no produjo un aumento en la banda OD de ninguna de estas especies moleculares. Aunque se observó un ligero aumento en la banda de 36 kDa, la diferencia no fue significativa (Figura 22 F).

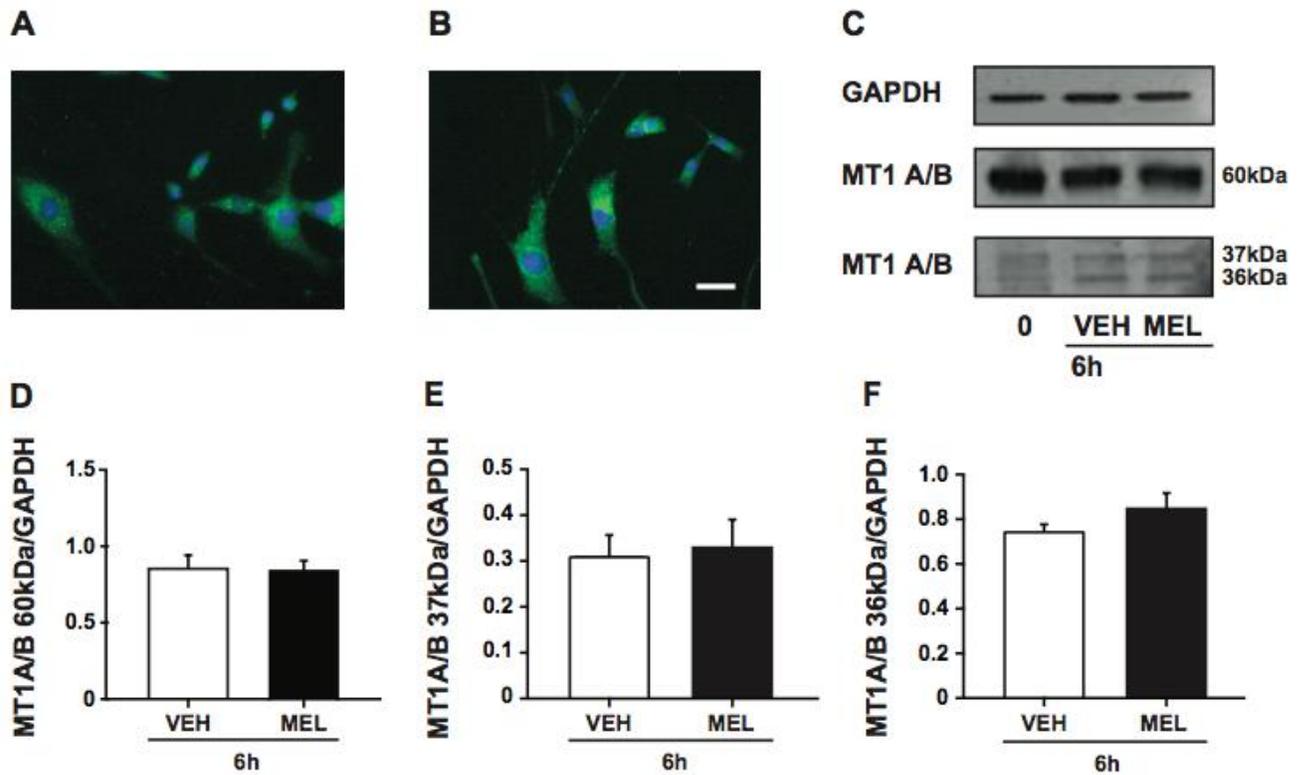


Figura 22. Efecto de la melatonina sobre la cantidad relativa de los receptores MT y MT2 en la clona de los precursores neuronales olfatorios. El panel A y B muestran la presencia de los receptores en la clona de los PNEOs, en verde se observa el anticuerpo MEL-1A/BR y en azul los núcleos teñidos con DAPI. Barra de escala: 20 μ m. En el panel C se muestra la fluorografía representativa de los receptores MT1/2 de los extractos de PNEOs. Se utilizó GAPDH como control de carga. En los paneles D-F se muestran las gráficas de barras de la cantidad relativa de receptores MT1/2 determinados a partir de la OD de las bandas con pesos moleculares de 60, 37 y 36 kDa respectivamente normalizada entre la cantidad de GAPDH obtenida de la determinación de la densidad óptica de las bandas.

La melatonina favorece la formación de axones en precursores neuronales del paciente con esquizofrenia.

Los cultivos primarios de precursores neuronales obtenidos de un sujeto control y de un paciente con esquizofrenia se incubaron con el VEH o con 10^{-7} y 10^{-5} M de MEL durante 3, 6 y 12 horas y se tiñeron con el anticuerpo anti-tau1, faloidina rodaminada y DAPI. Se observó que las células del sujeto control incubadas con el VEH mostraron una forma bipolar (Figura 23A), mientras que las células del paciente incubadas con el VEH no mostraron morfología bipolar. Sin embargo, se observan áreas teñir como cavidades (Figura 23B). Las células del sujeto control tratadas con MEL a una concentración de 10^{-5} M desarrollaron un axón largo (A') mientras que las del paciente con esquizofrenia adoptaron una morfología bipolar (B'). La Figura 21C muestra el curso temporal de la formación de axones en los PNEOs del sujeto control incubado con el VEH (círculos abiertos) y con MEL con 10^{-7} (círculos sólidos) o 10^{-5} M (cuadrados). En presencia del VEH, sólo el 11% de las células desarrollaron un axón después de 3 horas. Este porcentaje permaneció constante durante 12 horas de incubación. Por el contrario, después de 6 horas de incubación con MEL a 10^{-7} M se estimuló la formación de axones y se observó que el 20% de las células mostraron estas proyecciones. Las células incubadas con una concentración de 10^{-5} M de MEL mostraron un incremento en la formación de axones y el 40% de las células formaron estas proyecciones y el 60% después de 12 horas de incubación con 10^{-5} M de MEL mostraron un axón. Por otro lado, los PNEOs del paciente no formaron axones en ausencia de la MEL y en presencia del VEH. Sólo un 10% y 30% de las células desarrollaron axones después de 6 horas de incubación con 10^{-7} y 10^{-5} M de MEL respectivamente (Figura 23D). Aunque

la melatonina estimuló la formación axonal en cultivos primarios de los PNEOs del sujeto control y del paciente, no se observaron ramificaciones axonales en estos cultivos.

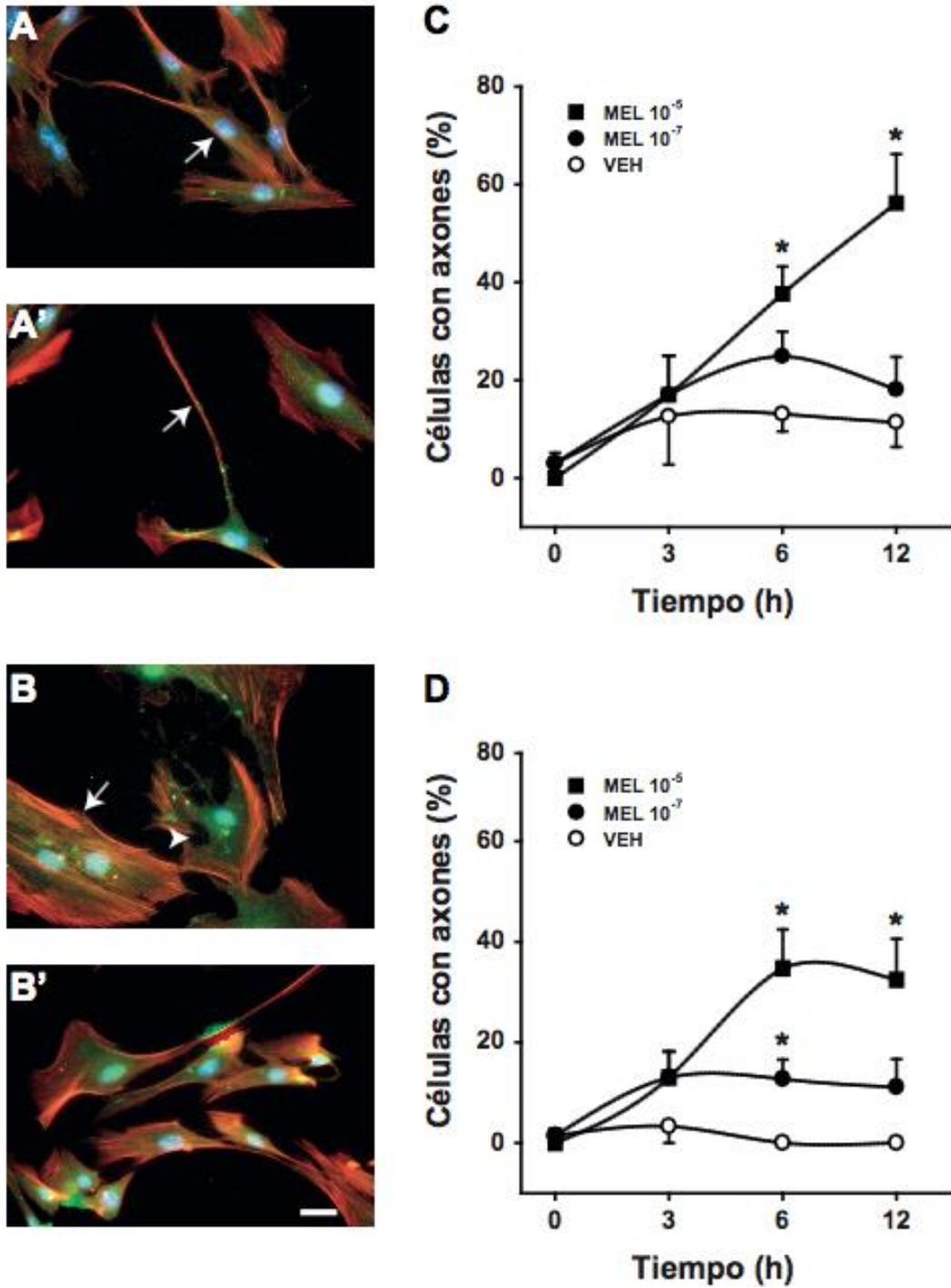


Figura 23. La melatonina aumenta la formación de axones en los precursores neuronales obtenidos de un sujeto control y un paciente diagnosticado con esquizofrenia. Imágenes representativas de los PNEOs obtenidas de un sujeto control (A, A') o de un sujeto con esquizofrenia (B, B'), incubadas durante 6 h con el VEH (A,

B) o con la MEL a una concentración de 10^{-5} M (A', B'). Las células se fijaron y tiñeron con el anticuerpo anti-tau1 (FITC, verde), microfilamentos (TRITC-faloidina, rojo), y los núcleos (DAPI, azul). Las flechas muestran una célula bipolar (A), un axón (A) y una célula extendida (B). La punta de flecha en B muestra una cavidad desprovista de marcaje. Barra de escala: 20 μ m. En el panel C y D el curso temporal del efecto de la melatonina sobre la formación axonal en cultivos primarios de SC y EZ, respectivamente. Las células se incubaron con el VEH (círculos blancos), o con MEL a 10^{-7} M (círculos negros), o 10^{-5} M (cuadrados negros). Los resultados representan la media \pm error estándar de la media (SEM) de 10 campos seleccionados en 6 pozos para cada condición experimental. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con las células incubadas en el vehículo (P <0,05).

Efecto de la melatonina sobre la fosforilación de la GSK3 β en los cultivos primarios PNEOs sujeto control y un paciente con esquizofrenia

Para conocer si la melatonina tiene efecto sobre la fosforilación de la GSK3b en los cultivos primarios del paciente con esquizofrenia y del sujeto control, los PNEOs se incubaron con VEH o la MEL 10^{-5} M durante 6 horas. Se obtuvieron extractos de proteína y se analizaron por *Western blot*. Como se muestra en la figura 24 A la melatonina incrementa la fosforilación de la GSK3 β en los cultivos primarios del sujeto control y del paciente con esquizofrenia. Mientras que el VEH y la MEL no tuvo efectos en el control de carga (GAPDH) y la GSK3 β total. En la figura 24 B se muestra una gráfica de barras con las cantidades relativas de p-GSK3 β normalizada entre la cantidad GSK3 β total obtenida de la determinación de la densidad óptica de las bandas. Tanto en los extractos obtenidos del SC y del EZ la MEL incremento la fosforilación de la p-GSK3 β . Sin embargo, se observa que los extractos del paciente hay una menor cantidad de p-GSK3 β en comparación con el sujeto control. La figura 24

C y D muestra imágenes representativas de una tinción con el anticuerpo anti-phospho-GSK3 β en las células obtenidas de un sujeto sano y un paciente con esquizofrenia, respectivamente. Se observó que el anticuerpo reconoció en el sujeto sano la zona perinuclear así como en algunas de las prolongaciones, sin embargo en el paciente solo se observa la tinción en la zona perinuclear.

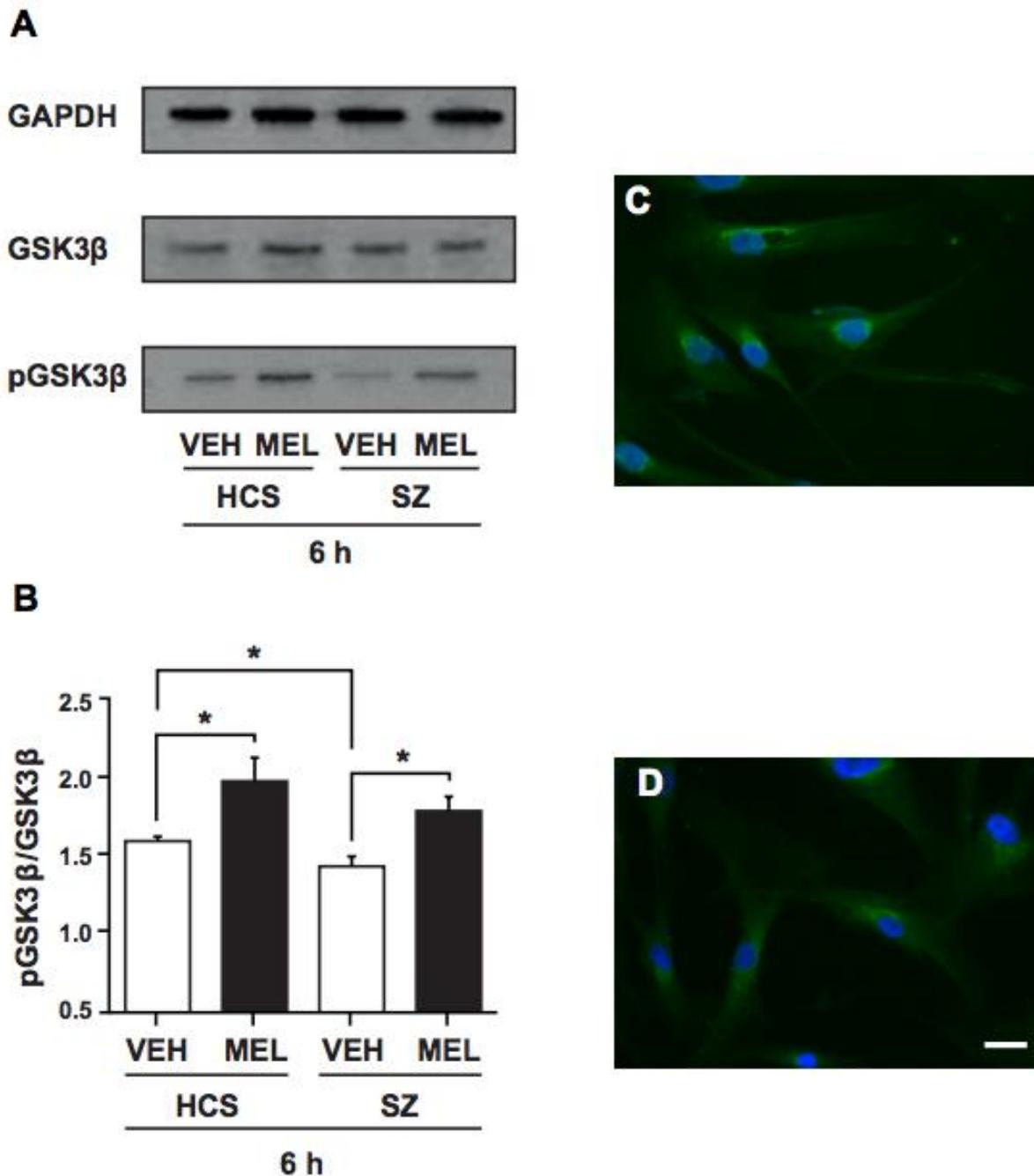


Figura 24. La melatonina incrementa la fosforilación de la GSK3β en los precursores neuronales del epitelio olfatorio. *Western blot* representativo de la isoforma GSK3β fosforilada (p-GSK3β) y GSK3β total de los extractos celulares de los PNEOs del sujeto control y del paciente con esquizofrenia incubados durante 6 h con el VEH o la MEL (A). Cantidad relativa de p-GSK3β determinada por densitometría, normalizada por la cantidad de GSK3β total. Los resultados se expresan como la media

± SEM de ocho ensayos. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$). No se observan cambios en el control de carga GAPDH. Las imágenes C y D muestran una tinción con el anticuerpo anti-phospho-GSK3 β (FITC verde) y de los núcleos (DAPI) del sujeto control y del paciente. Barra de escala: 20 μ m

Receptores a melatonina MT1 y MT2 en precursores neuronales obtenidos de un paciente diagnosticado con esquizofrenia y un sujeto control.

Para estudiar la distribución de los receptores de melatonina (MT1 y MT1) en los PNEOs derivados del sujeto control y del paciente con esquizofrenia, las células se incubaron con el VEH o la MEL a una concentración de 10^{-5} M durante 6 horas y se tiñeron con el anticuerpo MEL-1A / BR. En las células de sujeto control incubadas con VEH se observan puntos fluorescentes definidos localizados en la zona perinuclear así como en las prolongaciones (Figura 25 A), en la imagen de las células del paciente con esquizofrenia se observa además de los puntos, zonas carentes de tinción (cavidades, flecha blanca) (Figura 25 B). La MEL parece aumentar la inmunoreactividad de MT1 y MT2 tanto en los cultivos primarios del sujeto control (Figura 25 A ') como del paciente (Figura 25 B').

La cantidad relativa de los receptores de melatonina se determinó por *Western blot* (Figura 26 A) en extractos celulares obtenidos de los cultivos primarios. En los PENOs primarios sólo se detectó una banda de 60 kDa. La melatonina aumentó la cantidad relativa de esta banda. La Figura 26 B muestra el análisis densitométrico de la banda reconocida por el anticuerpo anti-MEL-1A/BR normalizada entre la cantidad de GAPDH obtenida de la determinación de la densidad óptica de las bandas. La cantidad relativa

de la banda reconocida por el anticuerpo en los extractos derivados del paciente con EZ fue significativamente más baja que las muestras obtenidas del sujeto control. La melatonina aumentó la cantidad relativa de la banda de 60kDa-MT1 / 2 en el extracto de células sujeto control.

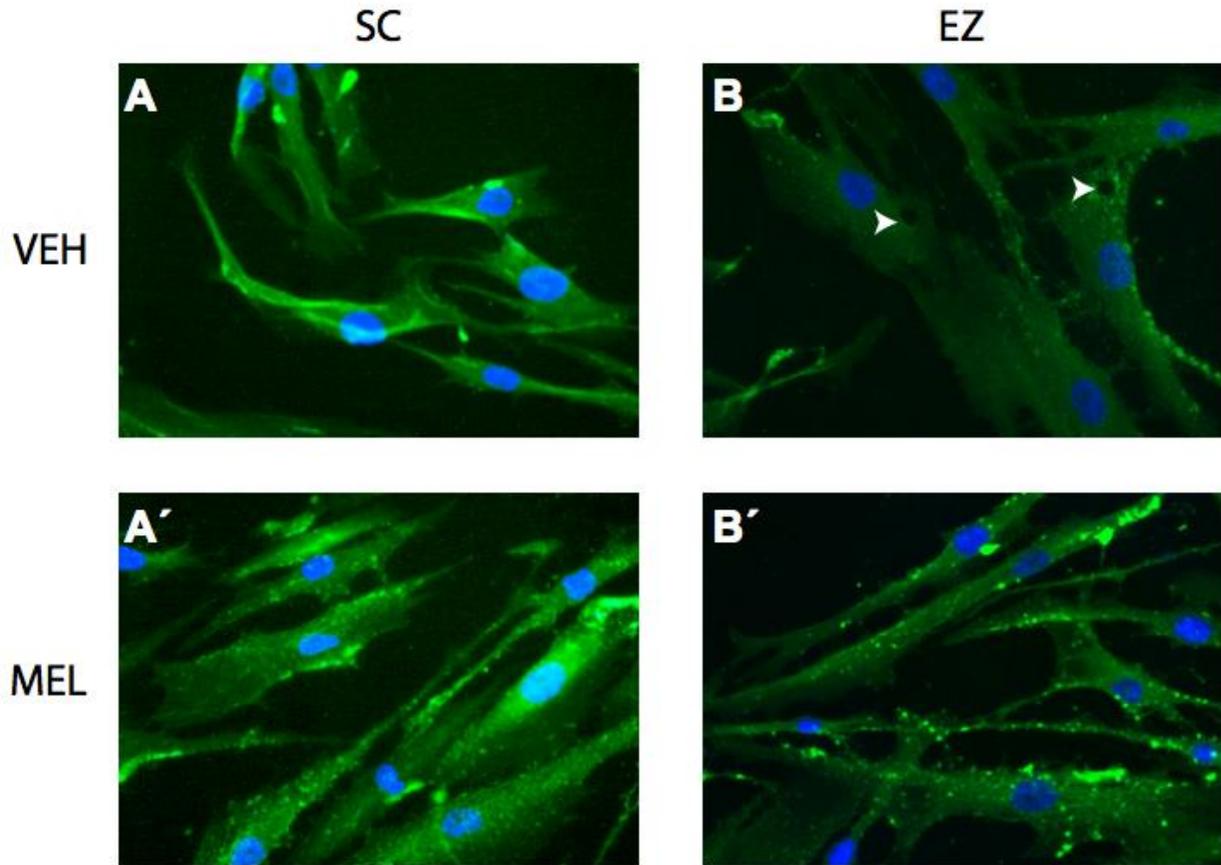


Figura 25. Distribución de los receptores a melatonina MT1/2 en cultivos primarios de precursores neuronales olfatorios obtenidos de un sujeto control y un paciente con esquizofrenia. En el panel A y A' se muestran las imágenes representativas de los PNEOs del sujeto control o de un sujeto diagnosticado con esquizofrenia (B, B'), incubadas durante 6 h con el VEH (A, B) o con la MEL 10^{-5} M (A', B'). Las células fueron fijadas y teñidas para con el anticuerpo anti- MEL-1A/BR receptores MT1 / 2 (FITC, verde) y los núcleos (DAPI, azul), Barra de escala = 20 μ m.

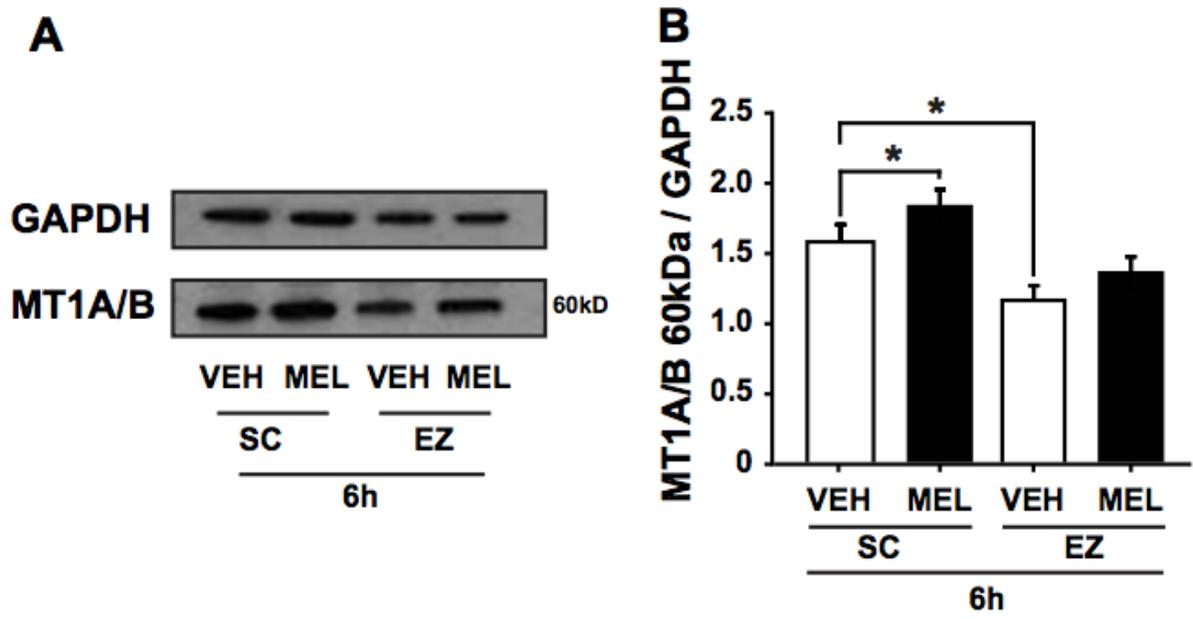


Figura 26. **Cantidad relativa de los receptores a melatonina MT1/2 en cultivos primarios de precursores neuronales de un sujeto control y un paciente con esquizofrenia.** En el panel A se muestra una fluorografía representativa de las bandas de proteína reconocidas con el anticuerpo MEL-1A/BR. Los precursores se incubaron durante 6 h con el VEH o con la MEL 10^{-5} M. En el panel D se muestra la gráfica de barras de la cantidad relativa de la banda reconocida con el anticuerpo MEL-1A/BR determinada por densitometría, normalizada por la cantidad de GAPDH total. Los resultados representan la media \pm SEM de ocho ensayos. Los asteriscos indican diferencias significativas (P < 0,05)

Discusión

La hipótesis del neurodesarrollo para la etiología de la esquizofrenia sostiene que durante el segundo trimestre del embarazo tanto factores genéticos y ambientales que afecten a la madre pueden producir alteraciones en el desarrollo del cerebro fetal que eventualmente conducen a la aparición de la enfermedad en la vida adulta. En ese sentido, evaluamos en primera instancia los efectos de la melatonina en la axogénesis en una clona de PNEOs que se obtuvo de un sujeto sano, esto con el propósito de evitar la variabilidad genética en las respuestas farmacológicas y para obtener los efectos más robustos (Tajinda et al. 2010, Clarke, Erskine, and Lumsden 1998). Posteriormente se utilizaron cultivos primarios de los PNEOs obtenidos a partir de un SC y un paciente con EZ para tener variabilidad fenotípica y una respuesta más representativa. Se identificaron cinco etapas de diferenciación morfológica en los PNEOs, basándonos en la clasificación de Calof y Tahirovic (Calof et al. 2002, Tahirovic and Bradke 2009) (Figura 27). Se demostró que la MEL estimula la formación axonal a través de los receptores MT1/2 y además aumenta la secreción en los precursores neuronales humanos. Así, la melatonina tiene un papel clave en la formación de axones en los PNEOs del paciente con EZ lo que nos da información sobre la etiología de la EZ, de esta manera podríamos sugerir que la alteración en la axogénesis de los pacientes podría ser debido a la disminución de los niveles de la MEL materna lo que daría lugar a la conectividad neuronal anormal que es parte de la patofisiología de la enfermedad (Arnold, Talbot, and Hahn 2005).

En este estudio se demostró que la MEL estimula la formación de axones a través de los receptores a MEL MT1 y MT2. Además, aumenta la fosforilación de la GSK3 β y la secreción en los precursores neuronales. Para ello, se utilizaron precursores neuronales obtenidos del epitelio olfatorio, que es un modelo validado (Calof and Chikaraishi 1989, Calof et al. 2002, Cascella et al. 2007, Benitez-King et al. 2011) con el cual se puede estudiar el neurodesarrollo en la EZ. El epitelio olfatorio nos da un acercamiento con el cual podemos observar los procesos embrionarios de neurogénesis y diferenciación neural (Benitez-King, Huerto-Delgadillo, and Anton-Tay 1991). Por otra parte es un tejido en el que podemos encontrar neuronas del sistema nervioso central, estas neuronas se regeneran y diferencian a lo largo de la vida, lo cual es clave en el neurodesarrollo (Cascella et al. 2007).

El efecto de la melatonina sobre la formación de axones

La melatonina estimuló de manera significativa la formación de axones en el paciente con EZ, que en condiciones basales no forma. Se sabe que los pacientes con EZ tienen una reducción en los niveles de MEL circulante en comparación con SC (Monteleone et al. 1997, Fanget et al. 1989), por lo que la falta de esta indolamina podría estar afectando la axonogénesis. En ese contexto el aporte de MEL ayuda a las neuronas a formar axones por lo tanto mejora el desarrollo neuronal en las células del paciente, el cual no tiene el aporte suficiente de la hormona.

En el contexto del neurodesarrollo embrionario el suministro adecuado de MEL materna a través de la placenta debe ser el óptimo para una diferenciación morfológica y

funcional de las neuronas y de esta manera se podrían prevenir las anomalías de neurodesarrollo asociadas a la EZ

De modo que, la MEL tiene un papel clave en la formación de axones en la EZ sugiriendo que la alteración durante neurodesarrollo, que podría deberse a la carencia o disminución de la MEL materna está dando como consecuencia defectos en la conectividad neuronal encontradas en los pacientes.

Los Receptores a melatonina MT1 y MT2 están implicados en la formación de axones en los precursores neuronales del epitelio olfatorio

Los resultados muestran que la melatonina estimula la formación de axones en los PNEOs a través de los receptores MT1 y MT2. Liu et al (Liu et al. 2015) demostró que la axogénesis en neuronas de hipocampo de rata es a través del receptor MT2. En ese sentido se bloqueó el efecto de la formación de axones con luzindol que es un antagonista de los receptores. Los resultados muestran que conforme se incrementa la concentración de luzindol disminuye el número de células con axón. En este trabajo se demostró la presencia de los receptores por medio de inmunodetección utilizando el anticuerpo específico MEL-1A/BR. Además, en la clona de los PNEOs se encontraron dos bandas con pesos moleculares de 36 y 37 kDa, que corresponden a los receptores MT2 y MT1, respectivamente. Acorde con esto en el 2001 Bordt et al encontraron una banda de 37kDa que corresponde a el receptor MT1(Bordt et al. 2001). Por otra parte, se encontró una banda de 60 kDa que corresponde a los receptores en su forma glicosilada (Govorovska et al. 2006). Algunos autores han propuesto la forma glicosilada de los receptores es la forma funcional la N-glicosilación es necesaria para

su transporte a la membrana plasmática (Matsuda et al. 2004, Govorovska et al. 2006). En cambio, en los cultivos primarios del sujeto control y del paciente solo se detectó la banda de 60 kDa. En estos cultivos la cantidad relativa de receptor incremento después de incubar con melatonina, esto puede deberse a que la melatonina tiene la capacidad para autorregular la densidad de sus receptores (Guerrero et al. 2000). En conjunto, los resultados muestran por primera vez que los precursores neuronales del epitelio olfatorio humano están expresando los receptores funcionales de la MEL.

Participación de la Glucógeno Sintasa Cinasa 3 Beta fosforilada en la formación de axones en los precursores neuronales del epitelio olfatorio

La inactivación de la GSK3 β por medio de la fosforilación en la serina 9, es clave en la axogénesis. Jiang demostró que la inactivación de la GSK3 β en la etapa 2 es necesaria para la formación axonal (Jiang et al. 2005). En ese contexto, se encontró que la MEL aumenta los niveles relativos de la fosfo-Ser9-GSK3 β tanto en la clona como en los cultivos primarios. Sin embargo, no se conoce la posible cascada de señalización en la cual participa la activación de los receptores de MEL y fosforilación de GSK3 β en los PNEOs. Podemos suponer que la vía implicada en el proceso de formación de los axones en los PNEOs es la vía PI3K/AKT/GSK3 β río abajo de la activación de los receptores, que es una vía descrita para hipocampo de rata por Jiang et al en el 2015. En las células del paciente con EZ se encontró que hay una reducción en los niveles de la p-GSK3 β comparado con el sujeto control. De igual forma, Emamian encontró que

hay una reducción en la p-GSK3 β de linfocitos obtenidos de pacientes con EZ (Emamian et al. 2004). Por lo que se ha propuesto que existe una alteración en la actividad de la cinasa en la patofisiología de la EZ (Lovestone et al. 2007). En este sentido, los resultados sugieren que la melatonina podría estar modulando la fosforilación de la GSK3 β en los PNEOs del paciente con EZ lo que sugiere que la reducción de la GSK3 β fosforilada en estos pacientes no permitiera la formación de axones de manera espontanea.

Funcionalidad de los precursores neuronales del epitelio olfatorio tratados con melatonina medida por el incremento en la fluorescencia del FM1-43

Para conocer si los PNEOs eran capaces de formar sinapsis entre si, se incubaron con MEL o VEH por 6 horas. Las neuronas olfatorias *in vivo* forman un axón largo que atraviesa la placa cribosa y establecen contactos sinápticos con células mitrales en el bulbo olfatorio. Por lo tanto, no forman sinapsis entre sí en el neuroepitelio olfativo. En este trabajo, no encontramos estructuras sinápticas en la clona de los PNEOs incubados con el VEH. Sin embargo en los PNEOs incubados con MEL se encontró evidencia de la formación de unas cuantas estructuras sinápticas. Estos datos sugieren que en respuesta al tratamiento con MEL, los PNEOs expresan proteínas pre y postsinápticas que eventualmente podrían establecer sinapsis funcionales.

En ese sentido, para estudiar más a fondo la funcionalidad neuronal en los PNEOs, se analizó la exocitosis de diferentes regiones celulares y diferentes etapas de

diferenciación. La despolarización provocada por alto potasio desencadenó la exocitosis del soma, los axones y las ramificaciones axonales. La cinética lenta y duradera del aumento de la fluorescencia FM1-43 sugirió que la exocitosis de los PNEOs es extrasináptica. Aunque el papel de la secreción extrasináptica en estas células aún debe ser estudiado, posiblemente media la señalización parácrina para la modulación de los procesos del neurodesarrollo como la migración celular y el crecimiento axonal. Al aumentar la cantidad y la velocidad de la exocitosis, la melatonina podría mejorar esta señalización parácrina.

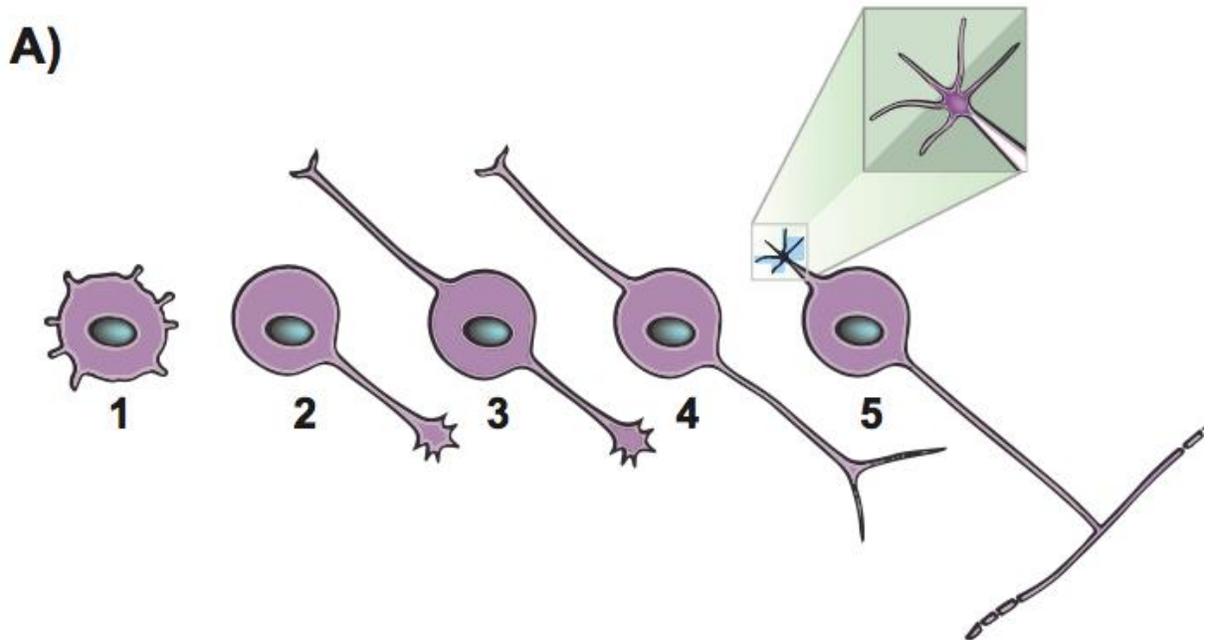


Figura 27. Etapas de la diferenciación neuronal observadas en la clona obtenida del epitelio olfatorio. Se muestra un diagrama modificado del de Calof y Chikarashi (1989) y de Tahirovich 2009, donde se ejemplifican las diferentes etapas de diferenciación neuronal (marcadas con números ascendentes).

Retomando la hipótesis del neurodesarrollo de la etiología de la EZ junto con las alteraciones en el ciclo luz/oscuridad durante el embarazo pueden ser un factor de riesgo para el desarrollo de trastornos neuropsiquiátricos (Schwartz 2011, 2014). Se sabe que la exposición deficiente de luz solar durante el segundo trimestre del embarazo, tal como ocurre durante el invierno en los países del norte, se asocia a un mayor número de niños que más tarde desarrollaron EZ en la etapa adulta (Torrey et al. 1997, Soliman et al. 2015). Esto se debe a que la secreción de MEL durante el invierno disminuye. Al haber noches más largas la duración de la secreción es mayor sin embargo, la concentración de MEL circulante es menor.

Aunque la MEL se sintetiza en la placenta desde las primeras semanas y prevalece durante todo el embarazo (Soliman et al. 2015), la MEL materna proveniente de la pineal la cual atraviesa fácilmente la barrera placentaria (Okatani et al. 1998), se cree que es la fuente más importante de esta hormona para el feto (Seron-Ferre et al. 2012, Mendez et al. 2012, Reiter et al. 2014, Mendez et al. 2016). Además de que en el cerebro fetal humano, los receptores de MEL se expresan alrededor de 15 semanas de gestación (Thomas et al. 2002) y el pico más alto de secreción de MEL nocturna en el suero materno es durante el tercer trimestre del embarazo (Tamura et al. 2008). En esta etapa, el desarrollo cerebral puede ser particularmente vulnerable a un déficit de MEL materna y las alteraciones que se puedan producir gracias al déficit melatoninérgico podrían tener consecuencias a largo plazo. Estudios recientes han demostrado que la descendencia de ratas expuestas a un ciclo de luz/oscuridad alterado en este caso luz continua en la última etapa de gestación presentan

alteraciones conductuales en la etapa adulta como ansiedad y un comportamiento depresivo, las cuales son revertidas al suministrar melatonina (Voiculescu et al. 2016).

En conjunto, la evidencia sugiere que los bajos niveles en la MEL materna, debido a las alteraciones del ciclo luz/oscuridad durante la gestación, pueden ser un riesgo de desarrollar EZ causando deterioro en la polarización neuronal y formación axonal en precursores neuronales (Figura 28). Estas anomalías en la diferenciación neuronal pueden conducir a una conectividad global deteriorada y la funcionalidad de circuitos neurales con los trastornos conductuales y cognitivos posteriores en la edad adulta. Por lo tanto, un suministro exógeno adecuado de la melatonina a las mujeres embarazadas, tal como un suplemento dietético, podría ser útil para prevenir el riesgo de alteraciones de la formación de circuitos neuronales que dependen de esta indolamina. El hecho de que la MEL ejerza sus efectos sobre la axogénesis a concentraciones similares a las encontradas en el suero o líquido cefalorraquídeo durante la noche sugiere que la secreción regular de esta hormona por la glándula pineal puede inducir la diferenciación neuronal in vivo.

La melatonina materna se transfiere al feto a través de la placenta

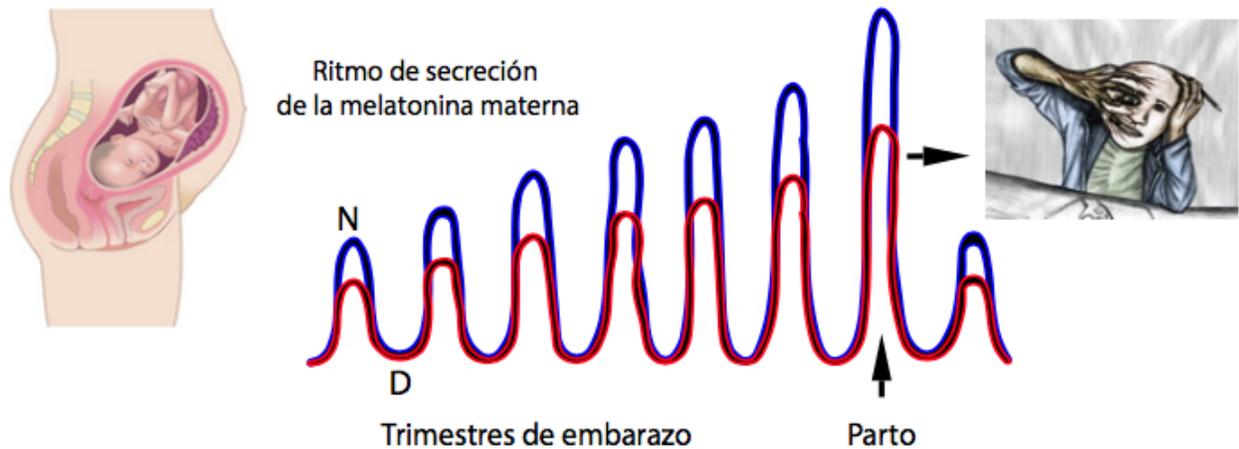


Figura 28. Secreción de la melatonina materna durante el embarazo. En el esquema se muestra el incremento de la melatonina materna secretada a través de los trimestres del embarazo (líneas azules). La carencia o la disminución en la secreción de esta indolamina (líneas rojas) puede provocar alteraciones en el neurodesarrollo fetal dando como consecuencia enfermedades neuropsiquiátricas, tales como la esquizofrenia. Figura modificada de Reiter et al 2013

- Alexander-Bloch, A. F., P. T. Reiss, J. Rapoport, H. McAdams, J. N. Giedd, E. T. Bullmore, and N. Gogtay. 2014. "Abnormal cortical growth in schizophrenia targets normative modules of synchronized development." *Biol Psychiatry* 76 (6):438-46. doi: 10.1016/j.biopsych.2014.02.010.
- Andersen, S. S., and G. Q. Bi. 2000. "Axon formation: a molecular model for the generation of neuronal polarity." *Bioessays* 22 (2):172-9. doi: 10.1002/(sici)1521-1878(200002)22:2<172::aid-bies8>3.0.co;2-q.
- Anderson, G., and M. Maes. 2012. "Melatonin: an overlooked factor in schizophrenia and in the inhibition of anti-psychotic side effects." *Metab Brain Dis* 27 (2):113-9. doi: 10.1007/s11011-012-9307-9.
- Anton-Tay, F., I. Martinez, R. Tovar, and G. Benitez-King. 1998. "Modulation of the subcellular distribution of calmodulin by melatonin in MDCK cells." *J Pineal Res* 24 (1):35-42.
- Arnold, S. E., and L. Rioux. 2001. "Challenges, status, and opportunities for studying developmental neuropathology in adult schizophrenia." *Schizophr Bull* 27 (3):395-416.
- Arnold, S. E., K. Talbot, and C. G. Hahn. 2005. "Neurodevelopment, neuroplasticity, and new genes for schizophrenia." *Prog Brain Res* 147:319-45. doi: 10.1016/s0079-6123(04)47023-x.
- Ashe, P. C., M. D. Berry, and A. A. Boulton. 2001. "Schizophrenia, a neurodegenerative disorder with neurodevelopmental antecedents." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 25 (4):691-707.
- Bakhshi, K., and S. A. Chance. 2015. "The neuropathology of schizophrenia: A selective review of past studies and emerging themes in brain structure and cytoarchitecture." *Neuroscience* 303:82-102. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.06.028.
- Bellon, A., L. Ortiz-Lopez, G. Ramirez-Rodriguez, F. Anton-Tay, and G. Benitez-King. 2007. "Melatonin induces neuritogenesis at early stages in N1E-115 cells through actin rearrangements via activation of protein kinase C and Rho-associated kinase." *J Pineal Res* 42 (3):214-21. doi: 10.1111/j.1600-079X.2006.00408.x.
- Benitez-King, G., L. Huerto-Delgadillo, and F. Anton-Tay. 1991. "Melatonin modifies calmodulin cell levels in MDCK and N1E-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity in vitro." *Brain Res* 557 (1-2):289-92.
- Benitez-King, G., L. Huerto-Delgadillo, and F. Anton-Tay. 1993. "Binding of 3H-melatonin to calmodulin." *Life Sci* 53 (3):201-7.
- Benitez-King, G., A. Riquelme, L. Ortiz-Lopez, C. Berlanga, M. S. Rodriguez-Verdugo, F. Romo, E. Calixto, H. Solis-Chagoyan, M. Jimenez, L. M. Montano, G. Ramirez-Rodriguez, S. Morales-Mulia, and A. Dominguez-Alonso. 2011. "A non-invasive method to isolate the neuronal lineage from the nasal epithelium from schizophrenic and bipolar diseases." *J Neurosci Methods* 201 (1):35-45. doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.07.009.
- Bordt, S. L., R. M. McKeon, P. K. Li, P. A. Witt-Enderby, and M. A. Melan. 2001. "N1E-115 mouse neuroblastoma cells express MT1 melatonin receptors and produce neurites in response to melatonin." *Biochim Biophys Acta* 1499 (3):257-64.
- Calof, A. L., A. Bonnin, C. Crocker, S. Kawauchi, R. C. Murray, J. Shou, and H. H. Wu. 2002. "Progenitor cells of the olfactory receptor neuron lineage." *Microsc Res Tech* 58 (3):176-88. doi: 10.1002/jemt.10147.

- Calof, A. L., and D. M. Chikaraishi. 1989. "Analysis of neurogenesis in a mammalian neuroepithelium: proliferation and differentiation of an olfactory neuron precursor in vitro." *Neuron* 3 (1):115-27.
- Cardenas, A. M., and F. D. Marengo. 2016. "How the stimulus defines the dynamics of vesicle pool recruitment, fusion mode, and vesicle recycling in neuroendocrine cells." *J Neurochem* 137 (6):867-79. doi: 10.1111/jnc.13565.
- Cardinali, D. P., L. I. Brusco, M. Garcia Bonacho, and A. I. Esquifino. 1998. "Effect of melatonin on 24-hour rhythms of ornithine decarboxylase activity and norepinephrine and acetylcholine synthesis in submaxillary lymph nodes and spleen of young and aged rats." *Neuroendocrinology* 67 (5):349-62.
- Cardinali, D. P., R. A. Cutrera, M. G. Bonacho, and A. I. Esquifino. 1997. "Effect of pinealectomy, superior cervical ganglionectomy, or melatonin treatment on 24-hour rhythms in ornithine decarboxylase and tyrosine hydroxylase activities of rat spleen." *J Pineal Res* 22 (4):210-20.
- Cascella, N. G., M. Takaki, S. Lin, and A. Sawa. 2007. "Neurodevelopmental involvement in schizophrenia: the olfactory epithelium as an alternative model for research." *J Neurochem* 102 (3):587-94. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.4628.x.
- Chen, Y. C., J. M. Sheen, M. M. Tiao, Y. L. Tain, and L. T. Huang. 2013. "Roles of melatonin in fetal programming in compromised pregnancies." *Int J Mol Sci* 14 (3):5380-401. doi: 10.3390/ijms14035380.
- Clarke, J. D., L. Erskine, and A. Lumsden. 1998. "Differential progenitor dispersal and the spatial origin of early neurons can explain the predominance of single-phenotype clones in the chick hindbrain." *Dev Dyn* 212 (1):14-26. doi: 10.1002/(sici)1097-0177(199805)212:1<14::aid-aja2>3.0.co;2-5.
- Conde, C., and A. Caceres. 2009. "Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites." *Nat Rev Neurosci* 10 (5):319-32. doi: 10.1038/nrn2631.
- Dazzan, P., and R. M. Murray. 1999. "Schizophrenia is (not simply) a neurodevelopmental disorder." *Epidemiol Psichiatr Soc* 8 (4):235-41.
- Dent, E. W., and F. B. Gertler. 2003. "Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance." *Neuron* 40 (2):209-27.
- Dominguez-Alonso, A., G. Ramirez-Rodriguez, and G. Benitez-King. 2012. "Melatonin increases dendritogenesis in the hilus of hippocampal organotypic cultures." *J Pineal Res* 52 (4):427-36. doi: 10.1111/j.1600-079X.2011.00957.x.
- Dubocovich, M. L. 1984. "Presynaptic alpha-adrenoceptors in the central nervous system." *Ann N Y Acad Sci* 430:7-25.
- Dubocovich, M. L. 1988. "Pharmacology and function of melatonin receptors." *Faseb j* 2 (12):2765-73.
- Dubocovich, M. L., P. Delagrang, D. N. Krause, D. Sugden, D. P. Cardinali, and J. Olcese. 2010. "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors." *Pharmacol Rev* 62 (3):343-80. doi: 10.1124/pr.110.002832.
- Dubocovich, M. L., M. A. Rivera-Bermudez, M. J. Gerdin, and M. I. Masana. 2003. "Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors." *Front Biosci* 8:d1093-108.

- Ebisawa, T., S. Karne, M. R. Lerner, and S. M. Reppert. 1994. "Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (13):6133-7.
- Emamian, E. S., D. Hall, M. J. Birnbaum, M. Karayiorgou, and J. A. Gogos. 2004. "Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3 β signaling in schizophrenia." *Nat Genet* 36 (2):131-7. doi: 10.1038/ng1296.
- Fanget, F., B. Claustrat, J. Dalery, J. Brun, J. L. Terra, M. Marie-Cardine, and J. Guyotat. 1989. "Nocturnal plasma melatonin levels in schizophrenic patients." *Biol Psychiatry* 25 (4):499-501.
- Findikli, E., M. F. Inci, M. Gokce, H. A. Findikli, H. Altun, and M. F. Karaaslan. 2015. "Pineal gland volume in schizophrenia and mood disorders." *Psychiatr Danub* 27 (2):153-8.
- Frankle, W. G., J. Lerma, and M. Laruelle. 2003. "The synaptic hypothesis of schizophrenia." In *Neuron*, 205-16. United States.
- Fukata, Y., T. Kimura, and K. Kaibuchi. 2002. "Axon specification in hippocampal neurons." *Neurosci Res* 43 (4):305-15.
- Geraldo, S., and P. R. Gordon-Weeks. 2009. "Cytoskeletal dynamics in growth-cone steering." *J Cell Sci* 122 (Pt 20):3595-604. doi: 10.1242/jcs.042309.
- Govorovska, Kristina A., Markowska M., Kai L., Pazin M., Gerdin M. J., Masana M. I., and Dubocovich M. L. 2006. "Role of N-linked glycosylation on ligand binding and cellular expression of hMT1 and hMT2 melatonin receptors." *FASEB J*.
- Guerrero, H. Y., F. Gauer, C. Schuster, P. Pevet, and M. Masson-Pevet. 2000. "Melatonin regulates the mRNA expression of the mt(1) melatonin receptor in the rat *Pars tuberalis*." *Neuroendocrinology* 71 (3):163-9. doi: 54533.
- Hardeland, R. 2009. "Melatonin: signaling mechanisms of a pleiotropic agent." *Biofactors* 35 (2):183-92. doi: 10.1002/biof.23.
- Horiuchi, Y., S. Kano, K. Ishizuka, N. G. Cascella, S. Ishii, C. C. Talbot, Jr., A. E. Jaffe, H. Okano, J. Pevsner, C. Colantuoni, and A. Sawa. 2013. "Olfactory cells via nasal biopsy reflect the developing brain in gene expression profiles: utility and limitation of the surrogate tissues in research for brain disorders." *Neurosci Res* 77 (4):247-50. doi: 10.1016/j.neures.2013.09.010.
- Jiang, H., W. Guo, X. Liang, and Y. Rao. 2005. "Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3 β and its upstream regulators." *Cell* 120 (1):123-35. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.033.
- Jimenez-Jorge, S., J. M. Guerrero, A. J. Jimenez-Caliani, M. C. Naranjo, P. J. Lardone, A. Carrillo-Vico, C. Osuna, and P. Molinero. 2007. "Evidence for melatonin synthesis in the rat brain during development." *J Pineal Res* 42 (3):240-6. doi: 10.1111/j.1600-079X.2006.00411.x.
- Keshavan, M. S., S. Anderson, and J. W. Pettegrew. 1994. "Is schizophrenia due to excessive synaptic pruning in the prefrontal cortex? The Feinberg hypothesis revisited." *J Psychiatr Res* 28 (3):239-65.
- Konietzny, A., J. Bar, and M. Mikhaylova. 2017. "Dendritic Actin Cytoskeleton: Structure, Functions, and Regulations." *Front Cell Neurosci* 11:147. doi: 10.3389/fncel.2017.00147.
- Lacoste, B., D. Angeloni, S. Dominguez-Lopez, S. Calderoni, A. Mauro, F. Fraschini, L. Descarries, and G. Gobbi. 2015. "Anatomical and cellular localization of melatonin

- MT1 and MT2 receptors in the adult rat brain." *J Pineal Res* 58 (4):397-417. doi: 10.1111/jpi.12224.
- Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227 (5259):680-5.
- Lefebvre, J. L., J. R. Sanes, and J. N. Kay. 2015. "Development of dendritic form and function." *Annu Rev Cell Dev Biol* 31:741-77. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013020.
- Lenroot, R. K., and J. N. Giedd. 2006. "Brain development in children and adolescents: insights from anatomical magnetic resonance imaging." *Neurosci Biobehav Rev* 30 (6):718-29. doi: 10.1016/j.neubiorev.2006.06.001.
- Li, Y. C., and E. T. Kavalali. 2017. "Synaptic Vesicle-Recycling Machinery Components as Potential Therapeutic Targets." *Pharmacol Rev* 69 (2):141-160. doi: 10.1124/pr.116.013342.
- Liu, D., N. Wei, H. Y. Man, Y. Lu, L. Q. Zhu, and J. Z. Wang. 2015. "The MT2 receptor stimulates axonogenesis and enhances synaptic transmission by activating Akt signaling." *Cell Death Differ* 22 (4):583-96. doi: 10.1038/cdd.2014.195.
- Liu, J., K. C. Somera-Molina, R. L. Hudson, and M. L. Dubocovich. 2013. "Melatonin potentiates running wheel-induced neurogenesis in the dentate gyrus of adult C3H/HeN mice hippocampus." *J Pineal Res* 54 (2):222-31. doi: 10.1111/jpi.12023.
- Liu, Y. J., J. Zhuang, H. Y. Zhu, Y. X. Shen, Z. L. Tan, and J. N. Zhou. 2007. "Cultured rat cortical astrocytes synthesize melatonin: absence of a diurnal rhythm." *J Pineal Res* 43 (3):232-8. doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00466.x.
- Lovestone, S., R. Killick, M. Di Forti, and R. Murray. 2007. "Schizophrenia as a GSK-3 dysregulation disorder." *Trends Neurosci* 30 (4):142-9. doi: 10.1016/j.tins.2007.02.002.
- Macias, M., G. Escames, J. Leon, A. Coto, Y. Sbihi, A. Osuna, and D. Acuna-Castroviejo. 2003. "Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship." *Eur J Biochem* 270 (5):832-40.
- Maldonado, M. D., R. J. Reiter, and M. A. Perez-San-Gregorio. 2009. "Melatonin as a potential therapeutic agent in psychiatric illness." *Hum Psychopharmacol* 24 (5):391-400. doi: 10.1002/hup.1032.
- Mandell, J. W., and G. A. Banker. 1995. "The microtubule cytoskeleton and the development of neuronal polarity." *Neurobiol Aging* 16 (3):229-37; discussion 238.
- Martin, K. C. 2002. "Synaptic tagging during synapse-specific long-term facilitation of Aplysia sensory-motor neurons." *Neurobiol Learn Mem* 78 (3):489-97.
- Matsuda, K., J. Zheng, G. G. Du, N. Klocker, L. D. Madison, and P. Dallos. 2004. "N-linked glycosylation sites of the motor protein prestin: effects on membrane targeting and electrophysiological function." *J Neurochem* 89 (4):928-38. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02377.x.
- Mendez, N., L. Abarzua-Catalan, N. Vilches, H. A. Galdames, C. Spichiger, H. G. Richter, G. J. Valenzuela, M. Seron-Ferre, and C. Torres-Farfan. 2012. "Timed maternal melatonin treatment reverses circadian disruption of the fetal adrenal clock imposed by exposure to constant light." *PLoS One* 7 (8):e42713. doi: 10.1371/journal.pone.0042713.
- Mendez, N., D. Halabi, C. Spichiger, E. R. Salazar, K. Vergara, P. Alonso-Vasquez, P. Carmona, J. M. Sarmiento, H. G. Richter, M. Seron-Ferre, and C. Torres-Farfan. 2016. "Gestational Chronodisruption Impairs Circadian Physiology in Rat Male Offspring,

- Increasing the Risk of Chronic Disease." *Endocrinology* 157 (12):4654-4668. doi: 10.1210/en.2016-1282.
- Meyer-Lindenberg, A., and H. Tost. 2014. "Neuroimaging and plasticity in schizophrenia." *Restor Neurol Neurosci* 32 (1):119-27. doi: 10.3233/rnn-139014.
- Monteleone, P., M. Natale, A. La Rocca, and M. Maj. 1997. "Decreased nocturnal secretion of melatonin in drug-free schizophrenics: no change after subchronic treatment with antipsychotics." *Neuropsychobiology* 36 (4):159-63.
- Moriya, T., N. Horie, M. Mitome, and K. Shinohara. 2007. "Melatonin influences the proliferative and differentiative activity of neural stem cells." *J Pineal Res* 42 (4):411-8. doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00435.x.
- Mumm, J. S., J. Shou, and A. L. Calof. 1996. "Colony-forming progenitors from mouse olfactory epithelium: evidence for feedback regulation of neuron production." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (20):11167-72.
- Nakamura, Y., H. Tamura, S. Kashida, H. Takayama, Y. Yamagata, A. Karube, N. Sugino, and H. Kato. 2001. "Changes of serum melatonin level and its relationship to fetoplacental unit during pregnancy." *J Pineal Res* 30 (1):29-33.
- Okabe, S. 2002. "Birth, growth and elimination of a single synapse." *Anat Sci Int* 77 (4):203-10. doi: 10.1046/j.0022-7722.2002.00030.x.
- Okatani, Y., K. Okamoto, K. Hayashi, A. Wakatsuki, S. Tamura, and Y. Sagara. 1998. "Maternal-fetal transfer of melatonin in pregnant women near term." *J Pineal Res* 25 (3):129-34.
- Penazzi, L., L. Bakota, and R. Brandt. 2016. "Microtubule Dynamics in Neuronal Development, Plasticity, and Neurodegeneration." *Int Rev Cell Mol Biol* 321:89-169. doi: 10.1016/bs.ircmb.2015.09.004.
- Pilowsky, L. S., R. W. Kerwin, and R. M. Murray. 1993. "Schizophrenia: a neurodevelopmental perspective." *Neuropsychopharmacology* 9 (1):83-91. doi: 10.1038/npp.1993.46.
- Powell, S. K., R. J. Rivas, E. Rodriguez-Boulan, and M. E. Hatten. 1997. "Development of polarity in cerebellar granule neurons." *J Neurobiol* 32 (2):223-36.
- Prochiantz, A. 1995. "Neuronal polarity: giving neurons heads and tails." *Neuron* 15 (4):743-6.
- Racki, V., D. Petric, N. Kucic, N. Grzeta, K. Jurdana, and I. Roncevic-Grzeta. 2016. "Cortical gray matter loss in schizophrenia: Could microglia be the culprit?" *Med Hypotheses* 88:18-21. doi: 10.1016/j.mehy.2015.12.021.
- Reiter, R. J., D. X. Tan, A. Korkmaz, and S. A. Rosales-Corral. 2014. "Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology." *Hum Reprod Update* 20 (2):293-307. doi: 10.1093/humupd/dmt054.
- Reppert, S. M., D. R. Weaver, and T. Ebisawa. 1994. "Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses." *Neuron* 13 (5):1177-85.
- Sagrillo-Fagundes, L., E. M. Assuncao Salustiano, P. W. Yen, A. Soliman, and C. Vaillancourt. 2016. "Melatonin in Pregnancy: Effects on Brain Development and CNS Programming Disorders." *Curr Pharm Des* 22 (8):978-86.
- Sawa, A., and N. G. Cascella. 2009. "Peripheral olfactory system for clinical and basic psychiatry: a promising entry point to the mystery of brain mechanism and biomarker identification in schizophrenia." In *Am J Psychiatry*, 137-9. United States.

- Schwartz, P. J. 2011. "Season of birth in schizophrenia: a maternal-fetal chronobiological hypothesis." *Med Hypotheses* 76 (6):785-93. doi: 10.1016/j.mehy.2011.02.019.
- Schwartz, P. J. 2014. "Can the season of birth risk factor for schizophrenia be prevented by bright light treatment for the second trimester mother around the winter solstice?" *Med Hypotheses* 83 (6):809-15. doi: 10.1016/j.mehy.2014.10.014.
- Selemon, L. D. 2014. "Frontal lobe synaptic plasticity in development and disease: modulation by the dopamine D1 receptor." *Curr Pharm Des* 20 (32):5194-201.
- Seron-Ferre, M., N. Mendez, L. Abarzua-Catalan, N. Vilches, F. J. Valenzuela, H. E. Reynolds, A. J. Llanos, A. Rojas, G. J. Valenzuela, and C. Torres-Farfan. 2012. "Circadian rhythms in the fetus." *Mol Cell Endocrinol* 349 (1):68-75. doi: 10.1016/j.mce.2011.07.039.
- Soliman, A., A. A. Lacasse, D. Lanoix, L. Sagrillo-Fagundes, V. Boulard, and C. Vaillancourt. 2015. "Placental melatonin system is present throughout pregnancy and regulates villous trophoblast differentiation." *J Pineal Res* 59 (1):38-46. doi: 10.1111/jpi.12236.
- Stiess, M., and F. Bradke. 2011. "Neuronal polarization: the cytoskeleton leads the way." *Dev Neurobiol* 71 (6):430-44. doi: 10.1002/dneu.20849.
- Sweet, E. S., and B. L. Firestein. 2008. "Neuronal polarization: old cells can learn new tricks." *Curr Biol* 18 (15):R661-r663. doi: 10.1016/j.cub.2008.06.057.
- Tahirovic, S., and F. Bradke. 2009. "Neuronal polarity." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1 (3):a001644. doi: 10.1101/cshperspect.a001644.
- Tajinda, K., K. Ishizuka, C. Colantuoni, M. Morita, J. Winicki, C. Le, S. Lin, D. Schretlen, A. Sawa, and N. G. Cascella. 2010. "Neuronal biomarkers from patients with mental illnesses: a novel method through nasal biopsy combined with laser-captured microdissection." *Mol Psychiatry* 15 (3):231-2. doi: 10.1038/mp.2009.73.
- Tamura, H., Y. Nakamura, M. P. Terron, L. J. Flores, L. C. Manchester, D. X. Tan, N. Sugino, and R. J. Reiter. 2008. "Melatonin and pregnancy in the human." *Reprod Toxicol* 25 (3):291-303. doi: 10.1016/j.reprotox.2008.03.005.
- Thomas, L., C. C. Purvis, J. E. Drew, D. R. Abramovich, and L. M. Williams. 2002. "Melatonin receptors in human fetal brain: 2-[(125)I]iodomelatonin binding and MT1 gene expression." *J Pineal Res* 33 (4):218-24.
- Torres-Farfan, C., F. J. Valenzuela, M. Mondaca, G. J. Valenzuela, B. Krause, E. A. Herrera, R. Riquelme, A. J. Llanos, and M. Seron-Ferre. 2008. "Evidence of a role for melatonin in fetal sheep physiology: direct actions of melatonin on fetal cerebral artery, brown adipose tissue and adrenal gland." *J Physiol* 586 (16):4017-27. doi: 10.1113/jphysiol.2008.154351.
- Torrey, E. F., J. Miller, R. Rawlings, and R. H. Yolken. 1997. "Seasonality of births in schizophrenia and bipolar disorder: a review of the literature." *Schizophr Res* 28 (1):1-38.
- Trueta, C., and F. F. De-Miguel. 2012. "Extrasynaptic exocytosis and its mechanisms: a source of molecules mediating volume transmission in the nervous system." *Front Physiol* 3:319. doi: 10.3389/fphys.2012.00319.
- Tsuang, M. T., W. S. Stone, and S. V. Faraone. 2000. "Schizophrenia: vulnerability versus disease." *Dialogues Clin Neurosci* 2 (3):257-66.
- van Beuningen, S. F., and C. C. Hoogenraad. 2016. "Neuronal polarity: remodeling microtubule organization." *Curr Opin Neurobiol* 39:1-7. doi: 10.1016/j.conb.2016.02.003.

- Voiculescu, S. E., D. Le Duc, A. E. Rosca, V. Zeca, D. M. Chitimus, A. L. Arsene, C. M. Dragoi, A. C. Nicolae, L. Zagrean, T. Schoneberg, and A. M. Zagrean. 2016. "Behavioral and molecular effects of prenatal continuous light exposure in the adult rat." *Brain Res* 1650:51-59. doi: 10.1016/j.brainres.2016.08.031.
- Voiculescu, S. E., N. Zygouropoulos, C. D. Zahiu, and A. M. Zagrean. 2014. "Role of melatonin in embryo fetal development." *J Med Life* 7 (4):488-92.
- Weinberger, D. R. 1987. "Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia." *Arch Gen Psychiatry* 44 (7):660-9.
- Witt-Enderby, P. A., J. Bennett, M. J. Jarzynka, S. Firestine, and M. A. Melan. 2003. "Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms." *Life Sci* 72 (20):2183-98.
- Witte, H., and F. Bradke. 2008. "The role of the cytoskeleton during neuronal polarization." *Curr Opin Neurobiol* 18 (5):479-87. doi: 10.1016/j.conb.2008.09.019.
- Woo, T. U. 2014. "Neurobiology of schizophrenia onset." *Curr Top Behav Neurosci* 16:267-95. doi: 10.1007/7854_2013_243.
- Yoshimura, T., Y. Kawano, N. Arimura, S. Kawabata, A. Kikuchi, and K. Kaibuchi. 2005. "GSK-3beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity." *Cell* 120 (1):137-49. doi: 10.1016/j.cell.2004.11.012.
- Zlotos, D. P., R. Jockers, E. Cecon, S. Rivara, and P. A. Witt-Enderby. 2014. "MT1 and MT2 melatonin receptors: ligands, models, oligomers, and therapeutic potential." *J Med Chem* 57 (8):3161-85. doi: 10.1021/jm401343c.