



“Efecto de la melatonina sobre la organización de los microfilamentos en la formación de neuritas a través de la activación de ROCK y PCK en las células de Neuroblastoma, N1E-115”

Tesis que para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
Presenta:

Alfredo Bellon Velasco, Médico-cirujano

Tutora Principal:
Dra. Gloria Acacia Benítez King

Tutores:
Dr. Fernando Antón Tay
Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina

México, D.F. Junio 2007.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mi esposa Verónica Merelo

Por creer en mi en todas las facetas de la vida.

A mi madre

Por su invaluable ayuda sin la cual esta tesis no hubiera llegado a feliz termino.

A la Dra. Gloria Benítez King

Por que sin su apoyo y guía este proyecto ni siquiera existiría.

A mi padre y mi hermano

Por estar conmigo en todo momento.

A mis compañeros de laboratorio

Gerardo, Leonardo y David por todo lo que me enseñaron.

A Paty y Martha

Por su disposición y buen humor que hicieron este trabajo más fácil de llevar.

INDICE

RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	6
INTRODUCCIÓN.....	8
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVOS.....	29
METAS.....	30
METODOLOGÍA.....	33
RESULTADOS.....	41
DISCUSIÓN.....	71
CONCLUSIONES.....	84
PERSPECTIVAS.....	85
BIBLIOGRAFÍA.....	86

RESUMEN

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), es una indolamina filogenéticamente conservada que induce la formación de neuritas en la células de neuroblastoma, N1E-115, a través del alargamiento de los microtúbulos causado por el antagonismo de calmodulina y también mediante la reorganización de los filamentos intermedios inducido por la activación directa de la proteína cinasa C (PKC). La formación de neuritas también depende de cambios en el arreglo de los microfilamentos, los cuales participan en la formación de estructuras que preceden a la formación de neuritas como; los filopodios, los lamelopodios y los conos de crecimiento. En este trabajo se estudio el efecto de la melatonina en el rearrreglo de los microfilamentos en etapas tempranas de la neuritogénesis y la posible participación de la PKC y la cinasa-asociada a rho (ROCK), enzima que se encuentra vía abajo en la cascada de señalización de la PKC. Nuestros resultados muestran que la melatonina a una concentración de 1nM, incrementan el número de células de neuroblastoma con filopodios, conos de crecimiento y neuritas largas. Resultados similares fueron obtenidos con el activador específico de la PKC, el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA). Tanto la melatonina como el PMA incrementaron la cantidad de actina filamentosa. Por otro lado, el inhibidor específico de la PKC, la bisindolmaleimida, previno la reorganización de los microfilamentos inducida por la melatonina y el PMA, mientras que el inhibidor de la rho, el C3 o el inhibidor de la ROCK, el Y-27632, abolieron la formación bipolar de las células de neuroblastoma, causando la ramificación de la mismas

con neuritas cortas y delgadas. También se observó que la melatonina y el PMA activan a la PKC y la ROCK, tanto en extractos celulares como en células completas de neuroblastoma. Estos resultados indican que la melatonina incrementa el número de células inmaduras susceptibles a una posterior diferenciación y que en este reclutamiento de células hacia la neuritogénesis temprana inducido por la melatonina, están involucradas tanto la PKC como la ROCK.

ABSTRACT

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is a phylogenetic preserved indolamine which increases neurite formation in N1E-115 neuroblastoma cells through microtubule enlargement elicited by calmodulin antagonism, and intermediate filament reorganization caused by protein kinase C (PKC) activation. Microfilament rearrangements are also necessary for neurite formation and participate in filopodia, lamellipodium and growth cone structure. In this work, we studied the effects of melatonin on microfilament rearrangements at early stages of neurite formation and the likely participation of PKC and the Rho-associated kinase (ROCK), a downstream enzyme in the PKC signaling pathway. The results showed that 1 nM melatonin increased the number of cells with filopodia, growth cones and long neurites. Similar results were obtained with the PKC activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Both melatonin and PMA increased the relative amount of filamentous actin. By contrast, bisindolylmaleimide, the PKC inhibitor abolished microfilament organization elicited by either melatonin or PMA, while the rho inhibitor C3, or the ROCK inhibitor Y-27632, abolished the bipolar morphology of the neuroblastoma cells. Instead, these inhibitors prompted neurite ramification. ROCK activity measured in cell extracts and in whole neuroblastoma cells was increased in the presence of melatonin or PMA. The results indicate that melatonin increases the number of cells with immature neurites and suggests that these neurites can be susceptible to further differentiation. Data also

indicate that PKC and ROCK are involved at initial stages of neurite formation in the mechanism by which melatonin recruits cells for later differentiation.

INTRODUCCIÓN

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) (Figura 1) del griego *melanos* que significa negro o color, es una indolamina filogenéticamente conservada que se encuentra tanto en invertebrados como en vertebrados (Hardeland y col., 1995; Poeggeler y col., 1991; Ardent, 1985). Este indol es lipofílico, lo que le permite cruzar las membranas biológicas (Costa y col., 1995) y es secretado por la glándula pineal (Figura 2) en la fase oscura del fotoperíodo (Reiter, 1991). La melatonina vertida a la circulación general actúa como una hormona y su función principal es la de sincronizar la actividad biológica con el ciclo luz-oscuridad (Reiter, 1991). Se ha descrito su participación en la regulación del ciclo sueño-vigilia (Arendt, 1978) y la respuesta inmunológica (Lissoni y col., 1993). Evidencia reciente ha permitido clasificar a la melatonina como un “autocodie”¹ lo cual significa que tiene una función autocrina debido a que la melatonina es secretada y utilizada al mismo tiempo por las células de la retina (Tan y col., 2003). También hay evidencia de la utilización de este indol por el tejido nervioso circundante a la glándula pineal (Figura 2) por lo que se ha considerado a la melatonina como un “paracode”² lo que significa que tiene una función paracrina (Tan y col., 2003).

La síntesis de melatonina (Figura 3), amina biogénica similar a la serotonina, se lleva a cabo en los pinealocitos a partir del aminoácido triptófano

¹ Autocodie viene del griego (*autos* -> propio y *akos* -> Alivio) y está definido como una sustancia capaz de alterar a las células que la producen.

² Paracode es una sustancia formada y liberada por un grupo de células que altera la función de otras células a nivel local.

e inicia con la hidroxilación de éste en la posición 5 del anillo indólico por la enzima triptófano hidroxilasa. Esta hidroxilación resulta en el 5-hidroxitriptófano el cual es descarboxilado por la enzima descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos para formar a la 5-hidroxitriptamina (5-HT), también conocida como serotonina. A continuación, la 5-HT es acetilada en la cadena lateral por la N-acetiltransferasa, lo cual genera a la N-acetilserotonina. Finalmente, la N-serotonina es metilada en la posición 5 del anillo indólico por la enzima hidroxindol-O-metil transferasa lo cual resulta en la formación de la melatonina (Axelrod, 1974).

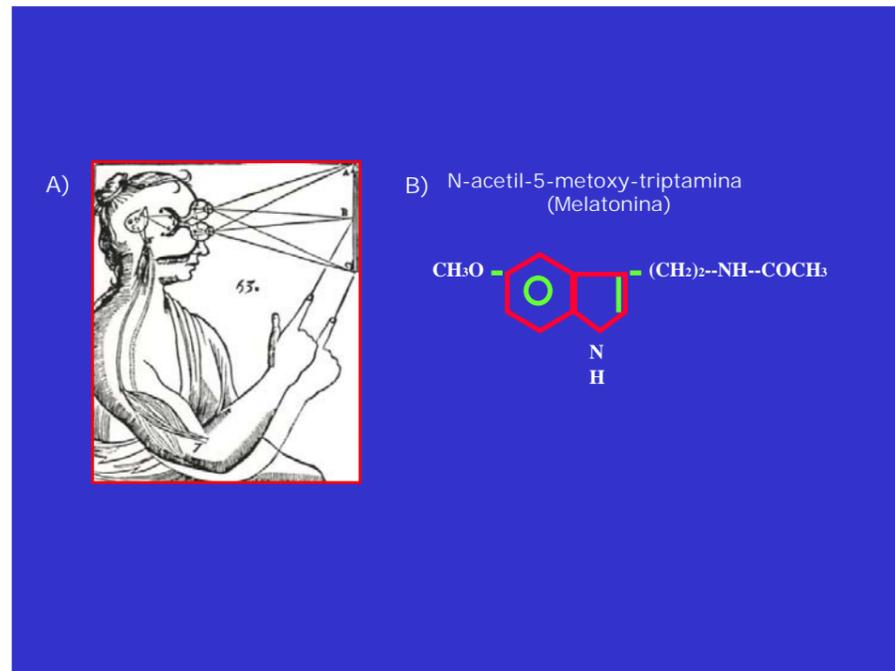


Figura 1. A) Esquema tomado del libro “El tratado del hombre” de René Descartes publicado en 1667, en donde describió que la glándula pineal era considerada el asiento del alma, por estar involucrada en eventos de percepción. B) Estructura química de la melatonina.

Se han descrito tres mecanismos de acción para la transducción de la señal de la melatonina (Figura 4): A través de receptores membranales

(Dubocovich, 1995; Reppert y col., 1994), mediante receptores nucleares (Weissenberg y col., 1995; Becker-Andre y col., 1994) y a través de la interacción directa con proteínas citoplásmicas como la calmodulina (CaM) y la proteína cinasa C (PKC) (Benítez-King y Antón-Tay, 1996, 1997).

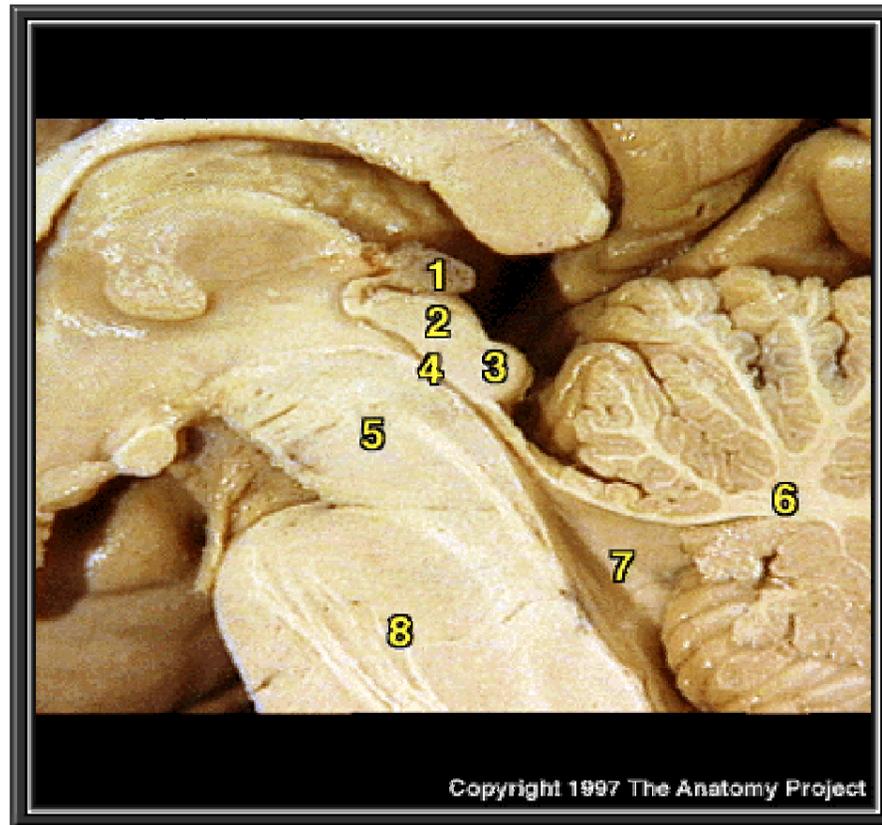


Figura 2. Localización anatómica de la glándula pineal. En la fotografía se observa la glándula pineal (1), el tectum (2 y 3), el acueducto cerebral (4), el mesencéfalo (5), el cerebelo (6), el cuarto ventrículo (7) y el puente (8). Tomado de la página en línea de The Anatomy Project.

La melatonina (Figura 4) se une a receptores localizados en la membrana plasmática (Dubocovich, 1995; Reppert y col., 1994) los cuales

tienen siete dominios transmembranales y se consideran parte de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (Reppert y col., 1994). Mediante estudios de biología molecular y por la afinidad que presentan a 2-[¹²⁵I]-melatonina se han clasificado en mt₁ o receptores de alta afinidad que se unen a su receptor en el rango picomolar y MT₂ o receptores de baja afinidad que se unen a su receptor en el rango nanomolar (Masana y Dubocovich, 2001). Un tercer receptor para melatonina, el receptor MT₃ fue recientemente caracterizado como una quinolona reductasa (Nosjean y col., 2000; 2003). Los receptores para melatonina se encuentran acoplados a las proteínas G inhibitoras que modulan la concentración de AMPc (Brydon y col., 1999; Petit y col., 1999) y por consiguiente la actividad de la proteína cinasa dependiente de AMPc; PKA (Witt-Enderby y col., 1998). Además, el receptor mt₁ participa en la activación de la fosfolipasa C desencadenando la cascada que forma diacilglicerol y promoviendo la activación de la PKC (McArthur y col., 1997, Barrett y col., 1998).

La melatonina (Figura 4) también se une a proteínas nucleares que pertenecen a la familia de los receptores retinoidales (Weissenberg y col., 1995; Becker-Andre y col., 1994). A la fecha se han descrito dos receptores a nivel nuclear RZR/ROR α (NR1F1) y el RZR β (NR1F2) (Carlberg, 2000) a los cuales la melatonina se une en el rango nanomolar (Weissenberg y col., 1995; Becker-Andre y col., 1994). La presencia de estos receptores varía dependiendo del tejido. El receptor NR1F1 se expresa en altas concentraciones

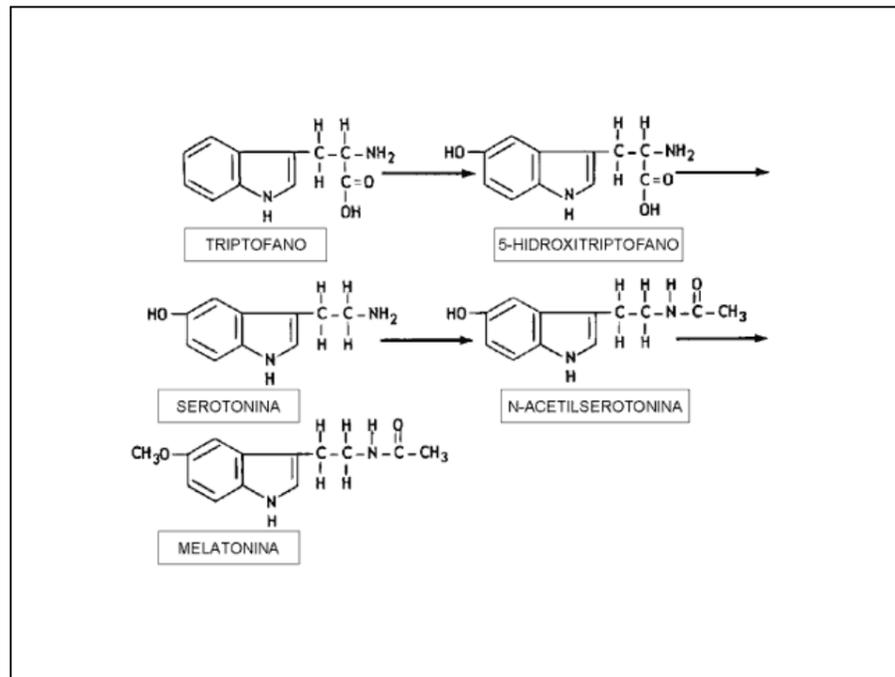


Figura 3. Síntesis de melatonina. La síntesis de melatonina se lleva a cabo a partir del aminoácido triptófano e inicia con la hidroxilación de este en la posición 5 del anillo indólico por la enzima triptófano hidroxilasa. Esta hidroxilación resulta en el 5-hidroxitriptófano el cual es descarboxilado por la enzima descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos para formar a la 5-hidroxitriptamina (5-HT) o serotonina. A continuación, la 5-hidroxitriptamina es acetilada en la cadena lateral por la N-acetiltransferasa, lo cual genera a la N-acetilserotonina. Finalmente, la N-serotonina es metilada en la posición 5 del anillo indólico por la enzima hidroxindol-O-metiltransferasa lo cual resulta en la formación de la melatonina.

en linfocitos B, T y en neutrófilos, así como en la piel (Becker-Andre y col., 1993; Steinmayer y col., 1998), mientras que el receptor NR1F2 se expresa tan solo en la retina y en el Sistema Nervioso Central (SNC) (Becker-Andre y col., 1994; Park y col., 1996; 1997). Los receptores nucleares regulan la transcripción de genes a través de la unión con secuencias específicas de ADN, llamados elementos de respuesta que se localizan en la región promotora de los genes blanco (Glass, 1994). Los genes regulados por los receptores nucleares que

unen melatonina son el gen de la enzima proinflamatoria 5-lipoxigenasa, el gen inhibidor del ciclo celular p21^{WAF1/CIP1} y el gen de la sialoproteína del hueso involucrado en la mineralización ósea (Steinhilber y col., 1995; Schrader y col., 1996).

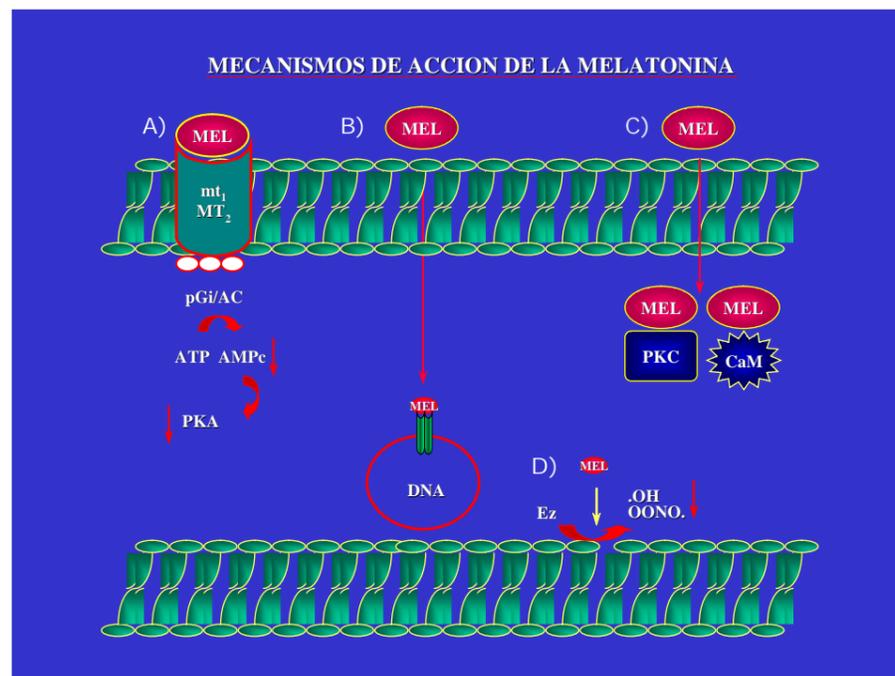


Figura 4. Mecanismos de Acción de la Melatonina. A) Interacción de la melatonina con receptores de membrana, B) con receptores nucleares, C) con proteínas citoplásmicas como la PKC y la CAM y D) la melatonina como captador de radicales libres.

También se ha descrito que la melatonina y sus metabolitos actúan como captadores de radicales libres (Figura 4) (Reiter y col, 1993; Allegra y col., 2003; Guenther y col., 2005; Onuki y col., 2005; Tomas-Zapico y col., 2005). Este indol neutraliza directamente agentes tóxicos como: radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el anión peroxinitrito (OONO^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2),

ácido hipocloroso (HOCl), y el singulete de oxígeno³ (¹O₂) (Reiter, 2003a,b). La interacción de la hormona con especies reactivas involucra la donación de un electrón de la melatonina hacia el radical libre logrando la estabilización de estas moléculas (Tan y col., 2002). Además, la melatonina tiene un efecto antioxidante indirecto mediante la activación de enzimas como la glutatión peroxidasa, la glutatión reductasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y la superóxido dismutasa, (Reiter y col., 1999; 2003a,b) así como a través de la síntesis del glutatión y de la expresión de la enzima gamma-glutamylcisteina sintetasa (Urata y col., 1999). Esta indolamina también se ha visto implicada en el mantenimiento de la integridad funcional de enzimas como la superóxido dismutasa y la catalasa (Reiter, 2003 a,b).

El N1-acetyl-5-metoxikinuramina o AMK es un metabolito de la melatonina con propiedades antioxidantes que reacciona con especies reactivas nitrogenadas (Guenther y col., 2005) mientras que el N1-acetil-N2-formil-5-metoxikinuramina o AFMK otro metabolito de la melatonina, se ha asociado con un posible efecto terapéutico para las porfirias, ya que previene el daño causado al DNA por el estrés oxidativo (Onuki y col., 2005).

La melatonina es capaz de interactuar con proteínas citoplásmicas directamente sin la intervención de receptores membranales (Figura 4). Esta indolamina se une y modula la actividad de la calmodulina (CaM) y de la

³ El oxígeno singlete o singulete de oxígeno (¹O₂) es un compuesto que se genera por absorción de energía electromagnética, la cual invierte transitoriamente el giro (spin) de uno de los dos electrones desapareados del oxígeno, de modo que los giros de los dos electrones desapareados muestran una orientación antiparalela. El oxígeno molecular, estado basal o triplete, es incapaz de aceptar dos electrones directamente, reducción bivalente, porque la adición de un par de electrones antiparalelos se encuentra restringida por los giros paralelos del estado basal. El oxígeno singlete, sin embargo, con sus giros electrónicos antiparalelos no tiene tales restricciones en su reactividad y es muy buen oxidante bivalente frente a muchas biomoléculas.

proteína cinasa C (PKC) (Benítez-King y Antón-Tay, 1996; 1997). A través de este mecanismo, la hormona regula el rearrreglo del citoesqueleto. Mediante el antagonismo de calmodulina, la melatonina induce el alargamiento de los microtúbulos en células de origen neuronal (Huerto-Delgadillo y col., 1994) que culmina con la formación de neuritas (Benítez-King y col., 1990). Además, existe evidencia que sugiere que el rearrreglo en los filamentos intermedios de vimentina también participa en el crecimiento de las neuritas inducido por la melatonina (Benítez-King, 2000). Además, este indol es capaz de inducir la formación de estructuras filamentosas en células no neuronales modificando la estructura del citoesqueleto de actina y tubulina (Witt-Enderby y col., 2000). La melatonina a una concentración de 1nM activa directamente a la PKC pura obtenida de una fracción de cerebro de rata (Antón-Tay y col., 1998), también se ha demostrado que esta hormona induce la activación de la PKC de la fracción citoesqueleto-membranal de células de neuroblastoma, N1E-115 (Benítez-King, 2000). La PKC es una serina-treonina cinasa a la cual se le han descrito doce isoformas (Figura 5) (Poole y col., 2004; Battaini, 2001). La clasificación de esta molécula se basó en las diferencias estructurales y en las condiciones de activación en respuesta a la estimulación de los receptores membranales asociados a fosfolipasa C. Estas doce isoformas, se han distribuido en tres diferentes grupos. Las isoformas dependientes de calcio (α , β I, β II, γ), las cuales necesitan calcio, fosfatidilserina y diacilglicerol para su activación. Las isoformas independientes de calcio (δ , ϵ , η , θ) las cuales necesitan de fosfatidilserina y diacilglicerol para ser activadas y las isoformas

atípicas (ξ , ι/λ , μ , ν), que no requieren calcio ni diacilglicerol, tan solo fosfatidilserina (Nishizuka y col., 1995; Battaini, 2001; Poole y col., 2004).

En estas células de neuroblastoma, la melatonina activa selectivamente a la isoforma α de la PKC pero no a la isoforma ε (Benítez-King y col., 2001). La activación de PKC por melatonina (Antón-Tay y col., 1998), induce cambios en el citoesqueleto de actina como el engrosamiento de fibras de tensión y del anillo cortical en células de origen epitelial (Benítez-King y col., 1990, Antón-Tay y col., 1998) en sincronía con cambios en la concentración de la hormona (Ramírez-Rodríguez y col., 2003).

Este indol además ha demostrado ser útil en el tratamiento del cáncer, no sólo en modelos animales (Blask y col., 2002; Sauer y col., 2001), sino también en los seres humanos. Mediante estudios clínicos se demostró que la melatonina causó la reducción en el crecimiento de los tumores y además prolongó la supervivencia de los pacientes tratados con esta hormona. Esto no se observó en aquellos pacientes en los que solo recibieron tratamientos convencionales contra el cáncer (Lissoni, 2002). Los mecanismos de acción propuestos que explican la acción oncoestática de la melatonina son a través de la disminución intracelular del ácido 13-hydroxiocetadecadienoico (13-HODE), el cual activa la mitosis y como resultado incrementa la proliferación tumoral (Blask y col., 2002). La disminución de la angiogénesis en tumores, el retraso en la transición de la fase G1 a la fase S en el ciclo celular y cambios en la adhesión celular han sido otros mecanismos de acción propuestos

mediante los cuales la melatonina ejerce una acción anticancerígena (Reiter, 2003b).

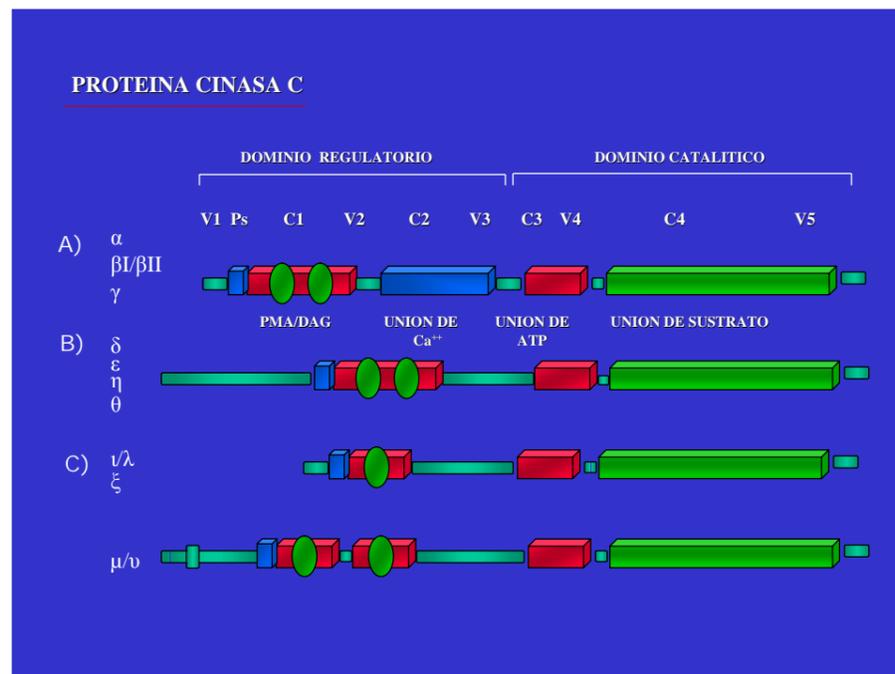


Figura 5. Estructura de la Proteína Cinasa C. A) Isoformas dependientes de calcio, B) Isoformas independientes de calcio, C) Isoformas atípicas.

La melatonina también se ha utilizado con éxito en el restablecimiento del ciclo sueño-vigilia (Dahlitz y col., 1991; Nagtegaal y col., 1998; Kayumov y col., 2001) y el tratamiento del jet-lag (Cardinali y col., 2002).

En el SNC, la melatonina actúa (Antón-Tay y col., 1971) como facilitador de la memoria a corto plazo (Argyriou y col., 1998) y participa en el desarrollo psicomotor normal (Tauman y col., 2002). Además de sus acciones en el desarrollo normal, la melatonina se ha relacionado con la patofisiología de varias enfermedades psiquiátricas como la depresión, la esquizofrenia y algunas demencias como la enfermedad de Alzheimer (Mishima y col., 1999;

Sandyk y Kay, 1990; Brown y col., 1985). También se ha sugerido que la melatonina actúa como un estabilizador del estado de ánimo (Kennedy y col., 1989; McIntyre y col., 1989; Kennedy y col., 1990; Tarquini y col., 1988; Nurnberger y col., 2000; Hallam y col., 2005). En la demencia de tipo Alzheimer, la esquizofrenia y la depresión los niveles de melatonina están disminuidos (Mishima y col., 1999; Ferrier y col., 1982; Fanget y col., 1989; Sandyk y Kay, 1990; Brown y col., 1985; Miles y Philbrick, 1988). También se ha descrito que en estos padecimientos mentales la citoarquitectura neuronal se encuentra alterada al grado de afectar la formación de axones y dendritas (Stockmeier y col., 2004; Chana y col., 2003; Bensimon y Chermat, 1991; Selemon, 2004). Ya que la melatonina tiene un efecto modulador del citoesqueleto y además actúa como captador de radicales libres, esta hormona se ha propuesto como posible agente terapéutico en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, la depresión y la esquizofrenia entre otras (Reiter y col., 1999; Benítez-King y col., 2004; Benítez-King y col., 2005). Su posible eficacia en el tratamiento de ciertas condiciones psiquiátricas también puede estar relacionada con su efecto inductor de la formación de neuritas (Benítez-King y col., 1990; Huerto-Delgadillo y col., 1994) ya que como se mencionó anteriormente, existe evidencia de que en algunas enfermedades psiquiátricas y neurológicas hay una disminución en el número de neuritas (Stockmeier y col., 2004; Chana y col., 2003; Bensimon y Chermat, 1991; Selemon, 2004).

Los filopodios y los lamelopodios, son parte fundamental de los conos de crecimiento y por lo tanto del desarrollo de las neuritas (Figura 6). Estas

estructuras están conformadas principalmente de actina (Luo, 2002; Smith, 1988). La actina, es una de las proteínas más abundantes, tanto en células musculares, como no musculares y se encuentra presente en dos formas: como actina-G o globular y como actina-F o filamentosa (Haugland y col., 1994). La abundancia relativa de estas dos formas está relacionada con los requerimientos celulares dinámicos necesarios para cambiar la estructura celular, inducir la motilidad de ciertas células y para la formación de los conos de crecimiento y de las neuritas, entre otros eventos intracelulares. Los cambios en la concentración de actina-G y actina-F se dan a través de la polimerización de actina, en donde los monómeros de actina se incorporan para formar filamentos. La polimerización de actina *in vitro* se lleva a cabo en tres fases. La primera llamada fase de nucleación, se caracteriza por un periodo en el que la actina G se agrega lentamente en oligómeros inestables y cortos. Una vez que estos oligómeros alcanzan una longitud de tres o cuatro subunidades de actina, entonces actúan como un núcleo, lo cual da origen a la segunda fase conocida como de alargamiento. En esta segunda fase los monómeros de actina-G se unen rápidamente a ambos extremos del núcleo. La incorporación de monómeros de actina induce el crecimiento del filamento. La tercera fase se conoce como de "steady state" o equilibrio dinámico ya que no hay cambio neto en la longitud del filamento de actina. Monómeros de actina se incorporan en un extremo del filamento al mismo tiempo que otros monómeros de actina-G son removidos en el extremo opuesto.

La formación de neuritas inicia con la presencia de un lamelopodio (Figura 6), una estructura en forma de lamela o laminilla formada por una red de actina en el extremo de la membrana de la célula indiferenciada (Dehemelt y Halpain, 2003). Esta estructura provee la adhesión necesaria para que la neurona comience el proceso de formación de neuritas (Da Silva y Dotti, 2002). A continuación los microtúbulos en el interior de la célula se alinean en dirección del lamelopodio (Tang y Goldberg, 2000; Yu y col., 2001; Dehemelt y col., 2003). Posteriormente estos microtúbulos ejercen presión en el lamelopodio recientemente formado, lo cual provoca la separación del lamelopodio del extremo de la membrana. Los microtúbulos en la parte posterior del lamelopodio forman el cuerpo de la neurita. Una vez separado del extremo de la neurita, el lamelopodio se conoce como cono de crecimiento (Dehemelt y Halpain, 2003). Durante esta transformación del lamelopodio en cono de crecimiento los microtúbulos invaden al lamelopodio trayendo consigo mitocondrias, así como otros organelos intracelulares (Dehemelt y Halpain, 2003). Esta diferencia estructural en el cono de crecimiento ha dado origen a su división en una zona periférica donde se encuentra lo que fue el lamelopodio y una zona central. La zona periférica esta formada principalmente por actina, mientras que la zona central esta formada por microtúbulos, mitocondrias, vesículas y otros organelos ausentes en la zona periférica.

El cono de crecimiento es capaz de extender prolongaciones delgadas de actina llamadas filopodios (Figura 6), las cuales están encargadas de explorar el entorno y responder a las señales que se encuentren en su camino

(DaSilva y Dotti, 2002). El cono de crecimiento guía a la neurita la cual continúa extendiéndose y al mismo tiempo adelgazándose debido a que los microtúbulos se arreglan en grupos compactos.

La fuerza propulsora del cono de crecimiento es la polimerización de actina en el extremo terminal de esta estructura, la cual sirve para empujar a la membrana lejos del soma celular (Tilney y col., 1981). Mientras que la miosina esta encargada de mover los filamentos de actina hacia el centro del cono de crecimiento en donde son despolimerizados con el fin de proveer monómeros de actina para continuar la propulsión de la neurita en extensión (Lin y col., 1996). Las miosinas que han sido involucradas en estos procesos son la miosina 1c y la miosina II (Diefenbach y col., 2002; Brown y Bridgman, 2003).

La polimerización de actina es regulada, entre otras proteínas, por la familia de las Rho GTPasas. Actualmente se han identificado más de 20 miembros en esta familia pero las más caracterizadas son la rho, la rac y la cdc42 (Negishi y Katoh, 2005; Luo, 2002), las cuales se han visto implicadas en la formación de fibras de tensión, filopodios y lamelopodios (Meyer y Feldman, 2002). La activación de las Rho GTPasas depende de su asociación con GDP o GTP. Cuando estas enzimas están unidas a GTP se encuentran en estado activo, mientras que cuando están unidas a GDP se encuentran en estado inactivo (Negishi y Katoh, 2002; Luo, 2002). La asociación entre GTP y las Rho GTPasas depende de Factores intercambiables de nucleótido de guanina

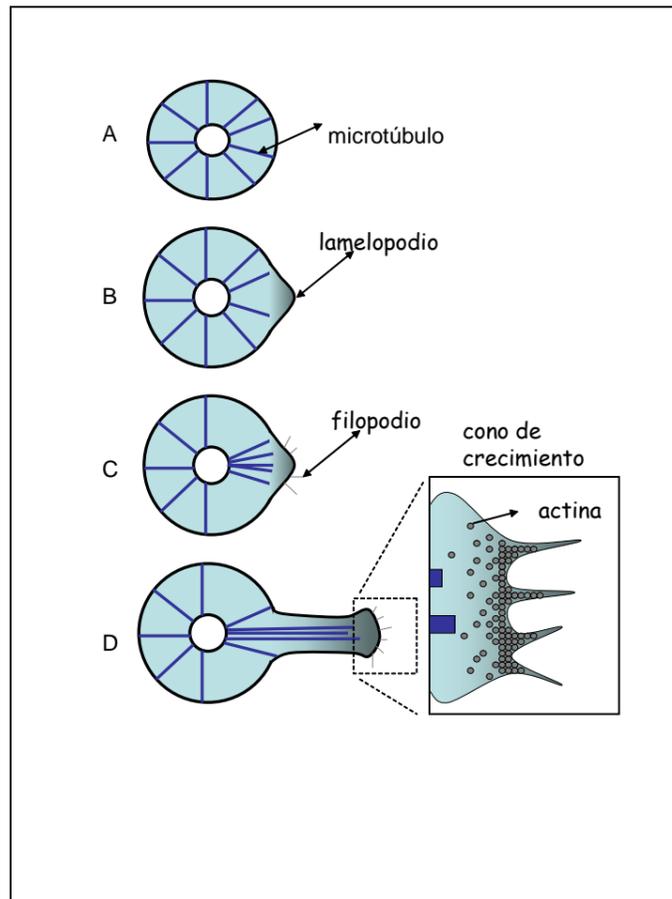


Figura 6. Cambios en el citoesqueleto durante la formación de neuritas. (A) Neuroblasto. (B) Formación de un lamelopodio a través de la reorganización de actina. (C) Los microtubulos se reorganizan hacia el lamelopodio recientemente formado, mientras que filopodios formados de actina se extienden al borde de la membrana. (D) La polimerización de actina y la formación de microtúbulos separan al lamelopodio del borde celular. El lamelopodio una vez separado de la membrana celular se conoce como cono de crecimiento. Modificado de Nat Rev Neurosci. 2002 Sep; 3(9):694-704. Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. Da Silva JS, Dotti CG. Cavalieri Ottolenghi Scientific Institute, Università Degli Studi di Torino, A.O. San Luigi Gonzaga, Regione Gonzole 10, 10024 Orbassano, Torino, Italy.

(Guanine nucleotide exchange factors, RhoGEFs) los cuales unen GTP y remueven GDP de las Rho GTPasas. Por otro lado, las Proteínas activadoras de la GTPasa (GTPase activating proteins, RhoGAPs) inducen la acción GTPasa de las Rho GTPasas y como resultado se hidroliza el GTP quedando la Rho GTPasa asociada a una molécula de GDP (Luo, 2002; Negishi y Katoh, 2002).

Una vez activadas, las Rho GTPasas interactúan con proteínas asociadas directamente con la polimerización y despolimerización de actina (Meyer y Feldman, 2002). La rac y la cdc42 activan al complejo Arp2/3 el cual se une a la actina asociada a difosfato de adenosina o ADP que se encuentra en los filamentos de actina y a partir de este punto el complejo Arp2/3 promueve la incorporación de actina asociada a trifosfato de adenosina o ATP y con esto la polimerización de actina (Meyer y Feldman, 2002; Luo, 2002). La rho por su parte activa a la cinasa-asociada a rho conocida como ROCK (Ishizaki y col., 1996; Leung y col., 1996; Matsui y col., 1996; Narumiya y col., 1997) y esta enzima a su vez activa a la LIM cinasa (Meyer y Feldman, 2002). La LIM cinasa también es activada por rac y cdc42 vía p21-cinasa-activada (PAK) (Manser y col, 1994). La activación de la LIM cinasa resulta en la inhibición de la ADF/cofilina, proteína que remueve a la actina asociada a ADP en los filamentos de actina ya formados (Bamburg y col., 1999). La remoción de la actina asociada a ADP parece promover la polimerización de actina, ya que el ADP asociado a los monómeros de actina se sustituye prontamente por ATP. Los monómeros de actina asociados a ATP favorecen la polimerización

de actina (Bamburg y col., 1999). Por lo tanto, la inhibición de la ADF/cofilina resultado de la activación de la LIM cinasa vía rho, rac y cdc42 debería de resultar en la despolimerización de actina pero no es así. Parece ser que en algunos casos la activación de la LIM cinasa resulta en la polimerización de actina mientras que en otros resulta en la despolimerización de la misma. Esto parece depender del estadio de maduración de la neurona y de la localización de la LIM cinasa dentro de la célula (Wang y col., 2000; Meyer y Feldman, 2002).

Tanto la rho, la rac y la cdc42 se han asociado con la formación e inhibición de la formación de las neuritas. La activación de rho parece inhibir la formación de procesos neuronales mientras que rac y cdc42 promueven su crecimiento (Luo y col., 1994; Kaufmann y col., 1998; Bito y col., 2000; Meyer y Feldman, 2002). Sin embargo, en células de feocromocitoma PC12, rho induce la formación de neuritas mediante la subsecuente activación de rac y cdc42 (Katoh y col., 2000). Por otro lado, la activación de ROCK por rho también se ha asociado a la inhibición de la formación de neuritas (Amano y col., 1998; Hirose y col., 1998; Katoh y col., 1998). Sin embargo, estudios recientes han encontrado que la activación de ROCK esta relacionada con la maduración de las neuritas (Bito y col., 2000). Actualmente, se piensa que la función de rho y ROCK depende del estadio de desarrollo en el que la célula se encuentra (Katoh y col., 2000; Bito y col., 2000).

Existe evidencia que indica la participación de la PKC en la activación de las Rho GTPasas y en la formación de las neuritas, los lamelopodios y los

filopodios. La PKC puede ser activada por los ésteres de forbol, como el 12-miristato 13-acetato (PMA) compuestos lipofílicos que cruzan las membranas biológicas (Castagna y col., 1982). La activación de la PKC, ya sea por él diacilglicerol, que es el compuesto que se produce en respuesta a la estimulación de los receptores acoplados a la fosfolipasa C o por los ésteres de forbol, causa el traslado de la enzima del citosol a la fracción citoesqueleto-membranal o viceversa (Castagna y col., 1982; Zalewski y col., 1990) en donde fosforila a proteínas intracelulares o enzimas que participan en la fisiología celular. Esta enzima se encuentra ampliamente distribuida en el SNC en donde fosforila proteínas involucradas en la diferenciación celular, en el desarrollo neuronal, en la transmisión sináptica y en la regeneración neuronal, entre otros procesos (Liu y col., 1996). Se ha descrito que la activación de la PKC por los ésteres del forbol tales como el PMA induce la formación de las neuritas en las células de neuroblastoma (Mak y col., 2001; Singleton y col., 2000; Zeidman y col., 2002; Fagerstrom y col., 1996). También, se sabe que la activación de esta enzima incrementa la polimerización de actina (Liang y col., 1998; Masson-Gadais y col., 1997). De igual forma, la activación de esta serina-treonina cinasa se relaciona con la formación de conos de crecimiento al modificar la interacción entre los microtúbulos y los microfilamentos (Xiang y col., 2002; Forscher y col., 2001).

La PKC α es activada y al mismo tiempo es capaz de activar a rho, cdc42 y rac (Slater y col., 2001). También se ha demostrado que la presencia de la PKC es indispensable para la activación de ROCK por rho (Barandier y

col., 2003). La activación de cdc42 mediante PKC induce la formación de filopodios (Shigeta y col., 2003). Mientras que la activación de rac a través de la PKC promueve la formación de lamelopodios y la polimerización de actina en neuronas del hipocampo (Pilpel y Segal, 2004).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existe evidencia de que la melatonina interactúa con proteínas intracitoplásmicas como la PKC y la CaM. Mediante esta interacción la melatonina es capaz de inducir cambios a nivel del citoesqueleto. Se ha demostrado que esta indolamina a través del antagonismo de CaM induce el alargamiento de los microtúbulos que resultan en la formación de neuritas y que cambios en los microfilamentos mediante la activación de PKC por melatonina originan el engrosamiento de fibras de tensión. También se ha descrito que la activación de la PKC induce la formación de neuritas en las células de neuroblastoma. De igual forma, la activación de esta serina-treonina cinasa se relaciona con la formación de conos de crecimiento, estructuras que preceden a la formación de neuritas. Por otro lado, se sabe que la familia de las Rho GTPasas regulan la polimerización de actina durante la formación de estructuras que anteceden a la formación de neuritas como los conos de crecimiento, filopodios y lamelopodios. Además existe evidencia de que la PKC alfa, una isoforma presente en las células de neuroblastoma N1E-115, activa a la familia de las Rho GTPasas. Sin embargo, no se sabe si la activación de la PKC inducida por la interacción directa con la melatonina induce cambios en la familia de las Rho GTPasas que promuevan el rearrreglo del citoesqueleto de actina y lleven a la formación de estructuras que preceden a la formación de neuritas como los filopodios, los lamelopodios y los conos de crecimiento. Este trabajo pretende aportar evidencia de que la melatonina a través de la interacción directa con proteínas citoplásmicas como la PKC es capaz de

inducir cambios a nivel de citoesqueleto de actina que preceden y que promueven la formación de las neuritas. También se estudiará la participación de la Rho GTPasa.

La relevancia de la evidencia obtenida en este estudio radica en que si la melatonina incrementa la formación de neuritas durante el desarrollo, entonces existe la posibilidad de que el uso de esta hormona podrían generar axones y dendritas necesarias en algunas enfermedades psiquiátricas para la promoción del restablecimiento de conexiones sinápticas.

HIPÓTESIS

Si la melatonina activa a la PKC y esta enzima participa en la organización de los microfilamentos y la formación de estructuras que preceden y forman neuritas como los filopodios, los lamelopodios y los conos de crecimiento, a través de la interacción con la ROCK, entonces la melatonina al activar a la PKC y a la ROCK inducirá la formación de filopodios, lamelopodios, y conos de crecimiento.

OBJETIVOS

Objetivo General

-Determinar si en el proceso mediante el cual la melatonina induce la formación de neuritas nuevas ocurren cambios en la organización de los microfilamentos, en un modelo de células de neuroblastoma, N1E-115.

Objetivo Particular o Secundario

- Definir la vía de señalización mediante la cual la melatonina estimula la formación de estructuras formadas por actina-F que preceden e inducen la formación de neuritas en células de neuroblastoma N1E-115.

METAS

- Determinar el tiempo óptimo de incubación para que la melatonina induzca la formación de estructuras que anteceden la formación de neuritas como filopodios, lamelopodios y conos de crecimiento en células de neuroblastoma N1E-115.
- Determinar la concentración óptima necesaria para que la melatonina a través de cambios en el citoesqueleto de actina induzca la formación de estructuras que anteceden la formación de neuritas como filopodios, lamelopodios y conos de crecimiento en las células de neuroblastoma N1E-115.
- Determinar la participación de la proteína cinasa C en la formación de filopodios, lamelopodios y conos de crecimiento.
- Determinar la participación de la Rho y la ROCK en la formación de filopodios, lamelopodios y conos de crecimiento.
- Determinar los cambios en la cantidad relativa de la actina-F inducidos por la melatonina y el activador de PKC, el PMA, en las células de neuroblastoma, N1E-115.

- Determinar la participación de los receptores membranales de la melatonina en la formación de filopodios, lamelopodios y conos de crecimiento a través de cambios en el citoesqueleto de actina inducidos por la melatonina.

METODOLOGÍA

Cultivo celular y tratamiento con melatonina

Las células de neuroblastoma de murino N1E-115 (pasaje 70-110) se cultivaron utilizando medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado con 10% de suero de bovino, 5% suero de caballo, adicionando 100UI/ml de penicilina mas 100mg/ml de estreptomicina (Huerto-Delgadillo y col., 1994). Las células se sembraron a una densidad de 20 000 células/cm² sobre cubre objetos de vidrio instalados en cajas de petri de 30 mm de diámetro (Benítez-King, 2000). Las células se cultivaron por 48 horas antes de realizar los experimentos.

Diseño Experimental

Para determinar el tiempo óptimo en el que la melatonina produce cambios en la organización de los microfilamentos en las células de neuroblastoma, las células se incubaron con medio de cultivo DMEM con melatonina 10⁻⁹ M o el vehículo por 1, 3, 6, 9 y 12hrs. Posteriormente las células se procesaron para inmunofluorescencia y análisis de imágenes.

Se realizaron experimentos dosis-respuesta para determinar si la concentración de melatonina capaz de inducir cambios en el citoesqueleto de actina es semejante a la que circula en el plasma o en el líquido cefalorraquídeo. Para esto las células se incubaron 10⁻¹¹, 10⁻⁹, 10⁻⁷, o, 10⁻⁵ M de melatonina o el vehículo por 6hrs.

Con el fin de determinar la participación de la PKC, la rho y la ROCK en los cambios en el citoesqueleto de actina inducidos por la melatonina, las células se incubaron por 6hrs con el agonista de la PKC, el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) 2nM o la melatonina a una concentración de 10^{-9} M. Paralelamente, otras células se preincubaron por 15 minutos con el inhibidor de la PKC; 5 μ M de bisindolilmaleimida, o con el inhibidor de la ROCK, el compuesto Y27632 (Iwamoto y col., 2000), o con el inhibidor de la rho, la exoenzima C3. Posteriormente, las células se incubaron con melatonina 10^{-9} M o PMA 2 nM por 6hrs.

Además, para determinar la participación de los receptores membranales de melatonina en la reorganización de los microfilamentos, las células de neuroblastoma de murino fueron preincubadas por 15 minutos con el antagonista de los receptores membranales de melatonina, el luzindol en concentraciones de 100 nM y 10 μ M. Posteriormente, las células se incubaron con 10^{-9} M melatonina por 6hrs.

La melatonina, el PMA y la bisindolilmaleimida se disolvieron en etanol, vehículo (50 mM Tris, glicerol al 2%, pH 7.4), y agua milli-Q o dimetil sulfóxido (DMSO), respectivamente y se diluyeron en medio de cultivo hasta la concentración deseada. Las células fueron posteriormente procesadas para tinciones por inmunofluorescencia, determinación de actina-F, y los ensayos de actividad de PKC y ROCK.

Microscopía de Fluorescencia

Los cambios en la organización de los microfilamentos inducidos por la melatonina y el PMA se observaron por inmunofluorescencia directa. Las células se cultivaron sobre cubre objetos de vidrio de 18 x 18 mm y se lavaron dos veces con PBS. Posteriormente se fijaron con formaldehído al 3.7% durante 20 minutos. Una vez fijadas, las células se permeabilizaron con tritón X-100 al 1% durante 20 minutos para finalmente teñir las células con faloidina rodaminada. A continuación, los cubre objetos se montaron sobre porta objetos de vidrio en medio de montaje "Anti-fade" (Molecular Probes). Las preparaciones se observaron en un microscopio óptico Olympus con epifluorescencia. Las imágenes se adquirieron con una video cámara Hitashi, para ser analizadas posteriormente con el programa "Image Pro Express Plus de "Media Cybernetics".

En cada experimento se contaron treinta campos con aproximadamente veinte células por cada campo dando un total de alrededor de 600 células contadas por experimento. Cada experimento se realizó por duplicado lo cual dio por resultado un número de células contadas de aproximadamente 1200. Estos experimentos se realizaron en cuatro distintas ocasiones. En cada campo se contó el total de células y el número de células que tenían diferentes arreglos de microfilamentos tales como lamelopodios, las fibras de tensión en las células extendidas, los filopodios, los conos de crecimiento y los microfilamentos distribuidos en las células con neuritas de menos de dos veces el soma neuronal y células con neuritas de más de dos veces el soma

neuronal. El resultado final de los 30 campos contados de cada uno de los seis rearrreglos de microfilamentos fue sumado. El resultado de la suma de todos los campos de cada uno de los rearrreglos de actina se ajustó al número total de células contadas el cual se consideraba como el 100%, de esta manera se obtiene un porcentaje que representa cada uno de los rearrreglos de actina en nuestro universo de alrededor de 600 células por experimento.

Determinación de la cantidad de actina-F por espectrofluorometría

Las células se sembraron sobre placas multipozos de Nunc a una concentración de 20 000 células/cm². Posteriormente se fijaron con formaldehído al 3.7% durante 20 minutos. A continuación se procedió a permeabilizarlas con Tritón X-100 al 1% durante 20 minutos, para luego incubar durante una hora con faloidina rodaminada a una concentración de 4µM. Pasado este tiempo, se retiró el exceso de faloidina rodaminada lavando con PBS (NaCl 0.128M, Na₂HPO₄ 0.010M, KH₂PO₄ 0.005M, pH 7.2). Finalmente, se adicionó metanol por doce horas a una temperatura de -20 °C, para extraer, la faloidina rodaminada acoplada a la actina-F. La cantidad de faloidina rodaminada unida a actina-F se determinó por espectrofluorometría en un espectrofluorómetro Shimadzu a una λ_{ex} 520 nm y a λ_{em} 563 nm (Goeckeler y Wysolmerski, 1995).

Obtención de una fracción enriquecida de microfilamentos

Las células se lavaron con una solución con una alta concentración de sal (Na_2HPO_4 0.010M, KCL 0.1M, pH 7.2) durante 30 minutos y posteriormente se incubaron con una solución de lisis (tritón X100 al 1%, aprotinina/leupeptina 0.025 mg/ml, fenilmetilsulfonil fluoruro 0.010M, ortovanadato de sodio 2×10^{-4} M e inhibidores de proteasas al 1%). Los extractos obtenidos se separaron por centrifugación en gradientes de percoll (1:1 v/v) a 11 750 rpm durante 45 minutos a 4° C. Estos fueron calibrados con marcadores de densidad y la fracción que correspondía a los microfilamentos presentó una densidad de 1.06 g/ml. La fracción se lavó dos veces con la solución de alta sal y se resuspendió en una solución que contenía NaCl 0.5M, EDTA 0.002M, glicerol 10%, tritón X 100 1%, SDS 0.2%, leupeptina 25 $\mu\text{g/ml}$, aprotinina 25 $\mu\text{g/ml}$, e inhibidores de proteasas al 1%, ortovanadato de sodio 2×10^{-4} M, deoxicolato de sodio 0.5% en tris-HCl 0.04 M pH 7.6 (Owaribe y Masuda, 1982).

Determinación de la actividad de la proteína cinasa C

La actividad de la PKC se determinó midiendo la incorporación de fosfato radioactivo al sustrato específico de esta enzima, el péptido sintético MBP (proteína básica de mielina). Se realizaron mezclas de reacción utilizando, 25mM de tris pH 7.4, 20 μM de ATP, 25 $\mu\text{Ci/ml}$ [γ - ^{32}P] ATP (3000 Ci/mMol) como donador de grupos fosfato, 20mM MgCl_2 , 50 μM MBP, 1mM CaCl_2 o 5mM EGTA en un volumen final de 25 μl .

Como fuente de enzima se utilizó una fracción enriquecida de microfilamentos obtenida de las células N1E-115. La fosforilación no específica se determinó en presencia de 20 μM del péptido sintético de PKC que es un inhibidor específico de la actividad de las isoformas de PKC calcio-dependientes (Yashuda y col., 1990). Las mezclas se incubaron por cinco minutos a 30° C con 10 μM de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) y 2.8 mg/ml de fosfatidilserina (FS), así como con melatonina 1nM. Se utilizó el inhibidor de la PKC, la bisindoleinmaleimida y el vehículo como control (20 mM de tris a pH 7.2 y 2% de glicero, diluido en medio de cultivo). La reacción se inició por la adición de [γ - ^{32}P] ATP. Después de cinco minutos de incubación, se tomaron alícuotas de 5 μl que se aplicaron en papel de fosfocelulosa. Posteriormente, el papel de fosfocelulosa con las alícuotas de la reacción, se lavó en tres ocasiones con ácido fosfórico 0.075M. Finalmente, se midió la incorporación de ^{32}P al péptido básico de mielina atrapado en el papel de fosfocelulosa, mediante un contador de centelleo líquido Beckman (Witt y Roskoski, 1975).

Determinación de la actividad de la ROCK

La actividad de la ROCK se determinó utilizando extractos de células de neuroblastoma N1E-115 como fuentes de la cinasa. Los extractos celulares se obtuvieron a partir de las células de neuroblastoma sembradas a una densidad de 20 000 células/ cm^2 en cajas de petri de 60mm. Una vez alcanzada la confluencia, las células se lavaron en dos ocasiones con una solución que contenía PBS (descrito en párrafos anteriores). Posteriormente, las células

fueron desprendidas con una solución que contenía Tris 0.050M, pH 7.2, EGTA 5×10^{-4} M, EDTA 5×10^{-4} M, 2-mercaptoetanol 0.002 M y PMSF 0.001mM. A continuación las células se homogeneizaron durante 30 segundos con un ultrasonicador de Cole Parmer a 40 Hz por 60 segundos y finalmente se incubaron en hielo por 30 minutos (Antón-Tay y col., 1998).

El péptido sintético S6 de la cinasa de la miosina, se usó como sustrato para la ROCK (Alabed y col., 2006). Las muestras de reacción consistieron de buffer de cinasa (25 mM Tris, pH 7.4, 20 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 20 μ M ATP y 25 μ Ci/mL γ - ^{32}P -ATP) con 2 μ g de proteína obtenida del homogenado celular y el péptido sintético S6 de la cinasa de la miosina (30 μ M) en un volumen final de 25 μ L. Las mezclas de reacción se incubaron por 30 minutos a 30 °C con el vehículo, o la melatonina 10^{-9} M, o el PMA 2nM. De manera paralela otros grupos de células se preincubaron por 20 minutos a con el inhibidor específico de la PKC, la bisindolilmaleimida 5 μ M, o el inhibidor de la rho el compuesto C3 10 μ M, o el inhibidor de la ROCK el compuesto Y27632 10 μ M (Iwamoto y col., 2000). Estas preincubaciones fueron seguidas de incubaciones con la melatonina 10^{-9} M o el PMA 2 nM por 30 minutos. La reacción enzimática se inició con la adición del γ - ^{32}P -ATP. Después de 10 minutos de incubación la reacción se detuvo depositando una alícuota de 5 μ l de la reacción en papel de fosfocelulosa (Wallis y col., 2000). Posteriormente, los papeles con la muestra se lavaron en tres ocasiones con ácido fosfórico 0.075M. Finalmente, se midió la incorporación de ^{32}P al péptido básico de mielina atrapado en el papel de fosfocelulosa, mediante un contador de centelleo líquido Beckman (Witt y

Roskoski, 1975). La melatonina y el péptido sintético S6 cinasa se disolvieron en 30 μ L de etanol.

Cuantificación de Proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Lowry utilizando albúmina sérica de bovino como estándar (Lowry y col., 1951).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante Student's *t*-test. Los resultados se expresaron como medias \pm S.E.M. Una *P* < 0.05 se consideró como significativa.

RESULTADOS

Curva de Concentración de Faloidina Rodaminada

La faloidina es una toxina producida por el hongo *Amanita phalloides*, que se une de manera específica a la actina filamentosa o actina-F. Con el fin de determinar la concentración óptima de faloidina rodaminada que permitiera la observación detallada de la organización de los microfilamentos en filopodios, lamelopodios, fibras de tensión, conos de crecimiento y neuritas, en las células de neuroblastoma N1E-115, se realizó una curva de concentración. Utilizamos 20, 40, 80 y 160nM de faloidina rodaminada (Figura 7). Las imágenes con concentraciones de faloidina rodaminada de 20 y 40nM muestran el citoesqueleto de actina con nitidez. Con estas concentraciones es posible observar filamentos compuestos por actina así como los incrementos en la intensidad de fluorescencia y en la intensidad del color que sugieren diferencias en la cantidad de actina organizada en microfilamentos. En la figura 7 recuadro FR 20nM y FR 40nM se observa el borde de las células de neuroblastoma de color amarillo intenso, mientras que el resto del soma celular se observa en rojo, sugiriendo que existe una mayor cantidad de actina en la zona que corresponde al anillo cortical. En el soma celular y en las neuritas es posible observar a la actina organizada en filamentos (Figura 7). Las concentraciones de faloidina rodaminada de 80 y 160nM, no permiten observar a los microfilamentos debido a que la intensidad de fluorescencia es muy alta y tan solo se observa un color amarillo intenso en toda la superficie celular

(Figura 7). Considerando que no existe una diferencia palpable entre las concentraciones de 20 y 40nM y con el fin de optimizar recursos se decidió utilizar 20nM de faloidina rodaminada para teñir las preparaciones.

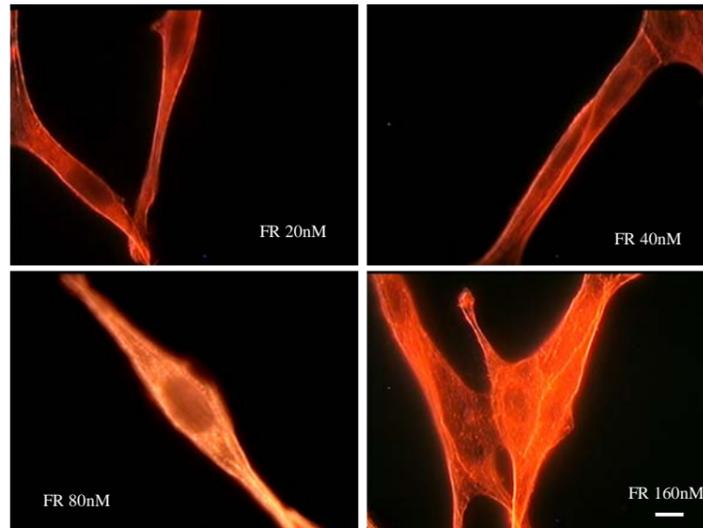


Figura 7. Determinación de la concentración óptima de faloidina rodaminada. Las células de neuroblastoma N1E-115 se sembraron sobre cubre objetos y se fijaron con 3.7% de formaldehído. Posteriormente, se tiñeron con 20 (FR 20nM), 40 (FR 40nM), 80 (FR 80nM) y 160nM (FR 160nM) de faloidina rodaminada. Barra = 10 μ m.

Caracterización de los arreglos de los microfilamentos en las células N1E-115

Una vez establecida la concentración de faloidina rodaminada con la que se observaron nítidamente los microfilamentos, se procedió a determinar los diferentes arreglos de microfilamentos que se encuentran en las células de neuroblastoma N1E-115 cultivadas en condiciones control (Hall y col., 2001). Se describieron seis diferentes arreglos; células extendidas, lamelopodios, filopodios, conos de crecimiento, neuritas con un tamaño menor a dos veces el soma celular y neuritas con un tamaño mayor a dos veces el soma celular (Figura 8). Estos seis arreglos de microfilamentos son los comúnmente observados en las diferentes etapas por las que pasan las células de origen neuronal durante la formación de neuritas. En la figura 8A se observa una célula de neuroblastoma extendida. En el borde celular la intensidad de fluorescencia es mayor que en el soma celular lo que sugiere una mayor cantidad de actina en la zona que corresponde al anillo cortical, mientras que en el interior de la célula se observa la actina organizada en filamentos. En el recuadro B (Figura 8) se observa un lamelopodio. En esta estructura localizada en el borde celular se encuentra una mayor intensidad de fluorescencia. Los lamelopodios están formados por una red de actina y tienen una forma de malla (Dotti y col., 1988). La formación de un lamelopodio es el primer paso en la formación de neuritas (Dotti y col., 1988; Da Silva y Dotti, 2002; Tang y col., 2000; Yu et al, 2001). En el recuadro C también de la figura 8 se observa una célula de neuroblastoma con filopodios a lo largo del borde celular. Estas

estructuras están formadas por filamentos de actina que se extienden a través de la membrana celular y hacia el espacio extracelular (Da Silva y Dotti, 2002; Meyer y Feldman, 2002; Luo, 2002). En la figura 8D, se observa una célula de neuroblastoma con neuritas y un incremento en la intensidad de fluorescencia en las puntas de estas neuritas que corresponden a los conos de crecimiento. Estos conos son estructuras formadas por redes de actina que se encuentran en la parte más distal de las neuritas (Dehmelt y Halpain, 2004). Finalmente, los recuadros E y F de la figura 8, muestran células de neuroblastoma con neuritas. En el recuadro E se observan células en las que las neuritas se extienden en direcciones opuestas y son de un tamaño menor a dos veces el soma neuronal, mientras que en el recuadro F se muestran células en las que las neuritas son de un tamaño mayor a dos veces el soma neuronal.

Curso Temporal

Una vez caracterizados los arreglos de actina F presentes en las células N1E-115, se procedió a incubar las células con 1nM de melatonina, (la concentración fisiológica circulante en el plasma durante la noche), durante un tiempo semejante al que la melatonina es secretada a la circulación general, es decir por 1, 3, 6, 9, y 12 horas (Figura 9). La organización de los microfilamentos observada en cada tiempo de incubación con melatonina 1nM se comparó con la organización observada en las células incubadas con el vehículo o sin tratamiento (en condiciones control). En condiciones basales se encontraron los seis arreglos de microfilamentos que preceden a la formación

de neuritas. Estos incluyen: células extendidas, células con filopodios, células con lamelopodios y células con conos de crecimiento. Además, se observaron células de neuroblastoma con neuritas con un tamaño menor al de dos veces el soma celular y células con neuritas con un tamaño de más de dos veces el soma celular (Figura 9). No hubo cambios entre las células incubadas con el vehículo y las células en condiciones control. En las células tratadas con melatonina se observó un incremento de 10% en células con arreglos de actina en conos de crecimiento a las tres horas (Figura 9). Mientras que a las seis horas, se observó un incremento del 6% en células con filopodios y un incremento del 14% en células con neuritas con un tamaño de más de dos veces el soma celular (Figura 9). También se observó una disminución del 9% en el número de células con arreglos de microfilamentos en forma extendida y una disminución del 13% en el número de células con neuritas con un tamaño menor a dos veces el soma celular (Figura 9). A las nueve y doce horas de incubación con melatonina, el incremento en células con arreglos de microfilamentos con neuritas con un tamaño de más de dos veces el soma se observó nuevamente. Sin embargo, no hubo cambios en el porcentaje de células con filopodios (Figura 9). Con estos mismos tiempos de incubación (9 y 12hrs), también se observó una disminución del 9% en el número de células con arreglos de microfilamentos extendidos y una disminución del 13% en el número de células con neuritas con menos de dos veces el soma celular (Figura 9). Estos resultados sugieren que la melatonina induce la formación de

neuritas precedida por la formación de filopodios, lamelopodios y conos de crecimiento.

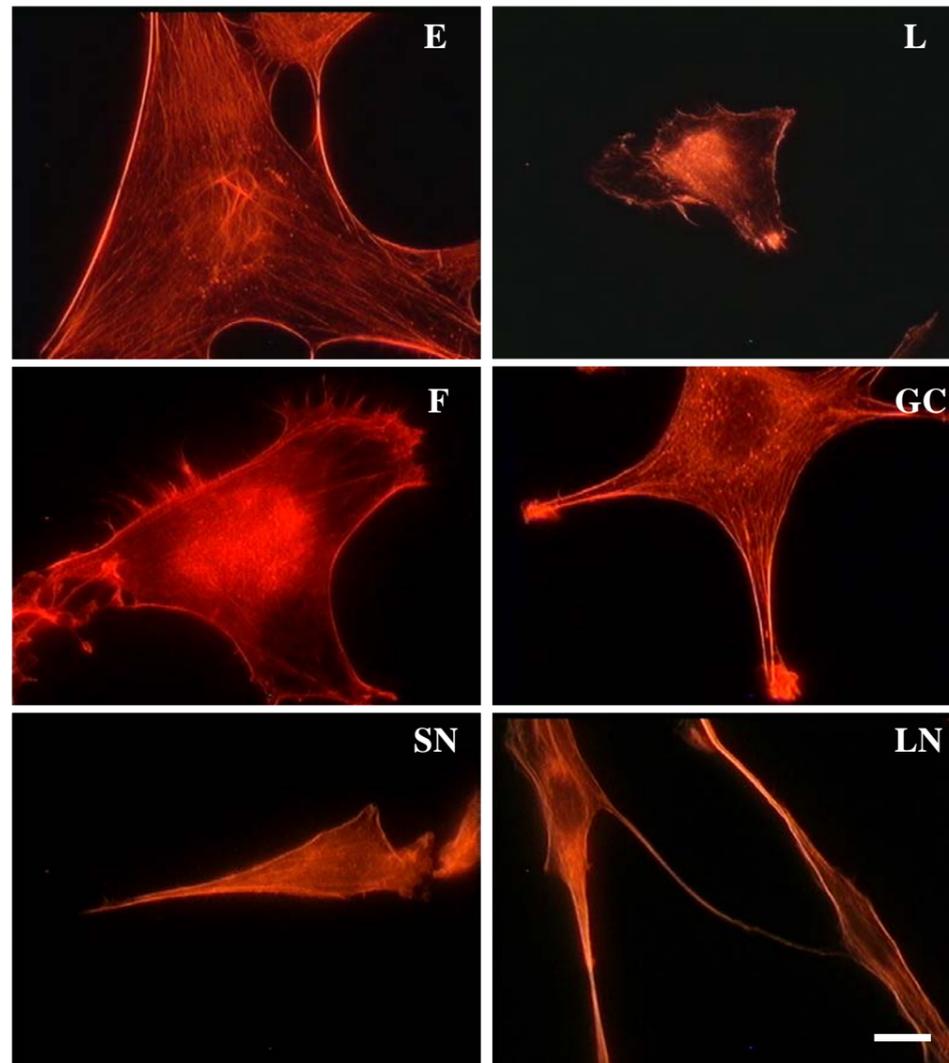


Figura 8. Arreglos de microfilamentos presentes en las células de neuroblastoma N1E-115. Las células de neuroblastoma N1E-115 se sembraron sobre cubre objetos y se fijaron con 3.7 % de formaldehído. Posteriormente, se tiñeron con 20 nM de faloidina rodaminada para caracterizar la organización de los microfilamentos. Células extendidas (E), células con lamelopodios (L), células con filopodios (F), células con conos de crecimiento (GC), células con neuritas con un tamaño menor a dos veces el soma neuronal (SN), células con neuritas con un tamaño de más de dos veces el soma neuronal (LN). Barra = 10 μm .

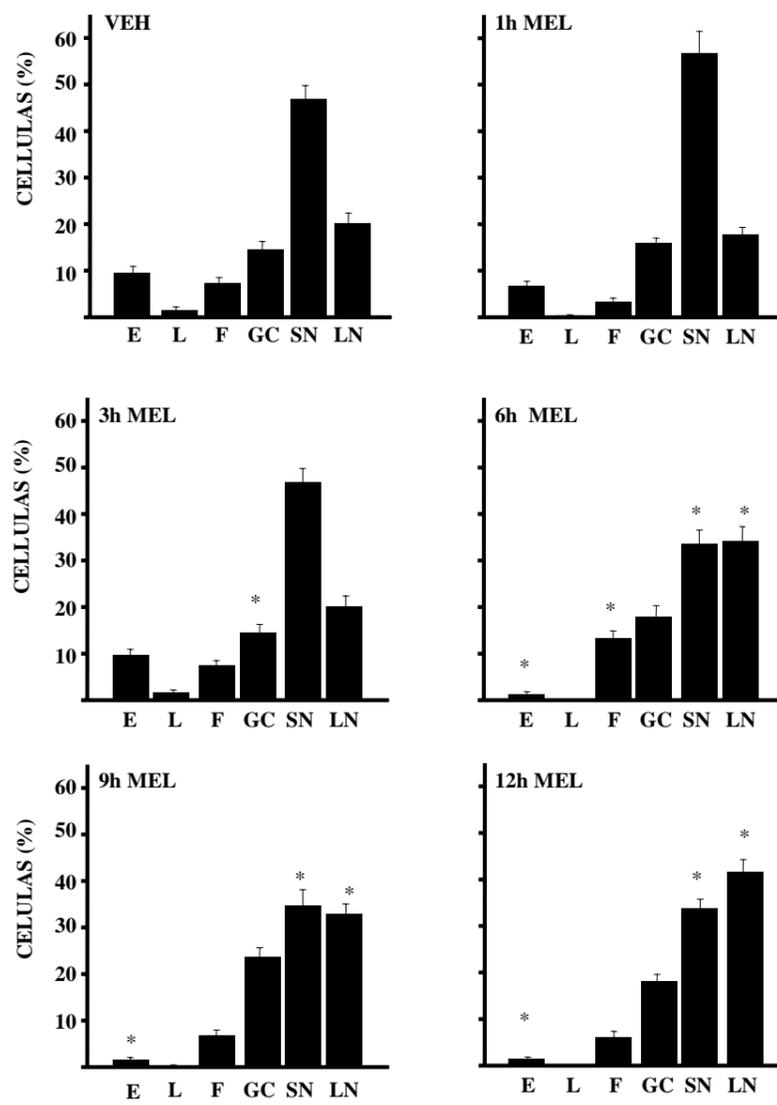


Figura 9. Curso temporal de los efectos de la melatonina sobre el arreglo de los microfilamentos en las células de neuroblastoma N1E-115. Las células de neuroblastoma N1E-115 se sembraron sobre cubre objetos y se incubaron con el vehículo (VEH) o 1 nM de melatonina (MEL) por 1, 3, 6, 9 y 12 horas. A continuación, las células se tiñeron con 20 nM de faloidina rodamina y se contó el número de células en campos obtenidos al azar. Los resultados representan la media \pm S.E.M. de uno de seis experimentos realizados por duplicado. Células extendidas (E), células con lamelopodios (L), células con filopodios (F), células con conos de crecimiento (GC), células con neuritas con un tamaño menor a dos veces el soma neuronal (SN), células con neuritas con un tamaño mayor de más de dos veces el soma neuronal (LN). Los asteriscos representan las diferencias significativas comparadas con el vehículo. * $P < 0.05$.

Curva Dosis-respuesta

Se realizó una curva dosis-respuesta (Figura 10) para determinar la concentración óptima de melatonina con la que produce el arreglo de los microfilamentos. Para este propósito, las células de neuroblastoma N1E-115 se incubaron durante 6 horas en presencia de melatonina 10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-5} M o del vehículo. A continuación, los microfilamentos se tiñeron con faloidina rodaminada y se analizaron campos obtenidos al azar. Estos experimentos se graficaron en forma de histogramas en donde se consideró al total de la población celular como el 100 por ciento y se contó el número de células con arreglos de microfilamentos en células extendidas con fibras de tensión, filopodios, lamelopodios, conos de crecimiento, y neuritas de menos de dos veces el soma celular y neuritas de más de dos veces el soma celular. En las células tratadas con cualquiera de las concentraciones de melatonina 10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-5} M se observó una disminución en el porcentaje de células extendidas en comparación con las células incubadas en condiciones control (Figura 10). En las células incubadas con 10^{-9} M melatonina se observó un incremento de 11% de células con filopodios y un incremento también del 11% de células con neuritas con un tamaño mayor a dos veces el soma celular (Figura 10). Al mismo tiempo, se observó una disminución de células extendidas y de células con neuritas con un tamaño menor a dos veces el soma celular. Las células incubadas con concentraciones de melatonina de 10^{-7} y 10^{-5} M mostraron cambios similares con incrementos en el porcentaje de células con filopodios de alrededor del 11% e incrementos del 13 y 15% con

concentraciones de melatonina de 10^{-7} y 10^{-5} M, respectivamente (Figura 10). De igual manera que en la células incubadas con 10^{-9} M de melatonina, en las células incubadas con 10^{-7} y 10^{-5} M de esta indolamina, se observó una disminución en el porcentaje de las células extendidas y las células con neuritas de menos de dos veces el soma celular (Figura 10). Estos resultados sugieren que en este modelo, la melatonina es capaz de inducir la formación de estructuras de actina que preceden a la formación de neuritas así como la extensión de neuritas tanto a concentraciones de melatonina circulantes en plasma durante la noche como a concentraciones significativamente mayores como las encontradas en el SNC (Skinner y Malpoux, 1999).

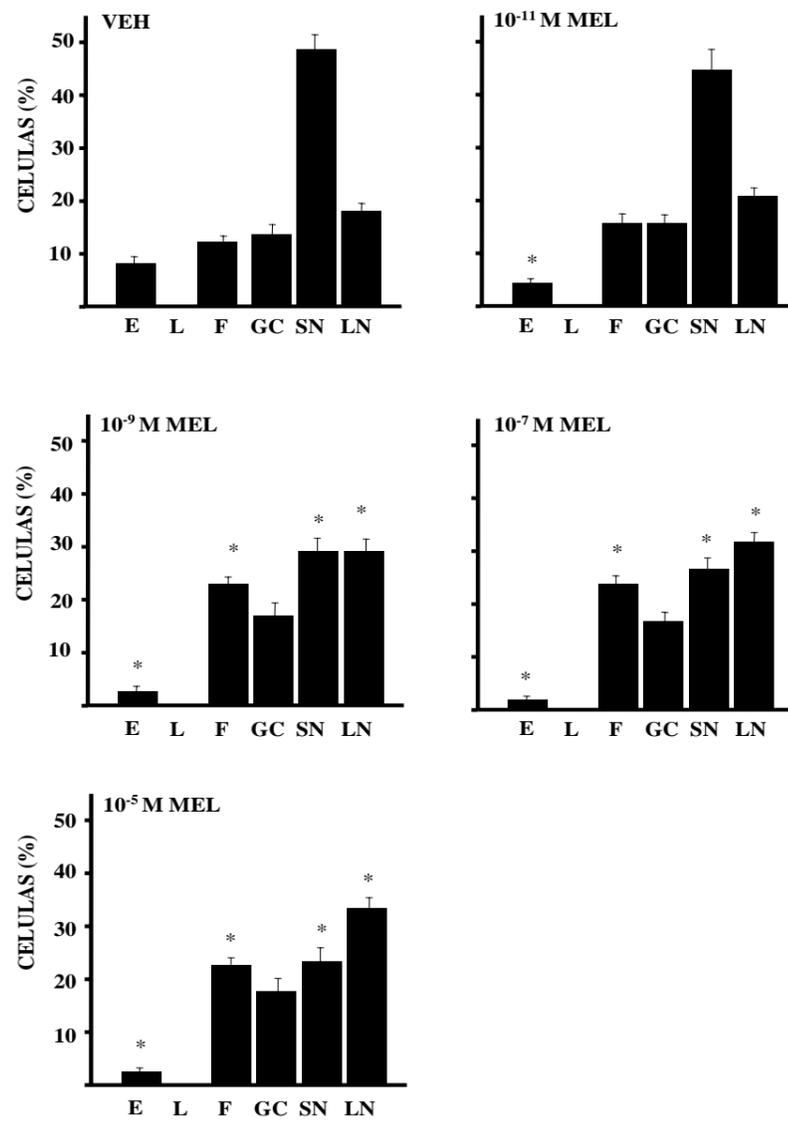


Figura 10. Curva dosis-respuesta de los efectos de la melatonina sobre los microfilamentos en las células de neuroblastoma N1E-115. Las células de neuroblastoma N1E-115 se sembraron sobre cubre objetos de vidrio y se incubaron con vehículo (VEH) y con concentraciones de melatonina de 1×10^{-11} (MEL 1×10^{-11}), 1×10^{-9} (MEL 1×10^{-9}), 1×10^{-7} (MEL 1×10^{-7}) y 1×10^{-5} (MEL 1×10^{-5}) por 6 horas. Posteriormente, las células se tiñeron con 20 nM de faloidina rodamina y se contó el número de células en campos obtenidos al azar. Los resultados representan la media \pm S.E.M. de uno de tres experimentos realizados por duplicado. Células extendidas (E), células con lamelopodios (L), células con filopodios (F), células con conos de crecimiento (GC), células con neuritas con un tamaño menor a dos veces el soma neuronal (SN), células con neuritas con un tamaño mayor a dos veces el soma neuronal (LN). Los asteriscos representan las diferencias significativas comparadas con el vehículo. * $P < 0.05$.

Asociación de la PKC con los microfilamentos de actina

Para demostrar que la PKC esta asociada la actina-G en las células de neuroblastoma N1E-115, se realizó una tinción simultanea de actina y de esta enzima, utilizando un anticuerpo anti-actina y RIM acoplado a rodamina (Figura 11), que es un compuesto que se une de manera específica a la PKC (Koyama y col., 2002, Yokoyama y col., 1998). El RIM acoplado a rodamina-tiñe de rojo, mientras que la actina se tiñó con un anticuerpo anti-actina y con un segundo anticuerpo acoplado a fluoresceína que tiñe en verde y que reconoce al primer anticuerpo. En el recuadro A de la figura 11 se observa la actina como puntos verdes distribuida en el soma celular, mientras que en el recuadro B se puede observar la distribución del RIM también a lo largo y ancho del soma celular como puntos rojos. En el recuadro C se observa el empalme de ambas tinciones. En esta microfotografía se puede apreciar los puntos de empalme en color amarillo sobre toda la superficie del neuroblastoma (Figura 11). El índice de co-localización fue de 0.9, el cual se determinó meditante con la ecuación de Perarson. Este coeficiente indica un alto porcentaje de co-localización entre ambas proteínas en las células de neuroblastoma, N1E-115.

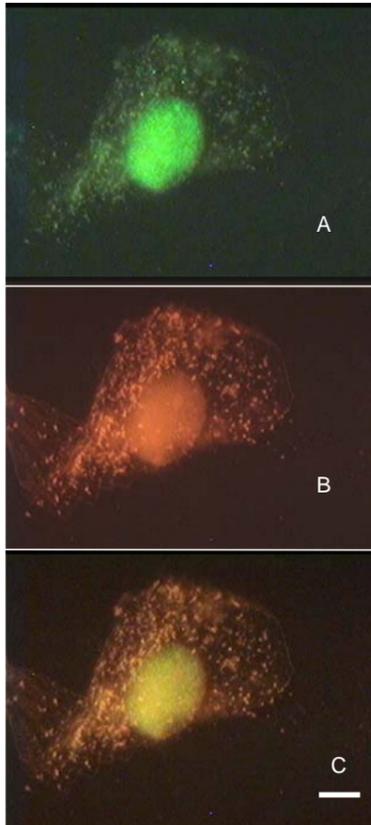


Figura 11. Distribución de la PKC y de la actina en las células de neuroblastoma, N1E-115. Las células de neuroblastoma se sembraron sobre cubre objetos y se tiñeron con un segundo anticuerpo acoplado a fluoresceína después de haber incubado las células con un primer anticuerpo anti-actina (A) y con el compuesto RIM acoplado a rodamina que se une específicamente a la proteína cinasa C (B). La microfotografía en el recuadro C muestra el empalme de las dos tinciones. Barra = 10 μm .

Participación de la PKC en la formación de filopodios, lamelopodios, conos de crecimiento y neuritas inducidos por la melatonina

Con el objeto de determinar la participación de la PKC en la formación de filopodios, lamelopodios, conos de crecimiento y neuritas, inducidas por la melatonina, las células N1E-115 se incubaron con el agonista de PKC, el PMA y con el inhibidor de esta enzima, la bisindolilmaleimida (Figura 12) (Eriksson y col., 1993, Renart y col., 1995, Fagerstrom y col., 1996). En las células tratadas con melatonina o con el éster del forbol, PMA, se observó un incremento en el porcentaje de células con filopodios de alrededor de 9%, con neuritas con más de dos veces el soma celular de 7%, así como una disminución en el porcentaje de células extendidas del 1% y una disminución en el porcentaje de células con neuritas con menos de dos veces el soma celular del 13% como se puede observar en los histogramas de la figura 12. En las células incubadas con el PMA también se observó un incremento de 7% en el porcentaje de células con conos de crecimiento que no se observó en las células incubadas con la melatonina (Figura 12). Las células preincubadas con el inhibidor de la PKC y tratadas con la melatonina o el PMA no presentaron diferencias comparadas con el vehículo o el control (Figura 12). Estos resultados sugieren que la PKC participa en los cambios inducidos por melatonina en la organización de los microfilamentos.

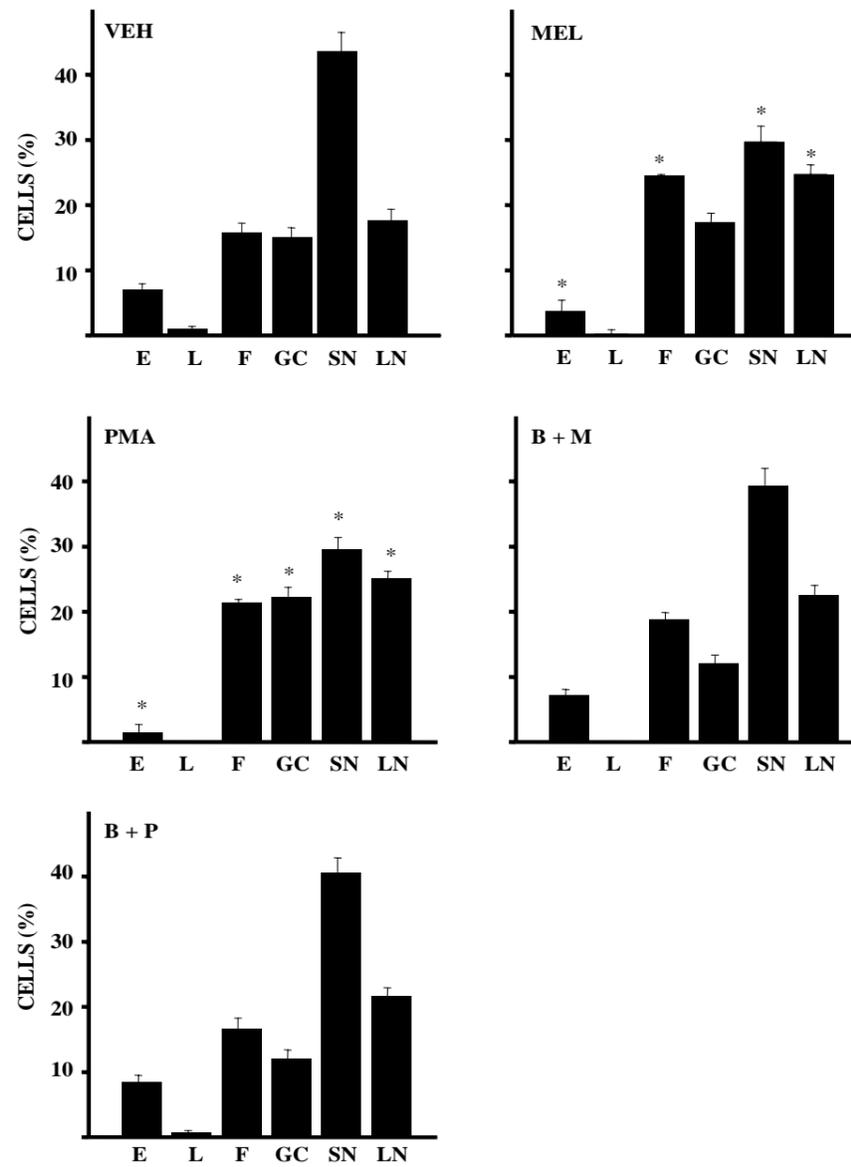


Figura 12. Participación de la PKC en la formación de filopodios, lamelopodios, conos de crecimiento y neuritas inducida por la melatonina. Las células de neuroblastoma N1E-115 se sembraron sobre cubre objetos y se incubaron con el vehículo (VEH), 1 nM de melatonina (MEL), 2 nM de PMA, por 6 horas, o se preincubaron por 15 minutos con 5 μ M de bisindolilmaleimida seguido de la incubación con 1 nM de melatonina (B + M) o 2 nM de PMA (B + P) por 6 horas. Las células fueron teñidas con 20 nM de faloidina rodaminada y se contaron en campos obtenidos al azar. Los resultados representan la media \pm S.E.M. de uno de tres experimentos realizados por duplicado. Células extendidas (E), células con lamelopodios (L), células con filopodios (F), células con conos de crecimiento (GC), células con neuritas de un tamaño menor a dos veces el soma neuronal (SN), células con neuritas con un tamaño mayor a dos veces el soma neuronal (LN). Los asteriscos representan las diferencias significativas comparadas con el vehículo. * $P < 0.05$.

Determinación de la actividad de la PKC en las células N1E-115 incubadas con melatonina

Con el fin de corroborar la participación de la PKC en los cambios en la organización de los microfilamentos inducido por la melatonina en la célula, N1E-115, se midió la actividad de esta enzima en una preparación enriquecida de microfilamentos (Figura 13). La actividad de la PKC se determinó por medio de la incorporación de fosfato radiactivo al péptido básico de la mielina, un sustrato específico de la PKC (Yasuda y col., 1990). Como se puede observar en la figura 13, las células incubadas con la melatonina, o con el activador específico de la PKC mostraron una actividad enzimática significativamente mayor que la del vehículo con diferencias de 150 y 250 picomolas/mg de proteína respectivamente (Figura 13). Por otro lado, en las células preincubadas con el inhibidor de la PKC, la bisindolilmaleimida, el aumento en la actividad de la enzima se bloqueó. Lo que sugiere que la activación de la PKC asociada a los microfilamentos esta involucrada en los cambios inducidos por la melatonina.

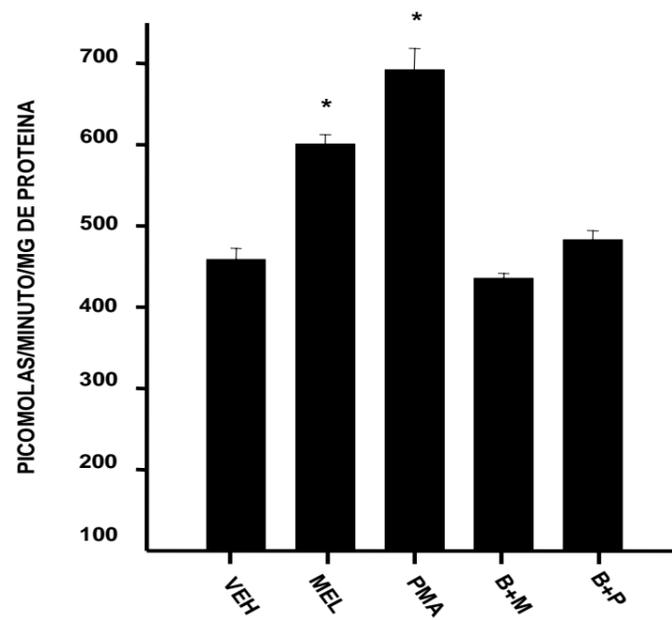


Figura 13. Estimulación de la actividad de la PKC inducida por la melatonina en una preparación enriquecida de microfilamentos. Las células de neuroblastoma, N1E 115 sembradas sobre cajas de Petri fueron tratadas para obtener una preparación enriquecida de microfilamentos. Se tomaron alícuotas de esta preparación y microfilamentos se incubaron con el vehículo (VEH), 1nM de melatonina (MEL), 2 nM de PMA o se preincubaron con 5 μ M del inhibidor de la PKC; la bisindolilmelaimida (BIS), para posteriormente ser tratados con 1nM de melatonina (B + M) o con 2 nM de PMA (B + P). Esta gráfica representa la media \pm S.E.M. de uno de tres experimentos realizados por cuadruplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas comparados con el vehículo ($P < 0.05$).

Caracterización de la participación de los receptores membranales en los cambios en la organización de microfilamentos inducidos por la melatonina

Se ha descrito la presencia de receptores membranales para melatonina mt_1 en las células N1E-115 de neuroblastoma murino (Bordt y col., 2001). Con el fin de determinar si estos receptores participan en las etapas que anteceden a la formación de las neuritas y en el alargamiento de estas estructuras inducidas por la melatonina, las células se preincubaron por 20 minutos con 100nM y 10 μ M del antagonista de los receptores membranales para melatonina; el luzindol (N-acetil-2-benzilriptamina) (Dubocovich, 1988) seguido de la incubación con 10⁻⁹ M de melatonina por 6 horas (Figura 14). Estas células se compararon con las células incubadas con el vehículo, en condiciones control y con células incubadas solo con 10⁻⁹ M de melatonina. Las células preincubadas con luzindol no mostraron ninguna diferencia significativa cuando se compararon con las células incubadas solo con 10⁻⁹ M de melatonina (Figura 14). Por lo tanto, el luzindol, antagonista de los receptores mt_1 y MT_2 para melatonina no bloquea los cambios a nivel de actina que induce la melatonina y que resulta en la formación y alargamiento de neuritas en el modelo en células de neuroblastoma N1E-115.

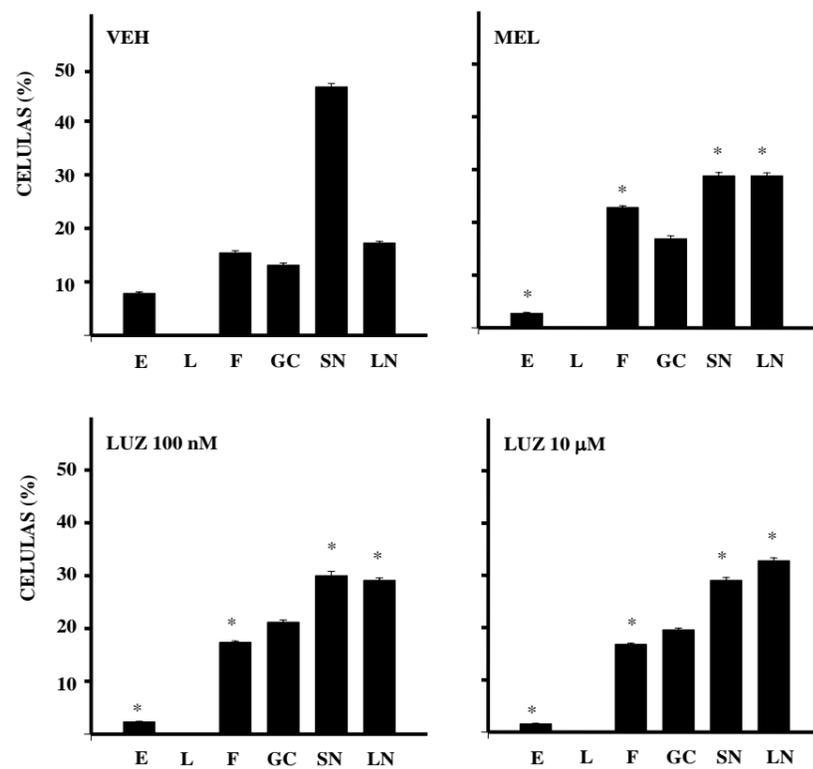


Figura 14. Participación de los receptores membranales para melatonina en el mecanismo por el que la melatonina estimula la formación de conos de crecimiento, lamelopodios y neuritas. Las células de neuroblastoma N1E-115 sembradas sobre cubre objetos se incubaron con el vehículo (VEH), 1 nM de melatonina (MEL) por 6 horas, o se preincubaron por 20 minutos con 100 nM (LUZ 100nM) o 10 μM (LUZ 10μM) de luzindol (N-acetil-2-benzilriptamina) seguido de la incubación con 1 nM de melatonina por 6 horas. Las células fueron teñidas con 20 nM de faloidina rodamina y se contaron en campos obtenidos al azar. Los resultados representan la media ± S.E.M. de uno de tres experimentos realizados por duplicado. Células extendidas (E), células con lamelopodios (L), células con filopodios (F), células con conos de crecimiento (GC), células con neuritas de un tamaño menor a dos veces el soma neuronal (SN), células con neuritas de un tamaño mayor a más de dos veces el soma neuronal (LN). Los asteriscos representan las diferencias significativas comparadas con el vehículo. * $P < 0.05$.

Cuantificación de la Actina-F por espectrofluorometría

Con el fin de determinar si los cambios en la organización de los microfilamentos inducidos por melatonina se acompañan de la polimerización de actina, se determinó la cantidad relativa de actina-F por espectrofluorometría. En un primer experimento se determinó la concentración óptima de metanol para extraer la faloidina rodaminada unida a la actina-F de las células de neuroblastoma, N1E-11E. Se utilizaron tres porcentajes diferentes de metanol reportados previamente en la literatura (Haugland y col., 1992, Howard y Oresajo, 1985), 50%, 80% y 100% (Figura 15). Con 50% de metanol no se extrajo la faloidina rodaminada total, ya que el uso posterior de metanol al 100% en estas mismas células evidenciaba restos de faloidina rodaminada. Con 80 y 100% de metanol, se extrajo la faloidina rodaminada total, pero con el 100% el error estándar obtenido fue muy grande debido muy probablemente a la evaporación del metanol (Figura 15). Así que se utilizó metanol al 80%. Por ejemplo, con metanol al 50% se extrajeron valores de intensidad de fluorescencia relativa de alrededor de 15, mientras que con metanol al 80 y 100% los valores de la intensidad de fluorescencia relativa que se obtenían de la faloidina rodaminada extraída fueron de alrededor de 35 y 42 respectivamente, como se puede observar en la figura 15.

A continuación se hizo una curva de concentración con faloidina rodaminada (Figura 16) con el objeto de determinar la concentración óptima de este compuesto para detectar cambios en la concentración de la actina-F. Se compararon células incubadas sin el inductor de la polimerización de actina

contra células incubadas con el inductor de la polimerización de actina, el PMA (Liang y col., 1998, Masson-Gadais y col., 1997). Ambos grupos se incubaron con concentraciones crecientes de faloidina rodaminada. Las concentraciones de este compuesto fluorescente utilizadas fueron 0.2, 0.5, 2, 4, 6, 8, 10 μ M (Figura 16). La figura 16 representa la gráfica de la intensidad de fluorescencia relativa normalizada entre miligramos de proteína y las concentraciones crecientes de falodina rodaminada. Con concentraciones menores a 0.5 μ M no se observan cambios entre células incubadas con el inductor de la polimerización de actina y células incubadas en condiciones control como se observa en la figura 16. Incubaciones con concentraciones de falodina rodaminada entre 0.5 y 6 μ M muestran claramente diferencias en intensidad de fluorescencia relativa entre células incubadas con PMA y células control, como se puede observar en la figura 16 y con más detalle en el recuadro localizado en la parte inferior de la derecha de la gráfica. Concentraciones de este compuesto fluorescente ente 8 y 10 μ M tampoco mostraron diferencias significativas. Por lo tanto se decidió utilizar una concentración de 4 μ M de faloidina rodaminada para determinar diferencias en la concentración de actina-F.

Con el fin de descartar cualquier pegado inespecífico de la faloidina rodaminada se hicieron experimentos en los que se utilizó faloidina fría (sin rodamina) previamente a la utilización de faloidina rodaminada. En estos experimentos observamos que no existía pegado inespecífico.

Como se mencionó en las líneas anteriores, se ha descrito que el PMA induce la polimerización de actina a través de la activación de la PKC en células en cultivo (Liang y col., 1998, Masson-Gadais y col., 1997). Con el fin de determinar la concentración óptima de PMA para la estimular la polimerización de actina en las células N1E-115, y utilizar este resultado como control positivo, se hizo una curva dosis-respuesta (Figura 17) con concentraciones de PMA de 2, 20, 50 y 100nM. La mayor diferencia en los valores de intensidad de fluorescencia relativa entre miligramo de proteína cuando se compararon las células incubadas con PMA contra el vehículo fue con una concentración de PMA de 2nM. En la figura 17 se muestra la curva de concentración. Se puede observar que a concentraciones mayores de PMA, disminuye la polimerización de actina, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura en cuanto a que el PMA a altas concentraciones es tóxico para la célula (Cartee y col., 2002; Vincent y col., 2000; Jones y col., 1997).

Una vez determinada las concentraciones óptimas de faloidina rodaminada para marcar la actina-F y de PMA para estimular la polimerización de actina, las células de neuroblastoma, N1E-115, se incubaron con melatonina 1nM o, con PMA 2nM por seis horas. Las células N1E-115 se preincubaron con bisindolilmaleimida, el inhibidor específico de la PKC (Eriksson y col., 1993, Behrens y col., 1995, Fagerstrom y col., 1996) para luego agregar ya sea melatonina o PMA (Figura 18). Todos los grupos tratados se compararon con el vehículo y el control. No hubo diferencias entre el vehículo o el control. En las células incubadas con PMA o melatonina se encontró un incremento en la

intensidad de fluorescencia relativa entre miligramos de proteína del 20% comparado con el control y el vehículo, lo cual corresponde a un incremento en el porcentaje de actina-F en estas células (Figura 18). En el caso de las células preincubadas con bisindolilmaleimida en las que posteriormente se adicionó el PMA o la melatonina, no se observó el incremento observado en presencia de la MEL o el PMA como se puede observar en la figura 18. Estos resultados sugieren que la reorganización de los microfilamentos inducidos por la melatonina o el PMA están asociados a con un incremento en la polimerización de actina.

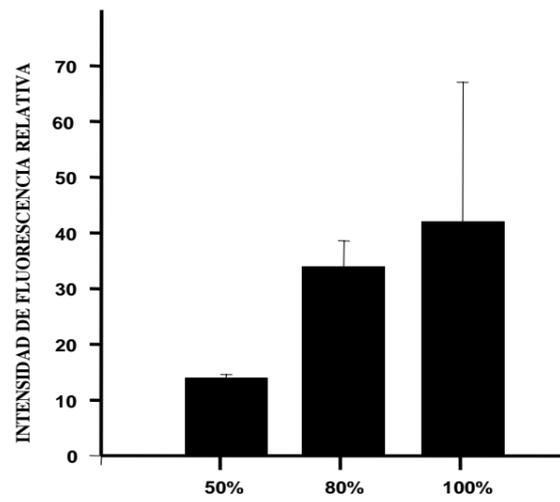


Figura 15. Extracción con metanol de la faloidina rodaminada unida a actina-F. Las células de neuroblastoma, N1E-115 se sembraron sobre placas multipozos y se incubaron con 4 μ M de faloidina rodaminada. Posteriormente, se mantuvieron a una temperatura de -20° C durante 12 horas con metanol al 50, 80 y 100%. La faloidina rodaminada extraída con el metanol se determinó en un espectrofluorómetro como se describió en Métodos. Los resultados se normalizaron entre la cantidad de proteína detectada en cada pozo. La gráfica muestra la media \pm S.E.M. de cinco experimentos realizados por cuadruplicado.

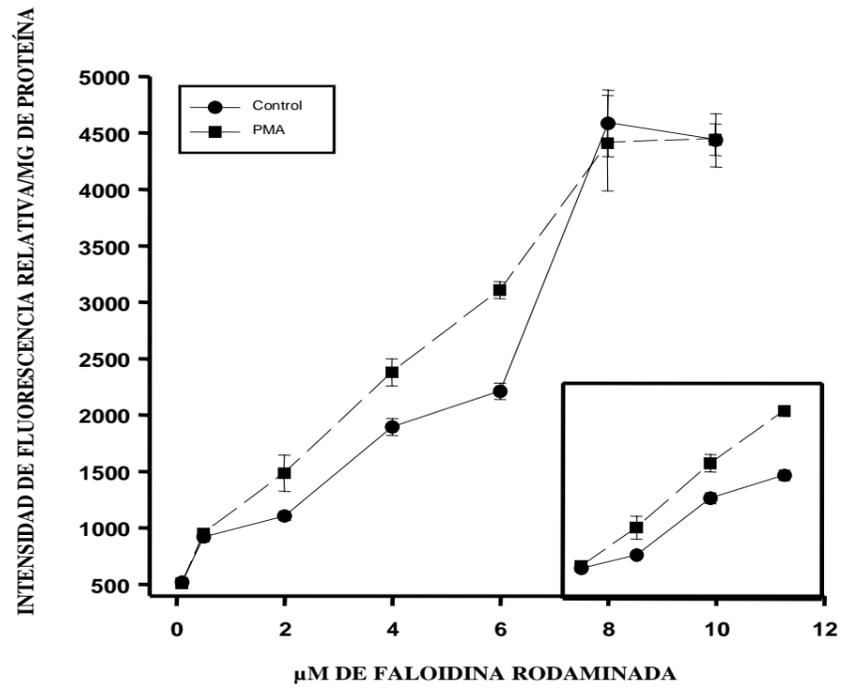


Figura 16. Curva de unión de falodina rodamina a actina-F. Las células de neuroblastoma, N1E-115 se sembraron sobre placas multipozos y se incubaron con 2 nM de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) para estimular la polimerización de actina o se mantuvieron en condiciones control. Posteriormente se adicionaron concentraciones de 0.2, 0.5, 2, 4, 6, 8, y 10 μ M de falodina rodamina tanto a las células incubadas con el PMA como a las células en condiciones control. A continuación, las muestras se leyeron en un espectrofluorómetro para determinar la intensidad de fluorescencia relativa. La gráfica muestra la media \pm S.E.M. de tres experimentos realizados por cuadruplicado. En el recuadro se muestran con más detalle las concentraciones entre 0.5 y 6 μ M de falodina rodamina.

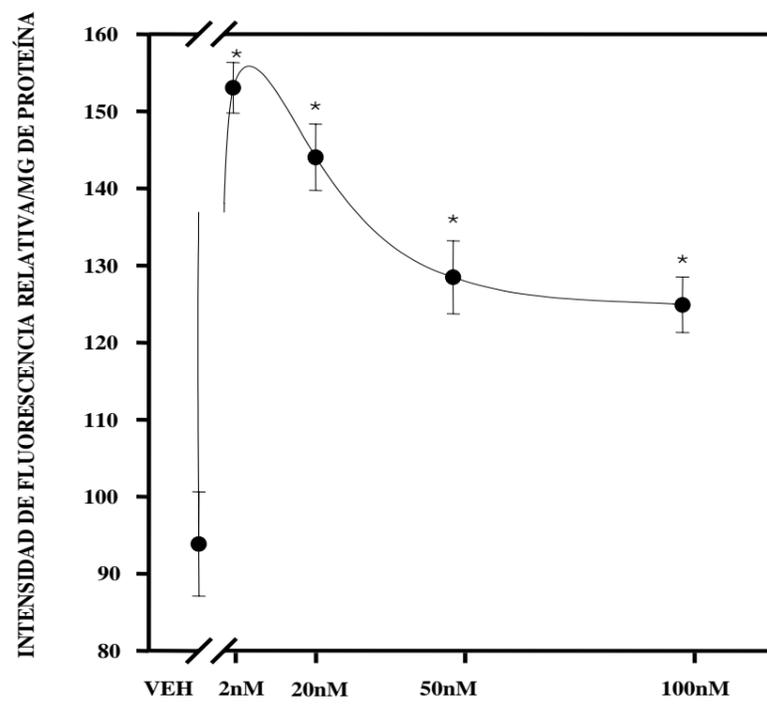


Figura 17. Determinación de la cantidad óptima de PMA para estimular la polimerización de actina. Las células de neuroblastoma, N1E-115 se sembraron sobre placas multipozos y se incubaron con concentraciones de 2, 20, 50, y 100 nM de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA). Posteriormente, a las células se les añadió 4 μ M de faloidina rodaminada, la cual se extrajo con metanol al 80 %. La cantidad de faloidina rodaminada extraída con metanol se determinó por espectrofluorimetría. Los datos se normalizaron con la cantidad de proteína determinada en cada pozo. La gráfica representa la media \pm S.E.M. de tres experimentos realizados por cuadruplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas comparadas con el vehículo. * $P < 0.05$.

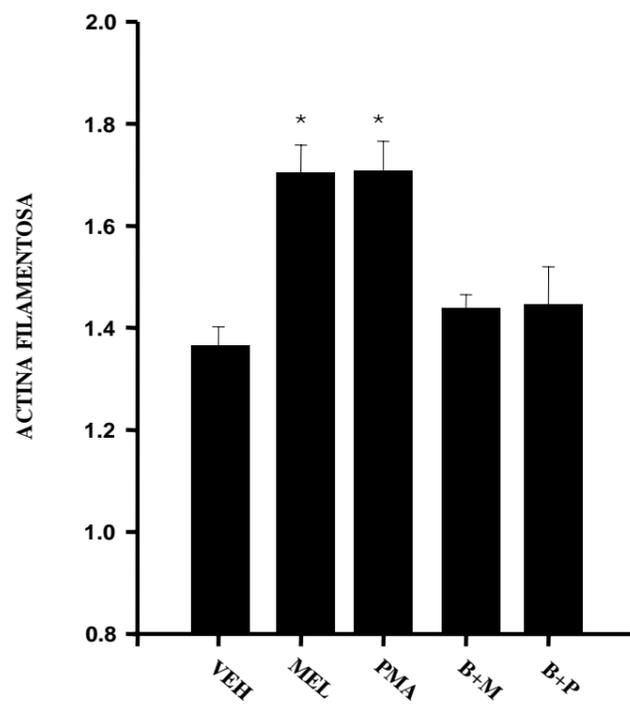


Figura 18. Cuantificación de actina-F por espectrofluorometría. Las células de neuroblastoma, N1E-115 se sembraron sobre placas multipozos y se incubaron por 6 horas con el vehículo (VEH), 1nM de melatonina (MEL), 2.5 nM de forborl 12-miristato 13-acetato (PMA), o se preincubaron con 5 μ M del inhibidor de la PKC; la bisindolilmelaimida, para posteriormente ser tratadas con 1 nM de melatonina (B + M), o 2 nM de PMA (B + P) por 6 horas. A continuación las células se tiñeron con faloidina rodaminada y se determinó la cantidad de actina-F como se describió en Métodos. Los resultados representan la media \pm S.E.M. de uno de dos experimentos realizados por cuadruplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas comparadas con el vehículo. * $P < 0.05$.

Participación de la rho y la ROCK en la formación de filopodios, lamelopodios, conos de crecimiento y neuritas inducidos por melatonina

Con el fin de determinar la participación de la rho y la ROCK en la formación de filopodios, lamelopodios, conos de crecimiento y neuritas inducidas por la melatonina, las células de neuroblastoma N1E-115 se incubaron con el inhibidor específico de la rho, el compuesto C3 y con el inhibidor específico de la ROCK, el compuesto Y27632. En los grupos de células incubadas ya sea con el inhibidor de la rho o con el inhibidor de la ROCK se observó la extensión y la ramificación de las neuritas que es un índice de una estructura neuronal madura, señalado con flechas blancas en la figura 19. En las células incubadas con la melatonina o el PMA la estructura celular es bipolar en su mayoría y se observan los conos de crecimiento señalados con flechas amarillas en la figura 19. Cuando se inhibió ya sea la rho o la ROCK antes de añadir la MEL o el PMA, se observó la maduración de las células N1E-115, con la aparición de múltiples ramificaciones señaladas con flechas blancas en la figura 19. La participación de rho/ROCK se corroboró midiendo la actividad de esta enzima utilizando como sustrato el péptido S6 de la miosina (Alabed y col., 2006). La actividad de la ROCK se midió en ensayos in vitro utilizando extractos celulares como fuente de la enzima y tratados con los inhibidores de rho y ROCK o con la melatonina y el ester del forbol, PMA. También se determinó la actividad de la ROCK en los homogeneizados de las células tratadas con los inhibidores o con la indolamina durante 6 horas. Los resultados obtenidos utilizando los homogeneizados de las células incubadas

en las condiciones descritas y con los extractos celulares fueron muy similares. La actividad basal de la ROCK fue de 33 ± 0.58 pmol/ μ g de proteína/min. Esta actividad se incrementó en un 40% con la presencia de la melatonina y en un 50% con la presencia del PMA como se puede observar en la figura 20. El aumento en la actividad de la ROCK se previno en presencia de inhibidores de la PKC, de la rho y de la ROCK (Figura 20). La actividad basal de la ROCK disminuyó en presencia de todos los inhibidores utilizados (Figura 20). Estos resultados, en conjunto con los resultados obtenidos en los experimentos previos, sugieren que la ROCK participa en la formación de filopodios, lamelopodios y conos de crecimiento inducidos por la melatonina, pero además parecen indicar que la activación de la ROCK por la melatonina mantiene a las células en un estado inmaduro y que la inhibición de ROCK induce la maduración y ramificación de las células de neuroblastoma, N1E-115.

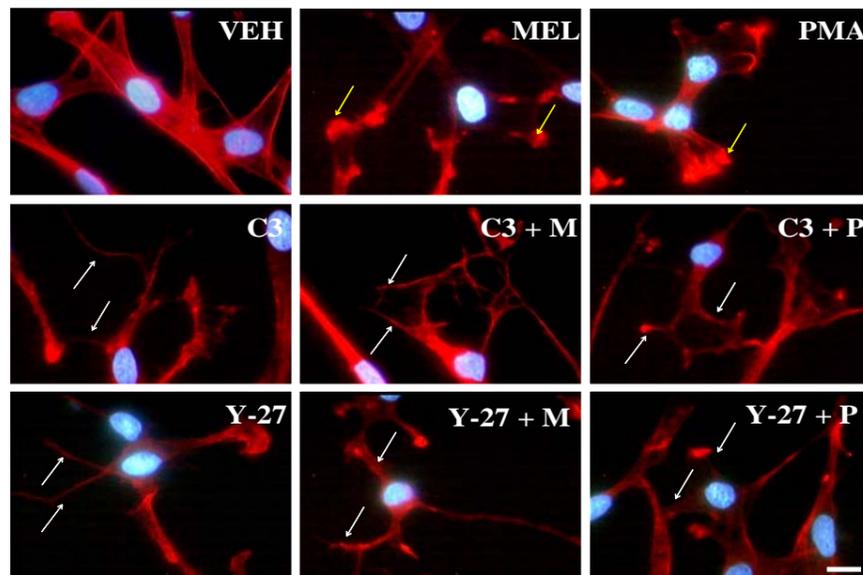


Figura 19. Participación de la rho/ROCK en la formación de lamelopodios, filopodios, conos de crecimiento y neuritas inducida por melatonina. Las células de neuroblastoma N1E-115 cultivadas sobre cubreobjetos se incubaron con el vehículo (VEH), 1 nM de melatonina (MEL), 2.5 nM de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), 10 μ M del inhibidor de rho; el compuesto C3 (C3), o 10 μ M del inhibidor de la ROCK; el compuesto Y27632 (Y-27) por seis horas. Otras células se preincubaron por 30 minutos con los inhibidores de la PKC, la rho o la ROCK para posteriormente ser tratados con 1nM de melatonina (B + M, C3 + M, Y + M) o con 2.5 nM de PMA (B + P, C3 + P, Y + P) por seis horas. Posteriormente, las células se tiñeron con faloidina rodaminada. Las microfotografías ilustran el patrón típico encontrado en la mayoría de las células con cada uno de los tratamientos. Las microfotografías representan los imágenes representativas observadas en tres experimentos realizados por duplicado. Barra = 10 μ m.

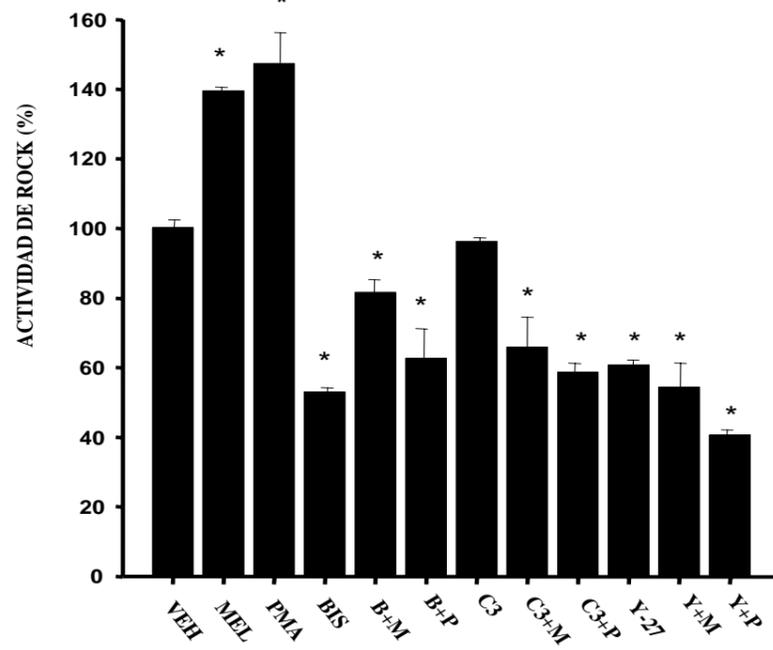


Figura 20. Determinación de la actividad de la ROCK en células tratadas con melatonina. Homogeneizados de las células de neuroblastoma N1E 115 se incubaron con el vehículo (VEH), 1nM de melatonina (MEL), 2.5 nM de forborl 12-miristato 13-acetato (PMA), 5 μ M del inhibidor de la PKC; la bisindolilmelaimida (BIS), 10 μ M del inhibidor de rho; el compuesto C3 (C3), o 10 μ M del inhibidor de la ROCK; el compuesto Y27632 (Y-27) durante 30 minutos. Otro grupo de células se preincubaron por 20 minutos con los inhibidores de la PKC, la rho o la ROCK para posteriormente ser tratados con 1nM de melatonina (B + M, C3 + M, Y + M) o con 2.5 nM de PMA (B + P, C3 + P, Y + P). Los homogeneizados celulares usados como fuentes de la enzima ROCK se incubaron con el sustrato específico para la ROCK el compuesto S6 de la cadena ligera de la miosina. El histograma representa la media \pm S.E.M. de uno de tres experimentos realizados por cuadruplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas comparados con el vehículo ($P < 0.05$).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo encontramos que la melatonina en las células N1E-115 induce la formación de filopodios, lamelopodios, conos de crecimiento y neuritas. En este proceso de reorganización de la estructura celular inducido por la melatonina, participan el rearrreglo de los microfilamentos de actina a través de la activación de la PKC y la ROCK, así como la polimerización de actina.

Las células de neuroblastoma se consideran un buen modelo para el estudio del citoesqueleto y del neurodesarrollo ya que son capaces de diferenciarse en neuronas (Schubert y col., 1969). Además, estas células, en condiciones experimentales adecuadas, son capaces de extender procesos neuronales de varios milímetros de largo, los cuales contienen los tres componentes principales del citoesqueleto los microtúbulos, los microfilamentos y los filamentos intermedios (Olmsted y col., 1970; Sedes y col., 1970; Wiche y col., 1974). La organización de estos componentes participa en el mantenimiento de la forma asimétrica y de la polaridad morfo-funcional de las neuronas en las que se han descrito dos dominios principales 1) el dominio somatodentrítico que recibe y procesa la información y 2) un dominio axonal encargado de transmitir la información a las células blanco (Cid-Aguerri y col., 1995). La distribución específica de diferentes proteínas del citoesqueleto participa en el mantenimiento de la polaridad estructural, de tal forma que la proteína tau se distribuye solamente en los axones y las proteínas asociadas a

los microtúbulos (MAPs) en el dominio somatodendrítico (Cid-Aguerri y col., 1995). Un proceso crucial que antecede a la formación de axones y dendritas maduras es la formación de neuritas nuevas o neuritogénesis. En este proceso se reorganizan dinámicamente los microfilamentos, los microtúbulos y los filamentos intermedios, y está sujeto también a la modulación por neurotransmisores y factores de crecimiento (Mattson, 1988, Meyer y Feldman, 2002; Dehemelt y Halpain, 2004).

En particular, la actina se organiza para formar los lamelopodios, los filopodios y los conos de crecimiento (Dotti y col., 1988; Da Silva y col., 2002). Estas tres diferentes estructuras se encontraron en el modelo de células de neuroblastoma cultivadas en condiciones basales junto con neuritas previamente formadas. En este trabajo, se caracterizaron estos rearrreglos de actina y se clasificaron como sigue; 1) células extendidas en las que se observó una gran cantidad de fibras de tensión, 2) células con lamelopodios, 3) células con filopodios, 4) células con conos de crecimiento y células con neuritas ya formadas las cuales se dividieron en 5) neuritas de menos de dos veces el soma celular y 6) neuritas de más de dos veces el soma celular (Figura 2). Debido a que la melatonina es secretada de manera cíclica con una duración de 12 horas en los humanos (Reiter, 1993), las células de neuroblastoma se incubaron por 1, 3, 6, 9 y 12 horas con una concentración de melatonina 10^{-9} M, semejante a la que circula en el plasma durante la noche. En las células N1E-115 la melatonina empieza a ejercer su acción a las 3 horas, ya que después de este tiempo de incubación se observó un incremento

en el porcentaje de células con conos de crecimiento, que son estructuras dinámicas, en donde ocurre una reorganización continua de la actina-F y que preceden a la formación de neuritas. A las seis horas de incubación se observaron incrementos en el porcentaje de células con filopodios así como incrementos en las células con neuritas de dos veces el tamaño del soma celular teñidas con la faloidina rodaminada. Esta reestructuración de los microfilamentos sugiere que la melatonina indujo cambios en la actina que promueven la formación, no solo de estructuras que preceden a la formación de neuritas sino también a la formación y alargamiento de las mismas, ya que el porcentaje de células con neuritas con más de dos veces el tamaño del soma celular incrementó a mayor tiempo de incubación, en este caso seis horas. También, se observó una disminución en el porcentaje de células con neuritas con menos de dos veces el tamaño del soma celular y una reducción en el porcentaje de células extendidas. Estos datos sugieren que las células extendidas desarrollan estructuras que preceden a la formación de neuritas como filopodios, lamelopodios o conos de crecimiento, mientras que las células con neuritas previamente formadas, alargan dichas neuritas en presencia de melatonina. Además, se observó que los cambios observados a las 6 horas prevalecieron a las 9 y 12 horas de incubación con melatonina y que la única diferencia significativa que se observó cuando se comparan incubaciones de 6 horas con las de 9 y 12 horas fue la disminución en el porcentaje de células con filopodios. Estos resultados indican que a semejanza con lo descrito previamente, los filopodios se mantienen en constante movimiento,

extendiéndose y contrayéndose en todo el contorno celular, pero una vez que el lamelopodio se separa de la membrana celular, los filopodios usualmente se desplazan a la orilla del cono de crecimiento recientemente formado y prácticamente desaparecen del borde celular (Luo, 2002).

La melatonina circula en plasma durante la noche a concentraciones de hasta 10^{-9} M (Reiter, 2003). Por otro lado la concentración de la melatonina en el SNC puede ser de hasta 20 veces la concentración circulante en plasma (Skinner y Malpoux, 1999). En trabajos previos sobre melatonina y el citoesqueleto de actina, se describieron cambios con concentraciones de melatonina entre 10^{-9} y 10^{-7} M en las células epiteliales MDCK después de 6 horas de incubación (Ramírez-Rodríguez y col., 2003). En ese trabajo, se probaron concentraciones crecientes de la melatonina de 10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} y 10^{-5} M y se determinó la proporción de células con diferentes arreglos de actina-F que preceden a la formación de neuritas nuevas (lamelopodios, filopodios y conos de crecimiento). El incremento en la proporción de las células en etapas tempranas de neuritogénesis, se determinó en este trabajo por el aumento observado en la proporción de células que presentan microfilamentos organizando estas estructuras. Este aumento se observó con la concentración circulante en plasma de melatonina a las seis horas de incubación. Concentraciones menores a la concentración circulante en plasma (10^{-11} M) mostraron solamente una disminución en el número de células extendidas con fibras de tensión comparadas con células incubadas en condiciones controles y que no están en la ruta o en el proceso de neuritogénesis. Estos resultados

sugieren que concentraciones menores a la concentración que circula en el plasma durante la noche, inducen cambios mínimos en los pasos necesarios para inducir la formación de neuritas. Por otro lado, en presencia de concentraciones mayores de melatonina, las células mostraron los mismos cambios observados con la concentración que circula en el plasma durante la noche y se observó una tendencia no significativa a incrementar el porcentaje de células con neuritas con más de dos veces el tamaño del soma celular. Estos resultados sugieren que en los organismos que secretan melatonina principalmente por la glándula pineal y que alcanzan concentraciones nanomolares durante la noche, se inducen cambios en el citoesqueleto de actina que resultan en el ensamble de estructuras que preceden la formación de neuritas.

En trabajos anteriores se demostró en las células epiteliales MDCK la participación de la PKC en el mecanismo por el que la melatonina induce un incremento en el grosor de las fibras de tensión así como en el grosor del anillo cortical (Ramírez-Rodríguez y col., 2003). Además, se ha descrito que la activación de la PKC por esteres de forbol como el PMA induce la formación de neuritas en células de neuroblastoma (Fagerstrom y col, 1996; Singleton y col., 2000; Mark y col., 2001; Zeidman y col., 2002). Por lo tanto, para demostrar la participación de la PKC en la formación de lamelopodios, filopodios conos de crecimiento y neuritas en presencia de la melatonina, las células de neuroblastoma se incubaron con el activador de la PKC, el PMA, con la melatonina o con el inhibidor específico de esta cinasa, la bisindolilmaleimida.

En presencia del agonista de la PKC, el PMA, o de la melatonina se observaron cambios semejantes en el arreglo de los microfilamentos, lo que sugiere que la PKC participa en el mecanismo mediante el cual la melatonina induce la organización de los microfilamentos en lamelopodios, filopodios y conos de crecimiento. Esta conclusión, se corroboró utilizando el inhibidor selectivo de la PKC, la bisindolilmaleimida. En las células pre-incubadas con este inhibidor se observó que los cambios inducidos a nivel de microfilamentos por PMA y por melatonina fueron bloqueados. La única diferencia que se observó en las células incubadas con el PMA con respecto a las células incubadas con la melatonina, fue que el éster del forbol incrementó el porcentaje de células con conos de crecimiento a las seis horas de incubación. Esta diferencia se puede originar debido a que el PMA activa a las dos isoformas de PKC α y ϵ presentes en las células de neuroblastoma, mientras que la melatonina solo activa a la isoforma α (Benítez-King y col., 2001).

Para confirmar la participación de la PKC en la formación de lamelopodios, filopodios y conos de crecimiento inducidos por la melatonina, se midió la actividad de esta enzima en una preparación enriquecida en microfilamentos obtenida a partir de las células de neuroblastoma, N1E-115. Tanto la melatonina como el PMA indujeron la activación de esta enzima, mientras que preincubaciones con la bisindolilmaleimida previnieron dicha activación. Estos resultados indican que la melatonina induce los cambios en el rearreglo de los microfilamentos a través de la activación de la PKC y concuerdan con lo descrito previamente sobre la estimulación de la actividad

de la PKC por melatonina en homogenizados totales de las células N1E-115 (Antón-Tay y Col 1998).

En este trabajo, también se observó que la melatonina activa a la ROCK y se sabe que esta enzima está vía abajo en la cascada de señalización de la PKC (Figura 21). La vía de señalización rho/ROCK es activada por la PKC (Ng y col., 2001; Brandt y col., 2002; Pilpel y Segal, 2004; Huang y col., 2005; Kang y col., 2007), específicamente se ha involucrado a la PKC α (Hippenstiel y col., 1998; Mehta y col., 2001; Radeff y col., 2004; Pan y col., 2005) la isoforma presente en las células de neuroblastoma, en las que también se ha descrito esta cascada de activación PCK-rho/ROCK (Tanabe y col., 2006). Incluso se ha propuesto que la PKC es necesaria para la activación de ROCK por rho (Barandier y col., 2003). Estudios recientes han demostrado que esta cascada de activación no va en un solo sentido sino que además el complejo activo rho/ROCK es capaz de activar a la PKC (Radeff y col., 2004; Patil y Bitar, 2006; Conrad y col., 2007). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la melatonina activa a la PKC y que esta enzima a su vez activa a la ROCK causando el reclutamiento de células N1E-115 en un estadio de neuritogénesis temprana que se evidencia por un aumento en el número de células con filopodios, lamelipodios y conos de crecimiento.

Trabajos previos han demostrado que la activación de la ROCK mantiene a las células neuronales en estadios inmaduros de diferenciación, en donde las células mantienen una forma bipolar con neuritas gruesas y

simétricas, extendidas a ambos lados del soma celular (Negishi y col., 2002; Takaishi y col., 2000; Meyer y Feldman, 2002; Luo, 2002).

En nuestro modelo, las células N1E-115 incubadas con la melatonina mostraron una forma bipolar con incrementos en el número de células que mostraban filopodios, lamelopodios y conos de crecimiento. Como se mencionó en líneas anteriores, la forma celular bipolar con neuritas gruesas y soma neuronal grande se encuentra en etapas tempranas de neuritogénesis y contrasta con formas neuronales maduras en las que se encuentran múltiples ramificaciones delgadas con un soma neuronal disminuido en tamaño. Esta forma neuronal madura la observamos con la utilización de inhibidores de la rho y la ROCK (Figura 19). Lo que sugiere que la activación de la ROCK por la melatonina mantiene a las células en un estadio inmaduro de diferenciación, de neuritogénesis temprana, en el que se promueve la formación de neuritas sin que se presente la ramificación de las mismas (Sebok y col., 1999; Bito y col., 2000).

Los pasos posteriores mediante los cuales se induce un estadio de neuritogénesis temprana a través de la activación de la ROCK no fueron estudiados en el presente trabajo. Por lo tanto la siguiente cascada de señalización (Figura 21) es tan solo una propuesta de lo que posiblemente suceda vía abajo de la activación de la rho/ROCK basado en lo que se ha descrito en otros modelos. Ya que estos trabajos no se pueden extrapolar a nuestro modelo, la siguiente vía de señalización tiene que ser tomada con cautela. Es posible que la activación de la ROCK ya sea por melatonina

directamente o a través de la PKC active a su vez a Rac1 como se ha descrito previamente en células de neuroblastoma N1E-115 y culmine con la formación de neuritas (Hall (a) y col., 2001). También existen reportes de la activación de Rac1 también por el complejo rhoA/ROCK posterior a la interacción con mDia1 (Arakawa y col., 2003) o con ERM (Liu y col., 2005; Jeon y col., 2005; Hass y col., 2007). ERM a su vez ha sido ligado recientemente con la activación de N-WASP (Manchanda y col., 2005) y la de Cdc42 (Prag y col., 2007). Por otro lado, es posible que tanto la melatonina como la PKC activen a la rhoG la cual ha sido implicada en la formación de neuritas en múltiples trabajos recientes (Bashaw y col., 2001; May y col., 2002; Aspenström y col., 2004; Negishi y Katoh, 2005). La activación de la rhoG parece ser resultado de la interacción con el complejo rhoA/ROCK (Wennrberg y col., 2002) e induce la formación de neuritas a través de la Rac1 (Estrach y col., 2002; Hiramoto y col., 2006) y de Cdc42 (Gauthier-Rouviere y col., 1998; Blangy y col., 2000; Katoh y col., 2000). Los pasos finales descritos previamente en cascadas de señalización que culminan con la formación de procesos neuronales, se llevan a cabo mediante la interacción con Arp2/3 y ADF/cofilina (Meyer y Feldman, 2002; Luo, 2002). Por lo tanto, es probable que Cdc42 y N-WASP actúen a través de Arp2/3, mientras que rac necesita de Scar para la posible activación de la proteína Arp2/3 e inducir como Cdc42 y N-WASP la polimerización de actina (Meyer y Feldman, 2002; Luo, 2002). Por otro lado, Cdc42 y rac también se han relacionado con la interacción con PAK en otros modelos y esta enzima a su vez interacciona con la LIMK para finalmente activar a la ADF/cofilina (Meyer y

Feldman, 2002; Luo, 2002). La activación de ADF/cofilina vía PAK o mediante la interacción con ROCK y posteriormente a LIMK se ha implicado tanto en la activación como en la inhibición de la polimerización de actina. Estos resultados aparentemente contradictorios parecen depender de la localización de ADF/cofilina dentro de la célula neuronal, así como del estadio de maduración de la misma (Meyer y Feldman, 2002).

La activación de la ROCK también se ha involucrado en la formación de fibras de tensión y de adhesiones focales (Kimura y col., 1996; Amano y col., 1996; Watanabe y col., 1999; Burridge y Wennerber, 2004). La ROCK mediante la inhibición de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLC) promueve la fosforilación de la misma y como resultado la contracción de la miosina (Figura 21) (Kimura y col., 1996; Amano y col., 1996). El incremento en la contracción de la miosina favorece la formación de fibras de tensión y de adhesiones focales (Kimura y col., 1996; Amano y col., 1996). Además, se ha descrito que la rho fosforila directamente a la MLC (Chrzanowska-Wodnicka y Burridge, 1996) y que también activa a la proteína mDia (Watanabe y col., 1999) conduciendo a la formación de adhesiones focales y fibras de tensión a través de la polimerización de actina (Li y Higgs, 2003). La relación entre la formación de fibras de tensión, adhesiones focales y la neuritogénesis temprana provocadas por la activación de ROCK, no fue estudiada en este trabajo. Sin embargo, es posible que la participación de las fibras de tensión en la forma celular (Maddox y Burridge, 2003; Arthur y Burridge, 2001) sea uno de los mecanismos mediante el cual la célula regula el estadio de maduración de las

neuritas y que por lo tanto la ROCK se encuentre involucrada en ambos procesos, el de la formación de fibras de tensión y el de la neuritogénesis temprana. De cualquier manera, se necesitan más estudios para determinar el papel preciso de la rho y la ROCK tanto en la formación de fibras de tensión como en la formación de neuritas y más aún para determinar cuales son las vías de señalización que desencadenan.

Datos previos indican que la formación de neuritas se acompaña de incrementos en la polimerización de actina que provee parte de la fuerza necesaria para el desplazamiento del cono del crecimiento en el inicio de la neuritogénesis (Meyer y Feldman 2002). Los datos obtenidos en este trabajo concuerdan con lo reportado previamente en la literatura, ya que observamos un 20% de incremento en los valores de actina-F en las células incubadas con melatonina ó con el agonista de la PKC, el PMA. Este incremento en la polimerización de actina se previene mediante incubaciones con inhibidores específicos de la PKC como la bisindolilmaleimida. Lo cual sugiere que la polimerización de actina se incrementa en presencia de la melatonina y que participa en los cambios en su organización. También estos datos indican que la activación de la PKC incrementa la polimerización de actina en células N1E-115.

Se ha descrito que las células de neuroblastoma N1E-115 expresan receptores para melatonina mt1 y que la activación de estos receptores por melatonina induce la formación de neuritas (Bordt y col., 2001). Por lo tanto, se estudiaron los cambios que la indolamina induce a nivel de citoesqueleto de

actina en presencia de luzindol, un antagonista de los receptores mt1 y MT2 para melatonina (Dubocovich y col., 1988). En este trabajo demostramos que los cambios en el citoesqueleto de actina inducidos por la melatonina no se inhibieron con el uso de luzindol, lo que implica que la melatonina induce el rearreglo de los microfilamentos de manera independiente de la estimulación de los receptores membranales mt1 y MT2. Los resultados aparentemente contradictorios encontrados entre el grupo de Bordt y colaboradores y los descritos en el presente trabajo podrían ser resultado del uso de toxina pertusis por el grupo de Bordt y colaboradores (Bordt y col., 2001). Ya que el uso de la toxina pertusis como bloqueador de los receptores para melatonina se acompaña de la disrupción total del citoesqueleto lo cual previene cualquier rearreglo en el mismo que pudiera ser inducido en este caso por la activación de la PKC por melatonina.

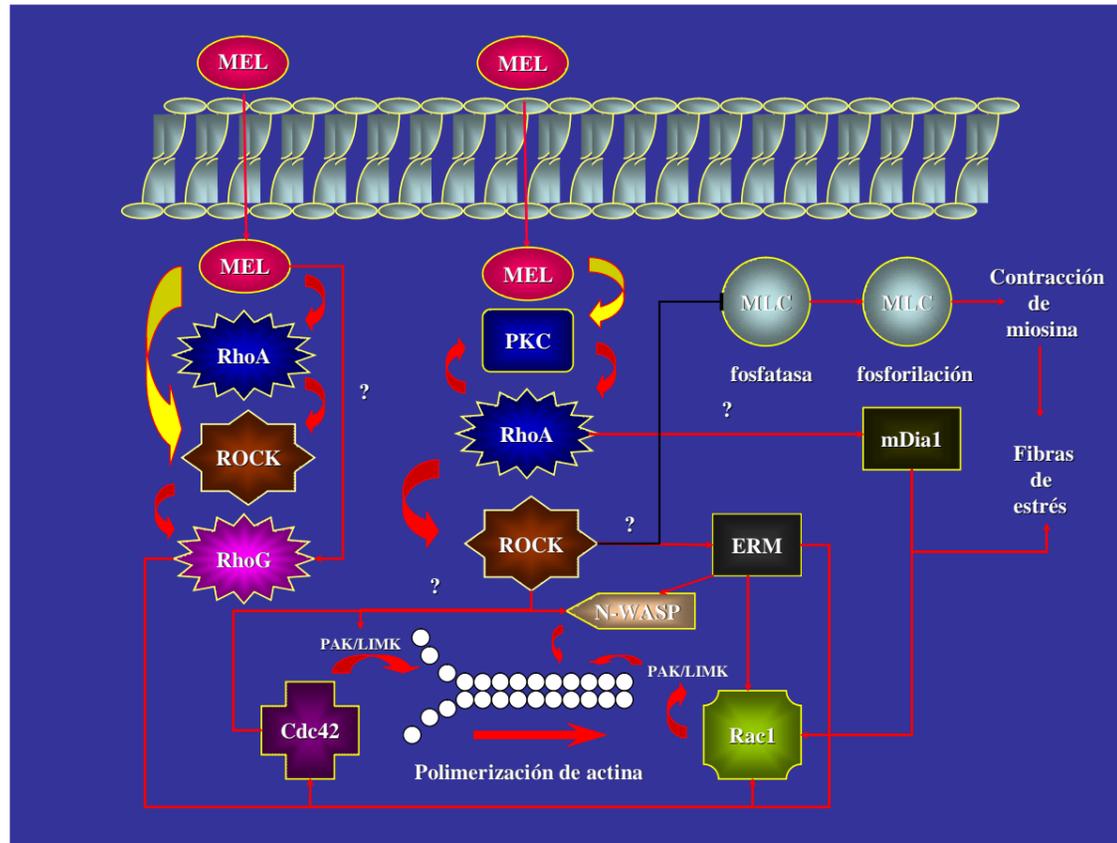


Figura 21*. Posible vía de señalización mediante la cual la activación de rho/ROCK por melatonina induce la neuritogénesis temprana. La melatonina cruza la membrana celular y activa a la PKC, la cual induce la posterior activación de rho/ROCK en células de neuroblastoma, N1E-115. Este complejo a su vez sea relacionado en otros modelos con la interacción con mDia1, y la posterior activación de Rac1. Rho/ROCK también ha sido involucrada en la activación de ERM el cual a su vez interacciona con Rac1, Cdc42 y N-WASP, proteínas capaces de iniciar la polimerización de actina. Sin embargo, esta interacción entre rho/ROCK y ERM no se ha descrito en nuestro modelo. Por otro lado, es posible que la melatonina active a la rhoG, ya sea directamente o a través del complejo rho/ROCK como sucede en otros modelos. La rhoG a su vez es capaz de activar la Rac1 y la Cdc42. Ambas proteínas inducen la polimerización de actina mediante su interacción con PAK/LIMK, mientras que la Cdc42 también lo hace a través de N-WASP. Los signos de interrogación (?) marcan las interacciones que no han sido estudiadas en nuestro modelo. Las flechas amarillas indican activaciones estudiadas en el presente trabajo, mientras que las flechas rojas indican activación descritas en otros modelos y la flecha negra señala inhibición también descrita en otros modelos.

***Debido a que esta vía de señalización no fue estudiada en el presente trabajo esta posible vía debe considerarse tan solo como una propuesta.**

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo indican que la melatonina induce el rearrreglo del citoesqueleto de actina mediante la activación directa de la ROCK vía abajo de la vía de señalización de la PKC. Mediante esta activación la melatonina induce la polimerización de actina, que participa en la formación de estructuras que preceden la formación de neuritas en estadios inmaduros de diferenciación (neuritogénesis temprana) en células de neuroblastoma N1E-115. Por lo tanto, estos datos apoyan el que la melatonina induce el rearrreglo del citoesqueleto de actina a través de la activación de proteínas citoplásmicas como la PKC y la ROCK y que este rearrreglo en el citoesqueleto de actina participa en los estadios de diferenciación temprana en las células de origen neuronal.

PERSPECTIVAS

Si los resultados expuestos en este trabajo son duplicados en modelos *in vivo* entonces es posible que la melatonina sea de utilidad en la prevención de enfermedades psiquiátricas y neurológicas como la depresión, la esquizofrenia y etapas tardías de la enfermedad de Alzheimer, como se ha propuesto en trabajos anteriores (Reiter y col., 1999; Benítez-King y col., 2004; Benítez-King y col., 2005). Debido a que en estos padecimientos no sólo los niveles de melatonina se encuentran alterados (Mishima y col., 1999; Ferrier y col., 1982; Fanget y col., 1989; Sandyk y Kay, 1990; Brown y col., 1985; Miles y Philbrick, 1988) sino que además la citoarquitectura se encuentra descompuesta, a tal grado que existe una disminución en el número de axones y dendritas⁴ (Stockmeier y col., 2004; Chana y col., 2003; Bensimon y Chermat, 1991; Selemon, 2004). Por lo tanto, si la melatonina tiene la capacidad de inducir la formación de estructuras que preceden a la formación de neuritas así como la misma formación y alargamiento de neuritas, como se postula en este trabajo, la melatonina podría inducir el restablecimiento de axones y dendritas en dichas enfermedades psiquiátricas y neurológicas. Sin embargo, esta línea de investigación requiere de un estudio mayor y más profundo en el futuro.

⁴ En la demencia de Alzheimer la disminución de axones y dendritas se observa en etapas tardías de esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- ALABED Y.Z., Grados-Munro E., Ferraro G.B., Hsieh S.H., Fournier A.E. Neuronal responses to myelin are mediated by rho kinase. *J Neurochem.* 96:1616-1625, 2006 .
- ALLEGRA M., Reiter R.J., Tan D.X., Gentile C., Tesoriere L., Livrea M.A. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res.* 34:1-10, 2003.
- AMANO M., Ito M., Kimura K., Fukata Y., Chihara K., Nakano T., Matsuura Y., Kaibuchi K. Phosphorylation and activation of myosin by Rho associated kinase (rho kinase). *J Biol Chem.* 271: 20246-20249, 1996.
- AMANO M., Chihara K., Nakamura N., Fukata Y., Yano T., Shibata M., Ikebe M., Kaibuchi K. Myosin II activation promotes neurite retraction during the action of Rho and Rho-kinase. *Genes Cells.* 3:177–188, 1998.
- ANTON-TAY F., Diaz J.L., Fernandez-Guardiola A. On the effect of melatonin upon the human brain: Its possible therapeutic implications. *Life Sci.* 10:841-850, 1971.
- ANTÓN-TAY F., Ramírez G., Martínez I., Benítez-King G. In vitro stimulation of protein kinase C by melatonin. *Neurochem Res.* 23:605-610, 1998.
- ARAKAWA Y., Bito H., Furuyashiki T., Tsuji T., Takemoto-Kimura S., Kimura K., Nozaki K., Hashimoto N., Narumiya S. Control of axon elongation via an SDF-1alpha/Rho/mDia pathway in cultured cerebellar granule neurons. *J Cell Biol.* 161(2):381-391, 2003.
- ARDENT J. Mammalian pineal rhythms. *Pineal Res Rev.* 3:161-213, 1985.
- ARENDT J. Melatonin assays in body fluids. *J Neural Transm. Suppl* 265-278, 1978.
- ARGYRIOU A., Prast H., Philippu A. Melatonin Facilitates short-term memory. *Eur J Pharmacol.* 349(2-3):159-162, 1998.
- ARTHUR WT., Burridge K. RhoA inactivation by p190Rho-GAP regulates cell spreading and migration by promoting membrane protrusion and polarity. *Mol Biol Cell.* 12: 2711-2720, 2001.

- ASPENSTRÖM P., Fransson A., Saras J. Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J.* 377(Pt 2):327-337, 2004.
- AXELROD J. The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science.* 184:1341-1348, 1974.
- BAMBURG J. R. Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 15:185-230, 1999.
- BARANDIER C., Ming X.F., Rusconi S., Yang Z. PKC is required for activation of ROCK by RhoA in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 304:714-719, 2003.
- BARRETT P., Davidson G., Hazlerigg D.G., Morris M.A., Ross A.W., Morgan P.J. Mel_{1a} melatonin receptor expression is regulated by protein kinase C and an additional pathway addressed by the protein kinase C inhibitor Ro 31-8220 in ovine pars tuberalis cells. *Endocrinology.* 139:163-171, 1998.
- BASHAW G.J., Hu H., Nobes C.D., Goodman C.S. A novel Dbl family RhoGEF promotes Rho-dependent axon attraction to the central nervous system midline in *Drosophila* and overcomes Robo repulsion. *J Cell Biol.* 155(7):1117-1122, 2001.
- BATTAINI F. Protein kinase C Isoforms as therapeutic targets in nervous system disease states. *Pharmacol Res.* 44(5):353-361, 2001.
- BECKER-ANDRE M., Andre E., DeLamarter J.F. Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. *Biochem Biophys Res Commun.* 194:1371-1379, 1993.
- BECKER-ANDRE M., Wiesenberg I., Schaeren-Wiemers N., Andre E., Missbach M., Saurat J.H., Carlberg C. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem.* 269:28531-28534, 1994.
- BEHRENS M.M., Martinez J.L., Moratilla C., Renart J. Apoptosis induced by protein kinase D inhibition in a neuroblastoma cell line. *Cell Growth Differ.* 6(11):1375-1380, 1995.
- BENÍTEZ-KING G. PKC activation by melatonin modulates vimentin intermediate filament organization in N1E-115 cells. *J Pineal Res.* 29:8-14, 2000.

- BENÍTEZ-KING G., Antón-Tay F. The role of melatonin in cytoskeletal remodeling is mediated by calmodulin and protein kinase C. *Front Horm Res.* 21:154-159, 1996.
- BENÍTEZ-KING G., Antón-Tay F. Calmodulin and protein kinase C are two Ca^{++} binding proteins that mediate intracellular melatonin signaling. *Pineal Gland Update*, 13-20, 1997.
- BENÍTEZ-KING G., Huerto-Delgadillo L., Antón-Tay F. Melatonin effects on the cytoskeletal organization of MDCK and neuroblastoma N1E-115 cells. *J Pineal Res.* 9: 209-220, 1990.
- BENÍTEZ-KING G., Hernández M.E., Tovar R., Ramírez G. Melatonin activates PKC- α but not PKC- ϵ in N1E-115 cells. *Neurochem. Int.* 39:95-102, 2001.
- BENÍTEZ-KING G., Ortíz G.G., Túnez I., Bellon A., Antón-Tay F. Melatonin prevents cytoskeletal alterations and oxidative stress induced by okadaic acid in N1E-115 cells. *Experimental Neurol.* 182:151-159, 2003.
- BENITEZ-KING G., Ramirez-Rodriguez G., Ortiz L., Meza I. The neuronal cytoskeleton as a potential therapeutical target in neurodegenerative diseases and schizophrenia. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 3:515-533, 2004.
- BENSIMON G., Chermat R. Microtubule disruption and cognitive defects: effect of colchicine on learning behavior in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 38:141-145, 1991.
- BLANGY A., Vignal E., Schmidt S., Debant A., Gauthier-Rouviere C., Fort P. TrioGEF1 controls Rac- and Cdc42-dependent cell structures through the direct activation of rhoG. *J Cell Sci.* 113:729-739, 2000.
- BLASK D.E., Sauer L.A., Dauchy R.T. Melatonin as a chronobiotic/anti-cancer agent: cellular, biochemical and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Curr. Topics Med Chem.* 2:113-132, 2002.
- BITO H., Furuyashiki T., Ishihara H., Shibasaki Y., Ohashi K., Mizuno K., Maekawa M., Ishizaki T., Narumiya S. A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons. *Neuron.* 26:431-441, 2000.
- BORDT S.L., Mckee R.M., Li P.K., Witt-Enderby P.A., Melan M.A. N1E-115 mouse neuroblastoma cells express MT1 melatonin receptors and produce neurites in response to melatonin. *Biochem Biophys Acta.* 1499:257-264, 2001.

- BRANDT D., Gimona H., Hillmann M., Haller H., Mischak H. Protein kinase C induces actin reorganization via a Src-and Rho-dependent pathway. *J Biol Chem.* 277(23):20903-20910, 2002.
- BROWN R., Kocsis J.H., Caroff S., Amsterdam J., Winokur A., Stokes P.E., Frazer A. Differences in nocturnal melatonin secretion between melancholic depressed patients and control subjects. *Am J Psychiatry.* 142:811-816, 1985.
- BROWN M.E., Bridgman P.C. Retrograde flow rate is increased in growth cones from myosin IIB knockout mice. *J Cell Sci.* 116:1087-1094, 2003.
- BRYDON L., Petit L., De Coppet P., Barrett P., Morgan P.J., Strosberg A.D., Jockers R. Polymorphism and signaling of melatonin receptors. *Reprod. Nutr. Dev.* 39:315-324, 1999.
- BURRIDGE K., Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell.* 116: 167-179, 2004.
- CARDINALI D.P., Brusco L.I., Lloret S.P., Furio A.M. Melatonin in sleep disorders and jet-lag. *Neuro Endocrinol Lett.* 23 Suppl 1:9-13, 2002.
- CARLBERG C. Gene Regulation by Melatonin. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 917: 387-396, 2000.
- CARTEE L., Smith R., Dai Y., Rahmani M., Rosato R., Almenara J., Dent P., Grant S. Synergistic induction of apoptosis in human myeloid leukemia cells by phorbol 12-myristate 13-acetate and flavopiridol proceeds via activation of both the intrinsic and tumor necrosis factor-mediated extrinsic cell death pathways. *Mol Pharmacol.* 61(6):1313-1321, 2002.
- CASTAGNA M., Takai Y., Kaibuchi K., Sano K., Sano., Kikawa U., Nishizuka Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid dependent protein kinase by tumor promoting esters. *J Biol Chem.* 257:7847-7851, 1982.
- CHANA G., Landau S., Beasley C., Everall P.I., Cotter D. Two-dimensional assessment of cytoarchitecture in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder, bipolar disorder, and schizophrenia: Evidence for decreased neuronal somal size and increased neuronal density. *Biol Psychiatry.* 53:1086-1098, 2003.
- CHRZANOWSKA-WODNICKA M., Burridge K. Rho stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol.* 133:1403-1415, 1996.
- CID-ARREGUI A., De Hoop M., Dotti C.G. Mechanism of neuronal polarity. *Neurobiol Aging.* 16:239-243, 1995.

- CONRAD S., Genth H., Hofmann F., Just I., Skutella T. Neogenin-RGMA signaling at the growth cone is bone morphogenetic protein-independent and involves RhoA, ROCK, and PKC. *J Biol Chem.* 282:16423-16433, 2007.
- COSTA E.J., López R.H., Lamy-Freund M. T. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *J Pineal Res.* 18:123-126, 1995.
- DAHLITZ M., Alvarez B., Vignau J., English J., Ardent J., Parkes J.D. Delayed sleep phase syndrome response to melatonin. *Lancet.* 337:1121-1124, 1991.
- DA SILVA J.S., Dotti C.G. Breaking the neuronal sphere: Regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nat Rev Neurosci.* 3:694-704, 2002.
- DEHMELT L., Smart F.M., Ozer R.S., Halpain S. The role of MAP2c in the reorganization of microtubules and Lamellipodia during neurite initiation. *J Neurosci.* 23:9479-9490, 2003.
- DEHMELT L., Halpain S. Actin and microtubules in neurite initiation: Are MAPs the missing link? *J Neurobiol.* 58:18-33, 2004.
- DIEFENBACH T.J., Latham V.M., Yimlamai D., Liu C.A., Herman I.M., Jay D.G. Myosin 1c and myosin IIB serve opposing roles in lamellipodial dynamics of the neuronal growth cone. *J Cell Biol.* 158:1207-1217, 2002.
- DOTTI C.G., Sullivan C.A., Banker G.A. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci.* 8(4):1454-1468, 1988.
- DUBOCOVICH M. Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Tips* 16: 50-56, 1995.
- DUBOCOVICH M. Luzindole (N-0774): A novel melatonin receptor antagonist. *J Pharmacol Experiment Therapeu.* 246(3):902-910, 1988.
- ESTRACH S., Schmidt S., Diriong S., Penna A., Blangy A., Fort P., Debant A. The Human Rho-GEF trio and its target GTPase RhoG are involved in the NGF pathway, leading to neurite outgrowth. *Curr Biol.* 12(4):307-312, 2002.
- FAGERSTROM S., Pahlman S., Gestblom C., Nanberg E. Protein kinase C- ϵ is implicated in neurite outgrowth and differentiating human neuroblastoma cells. *Cell Growth Differ.* 7(6):775-785, 1996.
- FANGET F., Claustrat B., Dalery J., Brun J., Terra J.L., Marie-Cardine M., Guyotat J. Nocturnal plasma melatonin levels in schizophrenic patients. *Biol Psychiatry.* 25:499-501, 1989.

- FERRIER I.N., Arendt J., Johnstone E.C., Crow T.J. Reduced nocturnal melatonin secretion in chronic schizophrenia: relationship to body weight. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 17:181-187, 1982.
- GAUTHIER-ROUVIERE C., Vignal E., Meriane M., Roux P., Montcourier P., Fort P. RhoG GTPase controls a pathway that independently activates Rac1 and Cdc42Hs. *Mol Biol Cell*. 9:1379-1394, 1998.
- GLASS C.K. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimmers, and heterodimers. *Endocr. Rev.* 15: 391-407, 1994.
- GOECKELER Z.M., Wysolmerski R.B. Myosin light chain kinase-regulated endothelial cell contraction: the relationship between isometric tension, actin polymerization, and myosin phosphorylation. *J Cell Biol*. 130:613-627, 1995.
- GUENTHER A.L., Schmidt S.I., Laatsch H., Fotso S., Ness H., Ressimyer A.R., Poeggeler B., Hardeland R. Reactions of the melatonin metabolite AMK (N1-acetyl-5-methoxykynuramine) with reactive nitrogen species: formation of novel compounds, 3-acetamidomethyl-6-methoxycinnolinone and 3-nitro-AMK. *J Pineal Res*. 39:251-260, 2005.
- HALL C., (a) Brown M., Jacobs T., Ferrari G., Cann N., Teo M., Monfries C., Lim L. Collapsin response mediator protein switches RhoA and Rac1 morphology in N1E-115 neuroblastoma cells and is regulated by Rho kinase. *J Biol Chem*. 276:43482-43486, 2001.
- HALL C., (b) Michael G.J., Cann N., Ferrari G., Teo M., Jacobs T., Monfries C., Lim L. Alpha2-chimaerin, a Cdc42/Rac1 regulator, is selectively expressed in the rat embryonic nervous system and is involved in neuritogenesis in N1E-115 neuroblastoma cells. *J Neurosci*. 21:5191-202, 2001.
- HALLAM K.T., Oliver J.S., Horgan J.E., McGrath C., Norman T.R. Low doses of lithium carbonate reduce melatonin light sensitivity in healthy volunteers. *Int J Neuropsychopharmacol*. 8(2):255-259, 2005.
- HARDELAND R., Balzer I., Poeggeler B., Fuhrberg B., Uria H., Behrmann G., Wolf R., Meyer T.J., Reiter R.J. On the primary functions of melatonin in evolution: Mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation and scavenging of free radicals. *J. Pineal Res*. 18:104-111, 1995.
- HASS M.A., Vickers J.C., Dickson T.C. Rho kinase activates ezrin-radixin-moesin (ERM) proteins and mediates their function in cortical neuron growth, morphology and motility in vitro. *J Neurosci Res*. 85(1):34-46, 2007.

- HAUGLAND R.P., You W., Paragas V.B., Wells S., DuBose D. Simultaneous visualization of G- and F-Actin. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 42:345-350, 1994.
- HEIKKILA J., Jalava A., Eriksson K. The selective protein kinase C inhibitor GF 109203X inhibits phorbol ester-induced morphological and functional differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 197:1185-1193, 1993.
- HIPPENSTIEL S., Kratz T., Krüll M., Seybold J., von Eichel-Streiber C., Suttrop N. Rho protein inhibition blocks protein kinase C translocation and activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 245(3):830-834, 1998.
- HIRAMOTO K., Negishi M., Katoh H. Dock4 regulated by RhoG and promotes Rac-dependent cell migration. *Exp Cell Res.* 312(20):4205-4216, 2006.
- HIROSE M., Ishizaki T., Watanabe N., Uehata M., Kranenburg O., Moolenaar W.H., Matsumura F., Maekawa M., Bito H., Narumiya S. Molecular dissection of the Rho-associated protein kinase (p160ROCK)-regulated neurite remodeling in neuroblastoma N1E-115 cells. *J. Cell Biol.* 141:1625–1636, 1998.
- HOWARD T.H., Oresajo C.O. A method for quantifying F-actin in chemotactic peptide activated neutrophils: study of the effect of tBOC peptide. *Cell Motil.* 5:545-557, 1985.
- HUANG Z.J., Haugland R.P., You W.M., Haugland R.P. Phalloxin and actin binding assay by fluorescence enhancement. *Anal Biochem.* 200:199-204, 1992.
- HUANG F., Subbaiah P.V., Holian O., Zhang J., Johnson A., Gertzberg N., Lum H. Lysophosphatidylcholine increases endothelial permeability: role of PKC α and RhoA cross talk. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 289(2):L174-175, 2005.
- HUERTO-DELGADILLO L., Antón-Tay F., Benítez-King G. Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: Role of melatonin as a calmodulin antagonist. *J. Pineal Res.* 17:55-62, 1994.
- ISHIZAKI T., Maekawa M., Fujisawa K., Okawa K., Iwamatsu A., Fujita A., Watanabe N., Saito Y., Kakizuka A., Morii N., Narumiya S. The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J.* 15:1885–1893, 1996.
- IWAMOTO H., Nakamuta M., Tada S., Sugimoto R., Enjoji M., Nawata H. A p160ROCK-specific inhibitor, Y-27632, attenuates rat hepatic stellate cell growth. *J Hepatol.* 32:762-770, 2000.

- JEON S., Kim S., Kim E., Lee J.E., Kim S.J., Juhn Y.S., Kim Y.S., Bae C.D., Park J. Chloride conductance is required for the protein kinase A and Rac1-dependent phosphorylation of moesin at Thr-558 by KCl in PC12 cells. *J Biol Chem.* 280(13):12181-12189, 2005.
- JONES B.A., Rao Y.P., Stravitz R.T., Gores G.J. Bile salt-induced apoptosis of hepatocytes involves activation of protein kinase C. *Am J Physiol*; 272(5 Pt 1): G1109-1115, 1997.
- KABIR N., Schaefer A.W., Nakhost A., Sossin W.S., Forscher P. Protein kinase C activation promotes microtubule advance in neuronal growth cones by increasing average microtubule growth lifetimes. *J Cell Biol.* 152(5):1033-1044, 2001.
- KANG J.H., Jiang Y., Toita R., Oishi J., Kawamura K., Han A., Mori T., Niidome T., Ishida M., Tatematsu K., Tanizawa K., Katayama Y. Phosphorylation of Rho-associated kinase (Rho-kinase/ROCK/ROK) substrates by protein kinases A and C. *Biochimie.* 89(1):39-47, 2007.
- KATOH H., Aoki J., Ichikawa A., Negishi M. p160 RhoA-binding kinase ROK α induces neurite retraction. *J. Biol. Chem.* 273:2489–2492, 1998.
- KATOH H., Yasui H., Yamaguchi Y., Aoki J., Fujita H., Mori K., Negishi M. Small GTPase RhoG is a key regulator for neurite outgrowth in PC12 cells. *Mol Cell Biol.* 20 7378-7387, 2000.
- KAYUMOV L., Brown G., Jindal R., Buttoo K., Shapiro C.M. A randomized, double-blind, placebo-controlled crossover study of the effect of exogenous melatonin on delayed sleep phase syndrome. *Psychosom Med.* 63:40-48, 2001.
- KAUFMANN N., Wills Z.P., Van Vactor D. *Drosophila* Rac1 controls motor axon guidance. *Development* 125:453–461, 1998.
- KENNEDY S.H., Tighe S., McVey G., Brown G.M. Melatonin and cortisol "switches" during mania, depression, and euthymia in a drug-free bipolar patient. *J Nerv Ment Dis.* 177(5):300-303, 1989.
- KENNEDY S.H., Brown G.M., Garfinkel P.E., McVey G., Parienti V. Sulphatoxy melatonin: an index of depression in anorexia nervosa and bulimia nervosa. *Psychiatry Res.* 32(3):221-227, 1990.
- KIMURA K., Ito M., Amano M., Chihara K., Fukata Y., Nakafuku M., Yamamori B., FENA JH., Nakano T., Okawa K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho associated kinase (Rho-kinase). *Science.* 273:245-248, 1996.

- KOYAMA S., Aizawa M. PKC-dependent IL-6 production and inhibition of IL-8 production by PKC activation in normal human skin fibroblasts under extremely high hydrostatic pressure. *Extremopiles*. (5):413-418, 2002 .
- KRENDEL M., Gloushankova N.A., Bonder E.M., Feder H.H., Vasiliev J.M., Gelfand I.M. Myosin-dependent contractile activity of the actin cytoskeleton modulates the spatial organization of cell-cell contacts in cultured epitheliocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:9666–9670, 1999.
- LEUNG T., Chen X.Q., Manser E., Lim L. The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol. Cell Biol.* 16:5313–5327, 1996.
- Li F., Higgs H.N. The mouse forming mDia1 is a potent actin nucleation factor regulated by autoinhibition. *Curr Biol.* 13:1335-1340, 2003.
- LIANG M., Eason M.G., Jewell-Motz E.A., Williams M.A., Theiss C.T., Dorn G.W. 2nd, Liggett S.B. Phosphorylation and functional desensitization of the alpha2A-adrenergic receptor by protein kinase C. *Mol Pharmacol.* 54:44-49, 1998.
- LISSONI P., Ardizzoia A., Tisi E., Rossini F., Barni S., Tancini G., Conti A., Maestroni G.J. Amplification of eosinophilia by melatonin during the immunotherapy of cancer with interleukin-2. *J Biol Regul Homeost Agents.* 7:34-36, 1993.
- LISSONI P. Is there a role for melatonin in supportive care? *Supportive Cancer Care.* 10:110-116, 2002.
- LIU J. P. Protein kinase C and its substrates. *Mol. Cell. Endocr.* 116:1-29, 1996.
- LIU G., Voyno-Yasenetskaya T.A. Radixin stimulates Rac1 and Ca⁺/calmodulin-dependent kinase, CaMKII: cross-talk with Gα₁₃ signaling. *J Biol Chem.* 280(47):39042-39049, 2005.
- LIN C.H., Espreafico E.M., Mooseker M.S., Forscher P. Myosin drives retrograde F-actin flow in neuronal growth cones. *Neuron.* 16:796-782, 1996.
- LOWRY O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265-275, 1951.
- LUO L., Liao Y.J., Jan L.Y., Jan Y.N. Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: *Drosophila* Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes Dev.* 8:1787–1802, 1994.

- LUO L. Actin Cytoskeleton Regulation in Neuronal Morphogenesis and Structural Plasticity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18:601-635, 2002.
- MADDUX A.S., Burrige K. RhoA is required for cortical retraction and rigidity during mitotic cell rounding. *J Cell Biol.* 160: 255-265, 2003.
- MAK NK., Lung HL., Wong RN., Leung Hw., Tsang HY., Leung KN. Expression of protein kinase C isoforms in euxanthone-induced differentiation of neuroblastoma cells. *Planta Med.* 67(5):400-405, 2001.
- MANCHANDA N., Lyubimova A., Ho H.Y., James M.F., Gusella J.F., Ramesh N., Snapper S.B., Ramesh V. The NF2 tumor suppressor Merlin and the ERM proteins interact with N-WASP and regulate its actin polymerization function. *J Biol Chem.* 280(13):12517-12522, 2005.
- MANSER E., Leung T., Salihunddin H., Zhao Z. S., Lim L. A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* 367:40-46, 1994.
- MASANA M. I., Dubocovich M. L. Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. *Sci. STKE.* 2001:E39, 2001.
- MASSON-GADAIS B., Salers P., Bongrand P., Lissitzky JC. PKC regulation of microfilament network organization in keratinocytes defined by a pharmacological study with PKC activators and inhibitors. *Exp. Cell. Res.* 236(1):238-247, 1997.
- MATTSON M. P. Neurotransmitters in the regulation of neuronal cytoarchitecture. *Brain Res. Rev.* 13:179-212, 1988.
- MATSUI T., Amano M., Yamamoto T., Chihara K., Nakafuku M., Ito M., Nakano T., Okawa K., Iwamatsu A., Kaibuchi K. Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J.* 15:2208-2216, 1996.
- MAY V., Schiller M.R., Eipper B.A., Mains R.E. Kalirin Dbl-homology guanine nucleotide exchange factor 1 domain initiates new axon outgrowth via RhoG-mediated mechanisms. *J Neurosci.* 22(16):6980-6990, 2002.
- MCARTHUR A., Hunt A., Gillette M. Melatonin action and signal transduction in the rat suprachiasmatic circadian clock: activation of protein kinase Cat dusk and dawn. *Endocrinology* 138:627-634, 1997.
- MCINTYRE IM., Judd F.K., Marriott P.M., Burrows G.D., Norman T.R. Plasma melatonin levels in affective states. *Int J Clin Pharmacol Res.* 9(2):159-164, 1989.

- MEHTA D., Rahman A., Malik A.B. Protein kinase C-alpha signals rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor phosphorylation and rho activation and regulates the endothelial cell barrier function. *J Biol Chem.* 276(25):22614-22620, 2001.
- MEYER G., Feldman E. L. Signaling mechanisms that regulate actin-based motility processes in the nervous system. *Journal of Neurochemistry* 83:490-503, 2002.
- MILES A., Philbrick D.R. Melatonin and psychiatry. *Biol Psychiatry.* 23:405-425, 1988.
- MISHIMA K., Tozawa T., Satoh K., Matsumoto Y., Hishikawa Y., Okawa, M. Melatonin secretion rhythm disorders in patients with senile dementia of Alzheimer's type with disturbed sleep-waking. *Bio. Psychiatry.* 15:417-421, 1999.
- NAGTEGAAL J.E., Kerkhof G.A., Smits M.G., Swart A.C., Van Der Meer Y.G. Delayed sleep phase syndrome: A placebo-controlled crossover study on the effects of melatonin administered five hours before the individual dim light melatonin onset. *J Sleep Res.* 7:135-143, 1998.
- NARUMIYA S., Ishizaki T., Watanabe N. Rho effectors and reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett.* 410:68-72, 1997.
- NEGISHI M., Katoh H. Rho family GTPases as key regulators for neuronal network formation. *J Biochem (Tokyo).* 132:157-166, 2002.
- NEGISHI M., Katoh H. Rho family GTPases and dendrite plasticity. *Neuroscientist* 11(3):187-191, 2005.
- NG T., Parsons M., Hughes W.E., Monypenny J., Zicha D., Gautreau A., Arpin M., Gschmeissner S., Verveer P.J., Bastiaens P.I., Parker P.J. Ezrin is a downstream effector of trafficking PKC-integrin complexes involved in the control of cell motility. *EMBO J.* 20:2723-2741, 2001.
- NISHIZUKA Y. Protein Kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 9:484-496, 1995.
- NOSJEAN O., Ferro M., Coge F., Beauverger P., Henlin JM., Lefoulon F., Fauchere JL., Delagrang P., Canet E., Boutin J.A. Identification of the melatonin binding site MT3 as the quinone reductasa 2. *J Biol Chem.* 275:31311-31317, 2000.
- NOSJEAN O., Nicolas J.P., Klupsch F., Delagrang P., Canet E., Boutin JA. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and

MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. *Biochem Pharmacol.* 35:221-230, 2003.

- NURNBERGER J.I. Jr., Adkins S., Lahiri D.K., Mayeda A., Hu K., Lewy A., Miller A., Bowman E.S., Miller M.J., Rau L., Smiley C., Vis-Singh D. Melatonin suppression by light in euthymic bipolar and unipolar patients. *Arch Gen Psychiatry.* 57(6):572-579, 2000.

- OLMSTED J.B., Carlson K., Klebe R., Ruddle F., Rosenbaum J. Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 65:129-136, 1970.

- ONUKI J., Almeida E.A., Medeiros M.H., Di Mascio P. Inhibition of 5-aminolevulinic acid-induced DNA damage by melatonin, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, quercetin or resveratrol. *J Pineal Res.* 38:107-115, 2005.

- OWARIBE K., Masuda H. Isolation and characterization of circumferential microfilament bundles from retinal pigmented epithelial cells. *J Cell Biol.* 95:310-315, 1982.

- PAN J., Singh U.S., Takahashi T., Oka Y., Palm-Leis A., Herbelin B.S., Baker K.M. PKC mediates cyclic stretch-induced cardiac hypertrophy through Rho family GTPases and mitogen-activated protein kinases in cardiomyocytes. *J Cell Physiol.* 202(2):536-553, 2005.

- PARK H. T., Baek S. Y., Kim B.S., Kim J. B., Kim J. J. Developmental expression of "RZR beta, a putative nuclear-melatonin receptor" mRNA in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neurosci Lett.* 217:17-20, 1996.

- PARK H.T., Kim Y. J., Ion S., Kim J. B., Kim J. J. Distributional characteristics of the mRNA for retinoid Z receptor beta (RZR beta), a putative nuclear melatonin receptor, in the rat brain and spinal cord. *Brain Res.* 747:332-337, 1997.

- PATIL S.B., Bitar K.N. RhoA- and PKC-alpha-mediated phosphorylation of MYPT and its association with HSP27 in colonic smooth muscle cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 290(1):G83-95, 2006.

- PETIT L., Lacroix I., De Coppet P., Strosberg A. D., Jockers R. Differential signaling of human Mel 1a and Mel 1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'- monophosphate pathway. *Biochem. Pharmacol.* 58:633-639, 1999.

- PILPEL Y., Segal M. Activation of PKC induces rapid morphological plasticity in dendrites of hippocampal neurons via Rac and Rho-dependent mechanisms. *Eur J Neurosci.* 19(12):3151-3164, 2004.

- POEGGELER B., Balzer I., Hardeland R., Lerchl A. Pineal hormone melatonin oscillates also in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Naturwissenschaften*. 78:268-269, 1991.
- POOLE A.W., Pula G., Hers I., Crosby D., Jones M. L. PKC-interacting proteins: from function to pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences* 25(10):528-535, 2004.
- PRAG S., Parsons M., Keppler M.D., Ameer-Beg S.M., Barber P., Hunt J., Beavil A.J., Calvert R., Arpin M., Vojnovic B., Ng T. Activated Ezrin promotes cell migration through recruitment of the GEF Dbl to lipid rafts and referential downstream activation of Cdc42. *Mol Biol Cell*. May 30; [Epub ahead of print], 2007.
- RADEFF J.M., Nagy Z., Stern P.H. Rho and Rho kinase are involved in parathyroid hormone stimulated protein kinase C alpha translocation and IL-6 promoter activity in osteoblastic cells. *J Bone Miner Res*. 19(11):1882-1889, 2004.
- RAMÍREZ-RODRIGUEZ G., Meza I., Hernández M.E., Castillo A., Benítez-King. Melatonin induced cyclic modulation of vectorial water transport in kidney-derived MDCK cells. *Kidney International*, 63:1356-1364, 2003.
- REITER R. J. Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev*. 12:151-180, 1991.
- REITER R. J. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*. 49:654-664, 1993.
- REITER R. J., Poeggeler, B., Tan, D. X., Chen, L. D., Manchester, L. C. y Guerrero, J. M. Antioxidant capacity of melatonin: A novel actin not requiring a receptor. *Neuroendocrinol. Lett*. 15:103-116. 1993
- REITER R.J., Tan D.X., Cabrera J., D'Arpa D. Melatonin and tryptophan derivatives as free radical scavengers and antioxidants. *Adv. Exp. Med. Biol*. 467:379-387, 1999.
- REITER R.(a) J., Tan D.X., Mayo J.C., Sainz R.M., Leon J., Czarnocki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim. Pol*. 50(4):1129-1146, 2003.
- REITER R. (b) J., Melatonin: clinical relevance. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism* Vol. 17(2):273-285, 2003.

- REPPERT S. M., Weaver D. R., Ebisawa T. Cloning and characterization of a mammalian receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13:1177-1185, 1994.
- SANDYK R. and Kay S. R. Pineal melatonin in schizophrenia: a review and hypothesis. *Schizophr Bull.* 16:653-662, 1990.
- SAUER L.A., Dauchi R.T., Blask D.E. Polyunsaturated fatty acids, melatonin and cancer progression. *Biochem. Pharmacol.* 61:1455-1462, 2001.
- SCHUBERT D., Humphreys S., Baroni C., Cohn M. In vitro differentiation of a mouse neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 64:316-323, 1969.
- SCHRADER M., Danielsson C., Wiesenberg I., Carlberg C. Identification of natural monomeric response elements of the nuclear receptor RZR/ROR. They also bind COUP-TF homodimers. *J.Biol.Chem.* 271:19732-19736, 1996.
- SEBOK A., Nusser N., Bebrececi B., Guo Z., Santos M.F., Szeberenyi J., Tigyi G. Different roles for RhoA during neurite initiation, elongation and regeneration in PC12 cells. *J Neurochem.* 73:949-960, 1999.
- SEEDS N.W., Maccioni R.B. Proteins from morphologically differentiated neuroblastoma cells promote tubulin polymerization. *J Cell Biol.* 76:547-555, 1978.
- SELEMON L.D., Rajkowska G., Goldman-Rakic P.S. Abnormally high neuronal density in schizophrenic cortex: a morphometric analysis of prefrontal area 9 and occipital area 17. *Arch Gen Psychiatry.* 52:805-818, 1995.
- SELEMON L.D., Goldman-Rakic P.S. The Reduced Neurophil Hypothesis: A Circuit Based Model of Schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 45: 7-25, 1999.
- SELEMON L.D. Increased Cortical Neuronal Density in Schizophrenia. *Am J Psychiatry;* 161:169, 2004.
- SHIGETA M., Sanzen N., Ozawa M., Gu J., Hasegawa H., Sekiguchi K. CD151 regulates epithelial cell-cell adhesion through PKC-and Cdc42-dependent actin cytoskeletal reorganization. *J Cell Biol;* 163(1):165-176, 2003.
- SINGLETON D.W., Lu C.L., Colella R., Roisen F.J. Promotion of neurite outgrowth by protein kinase inhibitors and gangliosid GM1 in neuroblastoma cells involves MAP kinase Erk ½. *Int J Dev Neurosci.* 18(8):797-805, 2000.
- SKINNER D.C., Malpoux B. High melatonin concentrations in third ventricular cerebrospinal fluid are not due to galen vein blood recirculating through the choroid plexus. *Endocrinology;* 140:4399-4405, 1999.

- SLATER S.J., Seiz J. L., Stagliano B. A., Stubbs C. D. Interaction of protein kinase C isozymes with Pho GTPases. *Biochemistry*. Apr 10;40(14):4437-4445, 2001.
- SMITH J. Neuronal Cytomechanics. The Actin-Based Motility of Growth Cones. *Science*. 242: 708-715, 1988.
- STEINHILBER D., Brungs M., Werz O., Wiesenberg I., Danielsson C., Kahlen J. P., Nayeri S., Schrader M., Carlberg C. The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J. Bio. Chem.* 270:7037-7040, 1995.
- STEINMAYER M., Andre E., Conquet F., Rondi-Reig L., Delhay-Bouchaud N., Auclair N., Daniel H., Crepel F., Mariani J., Sotelo C., Becker-Andre M. Staggerer phenotype in retinoid-related orphan receptor alpha-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:3960-3965, 1998.
- STOCKMEIER A.C., Mahajan J.G., Konick C.L., Overholser C.J., Jurjus J.G., Meltzer Y.H., Uylings B.M.H., Friedman L., Rajkowska G. Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression. *Biol psychiatry*, 56:640-650, 2004.
- TAKAISHI K., Matozaki T., Nakano K., Takai Y. Multiple downstream signalling pathways from ROCK, a target molecule of Rho small G protein, in reorganization of the actin cytoskeleton in Madin-Darby canine kidney cells. *Genes Cells*. 5:929-936, 2000.
- TAN D.X., Reiter R.J., Manchester L.C., Yan M.T., El-Sawi M., Sainz R.M., Mayo J.C., Kohen R., Allegra M., Hardeland R. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr. Top. Med. Chem.* Feb;2(2):181-97, 2002.
- TAN D.X., Manchester L.C., Hardeland R., Lopez-Burillo, S., Mayo, J.C., Sainz R.M., Reiter R.J. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J. Pineal Res.* 34:75-78, 2003.
- TANABE A., Kamisuki Y., Hidaka H., Suzuki M., Negishi M., Takuwa Y. PKC phosphorylates MARCKS Ser159 not only directly but also through RhoA/ROCK. *Biochem Biophys Res Commun.* 345(1):156-161, 2006.
- TANG D., Goldberg D. J. Bundling of microtubules in the growth cone induced by laminin. *Mol Cell Neurosci* 15:303-313, 2000.
- TAUMAN R., Zisapel N., Laudon M., Nehama H., Sivan Y. Melatonin production in infants: Association with perinatal factors and development. *Pediatr Neurol* 26:379-382, 2002.

- TARQUINI B., Perfetto F., Tarquini R. Melatonin and seasonal depression. *Recent Prog Med.* 89(7-8):395-403, 1998.
- TILNEY L.G., Bonder E.M., DeRosier D.J. Actin filaments elongate from their membrane-associated ends. *J Cell Biol* 90:485-494, 1981.
- TOMAS-ZAPICO C., Coto-Montes A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes . *J Pineal Res.* 39:99-104, 2005.
- URATA Y., Honma S., Goto S., Todoroki S., Iida T., Cho S., Honma K., Kondo T. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 27(7-8):838-847, 1999.
- VINCENT B., Patiel E., Frobert Y., Lehmann S., Grassi J., Checler F. Phorbol ester-regulated cleavage of normal prion protein in HEK293 human cells and murine neurons. *J Biol Chem.* 275(45):3561-3566, 2000.
- WALLIS S., Lloyd S., Wise I., Ireland G., Fleming T.P., Garrod D. The alpha isoform of protein kinase C is involved in signaling the response of desmosomes to wounding in culture epithelial cells. *Mol Biol Cell.* 11:1077-1092, 2000.
- WANG J.Y., Wigston D.J., Rees H.D., Levey A.I., Falls D.L. LIM kinase 1 accumulates in presynaptic terminals during synapse maturation. *J Comp Neurol.* 416:319-334, 2000.
- WATANABE N., Kato T., Fujita A., Ishizaki T., Narumiya S. Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol.* 1: 136-143, 1999.
- WENNERBERG K., Ellerbroek S.M., Liu R.Y., Karnoub A.E., Burridge K., Der C.J. RhoG signals in parallel with Rac1 and Cdc42. *J Biol Chem.* 277(49):47810-47817, 2002.
- WICHE G., Zomzely-Neurath C., Blume A.J. In vitro synthesis of mouse neuroblastoma tubulin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 71:1446-1450, 1974.
- WIESENBERG I., Missbach M., Kahlen J.P., Schrader M., Carlberg C. Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. *Nucleic Acids Res.* 23:327-333, 1995.
- WITT J.J., Roskoski J.R. Rapid protein kinase assay using phosphocellulose paper absorption. *Anal. Biochem.* 66:253-258, 1975.

- WITT-ENDERBY P.A., Mackenzie R.S., Mckeon R.M., Carroll E.A., Bordt S.B., Melan MA. Melatonin induction of filamentous structures in non-neuronal cells that is dependent on expression of the human mt1 melatonin receptor. *Cel Motil Cytoskeleton*; 46:28-42, 2000.
- WITT-ENDERBY P.A., Masana M.I., Dubocovich M.L. Physiological exposure to melatonin supersensitizes the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent signal transduction cascade in Chinese hamster ovary cells expressing the human mt1 melatonin receptor. *Endocrinology* 139:3064-3071, 1998.
- XIANG Y., Li Y., Zhang Z., Cui K., Wang S., Yuan XB., Wu CP., Poo MM., Duan S. Nerve growth cone guidance mediated by G protein-coupled receptors. *Nat Neurosci.* 5(9):843-848, 2000.
- YASHUDA I., Kishimoto A., Cnatu S., Cominaga M., Sajurai A., Nishizuka Y. A synthetic peptide substrate for selective assay of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 166:1220-1223, 1990.
- YOKOYAMA Y., Ito T., Hanson V., Schwartz GK., Aderem A.A., Holland J.F., Tamaya T., Ohnuma T. PMA-induced reduction in invasiveness is associated with hyperphosphorylation of MARCKS and talin in invasive bladder cancer cells. *Int J Cancer.* 75(5):774-779, 1998.
- YU W., Ling C., Baas P.W. Microtubule reconfiguration during axogenesis. *J Neurocytol.* 30:861-875, 2001.
- ZALEWSKI P.D., Porbes I.J., Giannakis C., Cowled P.A., Betts W.H. Synergy between zinc and phorbol ester in translocation of PKC to cytoskeleton. *FEBS Lett.* 273:131-134, 1990.
- ZEIDMAN R., Troller U., Raghuanth A., Palman S., Larsson C. Protein Kinase C epsilon actin-binding site is important for neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Mol. Bio. Cell.* 13(1):12-24, 2002.