



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

PARTICIPACIÓN DE LA CAM-CINASA II  
EN LA DENDRITOGÉNESIS INDUCIDA  
POR MELATONINA EN UN MODELO  
ORGANOTÍPICO DE RATA

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

ALINE DOMÍNGUEZ ALONSO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. GLORIA A. BENÍTEZ KING

COMITÉ TUTOR: DR. DANIEL MARTÍNEZ FONG

DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

MÉXICO, D.F.

FEBRERO, 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

PARTICIPACIÓN DE LA CAM-CINASA II  
EN LA DENDRITOGÉNESIS INDUCIDA  
POR MELATONINA EN UN MODELO  
ORGANOTÍPICO DE RATA

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

ALINE DOMÍNGUEZ ALONSO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. GLORIA A. BENÍTEZ KING

COMITÉ TUTOR: DR. DANIEL MARTÍNEZ FONG

DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

MÉXICO, D.F.

FEBRERO, 2011

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 22 de noviembre de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del la alumna **DOMÍNGUEZ ALONSO ALINE** con número de cuenta **509014508** con la tesis titulada **"PARTICIPACIÓN DE LA CaM-CINASA II EN LA DENDRITOGÉNESIS INDUCIDA POR MELATONINA EN UN MODELO ORGANOTÍPICO DE RATA."**, realizada bajo la dirección de la : **DRA. GLORA A. BENÍTEZ KING.**

Presidente:	DR.	DANIEL MARTÍNEZ FONG
Vocal:	DRA.	CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ
Secretario:	DRA.	GLORIA A. BENITEZ KING
Suplente:	DRA.	LOURDES MASSIEU TRIGO
Suplente:	DR.	LUIS FÉLIX JIMÉNEZ GARCÍA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 19 de enero de 2011

*M. del Coro Arizmendi*

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

## Agradecimientos

- ∂ Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por darme la oportunidad de desarrollar y concluir mis estudios de posgrado y por ofrecerme los diversos recursos académicos y tecnológicos para crecer profesionalmente.



- ∂ Extiendo un agradecimiento al Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz" por el financiamiento otorgado en la subcuenta 138, al proyecto 46593-M del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Corporativo Farmacéutico Medix por los apoyos económicos recibidos para la elaboración del presente proyecto de investigación.



- ∂ Agradezco a la Dra. Gloria A. Benítez King (tutora y madre científica) por darme la oportunidad diaria de pertenecer a su equipo de trabajo y por creer en mí para culminar esta meta. También, le agradezco por compartir conmigo sus conocimientos para continuar mi crecimiento profesional, por su comprensión en los momentos difíciles y por enseñarme los matices de la ciencia.
- ∂ Agradezco al Dr. Daniel Martínez Fong y al Dr. Luis Felipe Jiménez García, miembros del Comité Tutor, por asesorarme y motivarme constantemente en cada evaluación. Además, les agradezco por su comprensión en todo momento y por compartir conmigo sus conocimientos para concluir esta meta.
- ∂ Agradezco a la Dra. Clorinda Arias y a la Dra. Lourdes Massieu, por asesorarme y compartir conmigo sus conocimientos durante la revisión de esta tesis. Gracias por ser parte de mi crecimiento profesional.

## **Agradecimientos a título personal**

- ∂ Mi agradecimiento a la Dra. Isaura Meza por compartir sus conocimientos conmigo en todo momento, y por haberme recibido en su laboratorio para aprender sobre la elaboración de oligos y la transfección celular para la obtención de plásmidos.
- ∂ Le agradezco al Dr. Daniel Díaz por haber compartido conmigo su tiempo y sus conocimientos sobre la elaboración de oligos y la transfección celular para la obtención de plásmidos.
- ∂ Mi agradecimiento a la Sra. Martha Varela (Secretaria del Departamento de Neurofarmacología) por su excelente apoyo secretarial en todos los trámites necesarios para el proyecto y para mí como parte del personal. También por ofrecerme su apoyo y amistad y por enseñarme a desenvolverme en el ambiente laboral.
- ∂ Mi agradecimiento a la Sra. Patricia Chimal Cortés (Auxiliar de Laboratorio) por su excelente apoyo técnico y personal, por mantener en orden mi desorden y por ceder su tiempo cuando más la necesito. También por cuidar mi salud, apapacharme y ser como una segunda madre en el laboratorio.
- ∂ Le agradezco al Dr. Gerardo B. Ramírez Rodríguez por haberme compartido sus conocimientos y por apoyarme con sus consejos y observaciones en el desarrollo de mi tesis de posgrado, así como por las risas y los buenos momentos en el laboratorio.
- ∂ Le agradezco al Q.F.B. Leonardo Ortiz López por haberme enseñado las técnicas del laboratorio para desarrollar este proyecto y compartir conmigo sus conocimientos para el desarrollo de mi tesis de posgrado, así como por los buenos momentos en el laboratorio.
- ∂ Le agradezco a la Sra. Clara Aydee Amaya Castellanos (Secretaria de la Subdirección de Investigaciones Clínicas) por su apoyo secretarial en los diversos trámites que necesitamos realizar como personal del instituto y para el desarrollo del proyecto.
- ∂ Mi agradecimiento a la M. en C. Graciela Jiménez Rubio por sus enseñanzas y su apoyo incondicional cuando más lo he necesitado. Por ser una excelente compañera y amiga.

- ∂ Agradezco al estimado Biol. Héctor Solís Chagoyan por su apoyo como compañero y hermano en cada momento durante la elaboración de esta meta. Gracias por darme alegría, seriedad y discusiones filosóficas y científicas en el laboratorio.
- ∂ Agradezco a nuestro próximo psicólogo José Laguna Chimal por el apoyo fraternal, por los momentos que me desubican de mi parte rígida para ser solamente la hermana y amiga de alguien que me quiere tal y como yo lo hago.
- ∂ Agradezco a la Lic. Ana Laura Alba Barceinas por sus múltiples consejos y apoyo en su especialidad como comunicadora visual, por recomendarme todos esos programas que he aprendido a usar bajo su dirección.
- ∂ Agradezco a la M. en C. Marcela Valdés por constante apoyo y amistad en la escritura de esta tesis, cito textual: "Tesis Tesis, no te distraigas!"... Esas palabras fueron una enorme motivación para culminar esta meta.
- ∂ Mi agradecimiento a la Biol. Erandi Figueroa Pérez por su apoyo y amistad durante todos los momentos compartidos durante el posgrado.
- ∂ Agradezco enormemente al Dr. Martín Jesús Soberón Mobarak por motivarme día a día con sus comentarios peculiares para mantenerme en pie y no dejarme caer cuando se da el fenómeno de contrastes.

## *Dedicatorias*

*A Dios y a la vida:  
por guiarme y darme el conocimiento suficiente  
para encontrar una gota de su sabiduría  
en el maravilloso mundo de nuestro cerebro,  
y con esto, poder brindar una ayuda incondicional  
a la humanidad.*

*A toda esa gran constelación de estrellas  
familiar que con su brillo y fulgor protegen mi  
camino y me guían para cumplir mi destino.*

*A mis abuelos paternos y maternos:  
Porque sus almas me han convertido  
en una mujer luchadora y perseverante  
y con su ejemplo me motivan a seguir  
adelante día a día.*

*A mi padre:  
Por ser genéticamente competente para traerme a la vida  
y darme la oportunidad de ser quién soy  
para experimentar mi vida personal y profesional.*

*A mi amada Mamá Andy:  
Por ser la fuente de mi vida y el pilar de mi vida,  
por compartir sus experiencias conmigo,  
por enseñarme a disfrutar de los sabores de la vida.  
Sencillamente sólo por ser quién eres:  
Una mamá tan indescritiblemente  
inteligente, bella, solidaria, amorosa y comprensiva.*



*A mi hermanito:*

*Por cederme su espacio terrenal y  
darme fuerzas extras para seguir mi camino,  
por compartir alma con alma  
las sensaciones de la vida.*

*A mi alma gemela, Fidel:*

*Por ser mi complemento perfecto en la vida  
por brindarme su apoyo incondicional y sus consejos,  
por llenar mi vida de amor y felicidad. Je t'adore♥.*

*A mi Zingo, por ser mi fiel amigo y confidente. ¡Te extraño!*

*A mis niños traviesos... Barchis, Jabibi, Coffee y Kyara,  
por ser mi fuente de alegría al llegar a casa,  
por su amor incondicional y fiel.*

*A mis amistades entrañables,*

*Ana, Elo, Adi, Kari, Naty, Pelón, Rafa, Uriel y Mony:*

*Por darme su amistad por tantos años,  
por animarme en cualquier espacio-tiempo de mi vida,  
por las risas y las trivialidades, por seguir a mi lado  
y compartir nuestro pasado, presente y futuro  
como una fiesta que nunca termina.*

*Los quiero muchooo.*

## ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>5</b>
<b>III.</b>	<b>RESUMEN .....</b>	<b>7</b>
<b>IV.</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>9</b>
<b>V.</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
	1. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.....	11
	1.0. DEMENCIAS .....	12
	1.0.1. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS DEMENCIAS .....	14
	1.0.2. EL SISTEMA NERVIOSO EN LAS DEMENCIAS .....	16
	1.0.2.1. ALTERACIONES GENERALES .....	16
	1.0.2.2. EL HIPOCAMPO EN LAS DEMENCIAS .....	17
	1.0.2.2.1. Neuroanatomía breve del hipocampo .....	17
	1.0.2.2.2. Alteraciones estructurales .....	21
	1.0.2.2.3. Alteraciones celulares .....	22
	1.0.2.2.4. Alteraciones subcelulares .....	23
	1.0.3. TRATAMIENTOS POSIBLES DE LAS DEMENCIAS .....	27
	2. LA MELATONINA.....	29
	2.0. ESTRUCTURA QUÍMICA Y SUS PROPIEDADES .....	29
	2.1. BIOSÍNTESIS Y METABOLISMO DE LA MELATONINA .....	31
	2.2. PROPIEDADES FISIOLÓGICAS DE LA MELATONINA .....	36
	2.2.1. PAPEL DE LA MELATONINA EN EL CITOESQUELETO .....	38
	3. DENDRITAS.....	44
	3.0. DENDRITOGÉNESIS .....	45
	3.0.1. MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA FORMACIÓN Y CRECIMIENTO DE LAS DENDRITAS.....	47
	3.0.1.1. CaM-CINASA II .....	51
	3.0.1.1.1. LOS SUSTRATOS DE LA CaM-CINASA II: PROTEÍNAS QUE SE ASOCIAN A LOS MICROTÚBULOS Y QUE ESTABILIZAN EL CITOESQUELETO .....	54
<b>VI.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>55</b>
<b>VII.</b>	<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>56</b>
<b>VIII.</b>	<b>OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>56</b>
<b>IX.</b>	<b>OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>56</b>
<b>X.</b>	<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>57</b>
	A. OBTENCIÓN DE REBANADAS DE HIPOCAMPO .....	57

	B. CULTIVO ORGANOTÍPICO DE HIPOCAMPO .....	57
	C. CARACTERIZACIÓN DEL CITOESQUELETO EN CULTIVOS ORGANOTÍPICOS .....	57
	D. EFECTOS DE LA MELATONINA SOBRE LA DENDRITÓGENESIS EN CULTIVOS ORGANOTÍPICOS .....	59
	E. VÍA DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADA EN LA DENDRITOGÉNESIS INDUCIDA POR LA MELATONINA .....	59
	F. EVALUACIÓN DE LA DENDRITOGÉNESIS POR EL MÉTODO DE SHOLL MODIFICADO .....	59
	G. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS RESULTADOS .....	61
<b>XI.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>62</b>
	A. CARACTERIZACIÓN DEL CITOESQUELETO EN CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE HIPOCAMPO DE RATA.....	62
	B. EFECTOS DE LA MELATONINA SOBRE LA DENDRITÓGENESIS EN CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE HIPOCAMPO DE RATA.....	67
	C. VÍA DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADA EN LA DENDRITOGÉNESIS INDUCIDA POR LA MELATONINA EN NEURONAS HILARES DE CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE HPOCAMPO DE RATA.....	81
<b>XII.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>95</b>
<b>XIII.</b>	<b>CONCLUSIÓN .....</b>	<b>103</b>
<b>XIV.</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>103</b>
<b>XV.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>104</b>

## I. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>FIGURAS</b>	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Demencia tipo Alzheimer.	14
<b>Figura 2.</b> Características patológicas de las demencias.	17
<b>Figura 3.</b> Representaciones de la formación hipocampal y parahipocampal en el cerebro de rata.	20
<b>Figura 4.</b> Imágenes seriales de hipocampo de un paciente con Alzheimer obtenidas por resonancia magnética.	21
<b>Figura 5.</b> Imagen representativa de las marañas neurofibrilares y las placas amiloideas en un corte de cerebro de un paciente con Alzheimer.	25
<b>Figura 6.</b> Micrografías de la capa granular del giro dentado en cerebros de sujetos control y pacientes con Alzheimer.	26
<b>Figura 7.</b> Micrografía obtenida por microscopía electrónica de transmisión de cortes de cerebro de pacientes con Alzheimer.	27
<b>Figura 8.</b> Estructura química de la melatonina.	30
<b>Figura 9.</b> Biosíntesis de melatonina.	32
<b>Figura 10.</b> Clasificación de los patrones (A, B, C) de secreción de la melatonina en diversas especies de mamíferos.	34
<b>Figura 11.</b> Mecanismos de transducción de la norepinefrina sobre los receptores adrenérgicos de la glándula pineal.	36
<b>Figura 12.</b> Efectos de la melatonina sobre la reorganización de los microtúbulos en células N1E-115 tratadas con ácido ocaído.	40
<b>Figura 13.</b> Formación de neuritas inducido por melatonina en etapas tempranas de la neuritogénesis y la participación de la Rho/ROCK en células N1E-115.	42
<b>Figura 14.</b> Efecto de la melatonina sobre la proteína MAP2 en cortes coronales de la región CA1 del hipocampo.	43
<b>Figura 15.</b> Neurona de hipocampo.	45

<b>Figura 16.</b> Formación de las neuritas.	45
<b>Figura 17.</b> Proceso de dendritogénesis en las neuronas.	46
<b>Figura 18.</b> Participación de las GTPasas pequeñas en la organización de los microfilamentos.	48
<b>Figura 19.</b> Citoesqueleto y su participación en el cono de crecimiento para la formación de dendritas nuevas.	49
<b>Figura 20.</b> Participación de la proteína MAP2 en la dendritogénesis.	50
<b>Figura 21.</b> Estructura y distribución topológica de la CaM-Cinasa II.	52
<b>Figura 22.</b> Funciones de las isoformas de la CaM-Cinasa II.	53
<b>Figura 23A.</b> Esquema del método de Sholl modificado en una neurona multipolar.	60
<b>Figura 24.</b> Regiones principales del hipocampo en los cultivos organotípicos de rata.	62
<b>Figura 25.</b> Presencia de astrocitos y neurofilamentos en cultivos organotípicos de hipocampo de rata.	63
<b>Figura 26.</b> Organización de neurofilamentos M+H en cultivos organotípicos de hipocampo de rata.	64
<b>Figura 27.</b> Organización de las neurofilaminas M+H y de la proteína MAP2 en cultivos organotípicos de hipocampo de rata.	65
<b>Figura 28.</b> Caracterización de las dendritas en los cultivos organotípicos de hipocampo mediante la técnica de inmunohistoquímica.	66
<b>Figura 29.</b> Distribución de las regiones principales del hipocampo en los cultivos organotípicos de hipocampo de rata.	67
<b>Figura 30.</b> Control negativo para el anticuerpo anti-MAP2 en la tinción con inmunoperoxidasas en cultivos organotípicos de hipocampo de rata.	68
<b>Figura 31.</b> Efecto dosis-respuesta de melatonina sobre la dendritogénesis en las neuronas hilares de cultivos organotípicos de hipocampo de rata.	70
<b>Figura 32.</b> Efecto dosis-respuesta de melatonina en el número y longitud de las dendritas.	73

<b>Figure 33.</b> Efecto dosis-respuesta de melatonina en el grosor de las dendritas primarias y la complejidad dendrítica.	74
<b>Figure 34.</b> Efecto curso temporal de melatonina sobre la dendritogénesis en las neuronas hilares de cultivos organotípicos de hipocampo de rata.	76
<b>Figure 35.</b> Efecto curso temporal de melatonina en el número y longitud de las dendritas.	79
<b>Figure 36.</b> Efecto curso temporal de melatonina en el grosor de las dendritas primarias y la complejidad dendrítica.	80
<b>Figura 37.</b> Efecto del agonista y el antagonista de los receptores a melatonina en la dendritogénesis inducida por melatonina.	84
<b>Figura 38.</b> Participación de la los receptores a melatonina en la formación y crecimiento de las dendritas en neuronas hilares.	85
<b>Figura 39.</b> Participación de la los receptores a melatonina en el grosor de las dendritas primarias y la complejidad de las dendritas en neuronas hilares.	86
<b>Figura 40.</b> Participación de la PKC en la dendritogénesis inducida por melatonina.	89
<b>Figura 41.</b> Participación de la CaM-Cinasa II en la dendritogénesis inducida por melatonina.	90
<b>Figura 42.</b> Participación de la PKC y la CaM-Cinasa II en la formación y crecimiento de las dendritas en neuronas hilares.	91
<b>Figura 43.</b> Participación de la PKC y la CaM-Cinasa II en el grosor de las dendritas primarias y la complejidad de las dendritas en neuronas hilares.	92
<b>Figura 44.</b> Efecto del compuesto Y-27632 en la dendritogénesis inducida por melatonina.	93
<b>Figura 45.</b> Participación de la ROCK en la formación y el crecimiento de las dendritas en neuronas hilares.	94
<b>Figura 46.</b> Participación de la ROCK en el grosor de las dendritas primarias y la complejidad de las dendritas en neuronas hilares.	95
<b>Figura 47.</b> Participación de la PKC y CaM-Cinasa II sobre la dendritogénesis en las neuronas hilares de cultivos organotípicos de hipocampo.	98

<b>Figura 48.</b> Participación de los receptores de melatonina aunado a la inhibición de ROCK sobre la dendritogénesis en las neuronas hilares de cultivos organotípicos de hipocampo.	99
---	----

<b>TABLAS</b>	<b><i>Pág.</i></b>
<b>Tabla 1.</b> Efectos de la curva dosis-respuesta de melatonina sobre los parámetros dendríticos de las células hilares durante la dendritogénesis.	72
<b>Tabla 2.</b> Efectos del curso temporal de melatonina sobre los parámetros dendríticos de las células hilares durante la dendritogénesis.	77
<b>Tabla 3.</b> Interacciones moleculares de la melatonina y evaluación de la misma sobre las dendritas primarias y secundarias.	82
<b>Tabla 4.</b> Interacciones moleculares del la melatonina y evaluación de la misma sobre la complejidad dendrítica.	83

## II. ABREVIATURAS

<b>MCP</b>	Muerte celular programada
<b>ADN</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>GDS</b>	Global Deterioration Scale o Escala de deterioro global
<b>MMSE</b>	Mini-examen del estado mental
<b>GD</b>	Giro dentado
<b>CA</b>	<i>Cornus ammonis</i> o cuerno de Amón
<b>CE</b>	Corteza entorrinal
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento neural
<b>BDNF</b>	Factor neurotrófico derivado de cerebro
<b>MAP</b>	Proteínas de asociación a los microtúbulos
<b>STOP</b>	Stable tubule only polypeptide
<b>TPH</b>	Triptofano hidroxilasa
<b>AAAD</b>	Aminoácido aromático descarboxilasa
<b>NAT</b>	Serotonina N-acetiltransferasa
<b>HIOMT</b>	Hidroxindol-O metiltransferasa
<b>PA</b>	Placas amiloideas
<b>MN</b>	Marañas neurofibrilares
<b>AFMK</b>	N <sup>1</sup> -acetyl-N <sup>2</sup> formil-5-metoxiquinuramina
<b>AMK</b>	Nγ-acetil-5-metoxiquinuramina
<b>SCN</b>	Núcleo supraquiasmático
<b>NPV</b>	Núcleo paraventricular



<b>NE</b>	Norepinefrina
<b>PKC</b>	Proteína cinasa C
<b>AC</b>	Adenilato ciclasa
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Ca <sup>2+</sup>
<b>cAMP</b>	Adenosina cíclica 3',5'-monofosfato
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>AO</b>	Ácido ocadáico
<b>CaM</b>	Calmodulina
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>ROCK</b>	Proteína cinasa asociada a Rho
<b>RhoA</b>	Miembro homologo de Ras A
<b>Rac1</b>	Substrato de la toxina botulínica C3 relacionada con Ras
<b>aCSF</b>	Fluido cerebro espinal artificial
<b>BC</b>	Buffer de citoesqueleto
<b>PBS</b>	Buffer salino de fosfatos 1X
<b>TBS</b>	Solución amortiguadora de Tris
<b>VEH</b>	Vehículo
<b>MEL</b>	Melatonina
<b>BIS</b>	Bisindolilmaleimida, inhibidor de la PKC
<b>Y-27</b>	Compuesto Y-27631, inhibidor de la ROCK
<b>LZD</b>	Luzindol, antagonista de los receptores a melatonina
<b>8M</b>	Compuesto 8M-PDOT, agonista de los receptores a melatonina

### III. RESUMEN

Las demencias se caracterizan por la pérdida de la memoria y de la cognición. En estos padecimientos se ha observado que ocurre la pérdida de neuronas hilares, de las arborizaciones dendríticas y de las sinapsis en el hipocampo. La melatonina (MEL) previene el colapso del citoesqueleto causado por el ácido ocaáico que produce cambios moleculares semejantes a los de las enfermedades neurodegenerativas. También la MEL incrementa la formación de neuritas en las células N1E-115 por medio de la interacción con la proteína cinasa C (PKC) y la proteína cinasa asociada a Rho (ROCK). Se sabe que la MEL activa a la PKC, que a su vez fosforila a la calmodulina (CaM). Esta proteína en estado fosforilado se traslada a la fracción citoesqueleto-membranal en donde activa a la CaM-Cinasa II que se localiza en las densidades postsinápticas y fosforila a las proteínas en los residuos de serina y treonina para la formación de las dendritas.

En este trabajo se caracterizó el efecto de la MEL sobre la dendritogénesis en cultivos organotípicos de hipocampo de rata, así como la participación de la CaM-Cinasa II en este proceso. Los cultivos organotípicos de rebanadas de hipocampo, con un grosor de 400µm, se incubaron con medio neurobasal suplementado con B27. Después de una semana, se realizó un curso temporal incubando los cultivos con vehículo (VEH) o con  $10^{-7}$  M de MEL por 3, 6, 9 y 12 hs. También se elaboró una curva dosis-respuesta incubando por 6 h con el VEH o con varias concentraciones de MEL ( $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-5}$  M).

Para determinar la participación de los receptores a melatonina en la vía de señalización de la dendritogénesis, las rebanadas de hipocampo se incubaron por 6 h con el VEH o con  $10^{-7}$  M de MEL o con 10 nM del compuesto 8M-PDOT (agonista del receptor), o se pre-incubaron por 15 min con 100 µM de luzindol (antagonista del receptor) seguido de una incubación con el VEH, o con  $10^{-7}$  M de MEL o con el compuesto 8M-PDOT por 6 h.

Asimismo, para determinar la participación de las proteínas PKC, CaM-Cinasa II y ROCK en el mecanismo de acción de la melatonina se emplearon inhibidores específicos para cada proteína como la bisindolilmaleimida, el KN-62 y el compuesto Y-27632, respectivamente. Las rebanadas de hipocampo también se pre-incubaron por 15 min con 5 µM de bisindolilmaleimida, o con 10 µM de KN-62, o 10 µM de Y-27632 seguido de una incubación con el VEH, o con  $10^{-7}$  M de MEL o con el compuesto 8M-PDOT por 6 h.

Las dendritas se identificaron con un anticuerpo anti-MAP2 en cortes de 50 µm por la tinción de inmunoperoxidasas. La formación y alargamiento de dendritas, así como la complejidad dendrítica se determinó con el método de Sholl modificado.

Los resultados mostraron un promedio de tres dendritas primarias y cuatro secundarias por célula en las rebanadas incubadas en VEH a las 3 h, mientras que a las 12 h fueron 3 y 5 por célula, respectivamente. En las rebanadas incubadas por 3, 6, 9 y 12 h con  $10^{-7}$  M de MEL se observó un aumento en el número (N) de las dendritas primarias (N= 4.2, 5, 5.45 y 4.65) y secundarias (N= 6.75, 7.65, 8.75 y 7.4) por célula. También se observó un mayor número de ramificaciones (R) (R=7.05, 12.35, 16.6 y 15.2) y de terminaciones (T) (T= 12.2,

19.6, 25.35 y 22.1) por célula para cada tiempo estudiado (3, 6, 9 y 12 h), respectivamente. La máxima longitud de las dendritas primarias, secundarias y terciarias fue de 83  $\mu\text{m}$  a las 12 h de incubación con  $10^{-7}$  M de MEL.

Además, la MEL modificó la geometría y la morfología de las dendritas de manera dependiente de la concentración. En presencia del VEH se observaron un promedio de dos dendritas primarias por célula con una longitud de 7.24  $\mu\text{m}$  y un grosor de 1.41  $\mu\text{m}$ . La complejidad dendrítica definida por el número de ramificaciones y terminaciones, así como por la longitud total de la dendrita, en el vehículo fue de 2.3, 5.2 y 28.5  $\mu\text{m}$ , respectivamente. La concentración óptima de la MEL para estimular la formación de dendritas fue de  $10^{-7}$  M, con la cual se observó un aumento en el número de dendritas primarias (4.3) y secundarias (7.8) por célula. También la MEL aumentó la longitud en un 170.5% y el grosor en un 183.6%. La complejidad dendrítica a esta concentración muestra un aumento significativo en cada parámetro (R= 345.6%, T= 203.8%, longitud total= 107.8%) en comparación con el VEH.

El inhibidor de la CaM-Cinasa II (KN-62) bloqueó la formación, el alargamiento y la complejidad de las dendritas nuevas inducido por melatonina, ya que aún en presencia de ésta se colapsaron las dendritas hasta disminuir los valores de todos los parámetros evaluados. Esta dendritogénesis inducida por la melatonina es independiente de sus receptores de membrana, ya que el antagonista (luzindol) no bloqueó el efecto de la melatonina, mientras que el agonista por sí solo no incrementó los parámetros de las dendritas. En contraste, la bisindolilmaleimida I (inhibidor de la PKC) inhibió la dendritogénesis aún en presencia de la melatonina, lo cual indica que la CaM-Cinasa II participa en la vía de la señalización debajo de la activación de PKC. Además, el compuesto Y-27632 (inhibidor de la ROCK) bloqueó los efectos de la melatonina en la dendritogénesis; sin embargo, la formación y crecimiento de dendritas nuevas se estimuló en presencia del Y-27632 por la activación de los receptores de MEL con el agonista 8M-PDOT, lo cual podría indicar la participación de otras GTPasas pequeñas.

Los resultados indican que las concentraciones fisiológicas ( $10^{-7}$  M,  $10^{-5}$  M) de la MEL aumentaron la formación, el alargamiento y la complejidad dendrítica de las neuronas hilares del hipocampo mediante la participación de la CaM-Cinasa II en una vía de señalización que es independiente de receptores a melatonina y dependiente de la activación de la PKC. Los resultados sugieren que la MEL podría ser utilizada en pacientes neuropsiquiátricos como coadyuvante en el tratamiento de las demencias al modificar la citoarquitectura neuronal mediante la reparación de las dendritas perdidas y al aumentar las probabilidades de las dendritas para restablecer conexiones sinápticas produciendo cambios en la plasticidad neuronal del hipocampo.

## IV. ABSTRACT

Dementias are characterized by memory and cognition loss. Neuronal circuitry of hippocampus and frontal cortex are mainly affected, and loss of synapses and dendritic arborizations also occurs. Both of these structures are supported by neuronal cytoskeletal organization. Melatonin (MEL), the main product secreted by the pineal gland, has been shown to increase neurite formation in N1E-115 cells through protein kinase C (PKC) and Rho-associated kinase (ROCK), which is a downstream kinase in the PKC signaling pathway. PKC activated by MEL phosphorylates calmodulin (CaM) and induces its translocation from the cytosol to the cytoskeleton where activates CaM kinase II. This serine threonine kinase is localized in the postsynaptic densities and its stimulation elicits dendrite formation.

The aim of this work was to characterize dendritogenesis elicited by MEL in hippocampal organotypic cultures, and also, the participation of CaM kinase II was explored in this process. Organotypic cultures of hippocampal slices (400  $\mu\text{m}$  of thickness) were cultured with neurobasal medium supplemented with B27 during one week. A time course analysis of melatonin effect was performed by incubating the hippocampal slices for 3, 6, 9 and 12 h with neurobasal medium either with the vehicle (VEH) or  $10^{-7}\text{M}$  MEL. Dose-response melatonin effects on dendrite formation were also evaluated in hippocampal slices incubated for 6 h with VEH or either  $10^{-11}\text{M}$ ,  $10^{-9}\text{M}$ ,  $10^{-7}\text{M}$  and  $10^{-5}\text{M}$  MEL concentrations.

To determine the participation of melatonin receptor in the signaling pathway of dendritogenesis elicited by MEL, hippocampal slices were incubated for 6 h with either vehicle,  $10^{-7}\text{M}$  MEL or 10 nM 8-MPDOT (melatonin receptor agonist), or preincubated for 15 min with 100  $\mu\text{M}$  luzindole (melatonin receptor antagonist) followed by an incubation with VEH, MEL or 8M-PDOT for 6h.

To establish the participation of PKC, CaM-kinase II and ROCK participation in dendrite formation, elongation and complexity elicited by MEL, specific inhibitors were used for each protein (bisindolylmaleimide, KN-62 and Y-27632, respectively). Hippocampal slices were pre-incubated for 15 min with either 5  $\mu\text{M}$  bisindolylmaleimide I, 10  $\mu\text{M}$  KN-62, or 10  $\mu\text{M}$  Y-27632 followed by an incubation with VEH or  $10^{-7}\text{M}$  MEL or 8M-PDOT for 6 h.

Hippocampal slices of 50  $\mu\text{m}$  were stained with a specific anti-MAP2 antibody used for dendrites and mature neurons recognition, by immunoperoxidase staining. Dendritic architecture such as formation, elongation and complexity of dendrites was evaluated by the modified Sholl method.

Time course melatonin effects analysis showed an average of three primary dendrites and four secondary dendrites per cell in the VEH incubated slices at 3 h, while three and five per cell were observed at 12 h, respectively. In hippocampal slices incubated for 3, 6, 9 and 12 h with  $10^{-7}\text{M}$  MEL, an augmentation in the number (N) of primary (N= 4.2, 5, 5.45 and 4.65) and secondary (N= 6.75, 7.65, 8.75 and 7.4) dendrites per cell was observed after MEL exposure. Also, it was observed more dendritic nodes (R) (R=7.05, 12.35, 16.6

and 15.2) and tips (T) (T= 12.2, 19.6, 25.35 and 22.1) per cell at 3, 6, 9 y 12 h, respectively. Maximum length of primary, secondary and tertiary dendrites was 83  $\mu\text{m}$  at 12 h.

Moreover, MEL modifies dendrite geometry and morphology in a dose-response manner. In the vehicle (VEH) incubated slices, an average of two primary dendrites per cell was observed, and their length and thickness were 7.24  $\mu\text{m}$  and 1.41  $\mu\text{m}$ , respectively. Dendrite complexity was defined by the number of nodes, tips and total length. In the VEH incubated cells these values were 2.3, 5.2, and 28.5  $\mu\text{m}$ , respectively. MEL increases primary (4.3/cell) and secondary (7.8/cell) dendrites optimally at  $10^{-7}\text{M}$  in hilar interneurons and mossy cells. Also, MEL increases thickness by 183.6% and length by 170.5% of primary dendrites. Dendrite complexity was also augmented by MEL (R= 345.6%, T= 203.8%, total length=107.8%).

The CaM kinase II inhibitor (KN-62) blocked the formation, elongation and complexity of new dendrites in the presence of MEL, and it was also observed that the dendrites collapsed. All dendrite parameters diminished below basal values. Dendritogenesis elicited by MEL resulted to be independent of melatonin receptors because the antagonist, luzindole, did not abolish MEL effects, and the 8M-PDOT agonist did not increase any dendrite parameter by itself. By contrast, bisindolylmaleimide I (PKC inhibitor) inhibited dendritogenesis even in presence of MEL, which indicates that CaM-kinase II participate as a downstream enzyme in the PKC signaling pathway. The Y-27632 compound (ROCK inhibitor) also blocked the melatonin effects on dendritogenesis, however, the formation and elongation of new dendrites by melatonin receptors activation was stimulated in the presence of the ROCK inhibitor, which may involve the participation of other GTPases.

The results indicate that physiologic concentrations ( $10^{-7}\text{M}$ ,  $10^{-5}\text{M}$ ) of MEL increase dendrite formation, elongation and complexity in the hilar neurons of the hippocampus through CaM kinase II participation in the signaling pathway that is independent from melatonin receptors and dependent from PKC activation. Moreover, data suggest that MEL can be useful in the treatment of neuropsychiatric diseases to modify neuronal cytoarchitecture by repairing the dendrite loss, and produce changes in hippocampal neuronal plasticity by augmenting dendrite probabilities for reestablishing the synaptic connections.

## V. INTRODUCCIÓN

### 1. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Las enfermedades neurodegenerativas son padecimientos del sistema nervioso central que se caracterizan por la pérdida progresiva de la estructura y función de células neuronales, células gliales y células musculares (Pasantes *et al.*, 1999; Williams, 2006). Esta pérdida celular puede afectar las estructuras y actividades neurales a diferentes niveles como son las vías moleculares, las sinapsis, las neuronas, los circuitos y las redes neuronales más complejas (Palop, 2006). Existen diversos mecanismos celulares y moleculares implicados en la pérdida neuronal como son: el depósito de proteínas insolubles (Williams, 2006, Palop 2006), la disfunción en la degradación de proteínas (Rubinsztein, 2006), la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo (Lin y Beal, 2006), la excitotoxicidad (Pasantes *et al.*, 1999), la muerte celular programada (Bredesen *et al.*, 2006) y la presencia de priones (Caughey y Baron, 2006). Cada uno de éstos podría estar actuando por separado o de forma paralela en tipos celulares iguales o diferentes dependiendo de la enfermedad neurodegenerativa (Palop, 2006).

El depósito de proteínas insolubles es un proceso anormal que ocurre cuando las proteínas presentan modificaciones post-traduccionales anormales, o bien son secuestradas por otras proteínas para formar acumulaciones fibrosas tanto intracelulares como extracelulares en las enfermedades neurodegenerativas. Estos depósitos proteicos fueron descubiertos en 1906, por Alois Alzheimer en el cerebro *post mortem* de un paciente con la enfermedad de Alzheimer (Fig. 1), en el cual observó las placas amiloides y las marañas neurofibrilares, que ahora son los marcadores histopatológicos de esta enfermedad (Landsbury, 2006). El debate sobre el depósito de estas proteínas insolubles ha sido abordado con base en criterios neuropatológicos, genéticos y biofísicos, en las cuales sugieren la posibilidad de que estos depósitos tanto protofibrilares como fibrilares de las proteínas podrían ser la causa y/o la consecuencia de estas enfermedades, así como el vínculo entre genes específicos de la enfermedad y las proporciones de las proteínas nativas y mutantes de las enfermedades neurodegenerativas (Landsbury, 2006). Estos depósitos anormales de proteínas afectan la integridad de las sinapsis, tanto de las terminales presinápticas como de las células postsinápticas, y en consecuencia, promueve la ruptura de circuitos neuronales del hipocampo que son un componente principal de la plasticidad neuronal para el almacenamiento de la memoria. Sin embargo, la síntesis y la degradación de estas proteínas insolubles podrían estar reguladas mediante otros mecanismos celulares y moleculares como ocurre en las enfermedades de Parkinson, de Huntington o de Alzheimer. En estas enfermedades conocidas como proteinopatías se ha observado la disfunción de las vías de degradación como el sistema de ubiquitina-proteosoma o la macroautofagia que pueden contribuir al depósito de proteínas insolubles (Rubinsztein, 2006).

Otros mecanismos como la excitotoxicidad, el estrés oxidativo y la inflamación también están involucrados en estas proteinopatías (Palop, 2006). Tal es el caso del estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial, los cuales tienen notables efectos citotóxicos por la formación de radicales libres, la interacción con proteínas asociadas a la neurodegeneración y la regulación de la sobrevivencia y muerte celular programada (MCP) (Lin y Beal, 2006). Por otro lado, la excitotoxicidad provocada por neurotransmisores excitadores como el glutamato producen un aumento en el calcio intracelular ( $Ca^{2+}$ ) que desencadena una serie de reacciones metabólicas, las cuales producen la degeneración y la destrucción de las células neuronales (Pasantes *et al.*, 1999). Otro mecanismo es la MCP o *apoptosis* (término griego acuñado en los años 70 por los investigadores Wyllie, Kerr y Currie), el cual es un evento celular subsecuente a las alteraciones fisiológicas (ejemplo: las deficiencias electrofisiológicas, el estrés celular), a las alteraciones microanatómicas (ejemplo: la retracción de neuritas y la pérdida de sinapsis) y a otras alteraciones celulares como el daño del ADN, la carencia de factores tróficos, el depósito de proteínas insolubles, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la excitotoxicidad (Pasantes *et al.*, 1999; Bredesen *et al.*, 2006).

Por último, un caso especial es la pérdida neuronal originada por priones o proteínas priónicas. Estos priones son glicoproteínas que forman agregados supramoleculares acelulares y patógenos con plegamientos anómalos ricos en láminas beta, los cuales desencadenan enfermedades neurodegenerativas llamadas encefalopatías espongiformes transmisibles. Estas formas aberrantes de las proteínas priónicas ocasionan alteraciones en los procesos de sinaptogénesis, neuritogénesis, polarización, homeostasis de cobre, entre otras (Caughey y Baron, 2006). La neurodegeneración originada por los mecanismos celulares y moleculares mencionados causa daños cerebrales en el paciente que se manifiestan como cambios conductuales y alteraciones de las actividades cotidianas como el equilibrio, el habla, la respiración, las relaciones interpersonales, entre otras.

## 1.0. DEMENCIAS

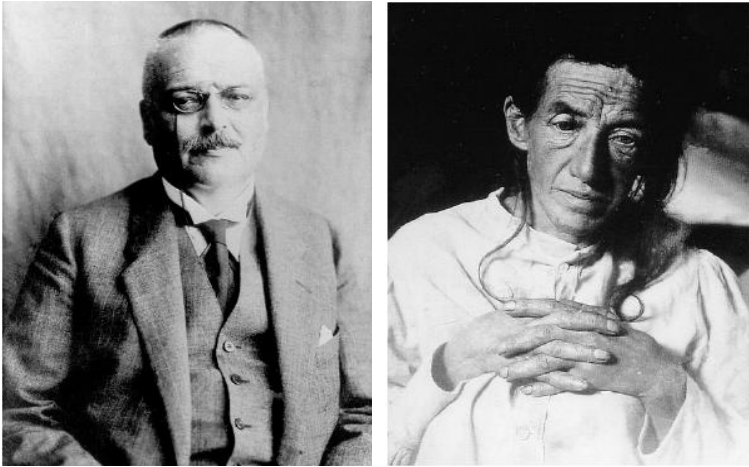
Uno de estos padecimientos neurodegenerativos, progresivos son las demencias, que se caracterizan por múltiples deficiencias cognitivas que incluyen tres tipos de síntomas: 1) la pérdida de la cognición, que incluye la memoria (aprendizaje, evocación, reconocimiento), las funciones ejecutivas, las habilidades visuales, la abstracción y la atención; 2) los cambios en la personalidad y en la conducta, que incluyen depresión, ansiedad, irritabilidad, ideas paranoides, alucinaciones, agresividad y disturbios del ciclo sueño-vigilia; 3) el detrimento de las capacidades para ejecutar actividades de la vida cotidiana como son: comer, vestirse, lavar, etc. (Burns *et al.*, 2002; URL1).

Otras características diagnósticas que definen a estos pacientes son las siguientes deficiencias cognitivas como: a) **afasia**, que proviene del griego ἀφασία que significa *sin*

*palabra*, es la pérdida de la capacidad para expresar y comprender el lenguaje, así como dificultad para escribir y leer (Burns *et al.*, 2002; URL1; URL2); b) **apraxia**, que es la pérdida de la capacidad para realizar movimientos de propósito o previamente aprendidos por la disociación entre la idea y la ejecución motora, así como pérdida de las funciones sensoriales (Burns *et al.*, 2002; URL1; URL3); c) **agnosia**, que proviene del griego ἄγνοσία que significa *desconocimiento*, es la pérdida de la capacidad para reconocer estímulos aprendidos (ejemplos: objetos, personas, sonidos, olores, etc.) y para aprender nuevos estímulos (Burns *et al.*, 2002; URL1); y d) **disfunción ejecutiva**, que es la pérdida de las funciones ejecutivas que le permiten al individuo pensar abstractamente, planear, iniciar, secuenciar, monitorear y parar un comportamiento complejo durante sus actividades cotidianas (Burns *et al.*, 2002; URL1). Todas estas deficiencias cognitivas disminuyen la capacidad de los pacientes para vivir de manera independiente y valerse por sí mismos, y también dificultan los cuidados por parte de los familiares (URL1).

Las demencias pueden ser clasificadas por el daño cognitivo o el grado de severidad del padecimiento. Para ello se emplean instrumentos de evaluación psiquiátrica como la escala de deterioro global (GDS por sus siglas en inglés Global Deterioration Scale) y la escala CDR (URL6). De acuerdo con estas escalas, los tipos de demencia se desglosan de forma general en: 1) demencia leve, cuando el paciente tiene dificultades para preparar alimentos y manejar los horarios de medicación (un mini-examen del estado mental (MMSE) con un puntaje mayor a 18, un GDS de 4 y un CDR de 1); 2) demencia moderada, cuando la persona tiene dificultades para preparar alimentos más simples, limpieza de la casa y requiere de cuidados especiales (MMSE de 10 a 18, un GDS de 5 a 6 y un CDR de 2); y 3) demencia severa, cuando la persona requiere asistencia personal de tiempo completo (un MMSE menor a 10, un GDS de 6 a 7 y un CDR de 3) (URL6). A su vez, estas enfermedades pueden clasificarse de acuerdo a su etiología en: demencia tipo Alzheimer (Fig. 1), demencia vascular, demencia causada por otras condiciones (ejemplos: el virus de inmunodeficiencia humana, trauma craneal, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington), demencia inducida por sustancias persistentes (ejemplo: abuso de drogas, medicación o exposición a toxinas), demencia por múltiples etiologías y demencia no especificada (URL1). Algunas otras también son conocidas como tauopatías, tales como la enfermedad de Alzheimer, la demencia senil, la enfermedad de Pick, la degeneración corticobasal y la parálisis progresiva supranuclear (Ávila, 2000).





**Figura 1. Demencia tipo Alzheimer.** En el panel de la izquierda se muestra al Dr. Alois Alzheimer, quien descubrió esta patología mental; y en el panel de la derecha se muestra al primer paciente que analizó, al cual nombró Auguste D. *Fuente: Burns et al., 2002.*

### **1.0.1. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS DEMENCIAS.**

Las demencias son enfermedades mentales que afectan alrededor de 24 a 30 millones de personas en todo el mundo (URL4; URL11) con 4.6 millones de casos nuevos anualmente, es decir, un caso nuevo cada 7 segundos (URL11). Además, las demencias ocupan el sexto lugar de las enfermedades mentales que causan discapacidad en las personas que las padecen (URL9). Por ello se han convertido en un problema de primera magnitud para los sistemas de salud pública (Baldereschi *et al.*, 2008). La edad para la aparición de las demencias depende de su etiología, generalmente aparece en los últimos años de vida, y presenta una alta prevalencia por encima de los 85 años (URL1; URL6). Además, una gran variedad de estudios epidemiológicos han mostrado que la prevalencia de las demencias se duplica aproximadamente cada cinco años de edad, en especial la de tipo Alzheimer que aumenta dramáticamente de forma exponencial con la edad (Manubens *et al.*, 1995; URL8; URL1; Williams, 2006; URL6).

A nivel mundial, las tasas de prevalencia según la edad oscilaron entre un 5-8% de las personas por encima de los 65 años, un 15-20% de personas por encima de los 75 años, y el 25-50% de personas por encima de los 85 años (URL1; URL6). Según la etiología de las demencias, sus proporciones de casos varían, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer que es el padecimiento más común posee un 50-70% del número total de casos de demencia, y con una proporción mayor de casos conforme aumenta la edad (URL6). En segundo lugar se encuentra la demencia vascular cuya prevalencia depende del subtipo de demencia, así como de su comorbilidad con otras demencias, mientras que la demencia con cuerpos de Lewy y el parkinsonismo ocurre en un 20% de las personas (URL6). Asimismo, las tasas de incidencia anual de la demencia son de aproximadamente 1% en los sujetos mayores de 65 años; oscila

entre el 0.2% y 0.8% en los sujetos de 65 a 69 años, y el 3% en los sujetos con 80 años (Baldereschi *et al.*, 2008).

En México, 5 millones de personas padecen demencias (URL4). Algunos reportes clínicos actuales indican la presencia de 500 mil a 700 mil personas con demencia (de forma imprecisa), de las cuales el 25% quizá no han sido diagnosticadas (Navarrete *et al.*, 2003). La prevalencia de la enfermedad se ubica por arriba del 3% en personas de 60 años, del 5% en adultos mayores de 65 años, y de entre 30 y 40% en personas que rebasan los 80 años (URL4). Asimismo, las demencias en la población mexicana son la principal causa de años de vida saludable perdidos para ambos sexos, ya que afectan al 60% de las mujeres y al 40% de los hombres (URL9; URL5). En la Ciudad de México, la prevalencia de las demencias es de 4.7% (Gutiérrez *et al.*, 2001); mientras que, la prevalencia de la enfermedad de Alzheimer está alrededor del 5% entre las personas mayores de 60 años (Lozano y Amaro, 1998).

A la fecha se han empleado principalmente diseños de casos-controles basados en la prevalencia para encontrar los factores de riesgo en las demencias. Entre estos factores de riesgo se encuentran el antecedente familiar positivo de demencia, una lesión craneal con pérdida de la conciencia, el síndrome de Down en familiares y los antecedentes de depresión en casos de inicio tardío (Baldereschi *et al.*, 2008).

Los datos epidemiológicos como prevalencia e incidencia mencionados también son fundamentales para la planificación coste-eficaz de los servicios de atención sanitaria, hoy en día se conoce que los costos para el tratamiento de estas enfermedades mentales, tales como la demencia tipo Alzheimer, oscilan entre los 536 millones y 1.75 billones de dólares, lo cual es un costo masivo que continuará incrementando durante los próximos años (URL9).

La prevalencia de las demencias entre los años 1990-2010 predice que, en el futuro, el número de casos de pacientes con demencia incrementará un 37%: de 7.4 millones a 10.2 millones, y también la población de adultos mayores por encima de 65 años incrementará un 30%: de 143 millones a 185 millones. Mientras que para el año 2050 los casos aumentarán al triple, por encima de los 26 millones hasta los 100 millones (Hebert *et al.*, 2000; Citron, 2004; URL 11; Mucke, 2009) por el incremento del 77% en la expectativa de vida para las personas mayores de 60-65 años (Banco Mundial, 1993; URL10) y por el mejor cuidado de los pacientes que les permitiría sobrevivir por más tiempo (URL10). Sin embargo, estos valores podrían disminuir, si se encuentra un tratamiento preventivo para esta enfermedad mental (URL10).

## **1.0.2. EL SISTEMA NERVIOSO EN LAS DEMENCIAS.**

### **1.0.2.1. ALTERACIONES GENERALES.**

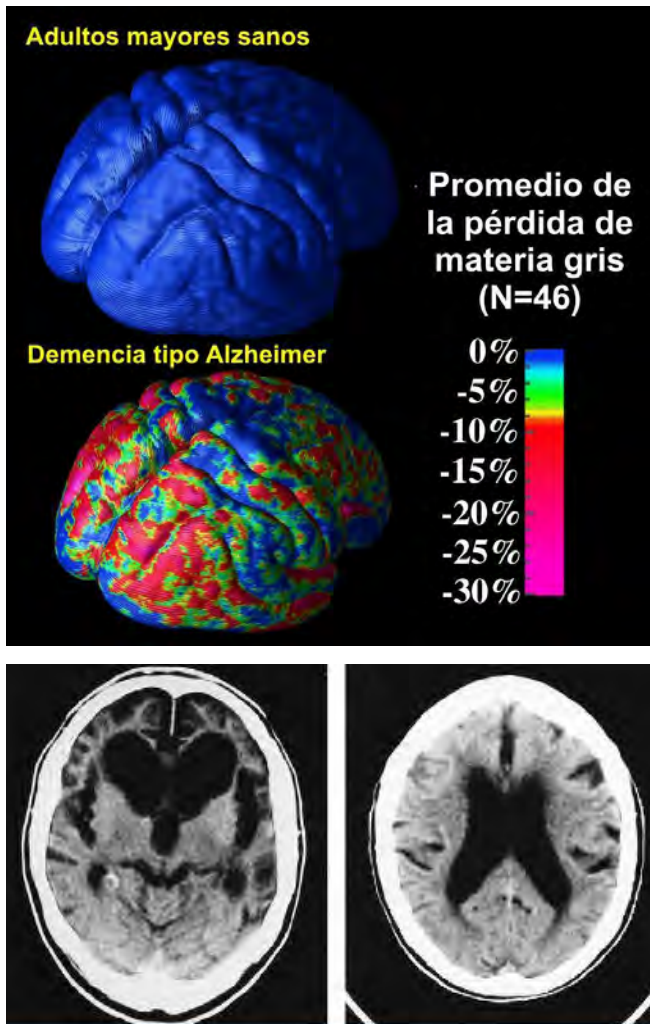
Las alteraciones del sistema nervioso en las demencias se originan tanto por el proceso de envejecimiento como por el mismo padecimiento. Durante el envejecimiento existe una disminución significativa en el peso del cerebro a partir de los 60 años. A partir de esta edad, la disminución del peso cerebral es paulatina y excede los 60 a 70 g, es decir, aproximadamente el 5% del peso del cerebro que es 1200 a 1400 g (Pasantes *et al.*, 1999). En varios estudios, esto se ha explicado por la disminución significativa tanto de la materia gris como de la materia blanca del cerebro (Minagar, 2009). Esta atrofia natural del cerebro es predominante en el lóbulo frontal y temporal, y menor en los lóbulos parietal y occipital (Squire *et al.*, 2008; Minagar, 2009).

En la demencia tipo Alzheimer, una de las principales características patológicas es la atrofia cerebral generalizada (Andersen *et al.*, 2007), y por lo tanto, la pérdida gradual de la materia gris, la cual se conforma de los somas neuronales y sus dendritas (Fig. 2) (Thompson *et al.*, 2003). La atrofia producida por estas enfermedades afecta diferentes regiones cerebrales como las áreas del sistema límbico (por ejemplo: el hipocampo, amígdala y giro parahipocampal), la corteza cerebral, la corteza entorrinal, la corteza de asociación, otras regiones subcorticales que incluyen el sistema colinérgico del prosencéfalo basal, el cuerpo estriado, el tálamo y el cerebelo, así como los lóbulos frontal, temporal y parietal. También se ha encontrado un daño en menor proporción en el lóbulo occipital durante las primeras etapas de la demencia tipo Alzheimer (Andersen *et al.*, 2007; Squire *et al.*, 2008).

Estas alteraciones de las regiones cerebrales están relacionadas con las deficiencias cognitivas que se presentan en el Alzheimer, tales como: las afasias que están causadas por el daño en ciertas áreas del hemisferio izquierdo como el área de Broca y/o de Wernicke y el fascículo arqueado que conecta ambas áreas (URL2); y las apraxias que están causadas por lesiones en el área de Broca y del cuerpo calloso (URL3), así como de las áreas de asociación parietal-frontal, corteza motora y otras áreas asociadas al movimiento, según el tipo de apraxia (Andersen *et al.*, 2007). Ambas disfunciones están asociadas con lesiones del borde occipital-temporal después de traumatismos cerebrales o enfermedades neurológicas (URL1).

Por otro lado, los daños causados en el lóbulo parieto-occipital provocan la pérdida de las funciones visuales y espaciales que desencadenan una agnosia topográfica, lo cual impide que el paciente reconozca detalles importantes para desplazarse en su ambiente y como consecuencia que se pierda en ambientes

familiares (Andersen *et al.*, 2007). En las etapas avanzadas de este tipo de demencia también se afectan las áreas visuales de asociación, el lóbulo parietal derecho, la región occipital-temporal izquierda, el lóbulo temporal derecho que provoca diversos tipos de agnosia visual, y en consecuencia el paciente no reconoce objetos o caras familiares (Andersen *et al.*, 2007).



**Figura 2. Características patológicas de las demencias.** En el panel superior de la imagen se muestra el promedio de la pérdida de la materia gris en 46 pacientes con Alzheimer; y en el panel inferior se muestra un escaneo de tomografía computada de la cabeza de un hombre de 70 años con demencia moderada tipo Alzheimer, en donde se observa la atrofia de la corteza y un alargamiento de los ventrículos, que se localizan en el centro de la imagen. *Modificado de: Thompson et al., 2003; Burns et al., 2002.*

## 1.0.2.2. EL HIPOCAMPO EN LAS DEMENCIAS.

### 1.0.2.2.1. NEUROANATOMÍA BREVE DEL HIPOCAMPO.

El hipocampo es una de las principales estructuras del cerebro, fue descrita por el anatomista Julius Ceasar Aranzi en el siglo XVI, la cual tiene forma de caballo de mar y se localiza en el lóbulo medio temporal del cerebro en los humanos (Andersen *et al.*, 2009). Mientras que en los roedores, esta estructura es cien veces más pequeña que en los humanos, y se alarga en forma de "C" hacia la

línea media del cerebro cerca del núcleo septal (en dirección rostral-dorsal), pasando sobre y debajo del tálamo dentro del lóbulo temporal (en dirección caudal y ventral) (Fig. 3A) (Andersen *et al.*, 2009). En todos los mamíferos, el hipocampo desempeña funciones implicadas en los procesos de memoria y aprendizaje.

De acuerdo con su neuroanatomía también se le denomina formación hipocampal, ya que comprende cuatro regiones con diferente citoarquitectura: a) el giro dentado (GD), b) el hipocampo, el cual tiene 3 subdivisiones llamadas cuerno de Amón (CA) (*cornus ammonis* en latín) y se enumeran CA3, CA2 y CA1 a partir del giro dentado hacia el subiculum, c) el complejo subicular, que incluyen el presubiculum, el parasubiculum y el subiculum; y d) la corteza entorrinal (CE). Sin embargo, las regiones c y d (a excepción del subiculum), así como la corteza perirrinal se denominan como la región parahipocampal (Fig. 3A, B y C) (Paxinus, 1994; Andersen *et al.*, 2009; Van Strien *et al.*, 2009).

Cada una de estas regiones está vinculada una con otra para formar una proyección única y unidireccional. Este circuito neuronal, principalmente excitador, comienza en la corteza entorrinal en donde las células de las capas superficiales mandan aferencias axonales al giro dentado formando la vía perforante. Asimismo, las células granulares del giro dentado proyectan axones para formar conexiones sinápticas, llamadas fibras musgosas, con las células piramidales de la región CA3 (Andersen *et al.*, 2009; Van Strien *et al.*, 2009).

Finalmente, los axones colaterales de Schaffer, que se originan en la región CA3, son las principales aferencias que proyectan hacia las células piramidales de CA1, y a su vez, éste proyecta aferencias hacia el complejo subicular y a la corteza entorrinal para cerrar el circuito hipocampal. En la literatura, éste se conoce como circuito trisináptico, ya que enfatiza las tres conexiones más importantes, y se representan de la siguiente forma: CE→GD (vía perforante), GD→CA3 (fibras musgosas), CA3→CA1 (colaterales de Schaffer) (Andersen *et al.*, 2009; Van Strien *et al.*, 2009).

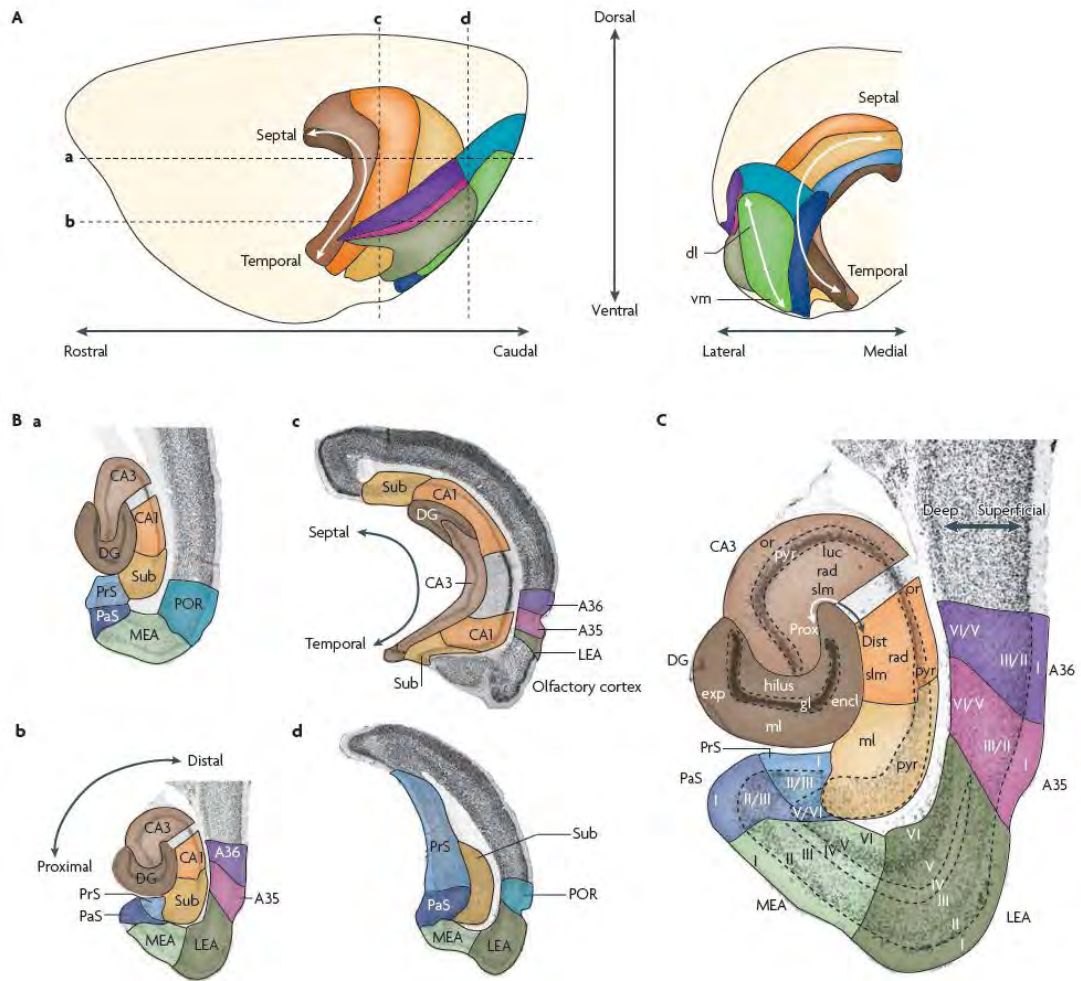
Algunas de las conexiones intrínsecas de la formación hipocampal tienen flujo recíproco de información, en donde el giro dentado tiene axones que se proyectan hacia esta misma región al igual que las células piramidales de la región CA3. Además, hay aferencias y eferencias corticales y subcorticales que interconectan con el hipocampo como la amígdala, el núcleo septal, el tálamo anterior, etc. También existen fibras eferentes desde el hipocampo y fibras aferentes desde las zonas subcorticales, que como estructuras se denominan el fórnix y la fimbria, respectivamente (Andersen *et al.*, 2009; Paxinus, 1994).

En cada una de las regiones del hipocampo existen millones de neuronas que trabajan en conjunto para recibir y transmitir información a través de este circuito. Las células piramidales son un tipo neuronal mayoritario del hipocampo que se distribuye en la capa piramidal en las regiones CA3, CA2 y CA1. Este tipo neuronal

difiere en tamaño y en conexiones sinápticas entre las regiones CA3 y CA1. Su polaridad está definida por la presencia de un árbol dendrítico basal que se extiende hacia la subregión del *stratum oriens* y otro árbol dendrítico apical que se extiende hacia la fisura hipocampal (esta fisura física separa las capas del giro dentado de la región CA1), mientras que sus axones corren transversalmente a su eje (Andersen *et al.*, 2009).

Una de las regiones más estudiadas del hipocampo es el GD por sus implicaciones en la memoria y la neurogénesis. Esta región posee diversas subdivisiones: la capa molecular, la capa granular y la capa polimórfica (Andersen *et al.*, 2009; Paxinos *et al.*, 1995; Van Strien *et al.*, 2009). En la capa superficial o molecular se encuentran las dendritas de las células granulares que mantienen contacto con las aferencias de la CE. Asimismo, se pueden localizar diversos árboles dendríticos de células canasta y células polimórficas, así como de axones provenientes de diversas fuentes (Andersen *et al.*, 2009; Paxinos *et al.*, 1995; Van Strien *et al.*, 2009). Debajo de esta capa molecular se localiza la capa granular, la cual posee células granulares que proyectan sus dendritas hacia la capa molecular y sus axones hacia la región de CA3. En la parte más profunda de esta capa también se encuentran células canasta con cuerpo piramidal y con 2 o tres dendritas basales que proyectan hacia la capa polimórfica (Andersen *et al.*, 2009; Paxinos *et al.*, 1995; Van Strien *et al.*, 2009).

La capa más profunda es la polimórfica, también denominada hilus. El hilus está formado por células musgosas que son multipolares o triangulares con 3 o más dendritas que se extienden hacia la capa molecular haciendo sinapsis con las dendritas de las células granulares, así como con los axones o dendritas de neuronas piramidales de la región de CA3. Otra característica de estas células son sus espinas dendríticas llamadas excrescencias espinosas, en las cuales conectan algunas terminaciones axonales de las fibras musgosas. También hay interneuronas que pueden ser células fusiformes, las cuales son reactivas a marcadores específicos para células gabaérgicas (Andersen *et al.*, 2009; Paxinos *et al.*, 1995; Van Strien *et al.*, 2009).

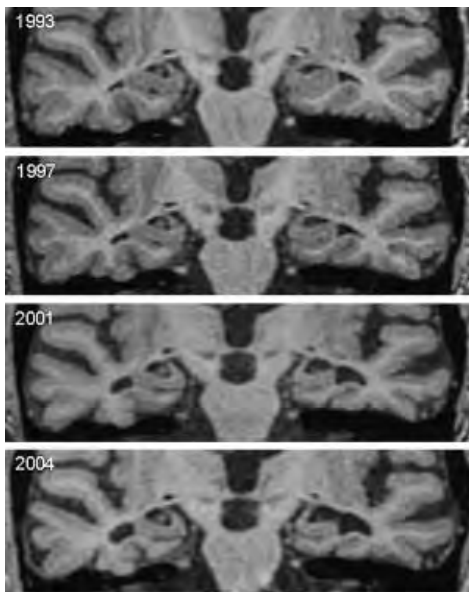


**Figura 3. Representaciones de la formación hipocámpal y parahipocámpal en el cerebro de rata.** En **A** se muestran las vistas lateral (panel izquierda) y caudal (panel derecha). En la orientación de la formación hipocámpal (que consiste del giro dentado (GD; café oscuro), CA3 (café arena), CA2 (no indicado), CA1 (naranja) y el subiculum (Sub; amarillo)), los tres ejes indican: el eje septo-temporal o longitudinal (también se denomina eje dorso-ventral); el eje próximo-distal o transversal, el cual corre de forma paralela a las capas celulares y comienza en el GD; y el eje superficial-profundidad o radial, el cual está definido por estar ubicado perpendicularmente al eje transversal. En la región parahipocámpal (áreas sombreadas de verde, azul, rosa y morado) se usa un eje radial. Además, el presubiculum (PrS; azul claro) y el parasubiculum (PaS; azul marino) se describen por el eje septo-temporal y próximo-distal. La corteza entorrinal, la cual tiene un aspecto lateral (LEA; verde oscuro) y medial (MEA; verde claro), se describe por un gradiente dorso-lateral al ventro-medial y un eje rostro-caudal. La corteza perirrinal (que consiste de las áreas de Brodmann (A) 35 (rosa) y 36 (morado)) y la corteza postririnal (POR; azul turquesa) comparten el último eje con la corteza entorrinal y se define por una orientación dorso-ventral. Las líneas discontinuas en **A** dentro del panel izquierdo indican dos niveles de los cortes horizontales (a,b) y dos de los cortes coronales.

En **B** se muestran las regiones del hipocampo y parahipocampo que corresponden al código de color ya mencionado; mientras que en **C** se muestra un corte horizontal (detallado de la parte Bb) en el cual se marcan las capas corticales y los ejes tridimensionales. Los números romanos indican capas corticales. CA, cornus ammonis; dist, distal; dl, parte dorsolateral de la corteza entorrinal; encl, adjunto de la hoja del GD; exp, hoja expuesta del GD; gl, capa granular; luc, stratum lucidum; ml, capa molecular; or, stratum oriens; prox, proximal; pyr, capa de células piramidales; rad, stratum radiatum; slm, stratum lacunosum-moleculare; vm, parte ventro-medial de la corteza entorrinal. *Fuente: Van Strien et al., 2009.*

#### 1.0.2.2.2. ALTERACIONES ESTRUCTURALES.

En los adultos mayores sanos, el hipocampo mantiene un volumen estable, en contraste con pacientes con demencia tipo Alzheimer en quienes se ha observado una disminución en el volumen de esta estructura (Squire *et al.*, 2008; Minagar, 2009). Algunos estudios de neuroimágenes han revelado que esta atrofia del hipocampo se asocia a la disminución del volumen de la corteza (Fig. 4), y que esta progresión del daño en ambas regiones se relaciona con las diferentes etapas del Alzheimer (Andersen *et al.*, 2007). Esta característica patológica no es específica entre los tipos de demencia debido a que esta disminución en el volumen del hipocampo se ha observado en la demencia con los cuerpos de Lewy, la demencia frontotemporal y la demencia vascular (Andersen *et al.*, 2007).



**Figura 4. Imágenes seriales de hipocampo de un paciente con Alzheimer obtenidas por resonancia magnética.** En estas imágenes se muestra la atrofia progresiva de un paciente que en 1993 no tenía deterioro cognoscitivo. En el 1997 se le diagnosticó deterioro cognoscitivo moderado y en 2001 se dio el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. La atrofia del hipocampo se aprecia por el ensanchamiento del cuerno temporal del ventrículo lateral. *Fuente: URL13.*

Estas alteraciones en la estructura del hipocampo están relacionadas con tareas de evocación de la memoria dependiendo del hemisferio en el que se localice, el lado izquierdo se correlaciona con la función verbal y el lado derecho con las funciones visuales y espaciales. (Andersen *et al.*, 2007). Estudios de imagen



por resonancia magnética funcional muestran la reducción de actividad neuronal en áreas de la corteza prefrontal y en todas las áreas de la formación hipocámpal que incluyen al subiculum, lo cual provoca deficiencias en la memoria episódica verbal de pacientes con demencia tipo Alzheimer (Andersen *et al.*, 2007).

#### **1.0.2.2.3. ALTERACIONES CELULARES.**

Algunos autores han descrito que durante el envejecimiento ocurre una pérdida neuronal difusa que oscila entre el 8 y 10% por cada década de la vida. Sin embargo esto es controversial, ya que otros trabajos han demostrado que esta pérdida neuronal varía entre 40 y 57% en diferentes regiones corticales, y que ésta ocurre entre los 20 y los 95 o 100 años de edad (Pasantes *et al.*, 1999; Squire *et al.*, 2008). El número total de las neuronas principales del hipocampo se preserva durante el proceso de envejecimiento; y son comparables entre los adultos mayores y los roedores senescentes, a pesar de una ligera disminución en las capacidades de aprendizaje y memoria (Squire *et al.*, 2008). Sin embargo, la pérdida de las neuronas del hilus se ha relacionado con la edad; y en pacientes con Alzheimer se ha demostrado una reducción del 14% en el número de éstas (West *et al.*, 2004). Además, las células musgosas del hilus están afectadas de forma severa en la epilepsia del lóbulo temporal (Seress *et al.*, 2009), y son células vulnerables a sufrir excitotoxicidad (Buckmaster *et al.*, 1994).

Las alteraciones de los circuitos neuronales también son características del proceso de envejecimiento y de las enfermedades neurodegenerativas, entre éstas se encuentran la disminución de las arborizaciones dendríticas (Stuart *et al.*, 2008), la disminución del número y la pérdida de la morfología de las conexiones sinápticas del hipocampo (ejemplo: las de la capa molecular del giro dentado) (Samuel *et al.*, 1994; Pasantes *et al.*, 1999; Tiraboshi *et al.*, 2000; Squire *et al.*, 2008), así como la disminución en la cantidad de receptores estriatales dopaminérgicos y de la neurogénesis (Haughey *et al.*, 2002; Stuart *et al.*, 2008). Las anomalías en la estructura dendrítica pueden afectar las propiedades funcionales de éstas como la integración sináptica, plasticidad, excitabilidad y el comportamiento de disparo (Stuart *et al.*, 2008). En estudios *postmortem* realizados en pacientes con Alzheimer se ha observado que las extensiones de los árboles dendríticos disminuyen al igual que el número y longitud de sus terminales en el giro parahipocámpal (Buell *et al.*, 1979), así como el número de dendritas en la región de cornus ammonis 1 (CA1), el cual se asocia al tamaño del soma neuronal (Yamada *et al.*, 1988). Asimismo, en la neocorteza y en el hipocampo se ha observado la reducción prominente de contactos sinápticos; en particular, esta pérdida de sinapsis se localiza en la capa molecular del giro dentado, lo cual

podiera reflejar la pérdida de las aferencias provenientes de las neuronas localizadas en la corteza entorrinal de estos pacientes (Hamos *et al.*, 1989; Lassmann *et al.*, 1993; Scheffa *et al.*, 2006).

Además, en los pacientes con diagnóstico de Alzheimer se disminuyen las densidades sinápticas por aumento de la susceptibilidad de las neuronas al estrés oxidativo y la reducción de los factores neurotróficos como el factor de crecimiento neural (NGF) y el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) (Kermer *et al.*, 2004).

#### **1.0.2.2.4. ALTERACIONES SUBCELULARES.**

A nivel subcelular, las neuronas poseen un sistema de fibras y túbulos localizados en el citoplasma que forman un soporte mecánico interno denominado citoesqueleto. Éste mantiene el volumen citoplasmático, así como la morfología y estructura polarizada de los dominios somatodendrítico y axonal de las neuronas, por lo que tiene una participación crucial para la fisiología neuronal (Benítez-King *et al.*, 2006; Alberts *et al.*, 1996; Squire *et al.*, 2008).

El neurocitoesqueleto está constituido por monómeros de proteínas pequeñas que se polimerizan en dos tipos principales de filamentos lineales y túbulos, denominados microfilamentos o filamentos de actina y los microtúbulos. Un tercer componente se forma por el ensamble hidrofóbico de proteínas que son específicas del tipo celular para constituir los filamentos intermedios (Benítez-King *et al.*, 2006; Alberts *et al.*, 1996). Los microfilamentos están formados por dos protofilamentos paralelos de 5-8 nm, compuestos de monómeros de actina globular, que se entrelazan uno con otro para formar una hélice, y se distribuyen debajo de la membrana plasmática formando una capa denominada corteza celular. Estos filamentos de actina están involucrados en la generación de fuerza durante la organización de la forma neuronal y en movimientos internos y externos de la célula. Los microtúbulos están formados por 12 protofilamentos de 25 nm que están constituidos por subunidades de alfa y beta tubulina, y los cuales se distribuyen en toda la célula a partir del centrosoma o centro organizador. Los microtúbulos participan en mantener la forma asimétrica de la polaridad neuronal, así como en el transporte axoplásmico (Benítez-King *et al.*, 2006; Alberts *et al.*, 1996). Por último, los neurofilamentos o filamentos intermedios son ensambles de heteropolímeros que se asocian por el dominio de hélice alfa central, y facilitan el crecimiento axonal y el transporte al estabilizar a los otros componentes del citoesqueleto (Benítez-King *et al.*, 2006; Alberts *et al.*, 1996).

Todas las funciones del citoesqueleto dependen de una gran variedad de proteínas accesorias, denominadas proteínas asociadas al citoesqueleto, que se

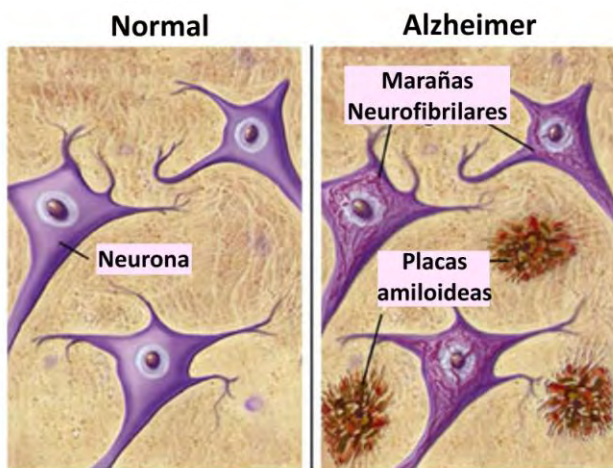
unen a los diferentes filamentos y/o túbulos y componentes celulares (Alberts *et al.*, 1996). Estas proteínas son esenciales en el control del ensamblaje y la actividad motora para el transporte intracelular (Alberts *et al.*, 1996). También proveen estabilidad y confieren las propiedades mecánicas de los componentes del citoesqueleto (Benítez-King *et al.*, 2006).

Las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP, por sus siglas en inglés) se asocian y unen a lo largo de éstos para formar paquetes. Su función es la de estabilizar a los microtúbulos para impedir la disociación de la tubulina. Algunas isoformas de las MAPs son las proteínas MAP1B, MAP2a, MAP2b, MAP2c, tau y STOP. Entre estas, la MAP2 y la tau se expresan mayoritariamente en el proceso de neuritogénesis y difieren entre ellas por su localización predominante en el dominio somatodendrítico y el dominio axonal, respectivamente (Benítez-King *et al.*, 2006; Alberts *et al.*, 1996). También existen proteínas de asociación a los microfilamentos como el complejo Arp 2/3 (Suetsugu *et al.*, 2002; Egile *et al.*, 2005) y la proteína STOP fosforilada (Baratier *et al.* 2006), la cual regula la polimerización y despolimerización de estos filamentos, para la formación de estructuras específicas como los lamelipodios, los conos de crecimiento y las dendritas. Mientras que proteínas como la timosina, el ADP, la cofilina y la profilina tienen una acción despolimerizante y contribuyen a la inestabilidad de las estructuras formadas por la actina (Benítez-King *et al.*, 2006; Kardos *et al.*, 2009). Otra proteína importante es la tropomiosina, la cual protege de la despolimerización regulando el tamaño de las dendritas (Benítez-King *et al.*, 2006; Alberts *et al.*, 1996).

La reorganización del citoesqueleto neuronal es altamente dinámica y participa en diversos procesos neuronales como son la migración y proliferación, el transporte axonal y dendrítico, la división celular, la comunicación intercelular, la adhesión celular, la diferenciación celular, la liberación de neurotransmisores, el crecimiento de neuritas, la axogénesis, la dendritogénesis y la sinaptogénesis (para una revisión ver: Benítez-King *et al.*, 2006; Alberts *et al.*, 1996). Es por ello que las anomalías en la reorganización de los componentes del citoesqueleto y de sus proteínas de asociación pueden modificar la citoarquitectura de las neuronas, así como interrumpir el transporte de materiales celulares y de las conexiones sinápticas. En las demencias, estas alteraciones podrían afectar toda la circuitería neuronal involucrada en la memoria declarativa y el aprendizaje (Kowall y Kosik, 1987; Squire *et al.*, 2008; Bamburg y Bloom, 2009).

Las patologías del citoesqueleto son enfermedades del sistema nervioso que se caracterizan por la presencia de estructuras histológicas anormales que están formadas por un arreglo aberrante del citoesqueleto y de las proteínas asociadas a éstos, las cuales se han observado en la demencia de tipo Alzheimer, así como en la enfermedad de Parkinson, entre otras enfermedades neurodegenerativas

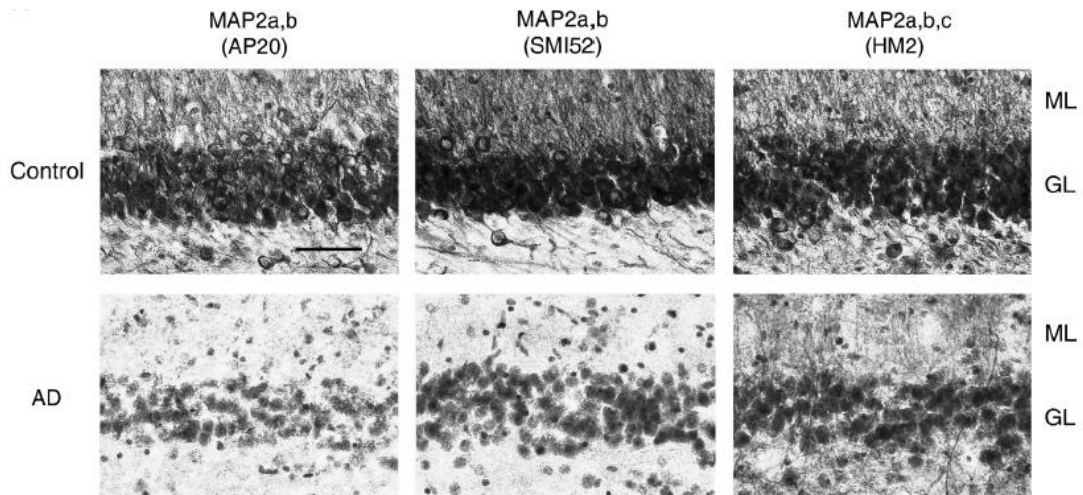
(Bamburg y Bloom, 2009). En cerebros de personas de más de 80 años se han observado algunos marcadores histopatológicos de la demencia tipo Alzheimer, como la presencia de placas amiloideas (PA) y las marañas neurofibrilares (MN), aunque no se muestre ningún signo clínico de la enfermedad (Fig. 5) (Pasantes *et al.*, 1999; Andersen *et al.*, 2007). En pacientes con Alzheimer se han observado la presencia de estas PA extracelulares (Fig. 7A), formadas por la proteína  $\beta$ -amiloide, tanto difusas como neuríticas en la neocorteza y en el hipocampo, durante las etapas tempranas de esta enfermedad. Mientras que las MN, formadas por filamentos apareados como proteína tau asociada al citoesqueleto (Fig. 7B),  $\beta$ -amiloide, ubiquitina y actina, muestran una forma de flama que se extiende en el soma y en la porción proximal de la dendrita apical de las neuronas afectadas (Andersen *et al.*, 2007; Squire *et al.*, 2008). Sin embargo, la proteína tau en este tipo de demencia también se ha encontrado en ambos dominios somatodendrítico y axonal de forma hiperfosforilada, proteolizada y oxidada (Bamburg y Bloom, 2009), lo cual puede interrumpir el transporte y crecimiento axonal y participar en la retracción de las neuritas (Dubey *et al.*, 2008).



**Figura 5. Imagen representativa de las marañas neurofibrilares y las placas amiloideas en un corte de cerebro de un paciente con Alzheimer.** En este dibujo se muestra la localización de las marañas neurofibrilares en el interior de las células y de las placas amiloideas que se depositan en el tejido de soporte e interrumpen las conexiones neuronales.

Las MN, por su composición proteica pueden ser teñidas con métodos inmunohistoquímicos que identifican a las subunidades de los neurofilamentos y de la proteína MAP2 (Bamburg y Bloom, 2009). En los cerebros de pacientes con Alzheimer se ha observado que los niveles de las MAP de alto peso molecular se correlacionan con los niveles de tau fosforilada lo que indica que las proteínas MAP1 Y MAP2 se asocian a esta última. La interacción MAP-tau fosforilada produce el desensamble de los microtúbulos que se encuentran en las dendritas (Alonso *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2007). Además, se ha observado una disminución dramática de las proteínas MAP2a y b en el giro dentado de los pacientes con Alzheimer (Fig. 6), lo cual indica la pérdida de la maduración neuronal en las células granulares del

giro dentado, aún cuando la generación de neuronas nuevas en la zona subgranular del giro dentado está presente en estos pacientes (Li *et al.*, 2008).

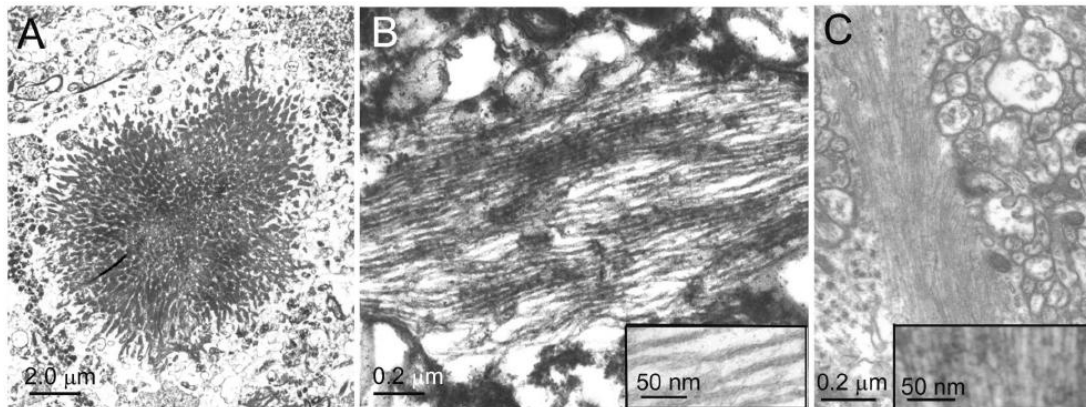


**Figura 6. Micrografías de la capa granular del giro dentado en cerebros de sujetos control y pacientes con Alzheimer.** Los cortes de cerebro de 40  $\mu\text{m}$  fueron teñidos por inmunohistoquímica con los anticuerpos AP20 (MAP2 a y b), SMI52 (MAP2 a y b), HM2 (MAP2 a, b y c). Los sujetos control mostraron una tinción positiva y marcada en las células granulares, mientras que en los pacientes con demencia se muestra una clara disminución de estos marcadores de la maduración neuronal. En todas las imágenes se realizó una co-tinción con hematoxilina, barra= 50  $\mu\text{m}$ . Fuente: Li *et al.*, 2008.

En pacientes con diagnóstico de Alzheimer se ha observado que la disminución de las densidades sinápticas se correlaciona con la aparición de PA (Lassmann *et al.*, 1993), así como con la formación de MN (Samuel *et al.*, 1994) en las subregiones del hipocampo como la capa molecular del fascículo dentado y del stratum lacunosum, las regiones de CA2, CA3 y CA4, y el subiculum (Samuel *et al.*, 1994). Además, se ha demostrado la presencia de marcadores de las proteínas alfa y beta amiloide en células hilares de pacientes con demencia frontotemporal y en la enfermedad de Parkinson (Galvin *et al.*, 1999).

Por otro lado, una alteración del citoesqueleto que también se presenta en pacientes con Alzheimer, son las inclusiones ricas en actina y cofilina (Fig. 7C), las cuales pueden adoptar forma de filamentos empaquetados, de agregados irregulares o de entramados paracrystalinos citoplasmáticos (también llamados cuerpos de Hirano), y cualquiera de estas formas bloquea el transporte dentro de las neuritas. Estos paquetes de actina y cofilina se han observado en el hipocampo y en la corteza frontal de pacientes con demencia y en ratones transgénicos con este padecimiento. Además, los cuerpos de Hirano se forman principalmente en los axones y las dendritas de las neuronas, los cuales pueden inducirse con

tratamientos de peróxido, glutamato y medio sin ATP en cultivos de neuronas aisladas y cultivos organotípicos de hipocampo de ratas o ratones “*knockout*” que no poseen el gen para la GTPasa Cdc42 (Davis *et al.*, 2009; Bamburg y Bloom, 2009).



**Figura 7. Micrografía obtenida por microscopía electrónica de transmisión de cortes de cerebro de pacientes con Alzheimer. (A) Placas amiloideas extracelulares. (B) Filamentos helicoidales pareados de 20nm que contienen la proteína tau; la estructura de listones torcidos se observa mejor en el acercamiento. (C) Paquetes de actina y cofilina con una morfología idéntica a los inducidos con tratamientos de peróxido, glutamato y medio sin ATP en cultivos organotípicos de cerebro de rata. En el acercamiento de estos filamentos se observan delgados (8-9 nm) en comparación con los filamentos helicoidales pareados. Fuente: Davis *et al.*, 2009; Bamburg y Bloom, 2009.**

### 1.0.3. TRATAMIENTOS POSIBLES DE LAS DEMENCIAS.

El tratamiento de las enfermedades mentales se puede clasificar en dos grupos, los psicosociales y los somáticos. En el primer grupo se contemplan cuatro subgrupos orientados: 1) al comportamiento, los cuales pueden disminuir o eliminar algunos comportamientos, 2) a las emociones, que pueden estimular la memoria y el humor, así como restaurar la autoestima y reducir el estrés de los pacientes, 3) a la cognición, el cual tiene por objetivo restaurar las deficiencias cognitivas, y 4) a la estimulación, que incluye actividades recreativas y ejercicio para movilizar al paciente mediante la estimulación y un medio enriquecido. Existen evidencias de que estos tratamientos logran el beneficio cognitivo y el entrenamiento de los pacientes para continuar con algunas de sus actividades cotidianas (URL6).

Muchos medicamentos están aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés), entre éstos se encuentran los fármacos utilizados en el tratamiento de las demencias (URL12), tales como los inhibidores de la acetilcolinesterasa, un antagonista de los receptores del

neurotransmisor glutamato y las drogas psiquiátricas que también se emplean en el control de la depresión y de comportamientos anormales (Mucke 2009).

Los inhibidores de la acetilcolinesterasa son los medicamentos más aceptados en el tratamiento de estas enfermedades, en una etapa donde los síntomas se clasifican de medios a moderados (Roger, 2003; URL12). Estos medicamentos ayudan a prevenir los síntomas y controlan el comportamiento del paciente por un tiempo limitado (URL12). Estos inhibidores impiden la degradación del neurotransmisor, acetilcolina, en el cerebro de los pacientes con Alzheimer; sin embargo, con el tiempo pueden perder su efecto debido a la pérdida gradual de este neurotransmisor en el cerebro (URL7; URL12; Mucke 2009). Los inhibidores comúnmente empleados son: galantamina (nombre comercial: Reminyl® o Razadyne®), rivastigmina (Exelon®), y donepezil (Aricept®) (URL6; URL12). En cambio, el antagonista no competitivo de los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) a glutamato, también llamado memantina (Namenda®, Akatinol®), se ha prescrito para el tratamiento de la demencia tipo Alzheimer de la etapa moderada a la severa. Este medicamento ayuda a mantener algunas funciones de la vida diaria. La memantina se une a proteínas del canal de estos receptores, una vez que este se ha activado previamente (Chen *et al.*, 1997; Parsons *et al.*, 2009). Su efecto terapéutico radica en que impide que concentraciones tóxicas de este neurotransmisor provoquen la muerte celular (URL6; URL12; Kermer *et al.*, 2004). Además, el uso de medicamentos como los antipsicóticos, las benzodiacepinas, los anticonvulsivantes, los antidepresivos puede tranquilizar a los pacientes y reducir los síntomas de agresión, agitación y depresión, así como el estrés de las personas que los cuidan. También se han empleado antioxidantes como la vitamina E, y la melatonina que mejora los trastornos del sueño de los pacientes con demencia (URL6; URL12). Sin embargo, el tratamiento de estos pacientes en etapa avanzada es limitado, por lo que se requiere la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas como activadores neuronales y agentes neurotrópicos y/o neuroprotectores (URL7; Roger, 2003).

## 2. LA MELATONINA.

La melatonina es el principal producto de la glándula pineal, la cual se produce rítmicamente en sincronía con el ciclo de luz y oscuridad. Esta indolamina es una molécula filogenéticamente muy antigua, posiblemente existe en todos los organismos desde bacterias (Manchester *et al.*, 1995), algas (Poeggeler *et al.*, 1991), hongos (Hardeland *et al.*, 1999), plantas (Manchester *et al.*, 2000; Reiter *et al.*, 2001), invertebrados y vertebrados, incluyendo al humano (Reiter, 2000; Hardeland *et al.*, 2006). Se estima que esta molécula ha evolucionado 2.5 a 3 millones de años atrás, lo que coincide con el desarrollo del metabolismo basado en el oxígeno (Reiter, 2000), y su expresión química durante la noche fue adquirida por los mamíferos para emplear el fotoperiodo como un indicador ambiental que dictaría ajustes fisiológicos (Reiter, 1991). Esta molécula es secretada rítmicamente por la glándula pineal o *epífisis cerebri* de los vertebrados, y se ha catalogado como una hormona por ser su principal producto, cuya concentración máxima se encuentra en la noche (Reiter *et al.*, 2007; Hardeland *et al.*, 2006).

Esta indolamina también tiene un origen extrapineal, es decir, que se produce en múltiples células, tejidos y órganos tales como los leucocitos mononucleares, las glándulas Harderianas, la cóclea membranosa, el tracto gastrointestinal, los ovarios, los testículos, la médula ósea, el cristalino y la retina, corazón, riñones y órganos linfoides (Hardeland *et al.*, 2006; Reiter *et al.*, 2007; Pan y Allen, 1986; Menendez-Pelaez *et al.*, 1987; Huether *et al.*, 1992; Itoh *et al.*, 1997; Tijimes *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 1999; Conti *et al.*, 2000; Abe *et al.*, 1999; Macchi *et al.*, 2004), en los cuales actúa localmente como un paracoide, un autoicoide, un factor tisular y/o un antioxidante (Tan *et al.*, 2003). Por otro lado, la melatonina también ha sido encontrada en diferentes fluidos relacionados con la reproducción como el semen, fluido amniótico, leche materna y los folículos preovulatorios; y en otros fluidos para su distribución y eliminación como el plasma, fluido cerebro espinal, saliva y orina (Macchi *et al.*, 2004; Reiter 1991).

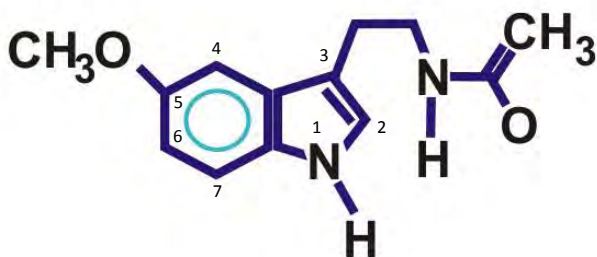
La melatonina ejerce diversas acciones fisiológicas en los organismos tales como defensa al estrés ambiental (Fuhrberg *et al.*, 1997), captador de radicales libres, para combatir el estrés oxidativo, control de los ritmos circadianos, inducción del sueño, regulación de la reproducción estacional, modulación de la respuesta inmune, entre otras (Tan *et al.*, 2002).

### 2.0. ESTRUCTURA QUÍMICA Y SUS PROPIEDADES.

La estructura química de la melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina fue descrita (Lerner *et al.*, 1958), aislada e identificada en tejido pineal de bovino por Lerner y colaboradores (Lerner *et al.*, 1959). La melatonina es una indolamina con un peso molecular de 232.3 daltones, la cual químicamente consiste en: 1) un indol heterocíclico,



es decir, un compuesto orgánico con una estructura bicíclica que consiste en un anillo de seis átomos de carbono (benceno) unido a otro de cinco átomos de carbono (pirrol); y 2) dos cadenas laterales que consisten en un grupo metoxi unido al carbono 5 y un grupo amida unido al carbono 3 (Tan *et al.*, 2002). Esta estructura se ilustra en la figura 8.



**Figura 8. Estructura química de la melatonina.** Cada número indica las posiciones de los átomos de carbono del indol heterocíclico. *Modificado de:* Tan *et al.*, 2002.

La estructura central de la melatonina es el indol heterocíclico. Esta porción indol es rica en electrones con una alta estabilidad de resonancia y electronegatividad, lo que determina su capacidad como captador de radicales libres (Tan *et al.*, 2002; Poeggeler *et al.*, 1993). Estudios computacionales químicos sobre las reacciones de esta indolamina con los radicales libres demostró que los átomos de carbono en las posiciones 2, 3, 4, 6 y 7 del indol heterocíclico son sitios adecuados para reacciones con los radicales hidroxilo o óxido nítrico (Stasica *et al.*, 2000, Turjanski *et al.*, 2001); siendo el sitio más reactivo del anillo indólico, el carbono 3 (Jackson *et al.*, 1967).

Por otro lado, la ruptura del anillo pirrólico es de importancia para la captación de radicales libres en tejidos como el cerebro (Hardeland *et al.*, 2006). Además, se generan productos derivados de la interacción de la melatonina con los radicales libres como son el 2-hidroxi, 3-hidroxi, 6-hidroxi, 7-hidroxi melatonina, 2 o 3-hidroxi melatonina cíclica, N-nitrosomelatonina y N<sup>1</sup>-acetyl-N<sup>2</sup> formil-5-metoxiquinuramina (AFMK, por sus siglas en inglés) (Tan *et al.*, 2002).

Las cadenas laterales de esta estructura contribuyen significativamente a la captación de radicales libres y limitan las acciones prooxidativas de la indolamina. En ausencia de los residuos O-metil o N-acetil, que contienen a la estructura N-carbonil (NHCO), decrece de forma evidente tanto la captación del radical hidroxilo (OH·) y del radical catión ABTS como la quimioluminiscencia emitida durante la oxidación (Poeggeler *et al.*, 2002, Gozzo *et al.*, 1999). Por otro lado, el grupo metoxi hace más susceptible al indol para reaccionar con las especies de radicales e impide la reacciones prooxidativas de los índoles, y también puede reaccionar con proteínas intracelulares como la calmodulina para modular el citoesqueleto (Anton-Tay *et al.*, 1998; Tan *et al.*, 2002). El reemplazo del grupo hidroxilo en la posición 5 o 6 incrementa la capacidad antioxidante de la indolamina en ensayos *in vitro* (Seegar *et al.*, 1997; Wilfer *et al.*, 1999; Ng *et al.*, 2000), mientras que estos cambios *in vivo* pueden disminuir la lipofilia de esta molécula (Tan *et al.*, 2002). También, si el grupo metoxi de la serotonina y otros hidroxiindoles es

reemplazado por un grupo hidroxilo se observa un comportamiento dual como prooxidante y antioxidante (Tan *et al.*, 2002).

Asimismo, ambas cadenas laterales son importantes para las propiedades físicas y químicas de la molécula proporcionándole la facultad de ser anfipática, es decir, que tiene propiedad lipofílica e hidrofílica para que la molécula cruce la membrana lipídica de cualquier célula y se distribuya en los fluidos corporales, así como en las fases lipídica y acuosa de los compartimientos celulares (Reiter, 1991; Tan *et al.*, 2002; Macchi *et al.*, 2004; Hardeland *et al.*, 2006).

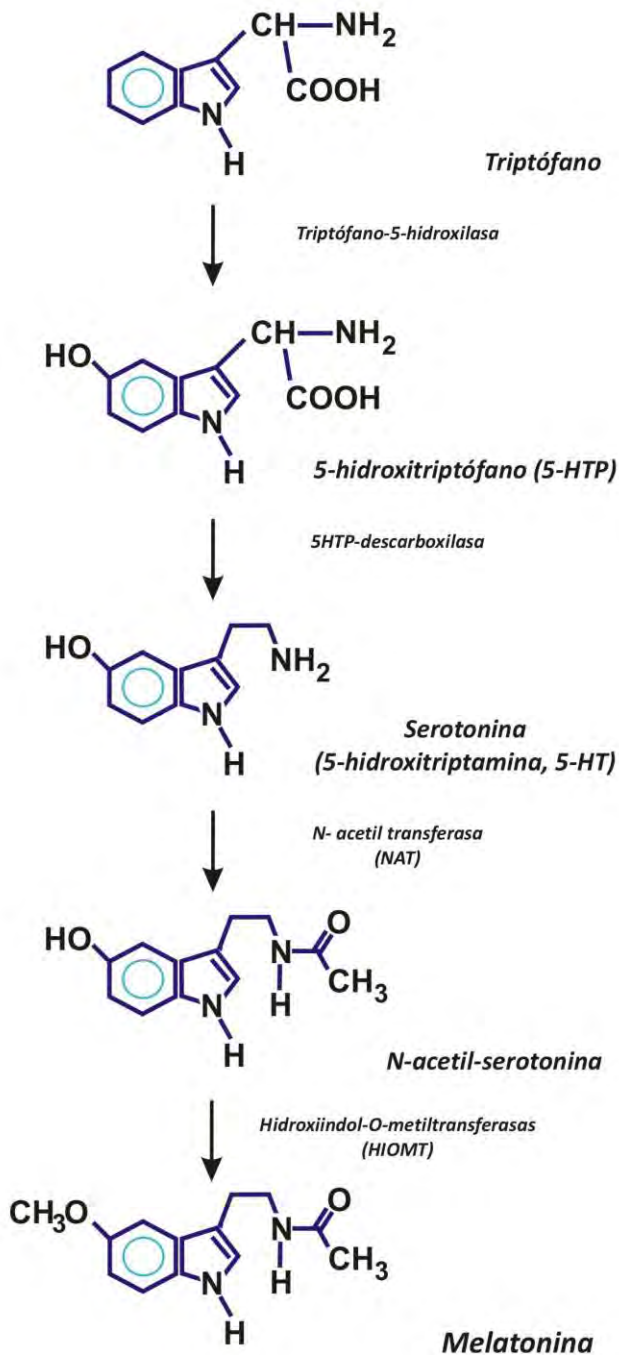
## **2.1. BIOSÍNTESIS Y METABOLISMO DE LA MELATONINA.**

La melatonina se sintetiza a partir del aminoácido L-triptófano como precursor, sobre él cual actúan cuatro enzimas principales: la triptofano hidroxilasa (TPH por sus siglas en inglés; EC 1.14.16.4), la aminoácido aromático descarboxilasa (AAD por sus siglas en inglés; EC 4.1.1.28), la serotonina N-acetiltransferasa (NAT por sus siglas en inglés; EC 2.3.1.87), y la hidroxindol-O metiltransferasa (HIOMT por sus siglas en inglés; EC 2.1.1.4) (Nowak y Zawilska, 1998).

Conforme a lo anterior, la vía principal de la biosíntesis de melatonina consta de la hidroxilación, descarboxilación, N-acetilación y O-metilación del triptófano (en este orden). Sin embargo, en menor proporción puede emplear las siguientes alternativas: a) síntesis de melatonina por la O-metilación de la serotonina seguido de la N-acetilación de la 5-metoxitriptamina, o b) por la O-metilación del triptófano seguido de su descarboxilación y N-acetilación (Hardeland *et al.*, 2006).

La cascada principal de la síntesis de la melatonina fue descrita por Axelrod, Klein y colaboradores y Reiter, y se puede resumir en lo siguiente (Fig. 9) Los pinealocitos adquieren el L-triptófano del torrente sanguíneo para convertirlo en 5-hidroxitriptófano a través de una 5-hidroxilación mediante la TPH; 2) el 5-hidroxitriptófano se convierte a serotonina por una descarboxilación generada por la AAD; 3) la serotonina se convierte a N-acetil-serotonina a través de la enzima limitante NAT, que es una enzima específica de compuestos aromáticos y la cual requiere la coenzima A como cofactor; 4) la N-acetil-serotonina es metilada en melatonina por acción de la enzima citosólica HIOMT (Macchi *et al.*, 2004; Nowak y Zawilska, 1998; 1991).

Una vez que la melatonina se sintetiza, es liberada principalmente a través del nicho pineal hacia el fluido cerebroespinal (Tricoire *et al.*, 2002; Hardeland *et al.*, 2006), y también en los capilares donde el 70% de la melatonina se une a la albúmina (Macchi *et al.*, 2004). Su vida media en la sangre después de una infusión intravenosa es de 30 min, y se ha observado que tiene un patrón de eliminación bifásica con vidas medias de 3 a 45 min cuando la administración es oral (Macchi *et al.*, 2004). En el cerebro, este patrón de eliminación de la melatonina es multifásica con tres vidas medias de 3.04 min, 36 min y 24 h después de una administración intracerebroventricular de esta indolamina tritiada (Antón-Tay *et al.*, 1988).

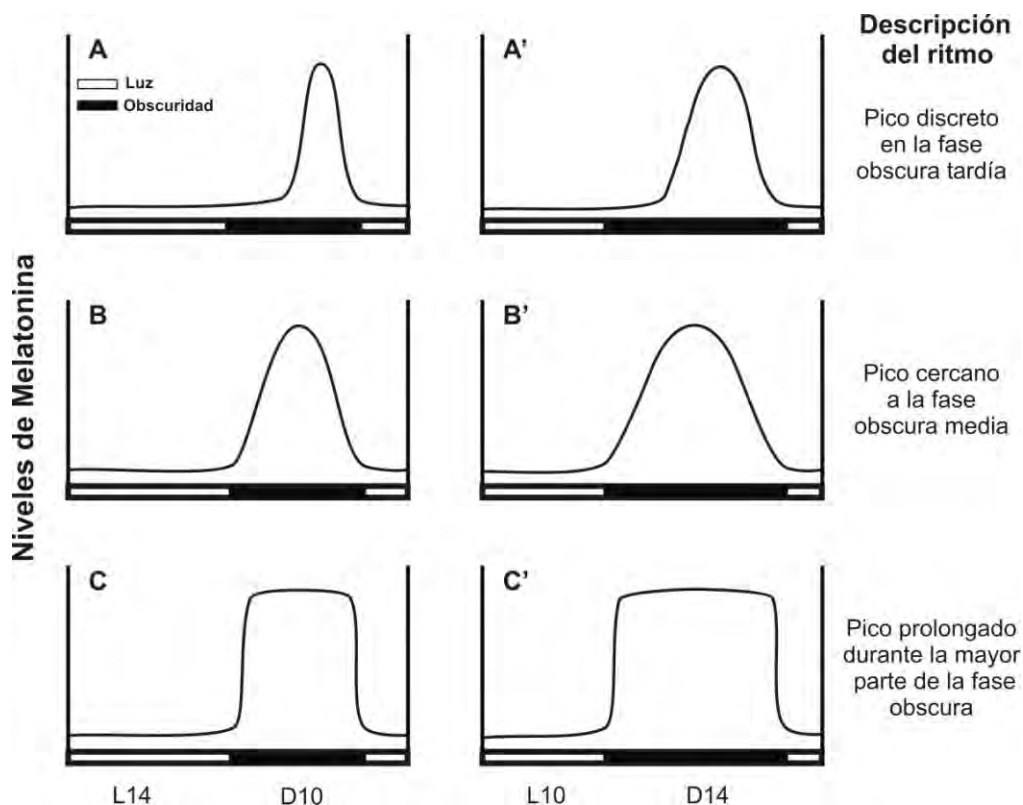


**Figura 9. Biosíntesis de melatonina.** En esta figura se muestra los cambios en la estructura química del triptófano a través de las diversas enzimas que participan para sintetizar la molécula de la melatonina. Modificado de: Hardeland *et al.*, 2006; Nowak y Zawilska, 1998.

En los humanos, la melatonina se metaboliza primariamente en el hígado; sin embargo, también puede metabolizarse en el riñón (Macchi *et al.*, 2004). La biotransformación de la melatonina en el hígado consiste en una reacción de dos fases para la formación de sus metabolitos que faciliten su eliminación renal (Nowak y Zawilska, 1998). La fase I engloba modificaciones químicas de la molécula de melatonina con la aparición de un grupo funcional hidroxilo en el carbono 6 a través de una reacción catalizada por la monooxigenasa P450 hepática que está presente en la fracción microsomal de los hepatocitos (Macchi *et al.*, 2004; Hardeland *et al.*, 2006). Posteriormente, en las reacciones de la fase II, el metabolito de la melatonina generados se une covalentemente al sulfato y al ácido glucorónico (moléculas endógenas) en un proceso denominado conjugación que permite un aumento de su hidrosolubilidad, así como una disminución de su actividad farmacológica (Macchi *et al.*, 2004; Hardeland *et al.*, 2006). Estas reacciones de la fase II están catalizadas por enzimas presentes en la fracción citosólica de la célula. El resultado de esta conjugación es el metabolito principal de la orina denominado 6-sulfatoximelatonina (aMT6s), aunque también se libera el 6-hidroximelatonina glucorónido (Macchi *et al.*, 2004; Hardeland *et al.*, 2006; Nowak y Zawilska, 1998). La liberación de aMT6s en la orina es de un 90% después de una administración de melatonina (Macchi *et al.*, 2004). Por otro lado, pequeñas cantidades de indolamina también pueden ser transformadas a N $\gamma$ -acetil-N-formil-5-metoxiquinuramina y N $\gamma$ -acetil-5-metoxiquinuramina (AMK) en el cerebro (Tan *et al.*, 2002).

La regulación de la biosíntesis de melatonina involucra tanto factores ambientales como celulares. El principal factor ambiental es la alternación de las fase luz (día) y fase oscuridad (noche). La mayoría de los organismos presentan niveles elevados de melatonina durante la fase oscura sin importar que sus patrones de actividad sean diurnos, nocturnos o crepusculares (Nowak y Zawilska, 1998). En los mamíferos se han descrito tres patrones distintos de la producción de melatonina: el tipo A, el tipo B y el tipo C (Fig. 10). El tipo A se caracteriza por un pico discreto de melatonina que aparece en una etapa tardía de la noche. Algunas especies que presentan este patrón son: el hámster Syriano, el gerbil de Mongolia y el ratón doméstico. Mientras que el tipo B está caracterizado por un pico de melatonina que aparece a media noche siendo el patrón más común. En las especies que presentan este patrón tales como la rata doméstica, puerco de Guinea, ardillas y humano, los niveles de melatonina disminuyen gradualmente conforme amanece. Particularmente en humanos saludables, la concentración de plasma sanguíneo comienza a elevarse en la tarde con umbrales detectables de 5 pg/ml y alcanza su nivel máximo a la media noche o entre 2 a.m. y 3 a.m. y disminuye de nuevo antes de la hora de despertar (Macchi *et al.*, 2004; Nowak y Zawilska, 1998). Asimismo, la producción de melatonina determinada por radioinmunoensayo para adultos se estima en 28.8  $\mu$ g/día y de 39.2 a 14.8  $\mu$ g/noche, en un grupo de adultos jóvenes sanos tanto hombres y mujeres en fase folicular del ciclo

menstrual, respectivamente. Sin embargo, la concentración diaria en plasma sanguíneo determinada por espectrometría de masa con cromatografía de gases, es ligeramente menor en mujeres (21.6  $\mu\text{g}$ ) que en hombres (35.7  $\mu\text{g}$ ), con una constante de secreción nocturna de 4.6  $\mu\text{g}/\text{h}$  en hombres y 2.8  $\mu\text{g}/\text{h}$  en mujeres (Macchi *et al.*, 2004). Por último, el tipo C se distingue por un patrón nocturno de la síntesis de melatonina con un pico máximo prolongando sus niveles durante toda la noche. Las especies que comparten este patrón son: la oveja doméstica, el gato doméstico y el hámster Djunarian (Nowak y Zawilska, 1998).



**Figura 10. Clasificación de los patrones (A, B, C) de secreción de la melatonina en diversas especies de mamíferos.** Este esquema muestra los niveles de melatonina con respecto a las fases del fotoperiodo (ya sean 10 o 14 horas de luz (L) u oscuridad (D)), así como las variantes en la aparición del pico máximo durante la fase oscura del fotoperiodo. También se muestra el aumento proporcional de los niveles de melatonina con respecto al aumento en la duración de la fase oscura. *Modificado de: Reiter, 1991.*

Es importante mencionar que la duración de la secreción de melatonina se correlaciona positivamente con la duración de la noche. Además, algunos estudios realizados en humanos y en ratones indican que la capacidad de la glándula pineal para producir la melatonina disminuye gradualmente con el envejecimiento, lo que ha

permitido sugerir un papel neuroprotector de la melatonina para retrasar los procesos relacionados al envejecimiento (Nowak y Zawilska, 1998).

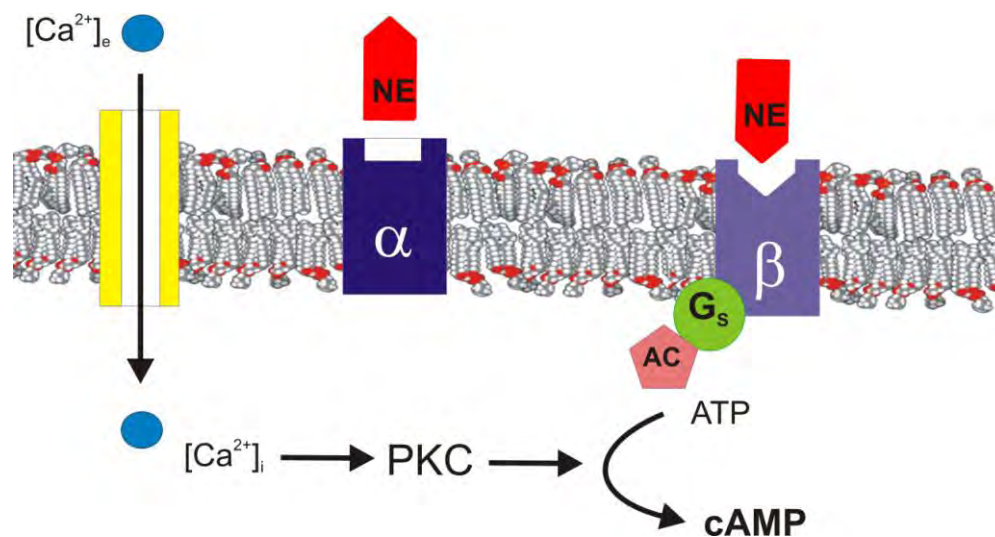
Por otro lado, los niveles de melatonina varían con una periodicidad ligeramente diferente de 24-25 h denominándole ciclo circadiano (Macchi et al., 2004; Nowak y Zawilska, 1998). Este ciclo circadiano en la biosíntesis y liberación de melatonina está dirigido endógenamente por un marcapasos, el núcleo supraquiasmático (SCN) del núcleo anterior del hipotálamo (Macchi et al., 2004; Nowak y Zawilska, 1998). Las señales fóticas son percibidas por células ganglionares de la retina, las cuales son fotosensibles a ondas de luz corta de 484 nm (Macchi et al., 2004), quienes envían la información del fotoperiodo para traducirla en una señal química llamada melatonina, que a su vez sirve como un mensajero para cada órgano en el cuerpo (Reiter, 1991).

Estas células ganglionares forman el tracto retinohipotalámico monosináptico a través del cual se transmite la información del fotoperiodo al SCN, el cual proyecta eferencias GABAérgicas hacia la subdivisión parvocelular autónoma de núcleo paraventricular (NPV). Eferencias provenientes del NPV lanzan proyecciones a través del prosencéfalo medio y la formación reticular hacia la columna inter-medio lateral de la médula espinal cervical, en donde las fibras adrenérgicas preganglionares conectan con el ganglio superior cervical para finalmente liberar norepinefrina (NE) en la glándula pineal a través de las fibras nerviosas simpáticas post-ganglionares (Moore y Lenn, 1972; Reiter, 1991; Macchi et al., 2004).

La liberación nocturna de NE en los pinealocitos es un factor determinante para la síntesis y secreción de melatonina. En los mecanismos de transducción posteriores a la liberación de NE están involucrados los receptores alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ) adrenérgicos localizados en la membrana de los pinealocitos, los cuales muestran una densidad que es dependiente de un ritmo de 24 horas (Reiter, 1991; Simonneaux *et al.*, 2003). Este neurotransmisor activa los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, los cuales estimulan la producción y acumulación de adenilato ciclasa (AC) (Macchi et al., 2004; Reiter, 1991). La activación simultánea de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos amplifican la respuesta de los receptores  $\beta$  al potenciar su actividad mediante el incremento de diacilglicerol y de las concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  para la activación de la proteína cinasa C (PKC) (Macchi et al., 2004; Reiter, 1991). Esta activación sinérgica de ambos receptores resulta en la elevación intracelular del segundo mensajero denominado adenosina cíclica 3',5'-monofosfato (cAMP), lo cual incrementa la producción de NAT (Macchi et al., 2004; Reiter, 1991). En el hámster Syrian, este aumento de cAMP y de su ARN mensajero de transcripción ocurre en las primeras cuatro horas de oscuridad, que preceden a la actividad de la NAT y a la síntesis de melatonina, así mismo también coincide con la liberación de NE (Fig. 11) (Reiter, 1991).

Además de estos eventos celulares que regulan la biosíntesis de melatonina, la luz es capaz de producir dos efectos en la producción de la hormona. Por un lado, en su amplio espectro de luz blanca y luz monocromática en su intervalo visible e invisible (UV-

A) suprime la actividad de la enzima NAT generando una disminución del contenido y liberación de melatonina hasta sus niveles basales (Nowak y Zawilska, 1998). Sin embargo, los pulsos de luz pueden restablecer al oscilador generando un ritmo de la producción de melatonina de forma dependiente a la fase, es decir que un pulso de luz aplicado en la fase temprana de la noche subjetiva (aquella parte del ritmo estudiado en el cual el organismo se comporta como cuando se encontraba en la fase de oscuridad del ciclo diario de luz-oscuridad después de un tratamiento con luz constante) produce un retraso de fase, mientras que un pulso aplicado durante la fase tardía de la noche subjetiva produce un avance de fase (Nowak y Zawilska, 1998).



**Figura 11. Mecanismos de transducción de la norepinefrina sobre los receptores adrenérgicos de la glándula pineal.** La norepinefrina (NE) interactúa con los receptores adrenérgicos beta (β) que desencadena una reacción bioquímica para la producción de cAMP mediante la proteína guanósín estimuladora (G<sub>s</sub>) que actúa sobre su efector denominado adenilato ciclasa (C) en presencia de adenosina trifosfato (ATP). Mientras que los receptores alfa (α) permiten la entrada de Ca<sup>2+</sup> (e: extracelular, i: intracelular) para activar la proteína cinasa C (PKC) para amplificar la señal de los receptores β. Fuente: Nowak y Zawilska, 1998.

## 2.2. PROPIEDADES FISIOLÓGICAS DE LA MELATONINA.

La melatonina es altamente pleiotrópica tanto por sus características químicas como físicas. Esta indolamina ejerce una amplia variedad de funciones fisiológicas y celulares, entre éstas se destaca como modulador de los ritmos biológicos, de la fisiología reproductiva y cardiovascular, del citoesqueleto, así como un inmunoestimulador, anti-inflamatorio, un potente antioxidante y un agente oncostático, citoprotector y anti-apoptótico (Tan *et al.*, 2002; Macchi *et al.*, 2004; Hardeland *et al.*, 2006).

Uno de los papeles más reconocidos de la melatonina es la de coordinar los ritmos biológicos debido a que esta indolamina actúa como un reloj interno para los eventos diarios e indicando el ritmo circadiano necesarios para el ciclo de sueño-vigilia. Además, la melatonina provee información del fotoperiodo, el cual produce cambios fisiológicos y conductuales adaptativos, tales como los ciclos estacionales de la reproducción, el crecimiento y color del pelaje, y la alimentación en mamíferos (Nowak y Zawilska, 1998; Hardeland *et al.*, 2006; Arendt, 1998). En el estudio de la modulación de la reproducción estacional se ha demostrado que la melatonina actúa como un factor anti-gonadotrópico o progonadotrópico en ganado que madura reproductivamente en días largos y cortos, respectivamente (Nowak y Zawilska, 1998).

Esta indolamina también actúa como un cronobiótico, al interactuar con estructuras de los ritmos circadianos. La administración de 1 a 5 mg de melatonina disminuye la latencia del sueño, el número de despertares por el sueño total y mejora la eficiencia del sueño, el humor y el rendimiento del paciente (Cardinali *et al.*, 2006). Sin embargo, la exposición de los pacientes a la luz brillante para inhibir la síntesis de melatonina puede aliviar algunos desordenes del sueño como el insomnio dependiente y/o independiente de la deficiencia de melatonina, el síndrome del *jet-lag* o cambio de zona horaria, el desorden de sueño por cambio de horario de trabajo y algunos desordenes del sueño relacionados a los pacientes con enfermedad de Alzheimer. Estos hallazgos indican que la melatonina puede proveer una terapia complementaria para los problemas relacionados con el sueño (Kennaway y Wright, 2002; Cardinali *et al.*, 2006).

Diversas líneas de investigación han sugerido otras funciones celulares de la melatonina que incluyen la captación de radicales libres, la estimulación del sistema inmune y la acción como agente oncostático (Blask *et al.*, 2002; Guerrero y Reiter, 2002). La propiedad de la melatonina como antioxidante y captador de radicales libres fue reportada en 1993 por Tan y colaboradores. Esta indolamina forma parte de un sistema de defensa antioxidante endógeno de la célula, el cual está encargado de reducir la toxicidad molecular de oxígeno y de especies reactivas de nitrógeno. La propiedad de la melatonina como captador de radicales puede ser de dos tipos: directa e indirecta.

- *Directa*: Cuando la melatonina es capaz de neutralizar directamente diversas especies reactivas como el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y otros oxidantes como radical super óxido ( $^1\text{O}_2$ ), y especies reactivas de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés) como el radical óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ) y el producto de la interacción entre el radical anión superóxido y el NO llamado anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) y/o sus metabolitos. También neutraliza el ácido hipocloroso (Tan *et al.*, 2002; Reiter, 2000).



- *Indirecta*: Cuando la melatonina actúa sobre algunos factores de transcripción para regular los niveles de ARN mensajero y las actividades de otros antioxidantes endógenos del cuerpo que metabolizan los radicales libres para convertirlos en productos menos dañinos. Estos antioxidantes son enzimas que remueven moléculas tóxicas antes del daño celular o evitan que se formen agentes tóxicos, tales como: la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión (GSH) peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa (GRd) y la catalasa (CAT) (Reiter, 2000). Por otro lado, la melatonina al unirse a la calmodulina puede inhibir la actividad de la enzima pro-oxidativa y dependiente de calmodulina llamada óxido nítrico sintasa en el cerebelo y el hipotálamo (Reiter, 1998).

Otros derivados de la melatonina como el AFMK y AMK también forman metabolitos por interacción con especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (Hardeland et al., 2006). Esta protección antioxidante es evidente en ratones de envejecimiento acelerado (Nogués et al., 2006). La acción de esta indolamina como agente antioxidante ha requerido una dosis igual o mayor a dos órdenes de magnitud a la administrada para los trastornos del sueño (Nowak y Zawilska, 1998).

Las propiedades inmunomoduladoras de la melatonina están mediadas vía receptores nucleares y de membrana a través de los cuales se ha reportado la activación de células T, B, NK y monocitos, la proliferación de timocitos, la liberación de citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12 y IFN $\gamma$ ), meta-enkefalinas e inmuno-opioides (Guerrero y Reiter, 2002; Carrillo-Vico *et al.*, 2003; Lissoni *et al.*, 2002). Asimismo, sus acciones anti-inflamatorias están relacionadas con la inhibición de los efectos de la prostaglandina E2 (PGE2), y en específico con la regulación negativa de la ciclooxigenasa 2 (COX2), la cual puede ser transmitida por su metabolito AMK (Hardeland et al., 2006).

En el caso de las acciones oncostáticas de la melatonina involucran la supresión de la recaptura del ácido linoleico dependiente de receptores MT1 y MT2 o por la regulación negativa de los receptores de estrógenos (Blask *et al.*, 2002). En pacientes con un estado avanzado de cáncer se han administrado dosis orales muy grandes entre los 20-50 mg diarios para prolongar la sobrevivencia y reducir el número y el grado de las complicaciones de los pacientes con diversos tipos de cáncer de pulmón, glándula mamaria, páncreas, hígado (Lissoni *et al.* 1991).

Los efectos de la melatonina dependen de la dosis, de la hora del día, de la edad, el sexo, la exposición actual y previa del fotoperiodo. Sus efectos adversos podrían depender de sus efectos a largo plazo y la interacción de la melatonina con otras drogas. Sin embargo, a la fecha no se ha reportado toxicidad en tratamientos a largo plazo (Arendt, 1998).

### 2.2.1. PAPEL DE LA MELATONINA EN EL CITOESQUELETO.

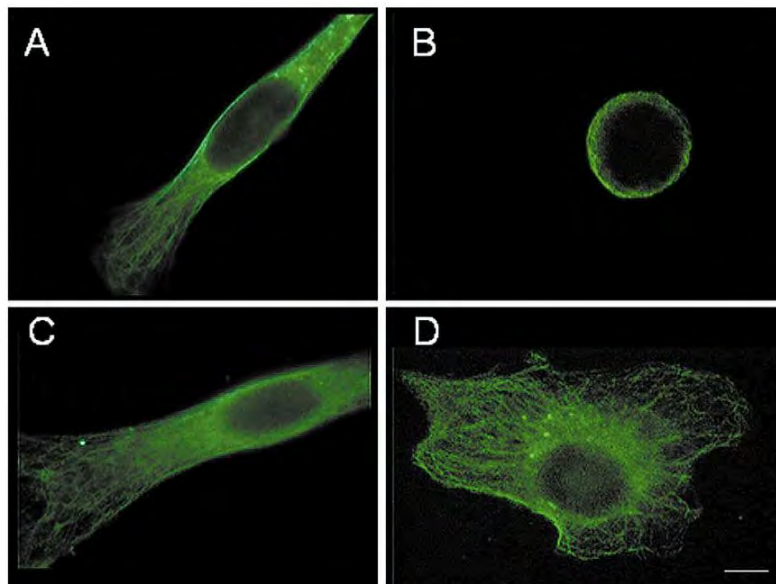
Una de las sustancias utilizadas para inducir neurodegeneración, es el de ácido okadáico (AO), que se ha utilizado para reproducir en células en cultivo, algunas de las alteraciones en el citoesqueleto y el incremento en el estrés oxidativo, que ocurren en las neuronas de pacientes con taoupatías (Arendt *et al.*, 1998). Este compuesto inhibe a las fosfatasa PP1 y PP2A (Bialjoan y Takai, 1988), y por lo tanto causa la fosforilación excesiva de la proteína tau, la formación de filamentos helicoidales apareados y la retracción del citoesqueleto alrededor del núcleo (Lee *et al.*, 2000) que son las características histopatológicas de las demencias.

En modelos de neurodegeneración, la administración intracerebroventricular aguda del AO en ratas, produce la fosforilación reversible de tau; por el contrario, la aplicación crónica de AO, es altamente tóxica y causa la muerte celular (Arendt *et al.*, 1998). La administración tópica del AO en el hipocampo, también causa un daño celular que involucra la fosforilación de residuos de serina de proteínas con un peso molecular entre 170 y 60 kDa como la subunidad NR2B del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (Arias *et al.*, 2002). Este daño reduce el grosor de las capas celulares, cambia la forma neuronal de bipolar a una estrellada hasta originar la pérdida de neuronas piramidales de CA1 (Arias *et al.*, 1998, 2002) y CA3 (Ramírez-Munguía *et al.*, 2003), de células granulares del giro dentado, y de neuronas del hilus (Arias *et al.*, 1998, 2002; He *et al.*, 2005).

Los cambios ocasionados en el citoesqueleto por el efecto neurotóxico del AO se han demostrado *in vitro* e *in vivo*. En cultivos de neuronas corticales y del cerebelo de rata, este compuesto ocasiona el incremento de la fosforilación de las proteínas asociadas a los microtúbulos como la MAP2a y la tau. También, causa la retracción de las dendritas, así como la redistribución de ambas proteínas de las neuritas al soma (Arias *et al.*, 1993; Arias *et al.*, 1998). Todo lo anterior, se ha sugerido que causa la ruptura en la memoria espacial de trabajo y de referencia (He *et al.*, 2001). Además, una inyección aguda con 1 mM de ácido okadáico (0.5  $\mu$ l) en el hipocampo dorsal induce la formación de filamentos helicoidales apareados en neuritas distróficas en la capa molecular-lacunosum de la capa CA1 y en la capa molecular de la capa del giro dentado, y también produce la pérdida de la proteína MAP2 (Lee *et al.*, 2000).

Se ha demostrado en las células N1E-115 de neuroblastoma, que el AO causa la retracción del citoesqueleto alrededor del núcleo, así como un incremento significativo en la fosforilación de la proteína tau. En este modelo de neurodegeneración, la melatonina previene en un 100% el efecto del AO. La red del citoesqueleto se mantiene en el citoplasma y en las neuritas de las células N1E-115 cultivadas 2 horas con melatonina, previas a la adición de 50 nM de AO (Fig. 12).

Además, la hormona inhibe el incremento en la lipoperoxidación inducida por este compuesto. Los efectos de la melatonina sobre la organización alterada del citoesqueleto, inducida por el AO, son dependientes de la dosis con la que se trataron los cultivos e independientes de los receptores a melatonina (Benítez-King *et al.*, 2003). Recientemente, se demostró que la incubación durante 6 horas con 100 nM de melatonina en células de neuroblastoma N1E-115 previene la hiperfosforilación de la proteína tau causada por el AO (15 nM -24h-) (Jiménez-Rubio *et al.*, 2007). Estas funciones protectoras de la melatonina también se han observado en células de neuroblastoma SH-SY5Y, en las cuales la melatonina inhibe la fosforilación y acumulación de proteínas del citoesqueleto como los neurofilamentos, así como el desensamble de los microtúbulos (Wang *et al.*, 2004).



**Figura 12. Efectos de la melatonina sobre la reorganización de los microtúbulos en células N1E-115 tratadas con ácido ocadaíco.** En estas fotomicrografías se muestran los arreglos de los microtúbulos en células tratadas con (A) vehículo, (B) 50 nM de ácido ocadaíco, (C)  $10^{-5}$  M de melatonina antes del tratamiento con ácido ocadaíco y (D) un pre-tratamiento con ácido ocadaíco seguido de un tratamiento con melatonina, barra= 10  $\mu$ m. Fuente: Benítez-King *et al.*, 2003.

La melatonina, además de modular la organización del citoesqueleto y la tasa de fosforilación de la proteína tau, actúa como un neuroprotector por su capacidad de captar radicales libres (Reiter, 1998). En las neuronas del hipocampo y en neuronas en cultivo, la indolamina disminuye los niveles de lipoperoxidación causados por las neurotoxinas 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Acuña-Castroviejo *et al.*, 1997), la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Mayo *et al.*, 1998), y el ácido kaínico (Tan *et al.*, 1998). Estos resultados sugieren que la melatonina puede ser útil en el

tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, por su capacidad antioxidante, por inducir la formación de neuritas en un modelo de neurodegeneración de células en cultivo y a través de la estimulación de la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo, y los cambios que la indolamina induce en el citoesqueleto. Esta hipótesis está sustentada, además, por el hecho de que los pacientes con enfermedad de Alzheimer tienen disminuidos los niveles plasmáticos de la hormona (Liu *et al.*, 1999) y por escasos estudios clínicos en los que se ha demostrado que la administración de la melatonina a sujetos que padecen esta enfermedad, causa una mejoría en los trastornos de ritmos circadianos (Brusco *et al.*, 1998; Jean-Louis *et al.*, 1998) así como una reducción en la disfunción cognocitiva (Brusco *et al.*, 2000).

Los mecanismos de acción de la melatonina abarcan un amplio espectro, ya que puede ejercer sus funciones vía múltiples receptores, tanto nucleares como de membrana, y directamente sin requerir unión al receptor al atravesar la membrana lipídica (Reiter *et al.*, 2007). La melatonina también puede difundir y ejercer sus efectos sistémicos a nivel subcelular (Macchi *et al.*, 2004).

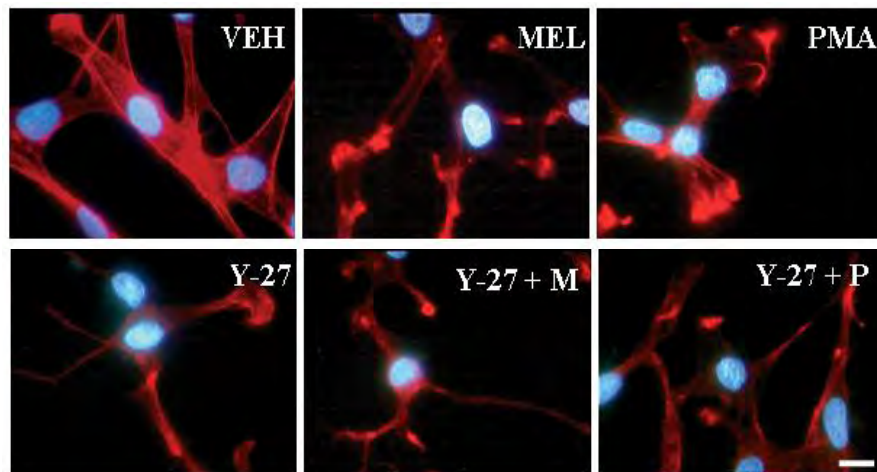
La información obtenida a la fecha indica que la melatonina actúa como un protector del neurocitoesqueleto, sin embargo no se conocen las vías de transducción involucradas y solo se conocen parcialmente algunos de los mecanismos moduladores de la organización del citoesqueleto en células en cultivo.

En las células N1E-115, la melatonina induce la polimerización de los microtúbulos y el alargamiento de las neuritas (Benítez-King *et al.*, 1990) por medio del antagonismo de la calmodulina (CaM) (Huerto-Delgadillo *et al.*, 1994). Además, en ensayos *in vitro* y en el orden de minutos, se inhibe la actividad de la CaM-Cinasa II y su autofosforilación (Benítez-King *et al.*, 1996). La melatonina induce la redistribución de la CaM en las células MDCK y duplica la cantidad de esta proteína en la fracción citoesqueleto-membranal (Antón-Tay *et al.*, 1998; Soto-Vega *et al.*, 2004). También, incrementa la actividad de la CaM-cinasa II en una fracción de citoesqueleto semipurificada (datos no publicados). Estas evidencias, sugieren que la melatonina puede tener un efecto bimodal opuesto sobre las actividades enzimáticas dependientes de CaM. Es decir, en un curso temporal de minutos actúa como un antagonista de CaM, en tanto que en un curso temporal de horas podría actuar como un activador de las enzimas dependientes de CaM, al incrementar la cantidad de esta proteína y por medio de su concentración en compartimientos celulares específicos (datos sin publicar).

En estudios *in vitro* se ha demostrado que una concentración de 1nM melatonina es capaz de activar directamente a la PKC al incrementar su unión al [<sup>3</sup>H] phorbol-12,3-dibutirato. Esta indolamina también aumenta la actividad de esta enzima en un 30% inducida por un agonista forbol ester, mientras que en presencia de un inhibidor de esta enzima se abole su activación. Sin embargo, esta indolamina

interactúa con la PKC solo en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que sugiere que la melatonina puede interactuar con otras proteínas hidrofóbicas y dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Anton Tay *et al.*, 1998). Otros estudios en células N1E-115, demuestran que la melatonina activa de forma selectiva a la isoforma  $\alpha$  de la PKC en la reorganización de los filamentos intermedios para la formación de neuritas (Benítez-King *et al.*, 2001). Además, la melatonina aumenta la fosforilación de la calmodulina inducida por la PKC (Soto-Vega *et al.*, 2004).

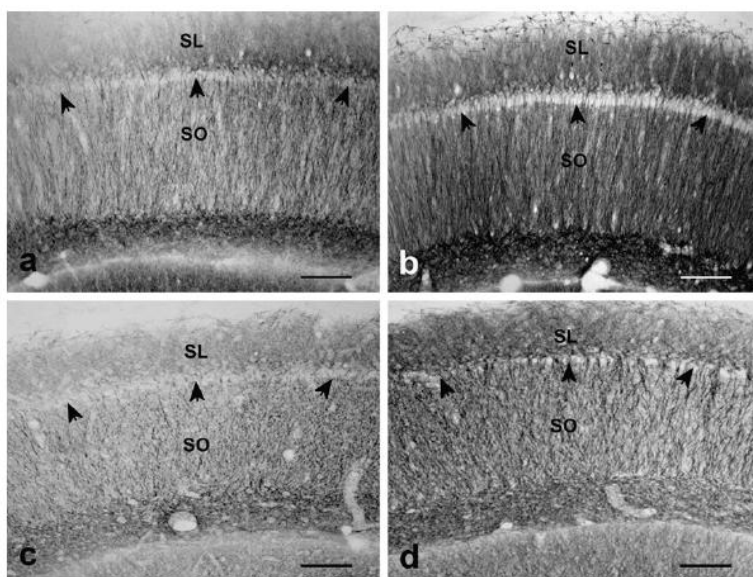
La restauración de la organización del citoesqueleto y la formación de neuritas inducida por la melatonina mediante la estimulación de la PKC y el antagonismo de CaM, se demostró empleando inhibidores específicos para cada proteína como la opiobiolina y la bisindolilmaleimida en células N1E-115 bajo condiciones de estrés oxidativo causado con un tratamiento de 100  $\mu\text{M}$  de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). También se demostró que el bloqueo de los receptores a melatonina empleando luzindol no afectó en la reorganización del citoesqueleto en estas células tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  y melatonina (Benítez-King *et al.*, 2005). Además, esta indolamina también promueve el arreglo de los microfilamentos en el proceso de neuritogénesis temprana, al incrementar el número de células con filopodios y con neuritas largas mediante la participación de la PKC y de la proteína cinasa asociada a Rho (ROCK) (Fig. 13) (Bellon *et al.*, 2007). Asimismo, en estas células de neuroblastoma también se ha demostrado un aumento en la cantidad de tubulina beta soluble y en la proteína asociada a microtúbulos como la MAP2 con concentraciones fisiológicas de esta indolamina (Meléndez *et al.*, 1996).



**Figura 13. Formación de neuritas inducida por melatonina en etapas tempranas de la neuritogénesis y la participación de la Rho/ROCK en células N1E-115.** En estas fotomicrografías se muestran los arreglos de los microfilamentos en células tratadas con vehículo (VEH), melatonina (MEL), 2.5nM de forbol 12-miristato, 13-acetato (PMA, inhibidor de PKC), 10  $\mu\text{M}$  de Y-27632 (Y-27) o un pre-tratamiento de Y-27 seguido de 1 nM de melatonina (Y-27+M) o de PMA (Y-27+P), barra= 10  $\mu\text{m}$ . Fuente: Bellon *et al.*, 2007.

Recientemente, en estudios *in vivo* con roedores se encontró que la administración de melatonina (aproximadamente de 5 mg por rata), por un tiempo de 6 o 12 meses, aumentó la densidad óptica de la tinción de la proteína MAP2 en el *stratum oriens* y *lucidum* de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, lo que sugiere que la melatonina podría incrementar la estabilidad dendrítica y atenuar el envejecimiento del hipocampo (Fig. 14) (Prieto-Gómez *et al.*, 2008).

Hasta ahora, la mayoría de la información sobre la modulación del citoesqueleto por la melatonina ha sido obtenida en células en cultivo. Los cultivos organotípicos permiten la conservación de tejido nervioso funcional (Stoppini *et al.*, 1991). Estos cultivos ofrecen diversas ventajas como: 1) mantener la arquitectura definida del circuito trisináptico del hipocampo (Gähwiler *et al.*, 1981; Galimberti *et al.*, 2006), 2) mantener la organización tridimensional de las proyecciones axonales con un grosor a largo plazo de 100-150  $\mu\text{m}$  (Stoppini *et al.*, 1991; Gähwiler *et al.*, 1997; Henze *et al.*, 2000; De Paola *et al.*, 2003; Galimberti *et al.*, 2006), 3) la viabilidad prolongada de 20 semanas en cultivo (Nargel *et al.*, 2004; Galimberti *et al.*, 2006), 4) la recuperación rápida del tejido nervioso (Stricker *et al.*, 1997) y 7) la maduración del tejido en sincronía con el tiempo correspondiente *in vivo* (Madison y Edson, 1997; De Simoni *et al.*, 2003). Lo anterior, indica que estos cultivos son un buen modelo experimental para el estudio de procesos tales como la neurogénesis (Raineteau *et al.*, 2004), la sinaptogénesis (Nikonenko *et al.*, 2003), la regeneración (Linke *et al.*, 1995), la expresión de proteínas (Lundstrom *et al.*, 2001) y la neurodegeneración (Gogolla *et al.*, 2006). También, por medio de métodos de transfección molecular (Benediktsson *et al.*, 2005; Lo *et al.*, 1994) o vectores virales (Lundstrom *et al.*, 2001) es posible realizar estudios de electrofisiología y análisis de imágenes en diferentes ventanas de tiempo (Gogolla *et al.*, 2006).



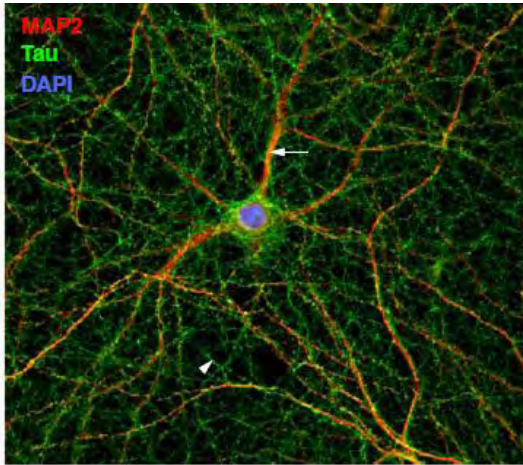
**Figura 14. Efecto de la melatonina sobre la proteína MAP2 en cortes coronales de la región CA1 del hipocampo.** En estas fotomicrografías se muestra el aumento de la intensidad de la tinción de la proteína MAP2 en ratas no tratadas (a,c) y tratadas (b,d) con melatonina. Fuente: Prieto-Gómez *et al.*, 2008.

### 3. DENDRITAS

Las dendritas son extensiones continuas y delgadas del soma que se ramifican de diversas formas para construir un intrincado árbol encargado de recibir e integrar la información proveniente de los estímulos externos o internos de nuestro cuerpo (Alberts *et al.*, 1996; Squire *et al.*, 2008, Stuart *et al.*, 2008). Estos árboles dendríticos están relacionados con distintos modos de conexión entre las neuronas y ocupan diversos dominios espaciales para recibir aferencias. Estas últimas pueden establecer contactos sinápticos directamente en el eje principal de las dendritas o en especializaciones de esta dendritas llamadas espinas dendríticas (Stuart *et al.*, 2008).

La estructura intracelular de las dendritas está compuesta por algunos organelos como mitocondrias, retículo endoplasmático, entre otros, para permitir la síntesis de algunas proteínas *in situ*. Además, estas prolongaciones poseen algunos componentes del citoesqueleto que adquieren arreglos únicos participando en la formación de conos de crecimiento para la formación de dendritas y sinapsis nuevas (Stuart *et al.*, 2008; Squire *et al.*, 2008). Los microtúbulos se caracterizan por su organización que consiste en una distribución uniforme y equidistante con apariencia de entramado en todo el diámetro de la dendrita (Bourne and Dianielli, 1972). Aunque estos microtúbulos se estabilizan por la asociación de proteínas como la MAP2 y STOP que se unen al citoesqueleto (Fig. 15), cada uno de éstos se encuentra rodeado de una sustancia que forma una superestructura. El arreglo de estos microtúbulos en las dendritas maduras tiene una polaridad mixta, es decir que aproximadamente el 50% de éstos son extremos más y el otro 50% de éstos son extremos menos. En el extremo más, la parte distal del microtúbulo polimeriza subunidades de tubulina y aumenta su longitud, mientras que el extremo menos se despolimeriza y reduce su longitud (Baas *et al.*, 1989).

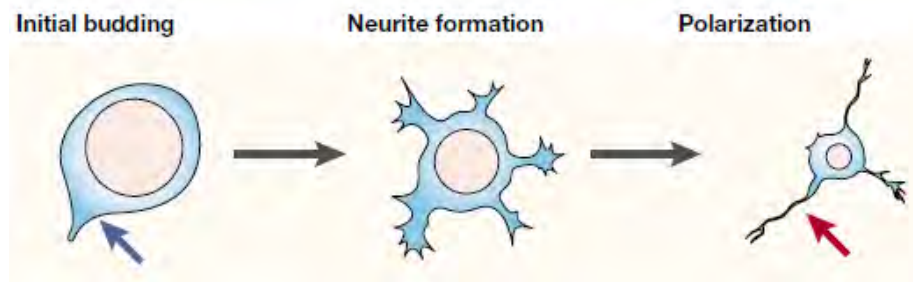
Por otro lado, los neurofilamentos son más numerosos que los microtúbulos y se agrupan en haces de 30 filamentos en las dendritas largas (ejemplo: motoneuronas) con propiedades rígidas (Rhoades and Bell, 2009; Zhang *et al.*, 2002). Estos filamentos intermedios tienen apariencia de cuerda en cortes longitudinales. Por último, los microfilamentos se concentran debajo de la membrana plasmática en las espinas dendríticas, en las terminales pre- y post-sinápticas y en los conos de crecimiento para formar nuevas dendritas (Rhoades and Bell, 2009). Este componente del citoesqueleto tiene arreglos dinámicos tanto en las dendritas como en las espinas, lo que permite la extensión y la retracción de filopodios. A pesar de esta organización de los filamentos de actina no difieren con la dinámica que desempeñan los axones en los conos de crecimiento, los filamentos de actina pueden ser estabilizados por proteínas asociadas al citoesqueleto (Dailey & Smith 1996).



**Figura 15. Neurona de hipocampo.** En esta fluorografía se muestran los dos subdominios de las proteínas MAP2 y tau en neuronas maduras. La MAP2 se localiza específicamente en las dendritas (flecha), mientras que tau se encuentra en el axón (cabeza de flecha). *Fuente: Dehmelt y Halpain, 2004.*

### 3.0. DENDRITOGÉNESIS.

El término de dendritogénesis se refiere a la formación de nuevas dendritas en la neurona, cuyo brote y alargamiento en el momento y tiempo adecuados, constituyen la base de la conectividad neuronal para la función cerebral y la base estructural de la plasticidad neuronal (Luo, 2000; Da Silva y Dotti, 2002). Un proceso previo a la formación de las dendritas es la neuritogénesis, que consiste en la formación de neuritas. Estas extensiones cilíndricas se caracterizan por poseer un cono de crecimiento en la parte distal y carecer de características específicas que las definan como dendrita o axón. En la neuritogénesis se han observado tres etapas principales: 1) el brote inicial, que produce lamelipodios alrededor de una neuroesfera, 2) la formación de 4 o 5 neuritas de 20-30  $\mu\text{m}$  a partir de los lamelipodios, y la célula posee una apariencia simétrica y 3) la polarización, en la cual las neuritas se alargan continuamente hasta transformarse en dendritas o axones con características ultraestructurales específicas e inmunohistoquímicas (Fig. 16) (Goslin *et al.*, 1990; Yuh-Nung *et al.*, 2001; Da Silva y Dotti, 2002).

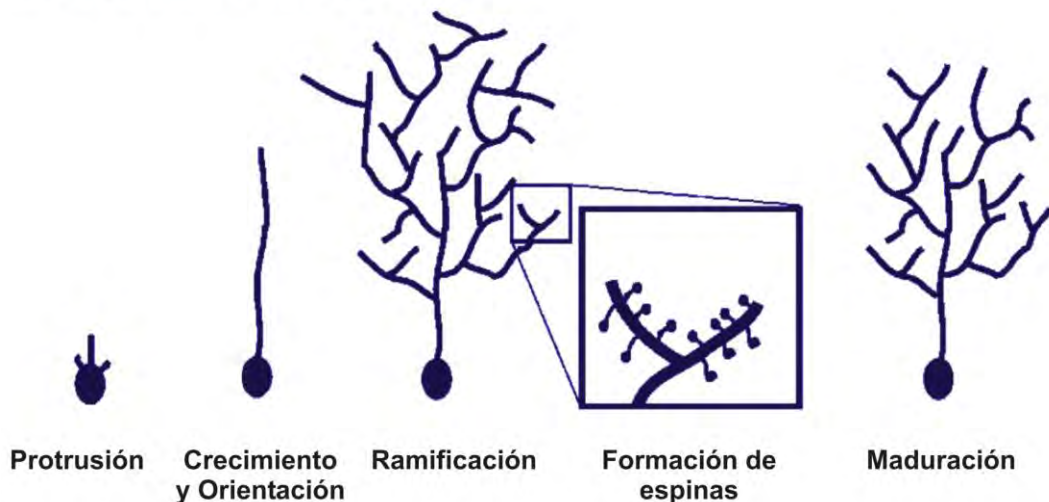


**Figura 16. Formación de las neuritas.** Se muestran los tres pasos, el brote inicial, la formación de la neurita y la polarización. *Fuente: Da Silva y Dotti, 2002.*



Este último paso de la neuritogénesis, que consiste en la diferenciación de los dominios axonal y somatodendrítico, se divide en tres sub-etapas: 1) una neurita se diferencia en el axón, y éste crece hasta establecer contactos sinápticos, 2) las neuritas restantes se diferencian en dendritas, las cuales crecen hasta formar árboles complejos (fig. 17) (Goslin *et al.*, 1990; Fletcher *et al.*, 1991, 1994; Yuh-Nung *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 2001) y 3) ambos dominios adquieren características maduras y proceden a la formación de contactos sinápticos, denominado sinaptogénesis (Yuh-Nung *et al.*, 2001). En las neuronas piramidales de la corteza se ha observado que las dendritas primarias emergen del soma, y que las dendritas secundarias y de otros órdenes emergen a partir de la ramificación de éstas. El alargamiento y la maduración de las dendritas dependen de la aparición de los conos de crecimiento y de los filopodios que se localizan en la parte distal de la dendrita principal, y a partir de éste se origina la ramificación de las mismas (Fig. 17) (Dailey y Smith, 1996; Scott *et al.*, 2001). Posteriormente, estas dendritas se vuelven menos dinámicas, y se establecen contactos sinápticos maduros que se estabilizan las dendritas secundarias y/o las espinas dendríticas. Si esto no sucede éstas se retraen (Fiala *et al.*, 1998, Goslin *et al.*, 1990). La selección de las dendritas parece ser un proceso estocástico en las neuronas del hipocampo; sin embargo, hay mecanismos intracelulares que participan en conjunto para la formación de las dendritas (Yuh-Nung *et al.*, 2001).

## DENDRITOGÉNESIS



**Figura 17. Proceso de dendritogénesis en las neuronas.** En este esquema se muestran los etapas para la formación de las dendritas. Desde la protrusión de las neuritas que se convertirán en dendritas hasta el crecimiento, ramificación y maduración de éstas. *Fuente: Scott et al., 2001.*

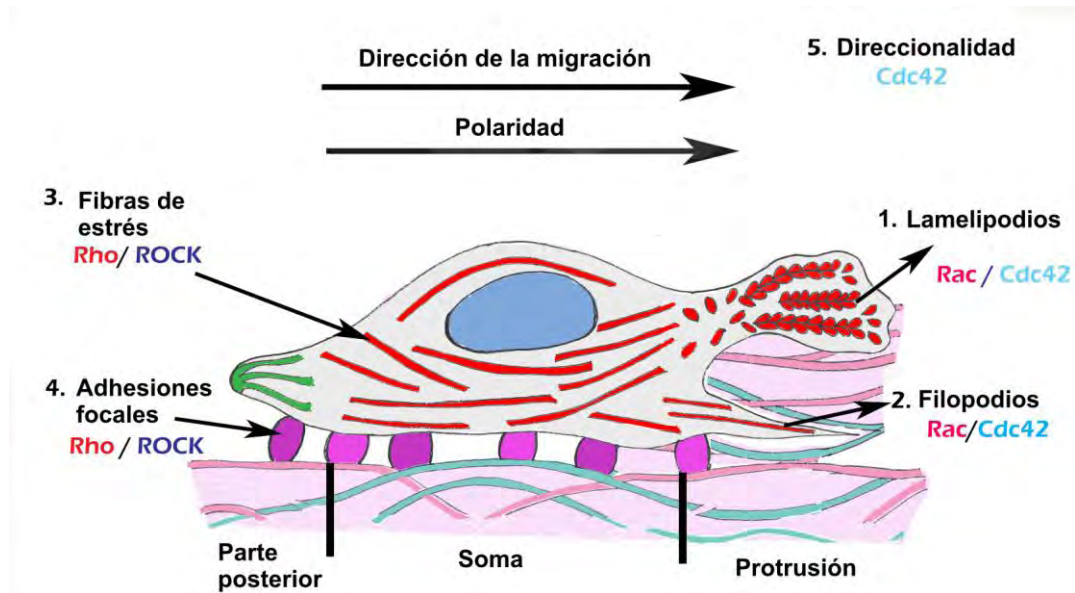
### 3.0.1. MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA FORMACIÓN Y EL CRECIMIENTO DE LAS DENDRITAS.

En la formación del cono de crecimiento para desarrollar nuevas dendritas y axones intervienen distintos mecanismos intracelulares y micro-ambientales que participan concertadamente para determinar el número, las características morfológicas, la orientación y la velocidad de crecimiento. En células vivas *in situ* se ha mostrado que la morfología y la orientación de las dendritas dependen de la naturaleza de las moléculas adyacentes como las proteínas de la matriz extracelular (tenascina, hialurano, etc.), de las moléculas de adhesión (colágeno, laminina, fibronectina, etc.), y de las moléculas solubles (factores de crecimiento como FGF2, TGF, VEGF, IGF, OP-1, BMP-7, Sema 3A y neurotrofinas, etc.) que también intervienen en la diferenciación de estas neuritas (Yuh-Nung *et al.*, 2001; Da Silva y Dotti, 2002; Lowery *et al.*, 2009). Asimismo, la protrusión de las neuritas también produce cambios en los microdominios membranales como lamelipodios o filopodios, los cuales se forman por la disminución en la tensión de la membrana mediante las interacciones de sustratos y superficie celular (ejemplos: activación de receptores de integrina o el agrupamiento de receptores inducido por laminina) (Da Silva y Dotti, 2002).

Otro componente intracelular importante es el neurocitoesqueleto, el cual también puede interactuar con señales externas (ejemplo:  $\text{Ca}^{2+}$ ) produciendo cambios dinámicos de polimerización y despolimerización que inducen la formación de filopodios y lamelipodios, y la extensión de neuritas (Da Silva y Dotti, 2002). La actina es una parte central que controla la protrusión, la exploración y la motilidad del cono de crecimiento. La combinación de actina filamentosa (actina-F) que avanza hacia el borde líder y la actina-F de flujo retrógrado del cono de crecimiento aportan la fuerza motriz para mantenerlo y guiarlo hacia las señales externas que dirigen su orientación (Lowery *et al.*, 2009). Este flujo retrogrado de actina-F está controlado por proteínas motoras como la miosina II, las cuales se unen mediante interacciones proteína-proteína en la zona de transición del cono de crecimiento, y además proporcionan la fuerza para la polimerización de la actina-F en el dominio periférico (Lowery *et al.*, 2009). Posteriormente, la actina-F se agrupa en haces con el extremo de crecimiento orientado hacia la punta formando filopodios que funcionan como sensores, o bien, constituye una red formando lamelipodios que producen una tensión y adhesión para el movimiento de los conos de crecimiento y la extensión de las neuritas (Fig. 18) (Da Silva y Dotti, 2002). Esta dinámica de la actina en las dendritas se relaciona con la acción de proteínas GTPasas pequeñas, las cuales responden a señales extracelulares y participan en la morfogénesis neuronal mediando procesos de crecimiento

dendrítico, ramificación de dendritas y formación de espinas dendríticas (Luo, 2000; Yuh-Nung *et al.*, 2001).

Las GTPasas pequeñas se han clasificado en la familia Rho como la RhoA (Miembro homólogo de Ras A) que participa en la formación de fibras de estrés y en las adhesiones focales, la Rac1 (substrato de la toxina botulínica C3 relacionada con Ras) que permite el ensamble de la actina para formar lamelipodios y bordes ondulados de la membrana y Cdc42 (ciclo de división celular 42) que también participa en la formación de filopodios (Da Silva y Dotti, 2002) (Fig. 18).



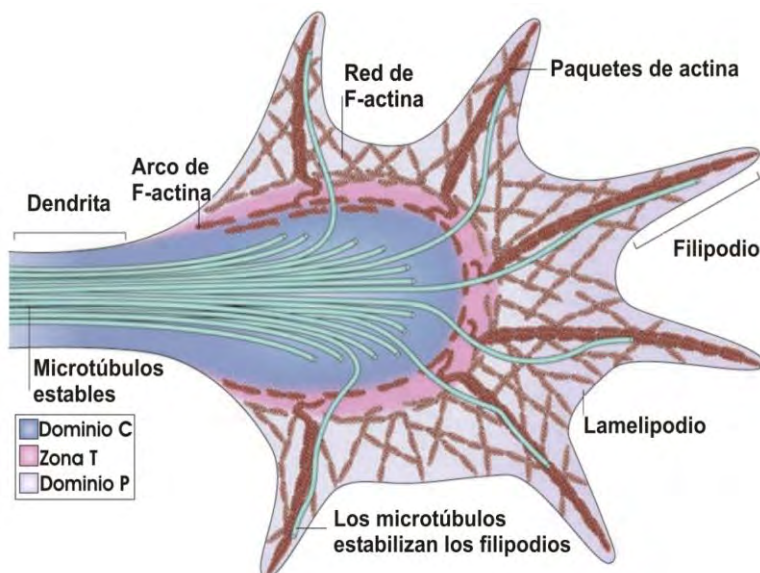
**Figura 18. Participación de las GTPasas pequeñas en la organización de los microfilamentos.** En este esquema se muestra la reorganización de los microfilamentos en lamelipodios y filopodios, así como fibras de estrés y adhesiones focales mediante la acción de las GTPasas Rho, Rac, Cdc42 y la cinasa de Rho (ROCK) para la migración celular, la formación de conos de crecimiento y la dendritogénesis.

El papel de estas proteínas Rho, Rac1 y Cdc42 se ha observado en diferentes sistemas biológicos como células PC12 y N1E-115, neuronas corticales, células de Purkinje, células ganglionares de la retina, neuronas tectales y en neuronas piramidales del hipocampo (Luo, 2000). Estos estudios han revelado que estas GTPasas regulan la extensión dendrítica al igual que el crecimiento axonal en un proceso dinámico, donde la proteína RhoA en estado activo inhibe el crecimiento, mientras que las proteínas Rac y Cdc42 participan en la iniciación, la alargamiento, ramificación y remodelación de las dendritas como reguladores positivos de los arreglos de actina (Luo, 2000; Yuh-Nung *et al.*, 2001; Da Silva y Dotti, 2002). Particularmente, la GTPasa RhoA transmite su información al citoesqueleto a partir de la cinasa de Rho (ROCK) que también participa en la regulación negativa de esta proteína (Luo, 2000; Da Silva y Dotti, 2002; Miller *et al.*, 2003). En neuronas tectales,

esta cinasa causa una simplificación dramática del árbol dendrítico, y su activación bloquea el crecimiento de las dendritas causado por una estimulación sensorial (Miller *et al.*, 2003).

Además, la organización de la actina requieren otros componentes que se unen a ella como: 1) la profilina, que promueve la asociación y polimerización de la actina, 2) la VASP, que acopla actina a la superficie, 3) la Arp2/3 interviene en la nucleación de la actina, 4) la filamina o  $\alpha$ -actinina, que entrecruza los filamentos de actina, 5) la gelsolina, que rompe los filamentos de actina, 6) la timosina, que secuestran subunidades de actina, 7) el factor despolimerizante de actina y cofilina, que promueven la disociación en el extremo terminal (Da Silva y Dotti, 2002).

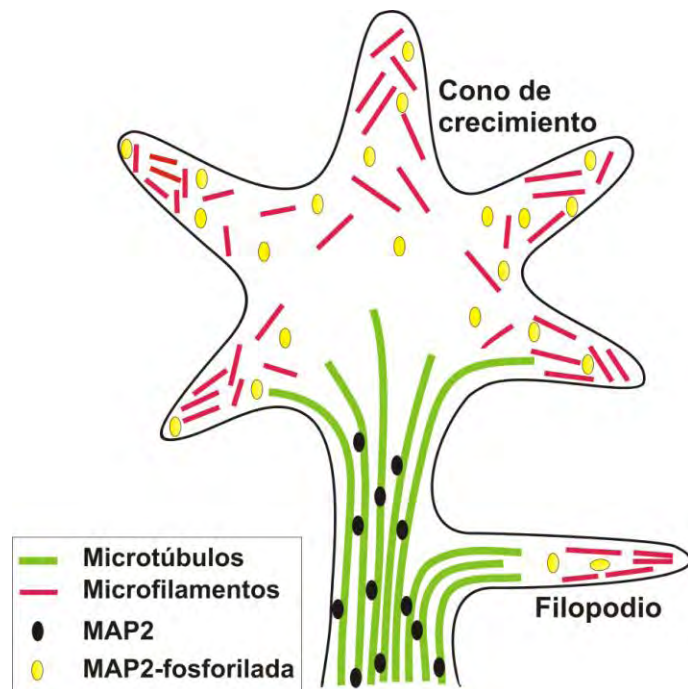
A pesar de la dinámica de las estructuras de actina, también es necesaria la intervención de los microtúbulos, los cuales participan de dos formas en el cono de crecimiento: en el dominio periférico actúan como sensores que guían, y en el dominio central dirigen el avance del cono de crecimiento dándole estabilidad al área de crecimiento (Fig. 19) (Lowery *et al.*, 2009). Esta reorganización de los microtúbulos también participa en la formación de las dendritas para que se desarrollen y se alarguen de forma sostenida, lo cual indica que la formación de las estructuras de actina es crucial para que los microtúbulos puedan penetrar en las mismas. En la fase de exploración, que es la etapa cuando los microtúbulos invaden el cono de crecimiento y fijan la dirección de la dendrita, la tubulina despolimerizada es inestable. Mientras que en la fase de consolidación, que es la etapa cuando los filamentos de actina se despolimerizan en el cuello del cono de crecimiento y la membrana se colapsa alrededor de los haces de microtúbulos para formar un cilindro, los haces de microtúbulos son gruesos y estables con tubulina acetilada y detirosinada que se asocia a las proteínas MAP (Da Silva y Dotti, 2002; Kaufmann *et al.*, 2000).



**Figura 19. Citoesqueleto y su participación en la formación del cono de crecimiento para la formación de dendritas nuevas.** En el esquema se muestra la organización de los microfibrillos de actina y de los microtúbulos en las diferentes zonas del cono de crecimiento. C: central, T: transición, P: periférico. Fuente: Lowery *et al.*, 2009.

La proteína MAP2 pertenece a la familia de las proteínas que se asocian a los microtúbulos y es crítica para la estabilización de la dirección del crecimiento de las dendritas, así como para el mantenimiento de las dinámicas de los microtúbulos para la ramificación de las dendritas. Las isoformas de esta proteína como la MAP2c están presentes en el inicio de la extensión y la maduración dendrítica, así como en las regiones de remodelación sináptica activa (Kaufmann *et al.*, 2000). Mientras que las MAP2 a y b (de alto peso molecular) participan activamente en la expansión y maduración dendrítica, ya que estas proteínas en su estado fosforilado aumentan la extensión distal de las dendritas debido a la selectividad de asociación con los microfilamentos de actina (Fig. 20). Sin embargo, en el periodo de maduración se reduce la fosforilación de todas las isoformas de MAP2 para la estabilización de los microtúbulos y el inicio de la sinaptogénesis (Fig. 20) (Kaufmann *et al.*, 2000).

**Figura 20. Participación de la proteína MAP2 en la dendritogénesis.** En el esquema se muestra la interacción de la proteína MAP2 fosforilada con los microfilamentos de actina para inducir la formación de filipodios y lamelipodios del cono de crecimiento. También se muestra como la proteína MAP2 en estado desfosforilado estabiliza los microtúbulos en las dendritas. *Modificado de: Sánchez et al., 2000.*



Asimismo, las proteínas GTPasas de la familia Rho también participan en la dinámica de organización de los microtúbulos. El papel dual de la proteína RhoA en la estabilización y desestabilización de los microtúbulos se ha demostrado, así como la participación de la proteína Rac1 para el crecimiento de los microtúbulos, y de la proteína Cdc42 en la reorientación del centrosoma durante la migración (Da Silva y Dotti, 2002). Por otro lado, las proteínas asociadas a estos microtúbulos también participan al tapar el extremo de crecimiento para permitir el alargamiento, mientras que el estado fosforilado de estas proteínas provoca la inestabilidad de la dendrita e induce la ramificación de la misma (Audesirk *et al.*, 1997). También el transporte de microtúbulos polimerizados desde el soma a las dendritas es esencial para este proceso (Sharp *et al.*, 1997).

Además, se ha observado que la actividad sináptica de las dendritas se traduce en la síntesis de diversas proteínas *in situ*, las cuales son necesarias para producir cambios en la estructura de las dendritas, y por lo tanto en la plasticidad sináptica. Esta síntesis de proteínas se refleja en la expresión de genes inmediatos tempranos que activan la producción de la proteína Arc (una proteína que se asocia al citoesqueleto y está regulada por la actividad sináptica) y de otras proteínas cinasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina que son importantes para la plasticidad sináptica (Wayman *et al.*, 2008). Otra proteína importante en la ramificación de las dendritas es la proteína plaquina, la cual ancla las redes de los componentes de microfilamentos y de microtúbulos uno con otro o a estructuras celulares como en las uniones adhesivas de los vertebrados e invertebrados, y se ha observado que mutantes del gen kakapo que codifica para esta proteína promueve defectos en la estabilización dendrítica (Yuh-Nung *et al.*, 2001).

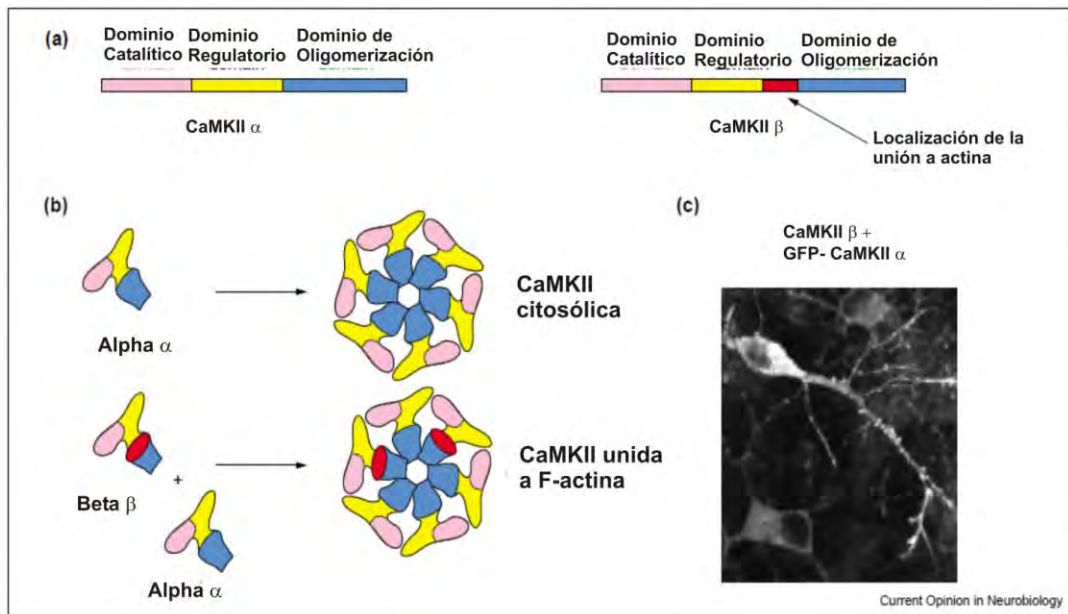
### **3.0.1.1 CAM-CINASA II.**

La dendritogénesis es dependiente de las señales intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . En las neuronas los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular son regulados por el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales y de los reservorios intracelulares de este catión. Una vez que el  $\text{Ca}^{2+}$  entra a la células, éste se une a moléculas como la calmodulina (CaM), la cual puede unir múltiples iones de  $\text{Ca}^{2+}$  para activar varios efectores intracelulares como las cinasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina (Wayman *et al.*, 2008). La CaM-cinasa I y IV se han relacionado con la motilidad del cono de crecimiento y con el desarrollo dendrítico, respectivamente (Wayman *et al.*, 2004, 2008). En tanto que la CaM-Cinasa II es la enzima más estudiada por participar en la formación de neuritas y en la dendritogénesis, que son estimulados en los procesos de neuroprotección.

La CaM-Cinasa II es una cinasa multifuncional que se activa por la unión del complejo calcio-calmodulina ( $\text{Ca}^{2+}$ /CaM), ya que la CaM es el principal aceptor de calcio en las células. Esta enzima está compuesta por subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  con 2 anillos hexaméricos que se apilan uno sobre otro formando un dodecamero heteromérico y/o homomérico, además posee un dominio de asociación con una única subunidad C-terminal. Su principal función es transferir grupos fosfato de un compuesto donador como el ATP a los residuos de serina y de treonina de una proteína aceptora, tales como proteínas de receptores y canales, proteínas de andamio, el citoesqueleto y proteínas asociadas a éste, proteínas motoras, algunas enzimas y proteínas que participan en la liberación de neurotransmisores (Fink y Meyer, 2002; Colbran y Brown, 2004; Wayman *et al.*, 2008). En el cerebro, esta enzima constituye entre el 1 y 2% de la proteína total, y se localiza en las densidades postsinápticas (Fink y Meyer, 2002) del hipocampo, entre otros

(Lengyel *et al.*, 2000). Además, esta enzima interactúa con el citoesqueleto y las proteínas asociadas a éste (Hely *et al.*, 2001).

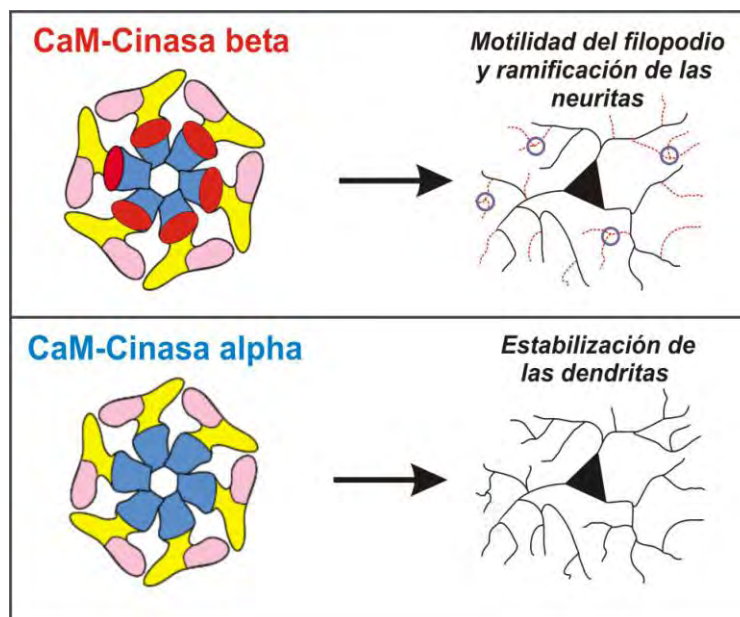
En cultivos de neuronas de mamíferos, se ha demostrado que existe una distribución selectiva de la CaM-Cinasa II (Petersen *et al.*, 2003). La isoforma beta ( $\beta$ ) de la CaM-cinasa II se asocia parcialmente con la actina en las densidades postsinápticas, en tanto que la isoforma alfa ( $\alpha$ ) se localiza en el citoplasma y no interactúa con las proteínas de la postsinápsis (Fig. 21) (Lisman *et al.*, 2002; Fink y Meyer, 2002; Fink *et al.*, 2003). En ausencia del complejo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , las isoformas  $\alpha$ - y  $\beta$ - de la CaM-Cinasa II pierden su actividad y se distribuyen en el citoplasma (Lisman *et al.*, 2002; Fink y Meyer, 2002). Sin embargo, cuando ambas se activan por  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  se trasladan hacia la terminal postsináptica en el término de segundos (Shen y Meyer, 1999; Fink *et al.*, 2003). Lo anterior implica que este transporte de CaMKII hacia la densidad postsináptica requiere concentraciones elevadas de  $\text{Ca}^{2+}$  y activación sináptica de receptores NMDA, lo cual sucede en la potenciación a largo plazo (LTP) (Shen y Meyer, 1999; Meyer y Shen, 2000). Esto indica que ambas isoformas están involucradas con la arquitectura dendrítica y la plasticidad sináptica para participar en procesos de memoria y aprendizaje (Giese *et al.*, 1998; Schulman *et al.*, 1999).



**Figura 21. Estructura y distribución topológica de la CaM-Cinasa II.** En el panel A se muestra una representación esquemática de las isoformas alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ) de la CaM-Cinasa II, mientras que en el panel B se muestra la formación de la CaM-Cinasa II en homómeros y heterómeros de sus subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , así como su distribución topológica en células de hipocampo de rata (panel C). Fuente: Fink y Meyer, 2002.

La distribución topográfica de la CaM-Cinasa II está regulada por la unión de la  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM y está involucrada en la formación de las sinápsis y de las espinas dendríticas, así como en el mantenimiento de las conexiones neuronales (Pratt *et al.*, 2003). En cultivos organotípicos de hipocampo, las CaM-Cinasa II induce tanto la formación de las espinas dendríticas como el crecimiento de filopodios (Jourdain *et al.*, 2003). Las isoformas de la CaM-Cinasa II tienen funciones diferenciales en la formación de nuevas neuritas. En cultivos neuronales de hipocampo, la  $\beta$ -CaM-Cinasa II promueve la motilidad de filopodios y la ramificación de neuritas para incrementar la arborización; mientras que, la  $\alpha$ -CaM-Cinasa II se expresa en estadios posteriores para el desarrollo neuronal y la estabilización de la estructura del árbol dendrítico (Fig. 22) (Wu *et al.*, 1998). En modelos animales también se han encontrado altos niveles de CaM-cinasa II en las dendritas de la región CA1 y en el giro dentado del hipocampo (Steward *et al.*, 2003; Havik *et al.*, 2003).

La síntesis local de la CaM-Cinasa II es crucial para la expansión y orientación de los conos de crecimiento que se lleva a cabo durante la dendritogénesis. En el cerebro de rata, los ARNm de las isoformas  $\alpha$ - y  $\beta$ - de la CaM-Cinasa II se distribuyen de forma diferencial. La isoforma  $\alpha$  se encuentra en dendritas y soma de neuronas piramidales y células granulares, mientras que la isoforma  $\beta$  solo está presente en el soma. La distribución del ARN mensajero de la isoforma  $\alpha$  en la postsinápsis indica que la cinasa es sintetizada en este compartimiento celular y que interviene en el mantenimiento y plasticidad de las estructuras postsinápticas (Walaas *et al.*, 1988; Burgin *et al.*, 1990). Sin embargo, la isoforma  $\beta$  podría ser capaz de iniciar la polimerización de actina debido a su interacción directa con ésta (Harms y Dunaevsky, 2007).



**Figura 22. Funciones de las isoformas de la CaM-Cinasa II.** En el panel superior se muestra la función de la isoformas beta ( $\beta$ ) sobre la motilidad de los filopodios (línea roja y punteada) y ramificación de las neuritas (círculos azules). Mientras que en el panel inferior se muestra la estabilización de las dendritas por acción de la isoforma alfa ( $\alpha$ ).



### **3.0.1.1.1. LOS SUSTRATOS DE LA CaM-CINASA II: PROTEÍNAS QUE SE ASOCIAN A LOS MICROTÚBULOS Y QUE ESTABILIZAN EL ÁRBOL DENDRÍTICO.**

La inducción de actividad sináptica produce el incremento de la polimerización de actina y de la CaM-Cinasa II en las espinas dendríticas. Esto permite inferir que la actina inicia los cambios de las dendritas y las espinas dendríticas, mientras que la CaM-Cinasa II estabiliza estos cambios morfológicos de la célula. La despolarización en neuronas del hipocampo de rata también se ha descrito como un factor que estimula la acumulación del gránulos de ARN mensajero de la CaM-Cinasa II para su traslado y posterior traducción en los procesos dendríticos, como respuesta a la actividad eléctrica neuronal (Rook *et al.*, 2000; Havik *et al.*, 2003). En las neuronas simpáticas, la despolarización inducida por cloruro de potasio (KCl) causa un incremento en la formación de dendritas estimuladas con el NGF. La utilización de inhibidores específicos de la CaM-Cinasa II previene la fosforilación de la MAP2a y causa la retracción de las dendritas (Vaillant *et al.*, 2002). Estos resultados sugieren que la fosforilación de la MAP2a por acción de CaM-Cinasa II promueve el alargamiento de los microtúbulos (Hely *et al.*, 2001) y la estabilización del árbol dendrítico (Wu *et al.* 1998).

Otra proteína que se asocia a los microtúbulos, que es sustrato de la CaM cinasa II y que interviene en la formación de las conexiones sinápticas, es la proteína STOP (stable tubule only polypeptide, por sus siglas en inglés) (Job *et al.*, 1981). En cerebros adultos se encuentra la variante N-STOP (Guillaud *et al.*, 1998; Bosc *et al.*, 1996). La proteína N-STOP es fosforilada *in vitro* e *in vivo* por la CaM-cinasa II en 2 sitios independientes (Ser 198 y Ser 491). Una vez fosforilada se disocia de los microtúbulos para unirse a la actina y se une a la sinapsina y a la proteína homer, que se encuentran en las sinapsis maduras (Baratier *et al.*, 2006) En ratones “*knockout*” para la proteína N-STOP (-/-) se producen deficiencias en el hipocampo que afectan la plasticidad sináptica a corto y largo plazo (Andrieux *et al.*, 2002). También se ha encontrado un incremento en las espinas dendríticas asociado con el aumento de la fosforilación de STOP mediada por glutamato lo que sugiere que la CaM-Cinasa II se activa y fosforila a la STOP. Esta evidencia sugiere que la STOP podría participar en procesos de neuritogénesis a través de la formación de conos de crecimiento como un integrador de las terminales nerviosas (Baratier *et al.*, 2006).

## VI. JUSTIFICACIÓN

Las demencias son padecimientos progresivos y neurodegenerativos, que se caracterizan por la pérdida de la memoria y de la cognición. Su prevalencia crece de forma exponencial con la edad (Williams, 2006; Manubens *et al.*, 1995) y afecta alrededor de 12 millones de personas en todo el mundo. Aproximadamente 4.5 millones de éstos en América, de los cuales se predice que aumentarán al triple para el año 2050 (Hebert *et al.*, 2000; Citron, 2004) por el incremento del 77% en la expectativa de vida para las personas mayores de 60 años (Banco Mundial, 1993). En Latinoamérica, las tasas de prevalencia oscilan entre 3 y 6% (Ketzoian *et al.*, 1997). Para la población mexicana, algunos reportes clínicos indican la presencia de 500 a 700 mil personas con demencia (de forma imprecisa), de las cuales el 25% quizá no han sido diagnosticadas (Navarrete *et al.*, 2003). En la Ciudad de México, la prevalencia de las demencias es de 4.7% (Gutiérrez *et al.*, 2001); mientras que, la prevalencia de la enfermedad de Alzheimer está alrededor del 5% entre las personas mayores de 60 años (Lozano y Amaro, 1998).

Las deficiencias cognoscitivas y de la memoria observadas en las demencias se han relacionado con la disminución del volumen cerebral (Jelliger K.A., in: Calne *et al.*, 1993) causadas por alteraciones del citoesqueleto (Kowall y Kosik, 1987). Estas alteraciones ocasionan que las neuronas se colapsen por la despolimerización de los componentes del citoesqueleto hasta producir la pérdida neuronal y la disminución de las conexiones sinápticas (Kowall y Kosik, 1987) en regiones del hipocampo y de la corteza cerebral (Giannakopoulos, *et al.* 1998). Un tratamiento potencial en las demencias es el uso de melatonina, la principal hormona producida por la glándula pineal (Reiter *et al.*, 1993), por su capacidad antioxidante (Tan *et al.*, 2002; Reiter, 2000) y sus efectos moduladores sobre el citoesqueleto (Benítez-King *et al.*, 2004). Esta estructura celular tiene un papel clave en los procesos de axogénesis y dendritogénesis, ya que es una estructura de soporte mecánico conformada por microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios (Alberts *et al.*, 2007; Benítez-King *et al.*, 2004). En las dendritas, estos componentes del citoesqueleto participan en la formación de conos de crecimiento para la formación de dendritas, espinas dendríticas y sinapsis nuevas (Stuart *et al.*, 2008; Squire *et al.*, 2008). En particular, la melatonina estimula la neuritogénesis (Bellon *et al.*, 2007), la actividad de la PKC (Soto-Vega *et al.*, 2004) y la CaM-Cinasa II en las células en cultivo N1E-115 (datos no publicados). Esta enzima tiene un papel clave en la formación de nuevas dendritas y por lo tanto en procesos de plasticidad sináptica, de memoria y aprendizaje a través de la fosforilación de las proteínas STOP y MAP2a, las cuales estabilizan a los microtúbulos y a los microfilamentos para la formación de las dendritas y sus espinas, así como para el establecimiento de las conexiones sinápticas (Wu *et al.*, 1998; Hely *et al.*, 2001; Baratier *et al.*, 2006).

## **VII. HIPÓTESIS**

La melatonina activa a la CaM-Cinasa II, la cual estimulará la formación de conos de crecimiento y la generación de nuevas dendritas en rebanadas de hipocampo de rata mantenidas en cultivo.

## **VIII. OBJETIVOS GENERAL**

Estudiar los efectos de la melatonina sobre la participación de la CaM-Cinasa II en el proceso de dendritogénesis de las neuronas hilares en cultivos organotípicos de hipocampo.

## **IX. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Caracterizar los efectos de la melatonina sobre el citoesqueleto en cultivos organotípicos de hipocampo de rata.
2. Caracterizar y evaluar el efecto de la melatonina sobre la dendritogénesis de las neuronas hilares en cultivos organotípicos de hipocampo de rata.
3. Determinar la participación de la CaM-Cinasa II inducida por melatonina en la dendritogénesis de neuronas hilares en cultivos organotípicos de hipocampo de rata.
4. Identificar el mecanismo de transducción a través del cual la melatonina activa a la CaM-Cinasa II y la cinasa de Rho para contribuir en la dendritogénesis de las neuronas hilares en cultivos organotípicos de hipocampo de rata.

## X. METODOLOGÍA

### A. *Obtención de rebanadas de hipocampo*

En el presente estudio, se emplearon ratas machos Wistar con un peso de 220-250g (adultos jóvenes, 52 a 56 días de edad). Los animales fueron pesados y sacrificados por decapitación para la extracción del cerebro. Estos se sumergieron en una solución fría de fluido cerebroespinal artificial (aCSF, por sus siglas en inglés) con 5% de bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y 95% oxígeno por un periodo de 15 min para conservar el tejido vivo. Esta solución está compuesta por: 124 mM NaCl, 5 mM KCl, 3.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM Glucosa, 0.09 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y agua milliQ, a un pH 7.4 (Pichugin *et al.*, 2006). Aún sumergidos en esta solución, los cerebros se cortaron en secciones coronales de 400 µm, desde el bregma -2.3 mm hasta el -6.00 mm, con el micrótopo de cuchilla vibrante (Microm International; Thermo Scientific, Waltham, MA) contemplando las siguientes especificaciones: 15-17 mm/s de velocidad, 55 Hz de frecuencia, 1.2 mm amplitud y en modalidad de corte continuo.

### B. *Cultivo organotípico de hipocampo*

Las rebanadas de hipocampo se inmovilizaron en insertos de membrana (0.4 µm de poro y 30 mm de diámetro; Millipore®, Billerica, MA) con una densidad de 4-6 secciones por membrana y se cultivaron con medio Neurobasal (Gibco Invitrogen™, Carlsbad, California) suplementado con 2% de B27 (Gibco Invitrogen™), 1% de L-glutamina (Gibco Invitrogen™) y 1% de antibiótico (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO) a 37°C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> de acuerdo al método descrito (Pichugin *et al.*, 2006; De Simoni *et al.*, 2006; Gogolla *et al.*, 2006). Al término de una semana, las rebanadas de hipocampo se emplearon para los experimentos.

### C. *Caracterización del citoesqueleto en cultivos organotípicos*

Para caracterizar el citoesqueleto en los cultivos organotípicos de hipocampo se realizó la detección de proteínas específicas del citoesqueleto mediante las técnicas de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica. Las rebanadas de hipocampo 400 µm se lavaron con buffer de citoesqueleto (BC) pH 6.1 (3 veces, cada 10 min), se fijaron con paraformaldehído al 4% en BC por 1 día a 4°C. Posteriormente, las rebanadas se conservaron en una solución de sacarosa al 30 % por 1-3 días para restablecer la estructura del hipocampo antes de la tinción. Las rebanadas de 400 µm o los cortes finos de 50 µm obtenidos de éstas se lavaron con buffer salino de fosfatos 1X (PBS 1X, el cual se compone de: 138 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 10.14 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 1.76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) y se

permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.4% por 90 min para después desenmascarar epítopes con HCl 2N por 20 min a 37°C. Se bloquearon toda la noche con una solución de suero de bovino fetal al 10% (Gibco Invitrogen™), suero albúmina de bovino al 2% (Sigma-Aldrich®) y tritón X-100 al 0.2%. Después se incubaron por 1 día a 4°C con anticuerpos primarios específicos contra las proteínas: neurofilamina (7.5 µg/ml, Zymed Invitrogen™), y GFAP (1:200, Dako, Glostrup, Denmark) (Ramírez-Rodríguez et al., 2003; Gogolla *et al.*, 2006). El anticuerpo secundario empleado fue Alexa Fluor® 568 (3 µg/ml, Molecular Probes Invitrogen™ Carlsbad, California). Asimismo, la co-tinción de los núcleos se realizó por medio de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Las imágenes se adquirieron en serie en z con pasos de 2 µm a través de una cámara digital acoplada a un microscopio de epifluorescencia (Nikon Instruments, Melville, NY), y se procesaron con los programas de análisis de imágenes de deconvolución de Image Pro-Plus y de NIS-Elements AR 3.0.

En otros experimentos, las rebanadas de hipocampo se lavaron con una solución amortiguadora de Tris 1X (TBS 1X que se prepara a partir del TBS 10X, el cual se compone de: 20 mM Tris base y 500 mM NaCl), y se fijaron con paraformaldehído al 4% en TBS 1X (pH 7.4) por 1 día. Posteriormente, se transfirieron a una solución de sacarosa al 30 % por 1-3 días para protegerlas del congelamiento y se congelaron a -70°C por 30 min. Después de este tiempo, se transfirieron al criostato a -20°C por 1 hora para obtener secciones con un grosor de 50 µm en el micrótopo criostato (Microm International). Las secciones finas se dejaron secar al aire unos minutos, se lavaron con TBS 1X y permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.25% con peróxido de hidrógeno al 0.6% (para la eliminación de peroxidasas endógenas, Sigma-Aldrich®) en TBS 1X por 30 min. Después se bloquearon con una solución de TBS-plus (1% de suero de burro (Gibco Invitrogen™), Tritón X-100 al 0.1% y TBS 1X y se incubaron por toda la noche o 1 día a 17°C con los siguientes anticuerpos primarios: anti-tubulina βIII neuronal (3µg/ml, Cell Signaling, Danvers, MA), doblecortina (DCX, 1:250;), anti-GFAP (1:200, marcadores de glia; Dako) y anti-MAP2 (1:200, marcador de dendritas; Sigma-Aldrich®). Al finalizar, se lavaron con TBS 1X y TBS-plus para agregar los anticuerpos secundarios biotinilados correspondientes (1:250, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA). Posteriormente, se incubaron por una hora con una solución del Vectastain® Elite Estándar ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) que contiene avidina DH y HRP H para formar el complejo necesario en las tinciones de inmunoperoxidasas; y por último, se revelaron con diaminobenzidina/niquel (Kit DAB/Ni, Vector Laboratories) para obtener una coloración negra o café oscuro (modificado de Prieto-Gómez, 2008). Las imágenes se adquirieron con una cámara digital acopladas a un microscopio óptico (Nikon Instruments), y se procesaron con los programas de análisis de imágenes de deconvolución y de reconstrucción tridimensional de Image Pro-Plus y de NIS-Elements AR 3.0.

#### *D. Efectos de la melatonina sobre la dendritogénesis en cultivos organotípicos*

Para estudiar los efectos de la melatonina sobre la dendritogénesis en los cultivos organotípicos de hipocampo, se realizó un curso temporal incubando las rebanadas (n=5) con vehículo (VEH) o con  $10^{-7}$ M de MEL (Sigma-Aldrich®) por 3, 6, 9 y 12 hrs. También se elaboró una curva dosis-respuesta incubando por 6h con VEH o con  $10^{-11}$ M,  $10^{-9}$ M,  $10^{-7}$ M y  $10^{-5}$ M de MEL. Después las rebanadas se fijaron y crioprotegieron para realizar las secciones finas y procesarlas por inmunohistoquímica como se describió anteriormente.

#### *E. Vía de señalización implicada en la dendritogénesis inducida por la melatonina*

La vía de señalización implicada en la dendritogénesis inducida por la melatonina se estudió en los cultivos organotípicos de hipocampo empleando un antagonista y un agonista de los receptores a melatonina, así como inhibidores de las proteínas PKC, CaM-Cinasa II y ROCK. Para determinar si el mecanismo de transducción depende de la activación de receptores a melatonina se empleó un agonista (8-metoxi-2-propionamidotetralina, 8M-PDOT; Tocris Bioscience, Ellisville, Missouri) y un antagonista (luzindol; Sigma-Aldrich®) para estos receptores. Las rebanadas de hipocampo se incubaron por 6 h con el VEH, con  $10^{-7}$ M de MEL ó con 10 nM de 8M-PDOT (8M); ó se pre-incubaron por 15 min con 100  $\mu$ M luzindol (LZD), seguido de una incubación con el VEH, con  $10^{-7}$ M de MEL y con el 8M-PDOT por 6 h.

Asimismo, para determinar la participación de las proteínas PKC, y sus proteínas río abajo como la CaM-Cinasa II y ROCK, en el mecanismo de acción de la melatonina, se emplearon inhibidores específicos para cada proteína como la bisindolilmaleimida (Sigma-Aldrich®), el KN-62 (Calbiochem® EMD Chemicals, Gibbstown, NJ) y el Y-27631 (Sigma-Aldrich®), respectivamente. Las rebanadas de hipocampo también se pre-incubaron por 15 min con 5  $\mu$ M bisindolilmaleimida (BIS), o con 10  $\mu$ M KN-62, o 10  $\mu$ M de Y-27631 (Y-27), seguido de una incubación con el VEH, con  $10^{-7}$ M de MEL ó con el 8M-PDOT por 6 h. Después las rebanadas se fijarán y crioprotegerán para realizar las secciones finas y procesarlas por inmunohistoquímica como se describió anteriormente.

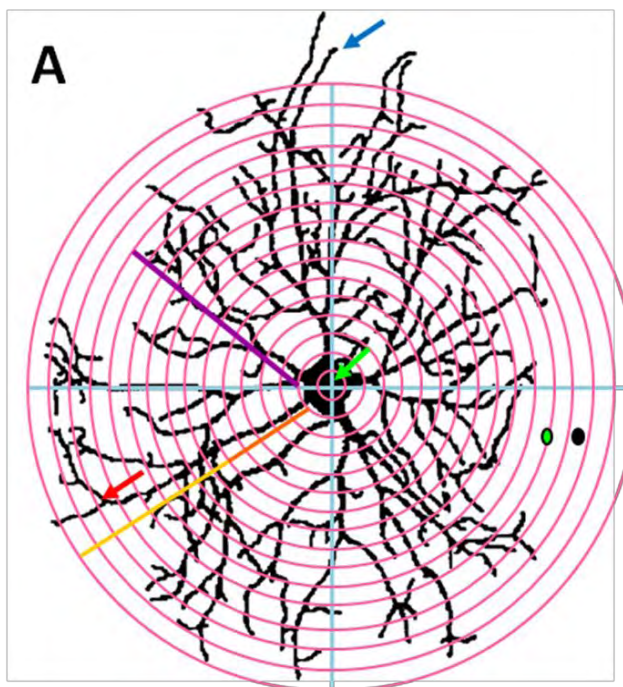
#### *F. Evaluación de la dendritogénesis por el método de Sholl modificado.*

En cada uno de los tratamientos mencionados anteriormente se estudió la dendritogénesis de las neuronas de la región hilar del hipocampo. Las rebanadas de hipocampo de 400  $\mu$ m se cortaron a un grosor de 50  $\mu$ m para procesarlas por inmunohistoquímica como se mencionó anteriormente. Las dendritas se identificaron tiñéndolas con un anticuerpo anti-MAP2a que es un marcador específico de dendritas y de neuronas maduras. Para el análisis de los resultados se utilizó microscopia óptica y una

cámara Nikon (Nikon Instruments); las imágenes adquiridas con un aumento de 200x se analizaron con el programa NIS-Elements AR 3.0. La dendritogénesis se evaluó en una muestra total de 20 neuronas por grupo y por cuadruplicado mediante el método de Sholl modificado, el cual permitirá contar los siguientes parámetros: el número, longitud y grosor de dendritas primarias, así como número y longitud de dendritas secundarias, así como el número de ramificaciones (nodos) y terminaciones dendríticas y la longitud total de las dendritas para dilucidar la complejidad dendrítica.

**Figura 23A. Esquema del método de Sholl modificado en una neurona multipolar.**

Este método consiste en: 1) la construcción de círculos concéntricos (color rosa) y equidistantes (tamaño del paso = 5  $\mu\text{m}$ , círculo negro), alrededor del soma neuronal (flecha verde) con la ayuda de líneas guía (líneas azules), 2) conteo del número de intersecciones (círculo verde) de las dendritas para evaluar la longitud de las dendritas primarias (línea naranja), secundarias (línea amarilla), y terciarias (línea morada) 3) definición de los parámetros a medir: número de dendritas, ramificaciones (flecha roja) y terminaciones dendríticas (flecha azul) para obtener la complejidad dendrítica.



La evaluación de la dendritogénesis se realizó tomando en cuenta los siguientes parámetros: 1) máscara de círculos concéntricos: la distancia entre cada círculo fue de 5  $\mu\text{m}$ , 2) localización: las neuronas seleccionadas se encontraron en el área de la capa polimórfica o hilus del giro dentado con un diámetro del soma de 10  $\mu\text{m}$ , 3) número de neuronas: la n por cada repetición por tratamiento fue de 5 neuronas de diferentes morfología y zonas dentro del hilus, 4) objetivos: la localización de las neuronas se realizó con el objetivo 20x con el zoom mínimo de 50%, mientras que el conteo de los parámetros dendríticos se realizó con un intervalo de zoom entre 200% y 300%, 5) tamaño de las dendritas: todas las dendritas primarias tenían que contar con una longitud mínima de 5  $\mu\text{m}$  para no confundirlas con espinas dendríticas, 6) longitud de las dendritas: se contó por el número de intersecciones, si una dendrita sobrepasaba la mitad de cada paso entre intersección e intersección se tomaba como la siguiente intersección, y si no alcanzaba la mitad se tomaba como la intersección anterior, 7) longitud de las dendritas secundarias:

se obtuvo por la diferencia entre la longitud total de la dendrita y la dendrita primaria, 8) grosor de las dendritas: se obtuvo por un promedio del grosor de las zonas proximal, media y distal de la dendrita primaria, y 9) longitud total de la dendrita: se midió de la dendrita más larga de cada neurona para obtener 20 datos.

#### *G. Análisis estadístico de los resultados*

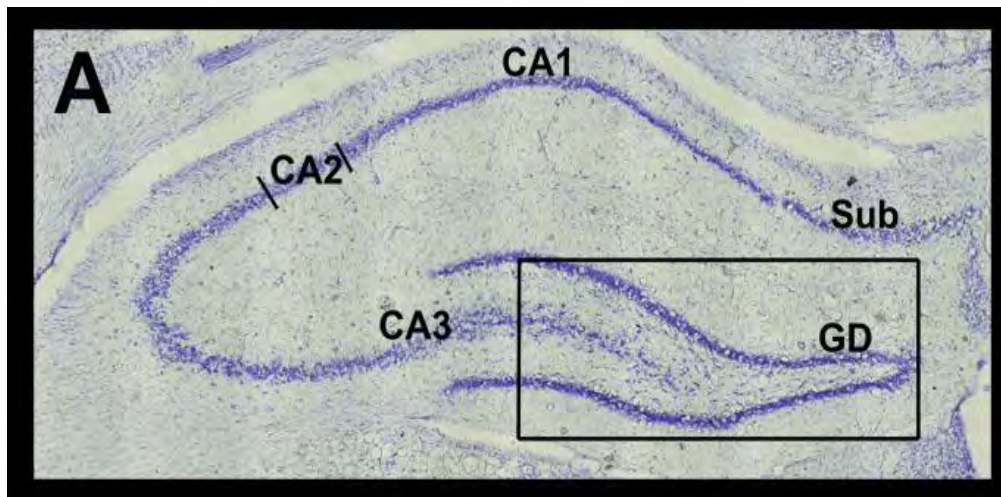
El análisis estadístico de los datos se realizó con el paquete estadístico Sigma Stat 3.1 (San Jose, CA) y se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal- Wallis ANOVA on Ranks seguido por una prueba post-hoc Student-Newman-Kelvs, ambos con una  $p < 0.05$ .



## XI. RESULTADOS

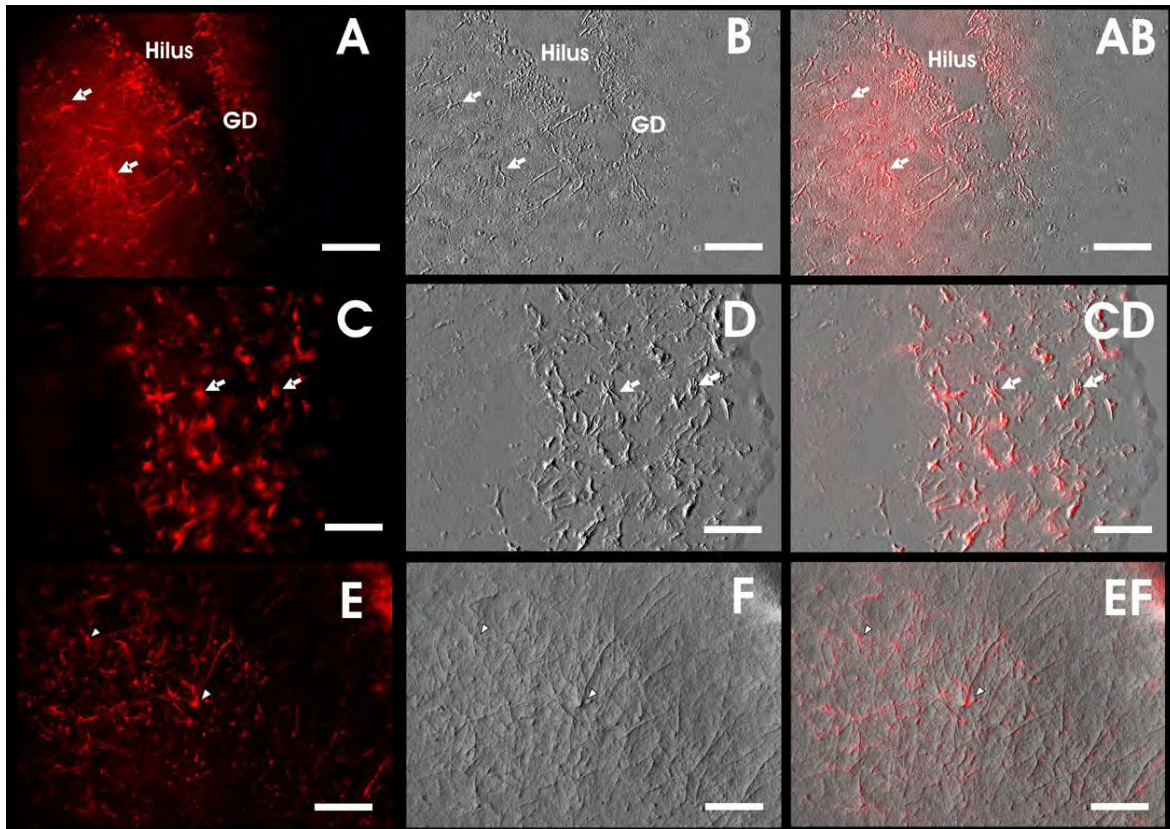
### A. CARACTERIZACIÓN DEL CITOESQUELETO EN CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE HIPOCAMPO DE RATA.

El hipocampo se caracterizó con criterios anatómico-estructurales con la técnica de Nissl en un corte coronal de hipocampo de 50  $\mu\text{m}$ , la cual proporcionó una panorámica general de la arquitectura bien definida y organizada de las regiones citoarquitectónicas del hipocampo, tales como el giro dentado (GD), el hipocampo formado por la región CA3, CA2 y CA1 y el subiculum (Figura 24A). Asimismo, esta tinción de Nissl muestra la capa granular del giro dentado en forma de C, y la extensión de la lámina formada por células piramidales de las regiones del *cornus ammonis* 3, 2 y 1, y el subiculum (Figura 24A).



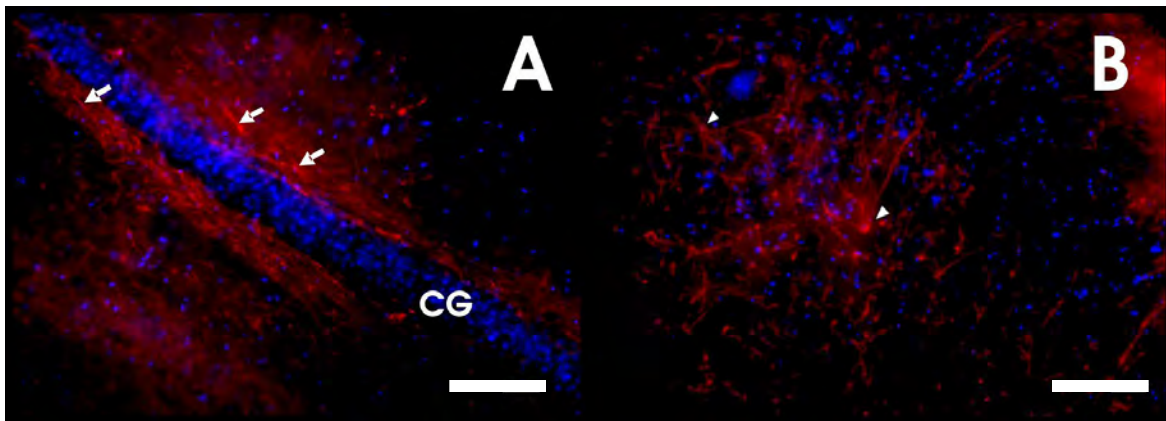
**Figura 24. Regiones principales del hipocampo en los cultivos organotípicos de rata.** Un corte coronal de hipocampo con un grosor de 50  $\mu\text{m}$  fue teñido por la técnica de Nissl. La micrografía adquirida en el panel **A** tiene un aumento de 200x. Este corte muestra los núcleos de las neuronas (puntos morados) que forman las capas celulares del hipocampo, y se distribuyen en diferentes regiones, tales como el giro dentado (GD), la región CA3, CA2 y CA1, y el subiculum.

Para determinar las poblaciones celulares en estos cultivos organotípicos se emplearon anticuerpos anti-GFAP que reconoce los astrocitos maduros, y anti-NF M+H que reconoce los filamentos intermedios específicos de neuronas. En la figura 25 se muestran las rebanadas de hipocampo con un grosor de 400  $\mu\text{m}$ , en las cuales se observaron células de morfología estrellada con una tinción positiva para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en el giro dentado y regiones aledañas a éste (panel A, B y AB), así como en el subiculum (panel C, D, y CD).



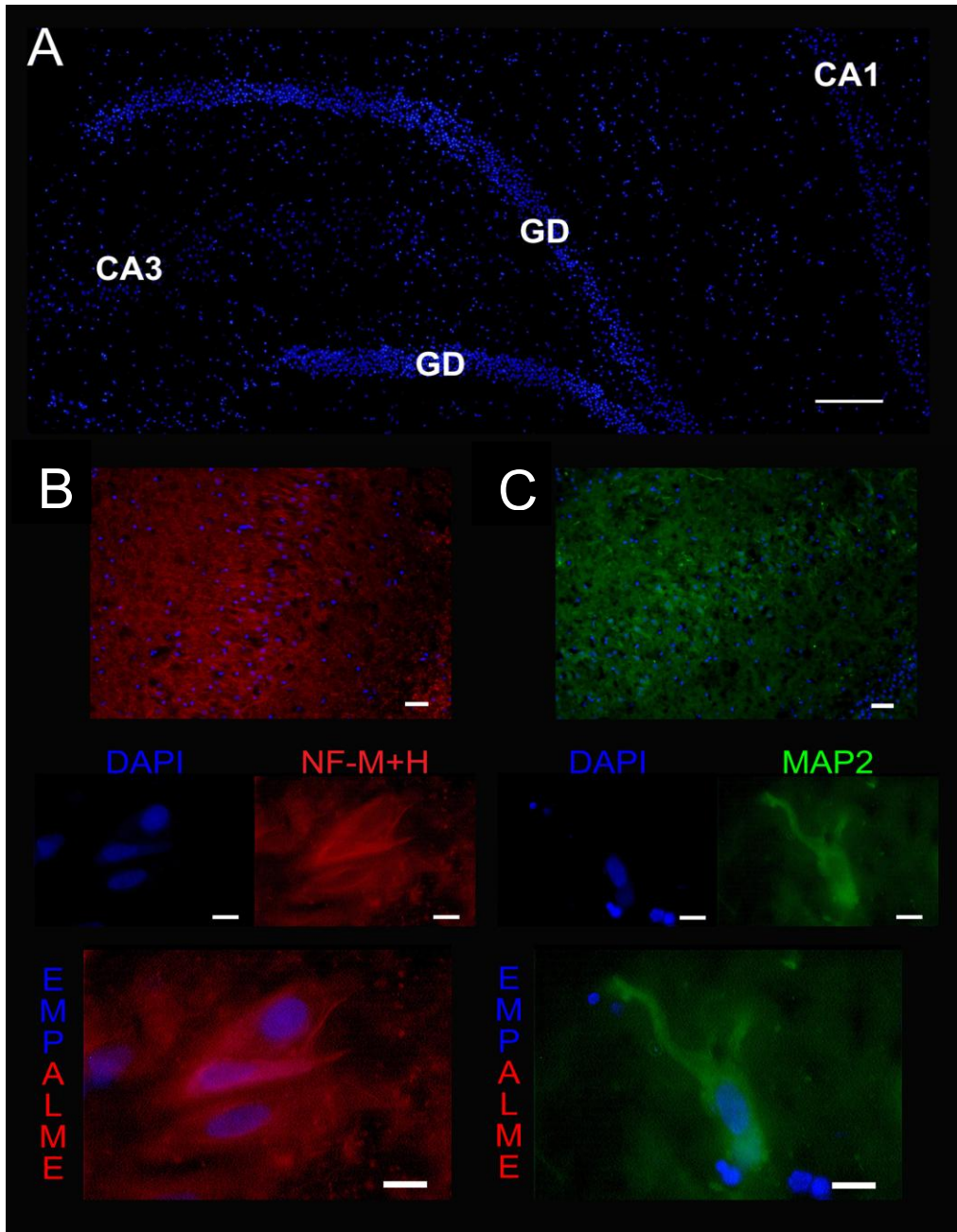
**Figura 25. Presencia de astrocitos y neurofilamentos en cultivos organotípicos de hipocampo de rata.** Las rebanadas de hipocampo (400  $\mu\text{m}$ ) se incubaron por una semana en insertos de membrana con medio neurobasal, y posteriormente, éstas fueron teñidas para los anticuerpos anti-proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y anti-neurofilaminas M y H, ambos se muestran en color rojo. En el panel **A** y **C** se muestran astrocitos maduros (flechas blancas) en el giro dentado y subiculum, y en el panel **E** se muestran interneuronas del subiculum (puntas de flecha). Mientras que en el panel **B**, **D** y **F** se observa el relieve de los trazos de la superficie generadas por el negativo de la imagen. Por último, se muestra el empalme de ambas imágenes en **AB**, **CD** y **EF**, barra= 100  $\mu\text{m}$ .

Asimismo, para demostrar la integridad estructural de los cultivos organotípicos de hipocampo se empleó el anticuerpo anti-NF M+H para observar la proyecciones neuronales como las dendritas y los axones. En la figura 25 (panel E, F y EF) y 26 B se observa la tinción positiva a neurofilaminas que se distribuyen en el soma y en los procesos que se extienden alrededor de las interneuronas, los cuales forman una red de conexiones neuronales en el *stratum lucidum* y *radiatum* del subiculum. En la figura 26 A también se muestra la tinción positiva a neurofilaminas en posibles axones que corren en paralelo a la capa granular del GD. Aunque en regiones de CA1, CA2 y CA3 del hipocampo se observó tinción positiva no se muestran las imágenes debido a que el fondo es demasiado evidente y no permitía la adquisición ni procesamiento de las imágenes.



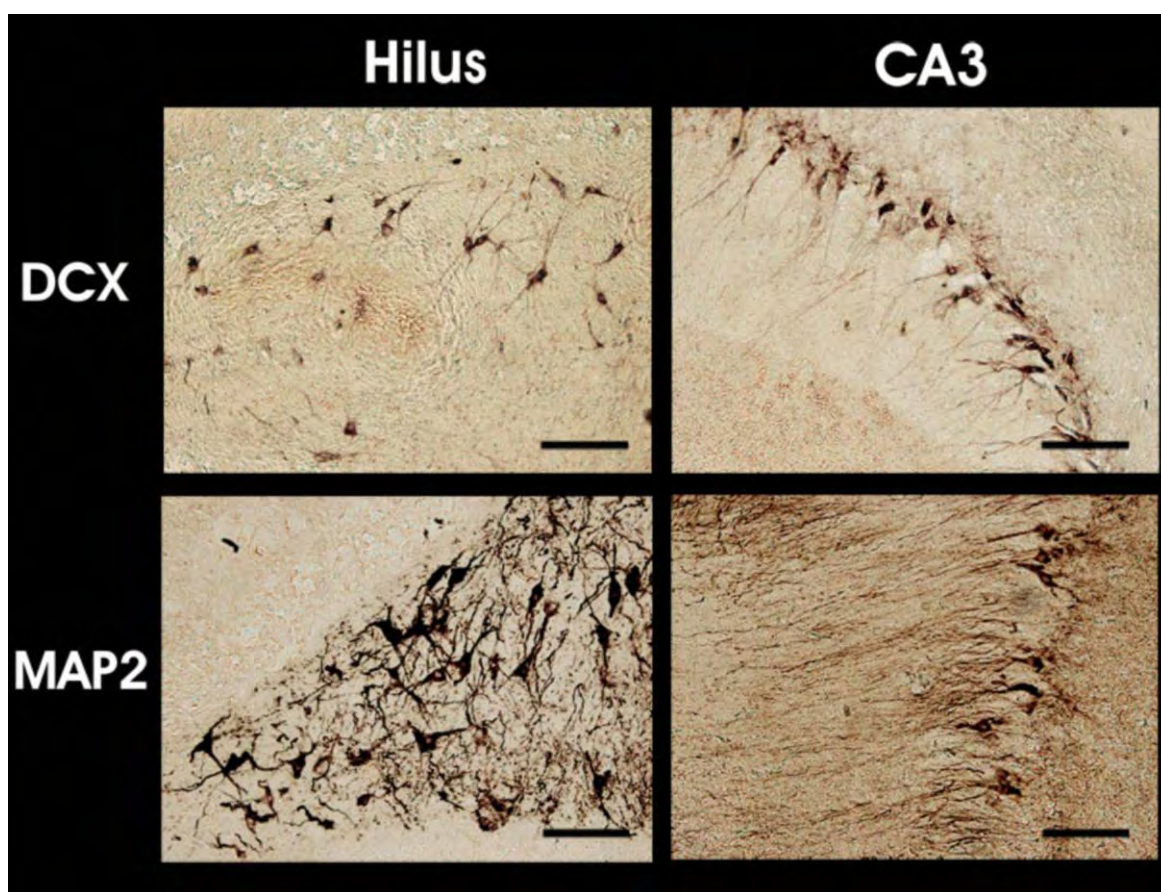
**Figura 26. Organización de neurofilamentos M+H en cultivos organotípicos de hipocampo de rata.** Las rebanadas de hipocampo (400  $\mu\text{m}$ ) se incubaron por una semana en insertos de membrana con medio neurobasal, y posteriormente, éstas fueron cortadas en secciones de 50  $\mu\text{m}$  y teñidas para el anticuerpo anti-neurofilaminas M y H (rojo) y DAPI (azul). En el panel **A** se muestran los neurofilamentos (flechas blancas) que corren de forma paralela la capa granular del giro dentado, y en el panel **B** se muestran interneuronas del subiculum (puntas de flecha), barra= 100  $\mu\text{m}$ .

Para caracterizar el citoesqueleto y las dendritas en los cultivos organotípicos de hipocampo se realizaron tinciones por inmunofluorescencia. En el panel A de la figura 27 se muestra una tinción positiva a DAPI que revela en color azul los núcleos de las diferentes neuronas del hipocampo que forman las regiones del *cornus ammonis* 3 (CA3) y 1 (CA1), así como el GD. Las dendritas de las neuronas del hipocampo se identificaron con los anticuerpos que reconocen a las neurofilaminas de medio (M,  $\sim 150$  kDa) y alto (H,  $\sim 200$  kDa) peso molecular (NF M+H). También se utilizó un anticuerpo que reconoce a las proteínas MAP2 (por sus siglas en inglés) y que reconoce el árbol dendrítico de las neuronas. En la figura 27 B y C se muestra una tinción positiva en color rojo para neurofilamentos y en color verde para la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2) de la neuronas piramidales que conforman la región de CA3. Esta tinción por inmunofluorescencia no permitió visualizar completamente el árbol dendrítico con suficiente resolución, ya que ambas proteínas se distribuyeron en el soma y en pocas de las dendritas de este tipo de neuronas del hipocampo.



**Figura 27. Organización de las neurofilaminas M+H y de la proteína MAP2 en cultivos organotípicos de hipocampo de rata.** Los rebanadas de hipocampo (400  $\mu\text{m}$ ) se incubaron por una semana en insertos de membrana con medio neurobasal, y posteriormente, éstas fueron cortadas en secciones de 50  $\mu\text{m}$  y teñidas con DAPI (panel **A**, azul), barra= 200  $\mu\text{m}$ . Estos cortes también fueron teñidas para los anticuerpos anti-neurofilaminas M y H (panel **B**, rojo), con anti-proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2) (panel **C**, verde), y DAPI (azul) para ambos paneles, barra= 100  $\mu\text{m}$ . En un acercamiento de cada panel se muestran las tinciones positivas de cada marcador y el empalme de éstos en neuronas piramidales de CA3, barra= 5  $\mu\text{m}$ .

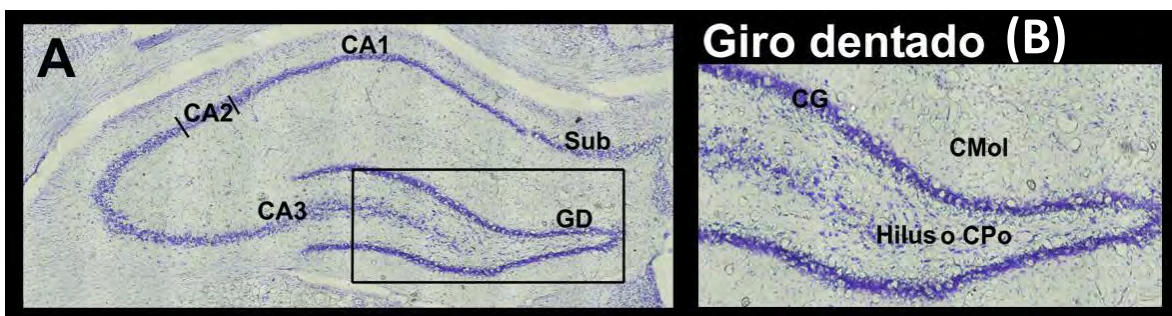
Por lo tanto, para la caracterización de las dendritas de las neuronas del hipocampo se decidió realizar la técnica de inmunohistoquímica con un marcador específico anti-MAP2 para dendritas y un marcador anti-doblecortina (DCX) para neuronas inmaduras. En la figura 28 se muestra la tinción positiva para los anticuerpos anti-DCX y anti-MAP2 tanto en la capa polimórfica o hilus del GD como en la región de CA3. Ambas proteínas asociadas a los microtúbulos se distribuyeron en el soma y las dendritas de las neuronas del hilus y de la región CA3. Además, estas proteínas también revelaron la presencia de distintas morfologías de las neuronas musgosas e interneuronas del hilus del GD en estos cultivos organotípicos, entre las que se destacan formas multipolares, triangulares, estrelladas y fusiformes. Sin embargo, el anticuerpo anti-MAP2 demostró una mejor definición de la presencia de esta proteína y del árbol dendrítico en las neuronas del hilus del GD y en las neuronas piramidales de CA3.



**Figura 28. Caracterización de las dendritas en los cultivos organotípicos de hipocampo mediante la técnica de inmunohistoquímica.** Las rebanadas de hipocampo (400  $\mu\text{m}$ ) se incubaron por una semana en insertos de membrana con medio neurobasal, y posteriormente, éstas fueron cortadas en secciones de 50  $\mu\text{m}$  y teñidas para los anticuerpos anti-doblecortina (DCX) y anti-proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2). En la parte izquierda se muestran los anticuerpos empleados para cada región del hipocampo (hilus y CA3), las cuales se muestran en la parte alta de la figura, barra= 100  $\mu\text{m}$ .

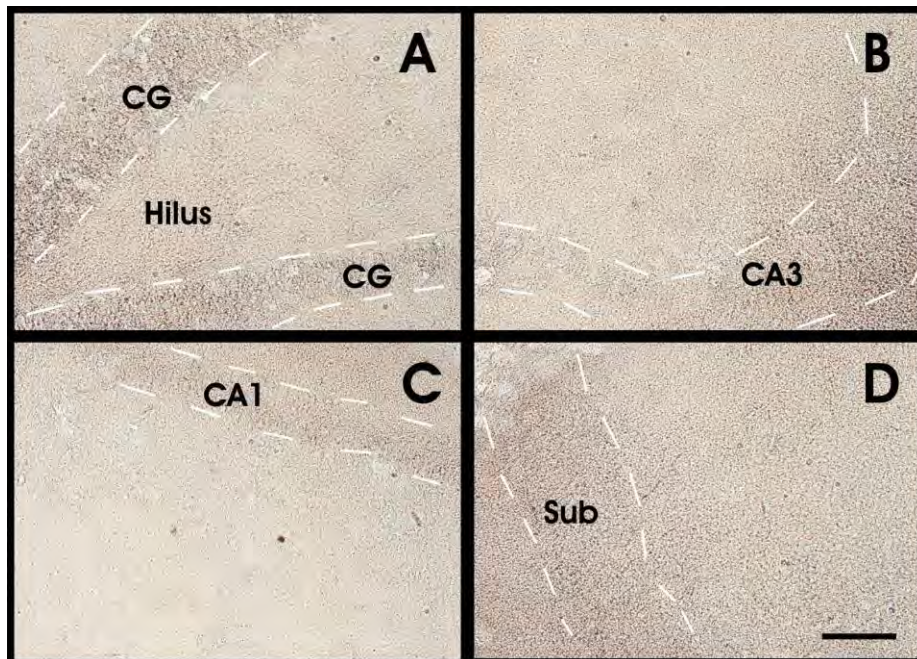
## B. EFECTOS DE LA MELATONINA SOBRE LA DENDRITOGÉNESIS EN CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE HIPOCAMPO DE RATA.

Los efectos de la melatonina (MEL) sobre la dendritogénesis se estudiaron en células musgosas e interneuronas de la capa polimórfica o hilus del GD del hipocampo. En la figura 29 A se muestra un corte coronal de hipocampo de 50  $\mu\text{m}$  teñido con la técnica de Nissl, en el cual se observa la panorámica de la distribución de las regiones citoarquitectónicas que lo componen, tales como el giro dentado (GD), el hipocampo formado por la región CA3, CA2 y CA1 y el subiculum. En la figura 29 B se muestra un acercamiento del GD y las láminas que lo constituyen: la capa molecular, la capa granular y la capa polimórfica o hilus.



**Figura 29. Distribución de las regiones principales del hipocampo en los cultivos organotípicos de hipocampo de rata.** Los cortes de hipocampo con un grosor de 50  $\mu\text{m}$  fueron teñidos por la técnica de Nissl. La micrografía adquirida en el panel A tiene un aumento de 200x, y el acercamiento del giro dentado es del 200% de la imagen original. En el panel A se observan líneas moradas, compuestas por los núcleos de las neuronas (puntos morados), en las principales regiones del hipocampo como el giro dentado (GD), la región CA3, CA2 y CA1, y el subiculum. En el panel B se indican la capa molecular (CMol), la capa granular (CG) y capa polimórfica o el hilus (CPo) del GD.

La dendritogénesis inducida por MEL en las neuronas hilares se determinó por inmunohistoquímica, empleando un anticuerpo anti-MAP2, el cual es un marcador específico de dendritas y neuronas maduras. Para descartar un falso positivo se realizó un control negativo para este anticuerpo en rebanadas de hipocampo incubadas con el vehículo (VEH) por 6h. La figura 30 muestra un corte de hipocampo con un grosor de 50  $\mu\text{m}$  con una tinción negativa en cuatro regiones diferentes del hipocampo, entre ellas: el hilus (panel A), la región CA3 (panel B), la región CA1 (panel C) y el subiculum (panel D). Esto demostró que en ausencia del anticuerpo primario no ocurre la formación del complejo de anti-MAP2-biotina-avidina-peroxidasa de rábano, el cual reacciona con el sustrato de DAB provocando la polimerización oxidativa y el ciclado oxidativo de este compuesto hasta formar el precipitado color café.



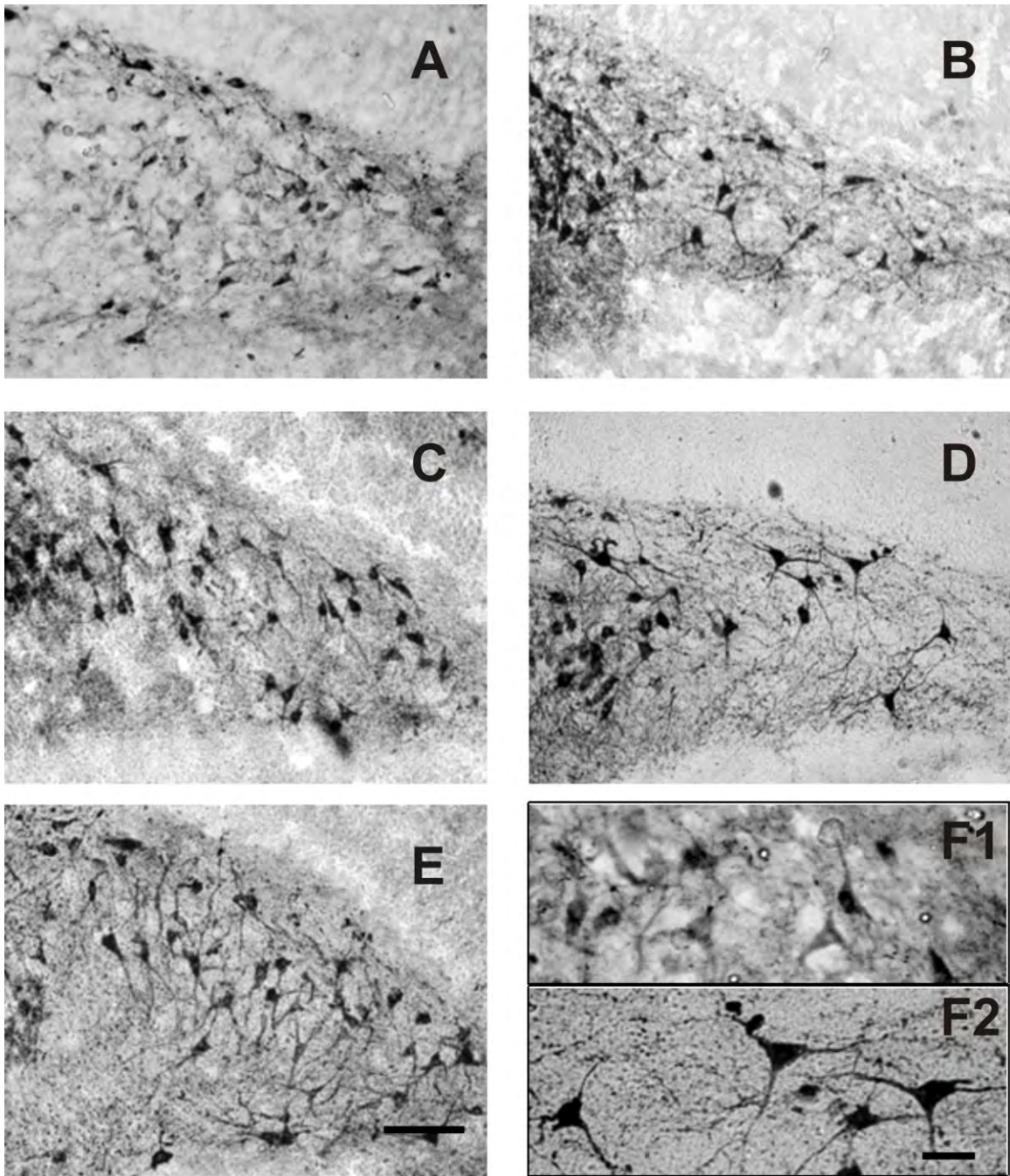
**Figura 30. Control negativo para el anticuerpo anti-MAP2 en la tinción con inmunoperoxidasas en cultivos organotípicos de hipocampo de rata.** Los cortes de hipocampo con un grosor de 50  $\mu\text{m}$  se procesaron por el método de inmunohistoquímica, pero sin adicionar el anticuerpo primario anti-MAP2. En esta figura se muestran cuatro regiones del hipocampo: giro dentado (panel **A**), región CA3 (panel **B**), región CA1 (panel **C**) y el subiculum (Sub) (panel **D**). En líneas punteadas se enmarcan las capas con neuronas piramidales de cada zona, así como la localización del hilus en medio de la capas granulares (CG), barra= 100  $\mu\text{m}$ .

Para determinar el efecto de la MEL (MEL) sobre la formación, alargamiento y complejidad de las dendritas se realizó una curva de dosis-respuesta en rebanadas de hipocampo con un grosor de 400  $\mu\text{m}$ , las cuales se incubaron con las concentraciones  $10^{-11}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-7}$  M y  $10^{-5}$  M de MEL por 6 h.

En esta curva de dosis-respuesta de MEL se observaron diferentes formas celulares, tales como fusiformes, redondas, triangulares, multipolares o estrelladas que corresponden a las células musgosas e interneuronas del hilus (Fig. 31, todos los paneles). También se observan otras neuronas con formas trapezoides o romboides dependiendo del plano de corte. En las rebanadas de hipocampo incubadas con el VEH se observaron neuronas de forma bipolar y triangular con dendritas delgadas y predominantemente cortas de forma sinuosa (Fig. 31, panel A y F1). Mientras que las dendritas que se observaron con una concentración de  $10^{-11}$  M de MEL fueron delgadas y largas con una dirección definida hasta formar ángulos con respecto al soma, y también las dendritas mostraron algunas ramificaciones (Fig. 31, panel B).

En la concentración nanomolar ( $10^{-9}$  M) de MEL que se encuentra en el plasma sanguíneo se observaron neuronas de forma triangular con dendritas cortas y rectas y/o largas y sinuosas, ambos tipos de dendritas mostraron ramificaciones secundarias y terciarias (Fig. 31, panel C). Por otro lado, los efectos de la concentración fisiológica de MEL ( $10^{-7}$  M), la cual se encuentra en el fluido cerebro espinal, mostró neuronas triangulares y trapezoides con dendritas más largas con un grosor mayor en la parte proximal al soma (Fig. 31, panel D), y en la parte distal se observaron delgadas y ramificadas hasta formar árboles dendríticos complejos (Fig. 31, panel F2). Por último, en las rebanadas de hipocampo tratados con la concentración de  $10^{-5}$  M de MEL se observaron neuronas triangulares, trapezoides y romboides con dendritas gruesas desde el soma hasta las terminaciones dendríticas. Estas dendritas poseen una dirección definida al igual que en presencia de  $10^{-11}$  M de MEL, y también son más largas y gruesas que las dendritas observadas con  $10^{-7}$  M de MEL (Fig. 31, panel E). Lo anterior indica que la MEL modificó la geometría y la morfología de las dendritas con respecto al soma de las neuronas hilares. Estas modificaciones fueron dependientes de la concentración de MEL.





**Figura 31. Efecto dosis-respuesta de melatonina sobre la dendritogénesis en las neuronas hilares de cultivos organotípicos de hipocampo de rata.** Las rebanadas de hipocampo con un grosor de 400  $\mu\text{m}$  se incubaron por 6 h con el VEH (panel **A**),  $10^{-11}$  M de MEL (panel **B**),  $10^{-9}$  M de MEL (panel **C**),  $10^{-7}$  M de MEL (panel **D**) y  $10^{-5}$  M de MEL (panel **E**). Posteriormente, los cortes de hipocampo de 50  $\mu\text{m}$  fueron teñidos con el anticuerpo anti-MAP2 seguido de un anticuerpo anti-ratón acoplado a biotina y peroxidasa de rábano, barra = 100  $\mu\text{m}$ . Una amplificación de los árboles dendríticos que corresponden a los paneles **A** y **D** se muestran en el panel **F1** y **F2**, respectivamente, barra= 50  $\mu\text{m}$ .

Para evaluar la dendritogénesis inducida por la MEL se cuantificaron 20 neuronas de cada grupo de la curva de dosis-respuesta para los siguientes parámetros de las dendritas como el número, el grosor y la longitud de las dendritas primarias (d1), el número y la longitud de dendritas secundarias (d2), el número de ramificaciones (nodos, R), el número de terminaciones dendríticas (T) y la longitud total de la dendrita. Cada parámetro de la curva de dosis-respuesta se muestra a detalle en la tabla 1. En las rebanadas de hipocampo incubadas con el VEH, las neuronas hilares mostraron un promedio de dos dendritas primarias por neurona (Fig. 32, panel A) con una longitud de 7.24  $\mu\text{m}$  (Fig. 32, panel B) y un grosor de 1.41  $\mu\text{m}$  (Fig. 33, panel A). También se observó un promedio de tres dendritas secundarias (Fig. 32, panel C) y una longitud de dendritas secundarias y terciarias de 15.6  $\mu\text{m}$  (Fig. 32, panel D). La complejidad dendrítica definida por el número de ramificaciones y terminaciones, así como por la longitud total de la dendrita, en el VEH fue de 2.3, 5.2 y 28.5  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Fig. 33, panel B, C y D).

Por otro lado, las rebanadas incubadas con las diferentes concentraciones de MEL ( $10^{-11}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-7}$  M y  $10^{-5}$  M) mostraron una curva de dosis-respuesta con forma de campana, en la cual aumenta el número de dendritas primarias (Fig. 32, panel A) y secundarias (Fig. 32, panel C) conforme aumenta la concentración de MEL. En estos parámetros, el número máximo de dendritas primarias y secundarias fue de 4.3 y 7.8 por neurona para la concentración de  $10^{-7}$  M de MEL, respectivamente; y este número disminuyó significativamente con la concentración de  $10^{-5}$  M (d1= 3.8 y d2= 6.7 por neurona). Estos números de dendritas tanto primarias como secundarias también fueron significativamente mayores con  $10^{-7}$  M de MEL en comparación con el VEH y las otras concentraciones de MEL.

Asimismo, la longitud de las dendritas primarias (Fig. 32, panel B) y de las dendritas secundarias y terciarias (Fig. 32, panel D) también aumentó conforme la concentración de MEL con una curva de dosis-respuesta con forma de campana y un aumento exponencial, respectivamente. El valor máximo para ambos parámetros fue 20.7  $\mu\text{m}$  y 41.3  $\mu\text{m}$  en presencia de la concentración de  $10^{-5}$  M de MEL, los cuales fueron mayores de forma significativa con respecto al VEH. Sin embargo, en la concentración de  $10^{-9}$  M de MEL se observó un decremento de la longitud de las dendritas primarias ( $11.29\mu\text{m} \pm 1.178$ ) (Fig. 32, panel B). Otro parámetro que se evaluó fue el grosor de las dendritas primarias, en el cual se observaron dendritas con un grosor máximo de 4.2  $\mu\text{m}$  en la concentración de  $10^{-5}$  M de MEL. Este incremento en el grosor también fue significativamente mayor con respecto a las demás concentraciones de MEL (Fig. 33, panel A).

La complejidad dendrítica de las células musgosas e interneuronas del hilus mostró una curva de dosis-respuesta de tipo campana para el número de ramificaciones (nodos, R), y las terminaciones dendríticas (T) (Fig. 33, panel B y C). Todos los parámetros también aumentan gradualmente hasta 10.3  $\mu\text{m}$  y 15.8  $\mu\text{m}$  en presencia de  $10^{-7}$  M de MEL, y éstos

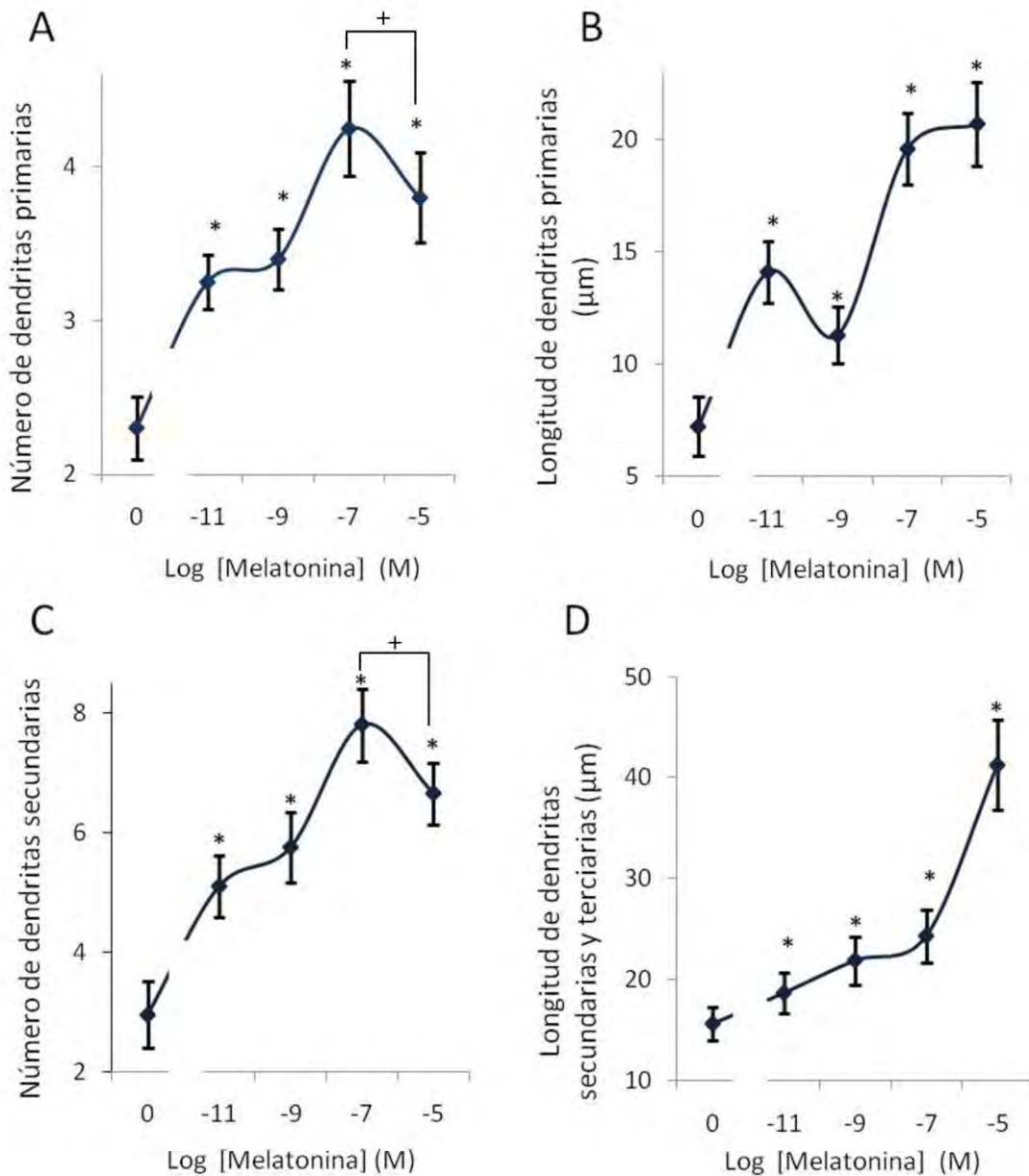
decrecen con  $10^{-5}$  M de MEL ( $R= 7.3 \mu\text{m}$  y  $T= 12.1 \mu\text{m}$ ), lo cual indica que la MEL produce la ramificación de las dendritas generando nuevas dendritas secundarias y terciarias o terminaciones dendríticas que en futuro pueden generar otras dendritas. También se evaluó la longitud total de la dendrita contemplando la presencia de dendritas primarias, secundarias y terciarias (Fig. 33, panel D), en la cual se observó un valor máximo de  $69.8 \mu\text{m}$  con una concentración de  $10^{-5}$  M de MEL. Aunque se observó un decremento de la longitud total en presencia de  $10^{-9}$  M de MEL ( $42 \mu\text{m}$ ).

Todo lo anterior indica que la concentración óptima de la MEL para estimular la formación, alargamiento y complejidad de las dendritas fue de  $10^{-7}$  M, con la cual se observó un aumento en el número de dendritas primarias y secundarias por célula en 187% y 260%, respectivamente. También la MEL aumentó la longitud en un 170.5% y el grosor en un 183.6%. La complejidad dendrítica a esta concentración muestra un aumento significativo en cada parámetro ( $R= 345.6\%$ ,  $T= 203.8\%$ , longitud total= 107.8%) en comparación con el VEH.

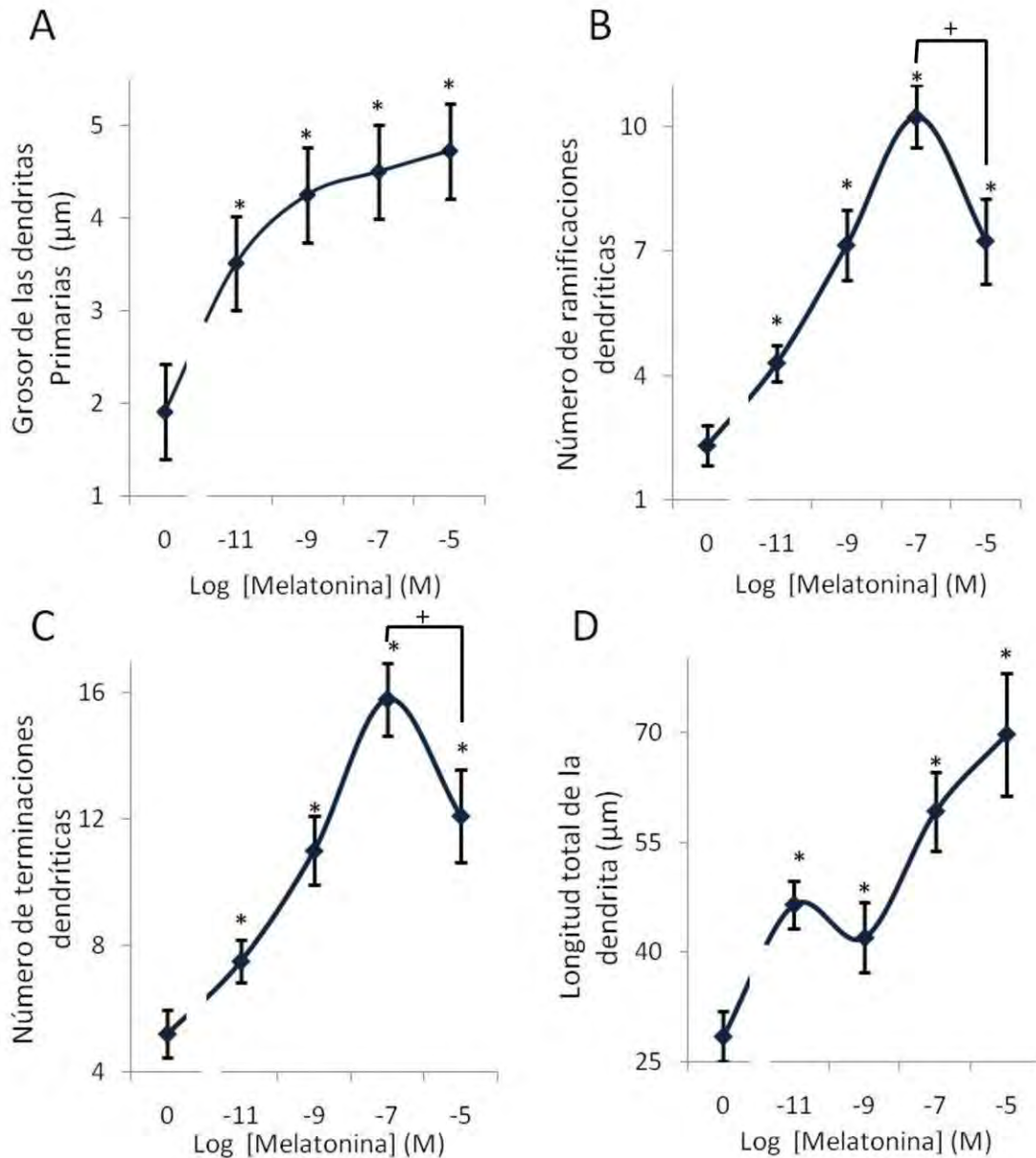
**Tabla 1. Efectos de la curva dosis-respuesta de melatonina sobre los parámetros dendríticos de las células hilares durante la dendritogénesis.**

Concentración melatonina (M)	Dendritas primarias			Dendritas secundarias		Complejidad dendrítica		
	Número	Longitud ( $\mu\text{m}$ )	Grosor ( $\mu\text{m}$ )	Número	Longitud ( $\mu\text{m}$ )	Nodos (número)	Terminaciones (número)	Longitud total de la dendrita ( $\mu\text{m}$ )
VEH	$2.3 \pm 0.206$	$7.2 \pm 1.020$	$1.4 \pm 0.177$	$3.0 \pm 0.559$	$15.6 \pm 1.691$	$2.3 \pm 0.482$	$5.2 \pm 0.753$	$28.5 \pm 3.405$
$10^{-11}$	$3.3 \pm 0.176^*$	$14.1 \pm 1.360^*$	$3.0 \pm 0.229^*$	$5.1 \pm 0.512^*$	$18.6 \pm 2.023^*$	$4.3 \pm 0.436^*$	$7.5 \pm 0.667^*$	$46.5 \pm 3.246^*$
$10^{-9}$	$3.4 \pm 0.197^*$	$11.3 \pm 1.178^*$	$3.8 \pm 0.257^*$	$5.8 \pm 0.589^*$	$21.9 \pm 2.373^*$	$7.2 \pm 0.853^*$	$11.0 \pm 1.088^*$	$42.0 \pm 4.735^*$
$10^{-7}$	$4.3 \pm 0.307^{*+}$	$19.6 \pm 1.606^*$	$4.0 \pm 0.136^*$	$7.8 \pm 0.610^{*+}$	$24.3 \pm 2.636^*$	$10.3 \pm 0.760^{*+}$	$15.8 \pm 1.158^{*+}$	$59.3 \pm 5.371^*$
$10^{-5}$	$3.8 \pm 0.296^*$	$20.7 \pm 1.826^*$	$4.2 \pm 0.240^*$	$6.7 \pm 0.509^*$	$41.3 \pm 4.475^*$	$7.3 \pm 1.026^*$	$12.1 \pm 1.417^*$	$69.8 \pm 8.331^*$

Las rebanadas de hipocampo con un grosor de  $400 \mu\text{m}$  se incubaron por 6 h con el VEH,  $10^{-11}$  M de MEL,  $10^{-9}$  M de MEL,  $10^{-7}$  M de MEL y  $10^{-5}$  M de MEL. Posteriormente, los cortes de hipocampo de  $50 \mu\text{m}$  fueron teñidos con el anticuerpo anti-MAP2 seguido de un anticuerpo anti-ratón acoplado a biotina y peroxidasa de rábano. Las imágenes se adquirieron con el programa NIS-Elements 3.0 AR. Los resultados representan la media  $\pm$  el error estándar de la media de dos experimentos realizados por cuadruplicado. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas comparadas con las rebanadas incubadas con el vehículo ( $p < 0.05$ ), mientras que el signo (+) indica diferencia significativa entre las rebanadas incubadas con las concentraciones de  $10^{-7}$  y  $10^{-5}$  de MEL ( $p < 0.05$ ).



**Figura 32. Efecto dosis-respuesta de melatonina en el número y longitud de las dendritas.** Las neuronas hilares teñidas con el anticuerpo anti-MAP2 fueron analizadas por el método de Sholl para determinar el número (panel **A**) y la longitud (panel **B**) de las dendritas primarias. También se muestra la cuantificación del número de las dendritas secundarias (panel **C**) y la longitud de las dendritas secundarias y terciarias (panel **D**). Los resultados representan la media  $\pm$  el error estándar de la media de dos experimentos realizados por cuadruplicado. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas comparadas con las rebanadas incubadas con el vehículo (VEH= 0 en el eje de las "x") ( $p < 0.05$ ), mientras que el signo (+) indica diferencia significativa entre las rebanadas incubadas con las concentraciones de  $10^{-7}$  y  $10^{-5}$  de MEL ( $p < 0.05$ ).



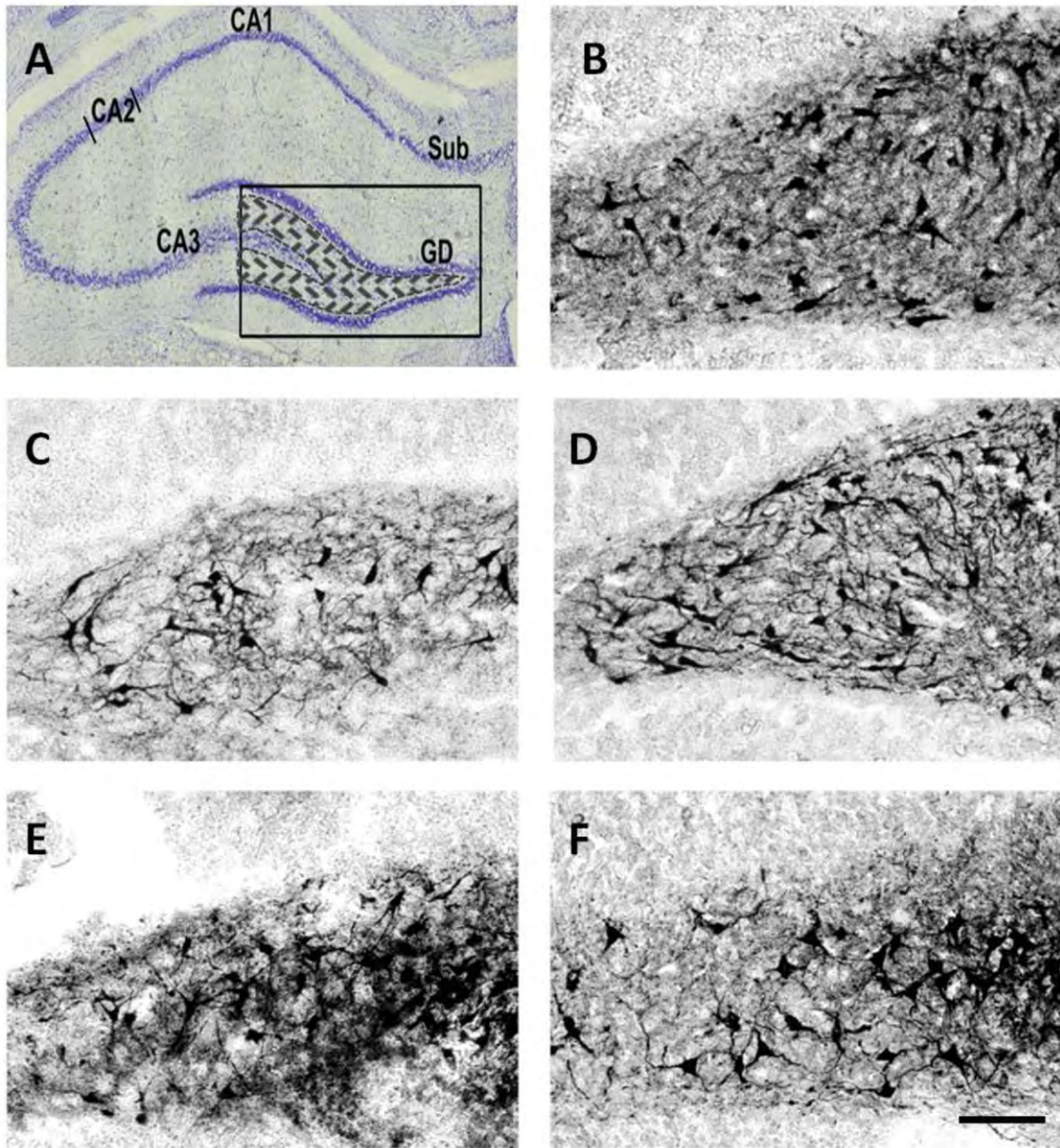
**Figure 33. Efecto dosis-respuesta de melatonina en el grosor de las dendritas primarias y la complejidad dendrítica.** Las neuronas hilares teñidas con el anticuerpo anti-MAP2 fueron analizadas por el método de Sholl para determinar el grosor de las dendritas primarias (panel **A**). También se cuantificó la complejidad dendrítica, la cual incluye el número de ramificaciones (panel **B**) y el número de terminaciones dendríticas (panel **C**), así como la longitud total de la dendrita (panel **D**). Los resultados representan la media  $\pm$  el error estándar de la media de dos experimentos realizados por cuadruplicado. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas comparadas con las rebanadas incubadas con el vehículo (VEH= 0 en el eje de las "x") ( $p < 0.05$ ), mientras que el signo (+) indica diferencia significativa comparadas con las rebanadas incubadas con las concentraciones de  $10^{-7}$  y  $10^{-5}$  de MEL ( $p < 0.05$ ).

Posteriormente, se realizó un curso temporal (CT) de MEL con la concentración óptima de  $10^{-7}$  M, con la que se produjeron cambios en la formación, crecimiento y complejidad dendrítica. Se observaron la formación, crecimiento y complejidad de las dendritas a las 3, 6, 9 y 12 h en presencia del VEH y de la MEL. En las rebanadas incubadas con el VEH se observaron de forma predominante neuronas bipolares que extienden dendritas sinuosas, cortas y poco ramificadas a las 3 y 12 h (Fig. 34, panel B). También se observaron neuronas de forma estrellada, triangular y romboide, pero en menor proporción con respecto a las bipolares.

Por el contrario, las rebanadas incubadas con  $10^{-7}$  M de MEL mostraron un mayor número de neuronas estrelladas, triangulares y romboides con dendritas largas y rectas a partir de las 3 h (Fig. 34, panel C). Después de las 6 h de incubación, estas neuronas hilares se observaron con una morfología bipolar y estrellada con dendritas largas y ramificadas (Fig. 34, panel D). Sin embargo, las dendritas en la rebanadas incubadas por 9 h con MEL mostraron morfologías variadas como triangulares, romboides y trapezoides con algunas dendritas largas y direccionadas y otras dendritas muy cortas (Fig. 34, panel E).

Al transcurrir doce horas de incubación con MEL, las neuronas hilares también mostraron una morfología estrellada con dendritas sinuosas, más largas y con ramificaciones en las terminales de éstas (Fig. 34, panel F). Lo anterior indica que la geometría y la morfología de las dendritas modificadas por la MEL en las neuronas hilares se observaron a partir de las 3 horas con respecto al VEH, y que estos cambios son más evidentes en la longitud de las dendritas a las 12 h con la concentración de MEL presente en el fluido cerebroespinal.

En este curso temporal de los efectos de la MEL también se evaluaron los parámetros de las dendritas, los cuales se muestran de forma detallada en la tabla 2. Las rebanadas de hipocampo incubadas con el VEH mostraron un promedio de 3 a 3.5 dendritas primarias por neurona a las 3 y 12 h, respectivamente (Fig. 35, panel A). Estas dendritas tuvieron una longitud de  $8.3 \mu\text{m}$  (Fig. 35, panel B) y un grosor de  $3 \mu\text{m}$  a las 12 h (fig. 36, panel B). También se observó un promedio de 4 a 5 dendritas secundarias por neurona a las 3 y 12 h (Fig. 35, panel C), y un promedio de la longitud de las dendritas secundarias y terciarias de  $18.2 \mu\text{m}$  para las rebanadas incubadas por 12 h con el VEH. En cuanto a la complejidad dendrítica se observaron el número de ramificaciones y terminaciones, así como la longitud total de la dendrita, cuyos valores en el VEH de las 12 h fueron de  $8.1$ ,  $13.2$  y  $41.3 \mu\text{m}$ , respectivamente (Fig. 36, panel B, C y D). En todos los parámetros de las dendritas se observó un incremento significativo entre ambos tiempos de incubación con el VEH.



**Figure 34. Efecto curso temporal de melatonina sobre la dendritogénesis en las neuronas hilares de cultivos organotípicos de hipocampo de rata.** En el panel A se muestra una rebanada de hipocampo con un grosor de 50 µm teñida con la técnica de Nissl, en la cual se observa el circuito trisináptico del hipocampo que consiste en las siguientes regiones citoarquitectónicas: el cornus ammonis 1 (CA1), 2 (CA2), 3 (CA3), el giro dentado (GD) y el subiculum (Sub). La capa polimórfica o hilus (área sombreada) del giro dentado fue analizada para la formación, alargamiento y complejidad de las dendritas nuevas. Las rebanadas de hipocampo de 400 µm fueron incubadas con el VEH por 12 h (panel B) o  $10^{-7}$  M de MEL por 3 h (panel C), 6 h (panel D), 9 h (panel E) y 12 h (panel F). Posteriormente, los cortes de 50 µm fueron teñidos con el anticuerpo anti-MAP2 seguido de un anticuerpo anti-ratón acoplado a biotina y a peroxidasa de rábano, barra= 100 µm.

**Tabla 2. Efectos del curso temporal de melatonina sobre los parámetros dendríticos de las células hilares durante la dendritogénesis.**

Tiempo de incubación	Dendritas primarias			Dendritas secundarias		Complejidad dendrítica		
	Número	Longitud (µm)	Grosor (µm)	Número	Longitud (µm)	Nodos (número)	Terminaciones (número)	Longitud total de la dendrita (µm)
<b>VEH 12h</b>	3.5 ± 0.198	8.3 ± 0.858	3.0 ± 0.256	5.1 ± 0.552	18.2 ± 1.738	8.1 ± 0.839	13.2 ± 1.064	41.3 ± 2.876
<b>MEL 3h</b>	4.2 ± 0.225*	14.3 ± 1.448*	3.7 ± 0.664*	6.8 ± 0.435*	36.8 ± 3.179*	7.1 ± 0.675*	12.2 ± 0.914*	66.0 ± 6.714*
<b>MEL 6h</b>	5 ± 0.290*	16.5 ± 1.352*	3.5 ± 0.18*	7.7 ± 0.666*	48.8 ± 2.481*	12.4 ± 1.761*	19.6 ± 2.407*	70.8 ± 4.14*
<b>MEL 9h</b>	5.5 ± 0.521*	13 ± 0.945*	4.1 ± 0.205*	8.8 ± 0.937*	47.1 ± 1.681*	16.6 ± 1.548*	25.4 ± 2.341*	60.0 ± 4.104*
<b>MEL 12h</b>	4.7 ± 0.319*	15.1 ± 1.142*	3.0 ± 0.165*	7.4 ± 0.559*	56.9 ± 3.696*	15.2 ± 1.463*	22.1 ± 1.818*	83.0 ± 7.056*

Las rebanadas de hipocampo con un grosor de 400 µm se incubaron con el VEH o con  $10^{-7}$  M de MEL por 3, 6, 9 y 12 h. Posteriormente, los cortes de hipocampo de 50 µm fueron teñidos con el anticuerpo anti-MAP2 seguido de un anticuerpo anti-ratón acoplado a biotina y peroxidasa de rábano. Las imágenes se adquirieron con el programa NIS-Elements 3.0 AR. Los resultados representan la media ± el error estándar de la media de dos experimentos realizados por cuadruplicado. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas comparadas con las rebanadas incubadas con el vehículo a las 12 h ( $p < 0.05$ ).

Por otro lado, en las rebanadas incubadas con  $10^{-7}$  M de MEL se observó un curso temporal en forma de campana para el número de dendritas primarias (Fig. 35, panel A) y secundarias (Fig. 35, panel C), en el cual el aumento en el número de dendritas es proporcional a las horas. El promedio de dendritas primarias y secundarias fueron 5.5 y 8.8 por neurona a las 9 horas, respectivamente; sin embargo, este número de ambas dendritas tiende a disminuir a las 12h (MEL 12h: 4.65 ± 0.319; 7.4 ± 0.559, respectivamente). Todos los grupos tratados con MEL son significativamente mayores al número de dendritas encontradas en el VEH a las 3 y 12 h.

La longitud de las dendritas primarias (Fig. 35, panel B), y de las secundarias y terciarias (Fig. 35, panel D) también aumentan gradualmente conforme al tiempo de incubación con  $10^{-7}$  M de MEL, a excepción de la longitud de las dendritas primarias que disminuye a las 9 h (MEL 9h: 13 µm ± 0.9451). Además, esta longitud de las dendritas primarias fue de 14.3 µm, 16.5 µm y 15 µm, mientras que la longitud de las dendritas secundarias y terciarias fue de 36.8 µm, 48.8 µm y 56.9 µm, a las 3, 6 y 12 h de incubación con MEL, respectivamente. También la longitud de estas dendritas secundarias y terciarias se incrementó proporcionalmente con respecto al tiempo, con un valor máximo de 56.9



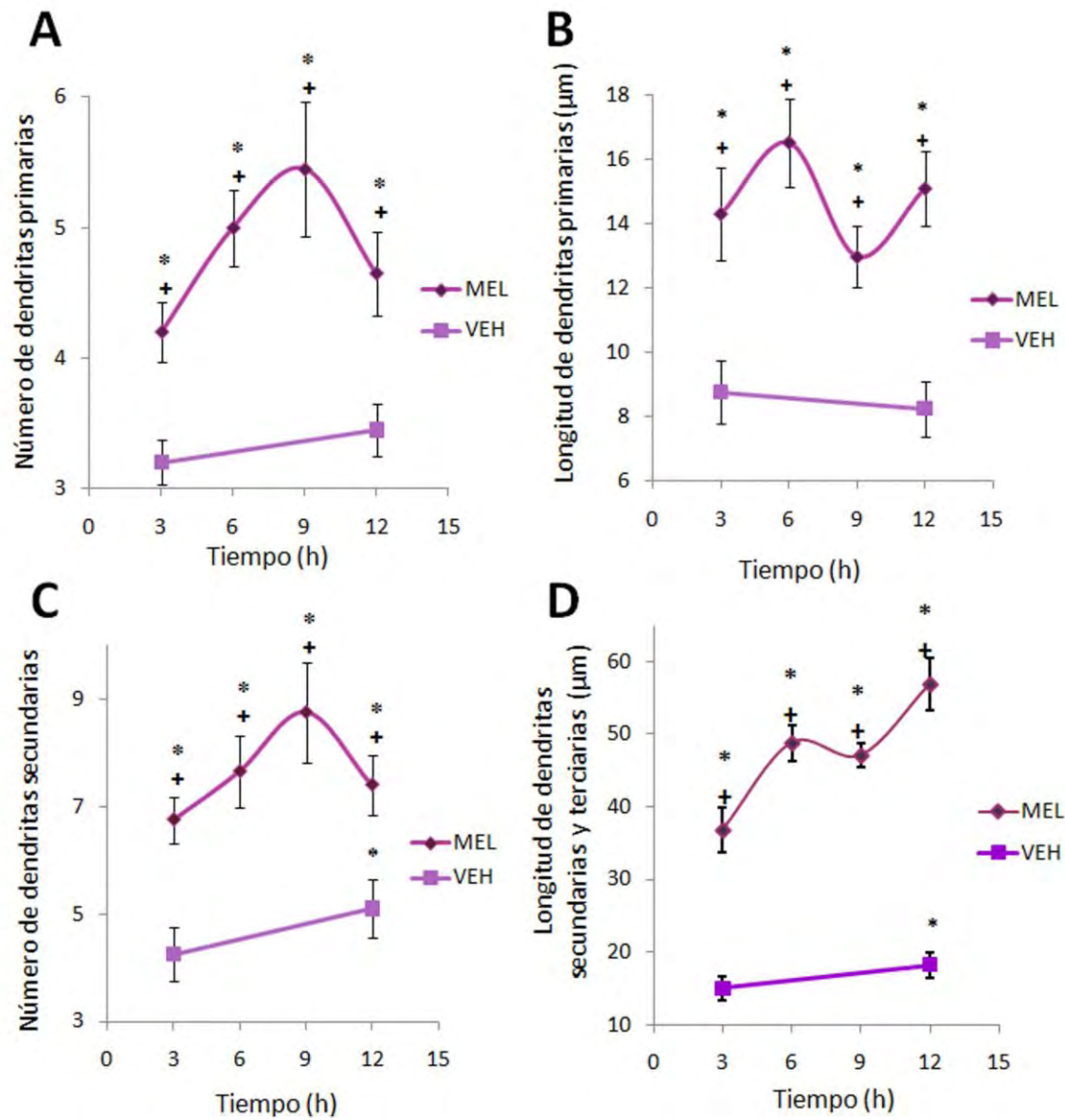
$\mu\text{m}$  a las 12 h. Cada uno de los valores observados con  $10^{-7}$  M de MEL fue significativamente mayor con respecto a los VEH de 3 y 12 h.

Además, en las rebanadas de hipocampo incubadas con  $10^{-7}$  M de MEL se observó que el grosor de las dendritas primarias aumentó a partir de las 3 h. Este grosor de las dendritas fue mayor a las 3 y 9 h con un promedio de  $3.7 \mu\text{m}$  y de  $4.1 \mu\text{m}$ , los cuales son significativamente mayores con respecto al VEH. Sin embargo, el grosor disminuyó a las 6 y 12 h. Estos valores respectivos para cada tiempo fueron de  $3.5 \mu\text{m}$  y  $3 \mu\text{m}$ , los cuales son significativamente mayores a lo observado en el VEH a las 3 h. También se encontraron diferencias significativas entre el grosor de las dendritas observadas en el VEH a las 12 h siendo más gruesas con respecto a las 3 h (Fig. 36, panel A).

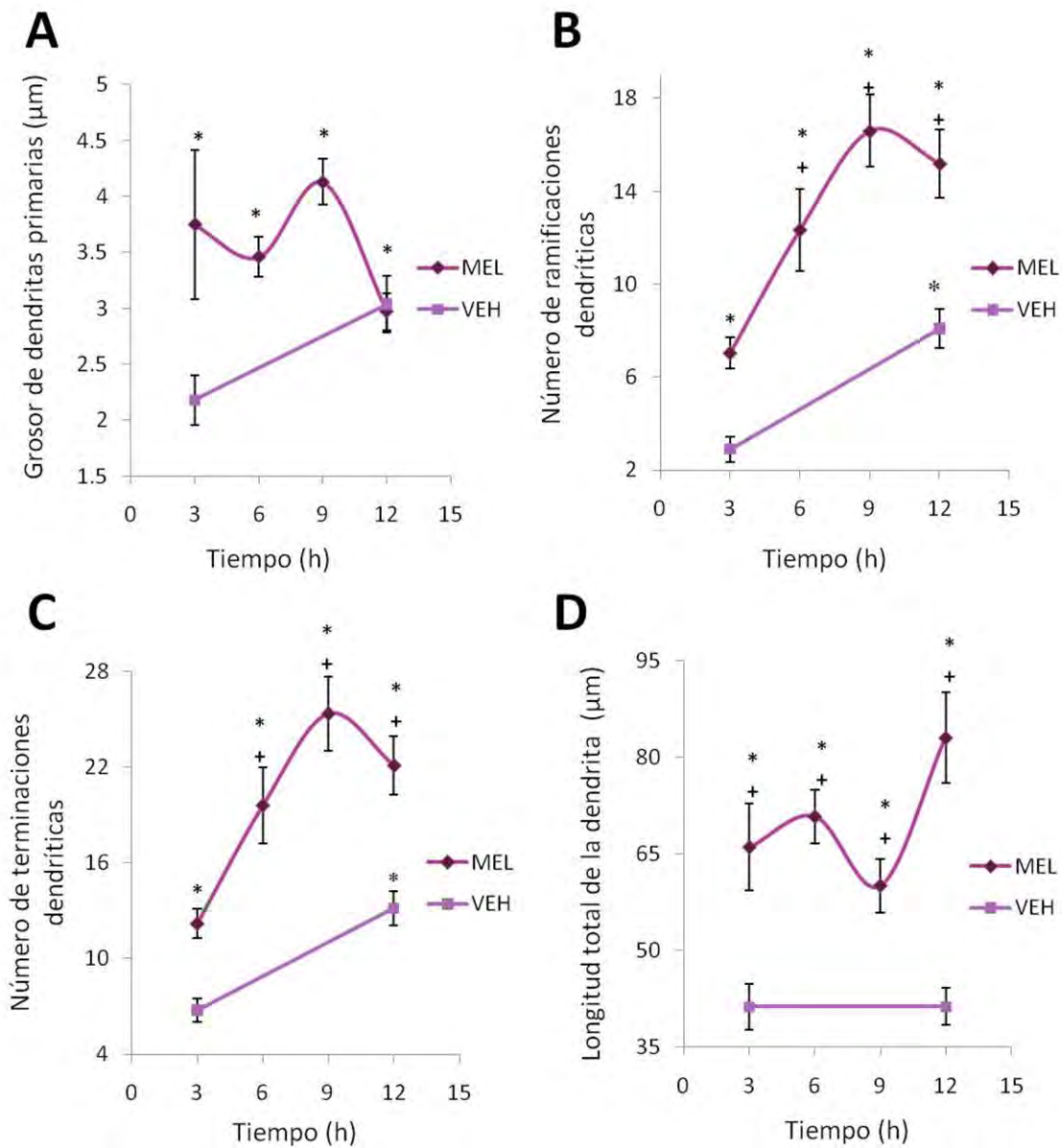
La complejidad dendrítica también se evaluó con respecto al tiempo de incubación de MEL. Este curso temporal mostró un aumento proporcional en el número de ramificaciones (R: MEL3h,  $7.1 \pm 0.675$ ; MEL6h,  $12.4 \pm 1.761$ ) (Fig. 36, panel B) y de terminaciones dendríticas (T: MEL3h,  $12.2 \pm 0.914$ ; MEL6h,  $19.6 \pm 2.407$ ) (Fig. 36, panel C) hasta alcanzar un valor máximo de 16.6 ramificaciones y de 25.4 terminaciones dendríticas a las 9 horas. Mientras que a las 12 h se observó una disminución del número de estas ramificaciones (R:  $15.2 \pm 1.463$ ) y terminaciones dendríticas (T:  $22.1 \pm 1.818$ ). Estos parámetros fueron significativamente mayores con respecto al VEH de las 3 y 12 h, y este último es significativamente mayor al VEH de 3 horas en ambos parámetros.

Al igual que la longitud de las dendritas primarias, el efecto de la MEL sobre la longitud total de las dendritas (Fig. 36, panel D) fue significativamente mayor a las 6 h y a las 12 h con una longitud promedio de  $70.8 \mu\text{m}$  y  $83 \mu\text{m}$ . Mientras que a las 3 y 9 h, la longitud total de las dendritas fue de  $66 \mu\text{m}$  y  $60 \mu\text{m}$ , cuya diferencia es significativa con respecto a ambos vehículos. Sin embargo, todas las rebanadas de hipocampo que fueron incubadas con  $10^{-7}$  M de MEL a diversos tiempos de exposición tienen dendritas más largas con respecto a los vehículos de 3 y 12 h.

Todo lo anterior indica que el tiempo de incubación óptimo para estimular la dendritogénesis fue de 6 h con una concentración de  $10^{-7}$  M de MEL, con la cual se observó un aumento en el número de dendritas primarias y secundarias por célula en 142% y 150%, respectivamente. También este tiempo de incubación con MEL aumentó la longitud en un 198.7% y el grosor en un 116.6%. La complejidad dendrítica a las 6 h también mostró un aumento significativo en cada parámetro (R= 153%, T= 148.4%, longitud total= 171.4%) en comparación con el VEH a las 12 h.



**Figure 35. Efecto curso temporal de melatonina en el número y longitud de las dendritas.** Las neuronas hilares teñidas con el anticuerpo anti-MAP2 fueron analizadas por el método de Sholl para determinar el número (panel **A**) y la longitud (panel **B**) de las dendritas primarias. También se muestra la cuantificación del número de las dendritas secundarias (panel **C**) y la longitud de las dendritas secundarias y terciarias (panel **D**). Los resultados representan la media  $\pm$  el error estándar de la media de dos experimentos realizados por cuadruplicado. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas comparadas con las rebanadas incubadas con el vehículo a las 3 h, y los signos (+) indican diferencias significativas comparadas con las rebanadas incubadas con el vehículo a las 12 h ( $p < 0.05$ ).



**Figure 36. Efecto curso temporal de melatonina en el grosor de las dendritas primarias y la complejidad dendrítica.** Las neuronas hilares teñidas con el anticuerpo anti-MAP2 fueron analizadas por el método de Sholl para determinar el grosor de las dendritas primarias (panel **A**). También se cuantificó la complejidad dendrítica, la cual incluye el número de ramificaciones (panel **B**) y el número de terminaciones dendríticas (panel **C**), así como la longitud total de la dendrita (panel **D**). Los resultados representan la media  $\pm$  el error estándar de la media de dos experimentos realizados por cuadruplicado. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas comparadas con las rebanadas incubadas con el vehículo a las 3 h, y los signos (+) indican diferencias significativas comparadas con las rebanadas incubadas con el vehículo a las 12 h ( $p < 0.05$ ).

### **C. VÍA DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADA EN LA DENDRITOGÉNESIS INDUCIDA POR LA MELATONINA EN NEURONAS HILARES DE CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE HIPOCAMPO DE RATA.**

Para explorar la vía de señalización implicada en la dendritogénesis inducida por la MEL en las neuronas del hilus, se utilizaron inhibidores de las proteínas PKC, CaM-Cinasa II y ROCK, así como el agonista 8M-PDOT y el antagonista luzindol de los receptores a melatonina.

Se cuantificaron los parámetros de las dendritas en las rebanadas de hipocampo cultivadas con el VEH, con  $10^{-7}$  M de MEL, o con el agonista de receptores, 8M-PDOT (8M), en presencia del antagonista de éstos, luzindol (LZD). Ambos compuestos tienen una mayor afinidad por los receptores MT2, pero también actúan sobre los receptores MT1. En presencia del agonista de los receptores a melatonina, 8M-PDOT, se observaron neuronas bipolares y triangulares con dendritas delgadas, cortas, y escasa complejidad dendrítica (Fig. 37 C), y se observa una tendencia a disminuir en los parámetros estudiados con respecto al grupo de MEL (Tabla 3 y 4, Fig. 38 y 39).

El antagonista del receptor a MEL (luzindol) en presencia de MEL (LZD + MEL) no bloqueó la dendritogénesis inducida por la indolamina (Tabla 3 y 4, Fig. 37, 38 y 39), ya que los parámetros fueron significativamente mayores con respecto a los del VEH. Lo anterior nos indica que los efectos de la MEL en las dendritas de las neuronas hilares es independiente de la estimulación de los receptores a melatonina. Sin embargo, estos efectos de luzindol en presencia de melatonina disminuyeron significativamente en todos los parámetros con respecto al efecto total de la MEL (Fig. 38 y 39). Adicionalmente, el luzindol, por sí solo, cuando se compara contra el vehículo podría tener un efecto en la dendritogénesis al incrementar el número de dendritas secundarias (Tabla 3 y 4, Fig. 37 y 38 B).

Como ya se describió anteriormente la MEL a una concentración de  $10^{-7}$  M incrementa el número y longitud de dendritas primarias, el número de dendritas secundarias, la longitud de dendritas secundarias y terciarias, el número de ramificaciones y terminaciones dendríticas, así como la longitud total de las dendritas. Sin embargo, la indolamina no incrementa el grosor de las dendritas primarias en presencia del antagonista, lo cual indica que este parámetro depende de la estimulación de los receptores a melatonina (Tabla 3 y 4, Fig. 37, 38 y 39).

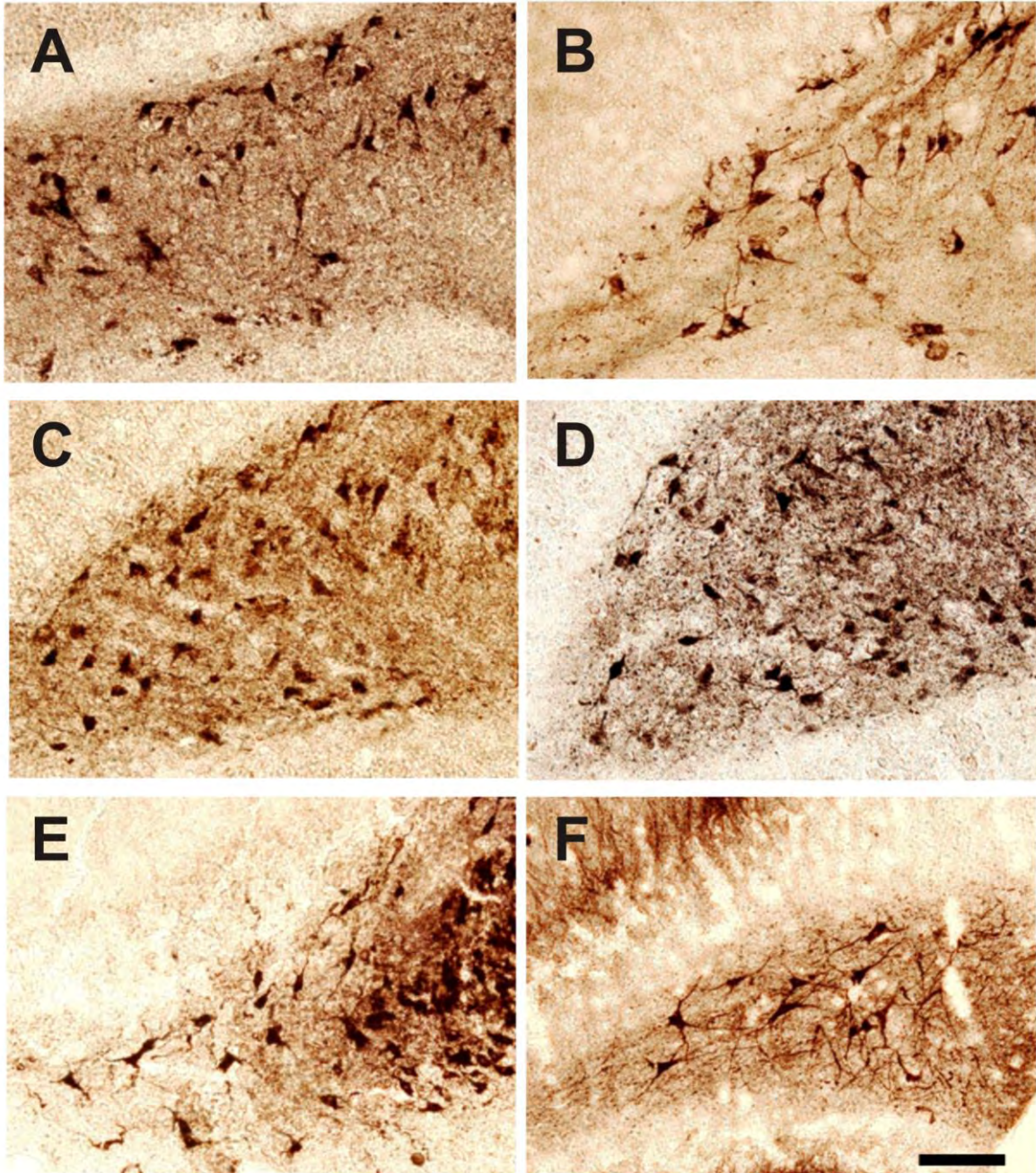
**Tabla 3. Interacciones moleculares de la melatonina y evaluación de la misma sobre las dendritas primarias y secundarias.**

GRUPO	Dendritas primarias			Dendritas secundarias	
	Número	Longitud (μm)	Grosor (μm)	Número	Longitud (μm)
VEH	4 ± 0.241	8.5 ± 0.935	2.9 ± 0.21	3.9 ± 0.324	21.04 ± 1.650
8M-PDOT	2.9 ± 0.176	5.9 ± 0.662	2.0 ± 0.224	3.2 ± 0.427	9.34 ± 1.153
MEL	5.3 ± 0.317*	12.5 ± 0.875*	3.3 ± 0.16*	7.9 ± 0.632*	59.06 ± 2.935*
LZD + VEH	4.1 ± 0.280	9.1 ± 0.860	2.7 ± 0.195	5.7 ± 0.602	20.05 ± 1.455
LZD+8M-PDOT	3.2 ± 0.213	7.8 ± 0.840	1.8 ± 0.174	3.1 ± 0.324	13.07 ± 1.340
LZD+MEL	4.7 ± 0.424*	9.9 ± 0.754*	2.9 ± 0.169	6.7 ± 0.561*	39.95 ± 2.032*
BIS +VEH	3.25 ± 0.216	7.26 ± 0.799	1.85 ± 0.19	3.2 ± 0.455	12.88 ± 1.310
BIS+MEL	3.5 ± 0.199	8.06 ± 0.795	2.16 ± 0.206	3.4 ± 0.373	15.99 ± 1.577
Y-27+VEH	3.25 ± 0.204	7.87 ± 0.919	1.92 ± 0.19	3.35 ± 0.455	15.47 ± 1.638
Y-27+8M	4.15 ± 0.233	11.88 ± 1.114*	2.56 ± 0.183	5.6 ± 0.916*	37.03 ± 2.560*
Y-27+MEL	3.4 ± 0.245	10 ± 1.023	2.56 ± 0.217	3.2 ± 0.438	18.30 ± 2.005
KN-62+ VEH	3.1 ± 0.161	6.4 ± 0.743	2.0 ± 0.209	3.7 ± 0.465	11.84 ± 1.366
KN-62+MEL	3.7 ± 0.300	8.3 ± 0.844	2.9 ± 0.235	2.9 ± 0.373	15.09 ± 1.261

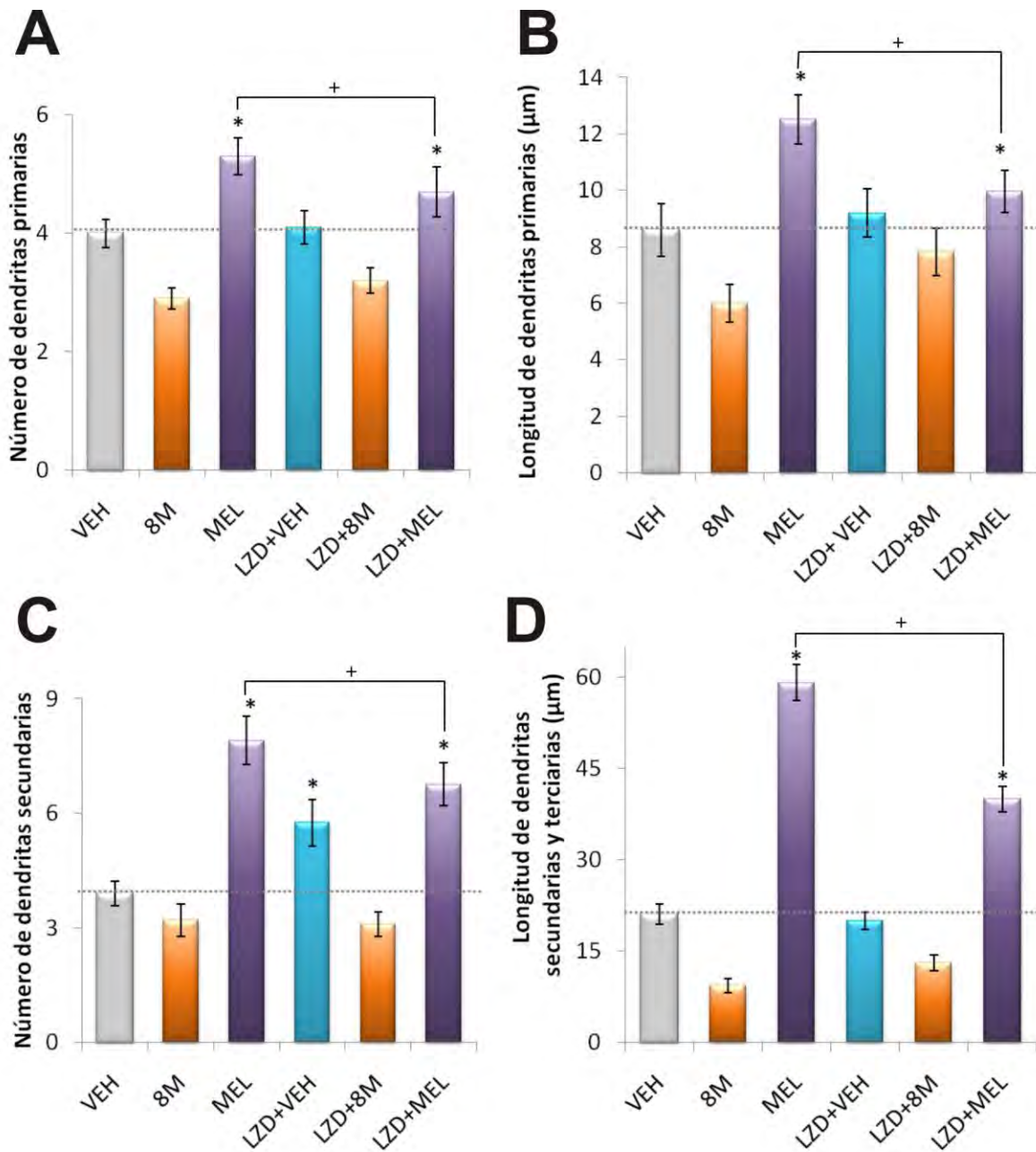
Las rebanadas de hipocampo de 400 μm se incubaron con los inhibidores de la PKC, bisindolilmaleimida (BIS), de la CaM-Cinasa II, KN-62, el inhibidor de la ROCK, Y-27632 durante 15 min antes de añadir el VEH, el agonista 8M-PDOT o la melatonina. Posteriormente, éstas se cortaron en secciones de 50 μm y se tiñeron con el anticuerpo anti-MAP2 seguido de un anticuerpo anti-ratón acoplado a biotina y peroxidasa de rábano. Las imágenes se adquirieron con el programa NIS-Elements 3.0 AR. Los resultados representan la media ± el error estándar de la media de dos experimentos realizados por cuadruplicado. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas comparadas con las rebanadas incubadas con el vehículo ( $p < 0.05$ ).

<b>Tabla 4. Interacciones moleculares del la melatonina y evaluación de la misma sobre la complejidad dendrítica.</b>			
<b>GRUPO</b>	<b>Complejidad dendrítica</b>		
	Ramificaciones (número)	Terminaciones (número)	Longitud total de la dendrita (μm)
<b>VEH</b>	4.5 ± 0.540	9.05 ± 0.622	43.2 ± 3.739
<b>8M-PDOT</b>	2.8 ± 0.360	6.25 ± 0.644	28 ± 2.096
<b>MEL</b>	20.0 ± 1.811*	30.3 ± 2.413*	69.5 ± 5.870*
<b>LZD +VEH</b>	5.3 ± 0.744	10.2 ± 1.085	37.5 ± 2.365
<b>LZD+8M-PDOT</b>	3.4 ± 0.455	6.9 ± 0.535	36.2 ± 2.430
<b>LZD+MEL</b>	12.9 ± 1.336*	20.1 ± 1.907*	59.2 ± 4.265*
<b>BIS +VEH</b>	2.9 ± 0.507	6.45 ± 0.701	34 ± 2.476
<b>BIS+MEL</b>	3.75 ± 0.383	7.8 ± 0.565	36.25 ± 2.807
<b>Y-27+VEH</b>	3.5 ± 0.6	7.2 ± 0.783	37.5 ± 3.451
<b>Y-27+8M</b>	8.1 ± 0.808*	13.95 ± 1.009*	64 ± 4.033*
<b>Y-27+MEL</b>	4.35 ± 0.544	8.15 ± 0.693	45.75 ± 4.311*
<b>KN-62 + VEH</b>	3.6 ± 0.549	6.9 ± 0.694	30 ± 2.666
<b>KN-62+MEL</b>	3.7 ± 0.476	8.2 ± 0.848	34.2 ± 1.929

Las rebanadas de hipocampo de 400 μm se incubaron con los inhibidores de la PKC, bisindolilmaleimida (BIS), de la CaM-Cinasa II, KN-62, el inhibidor de la ROCK, Y-27632 durante 15 min antes de añadir el VEH, el agonista 8M-PDOT o la melatonina. Posteriormente, éstas se cortaron en secciones de 50 μm y se tiñeron con el anticuerpo anti-MAP2 seguido de un anticuerpo anti-ratón acoplado a biotina y peroxidasa de rábano. Las imágenes se adquirieron con el programa NIS-Elements 3.0 AR. Los resultados representan la media ± el error estándar de la media de dos experimentos realizados por cuadruplicado. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas comparadas con las rebanadas incubadas con el vehículo ( $p < 0.05$ ).

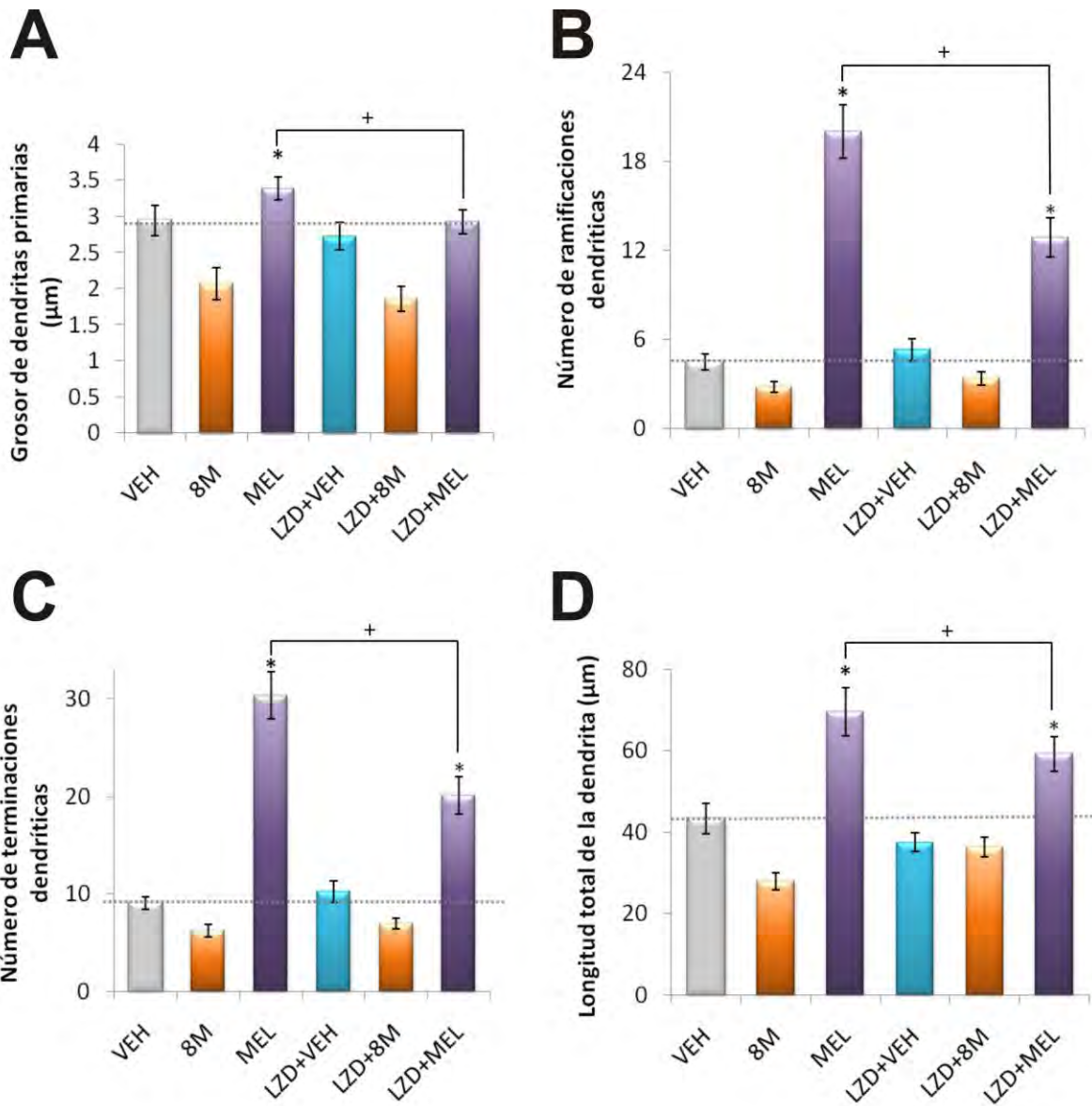


**Figura 37. Efecto del agonista y el antagonista de los receptores a melatonina en la dendritogénesis inducida por melatonina.** Las rebanadas de hipocampo con un grosor de 400  $\mu\text{m}$  se incubaron por 6 h con el vehículo (VEH, panel **A**),  $10^{-7}$  M de MEL (panel **B**), o 10nM del agonista 8M-PDOT (panel **C**), o se pre-incubaron con 100 $\mu\text{m}$  del antagonista luzindol seguido de una incubación con el VEH (panel **D**), el agonista 8M-PDOT (panel **E**), o  $10^{-7}$  M de MEL (panel **F**). Posteriormente, éstas fueron cortadas en secciones de 50  $\mu\text{m}$  y teñidas con el anticuerpo anti-MAP2 seguido de un anticuerpo anti-ratón acoplado a biotina y peroxidasa de rábano para observar los cambios en la geometría y morfología de las dendritas, barra = 100  $\mu\text{m}$ .



**Figura 38. Participación de los receptores a melatonina en la formación y crecimiento de las dendritas en neuronas hilares.** Los cortes de hipocampo de 50 µm teñidos con el anticuerpo anti-MAP2 fueron analizadas por el método de Sholl. La formación de las dendritas se determinó por el número de dendritas primarias (panel A) y secundarias (panel B). El crecimiento de las dendritas se demostró con la longitud de las dendritas primarias (panel C) y secundarias (panel D). Los resultados representan la media ± el error estándar de la media de un experimento realizado por cuadruplicado. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas comparada con las rebanadas incubadas con el VEH ( $p < 0.05$ ), y el signo (+) indica diferencia significativa entre las rebanadas incubadas con MEL y LZD+MEL ( $p < 0.05$ ).





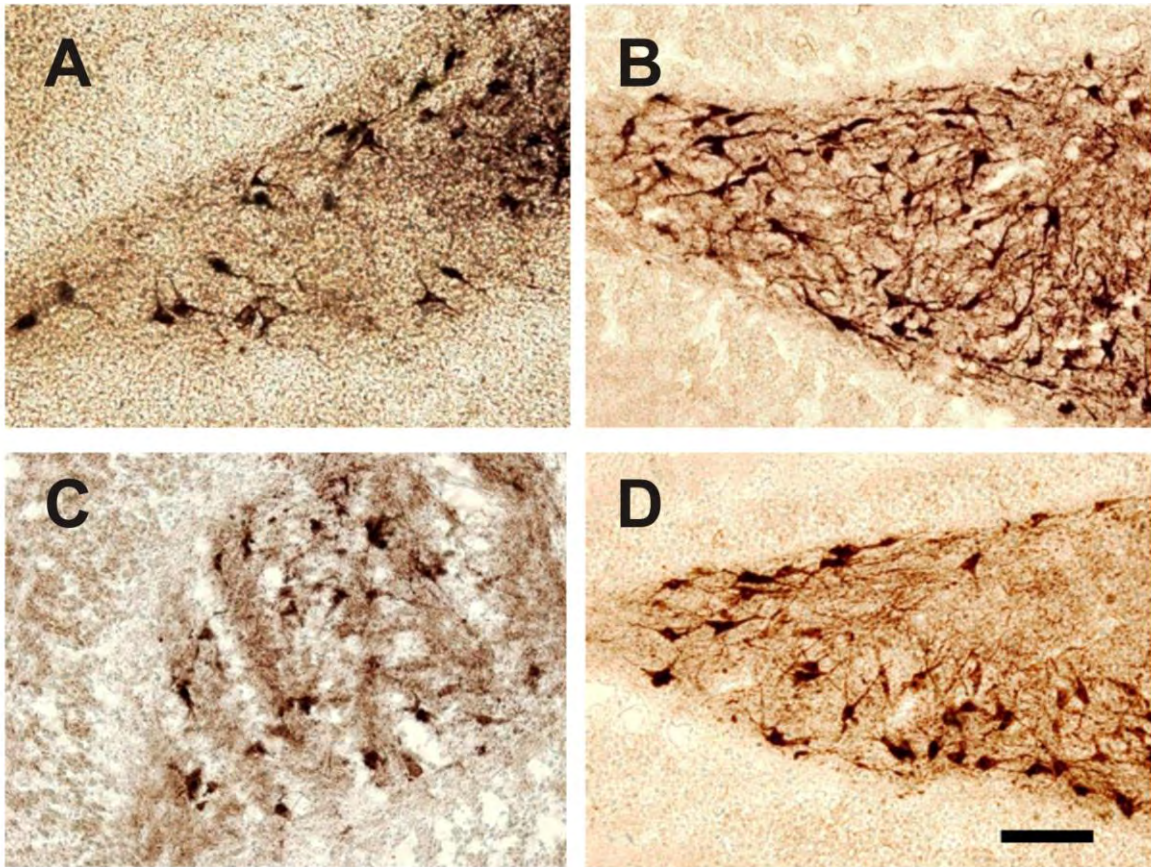
**Figura 39. Participación de la los receptores a melatonina en el grosor de las dendritas primarias y la complejidad de las dendritas en neuronas hilares.** Los cortes de hipocampo de 50 µm teñidos con el anticuerpo anti-MAP2 fueron analizadas por el método de Sholl para determinar el grosor de las dendritas primarias (panel **A**). La complejidad dendrítica se demostró con el número de ramificaciones (panel **B**) y el número de terminaciones dendríticas (panel **C**), así como la longitud total de la dendrita (panel **D**). Los resultados representan la media ± el error estándar de la media de un experimento realizado por cuadruplicado. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas comparadas con las rebanadas incubadas con el VEH ( $p < 0.05$ ), y el signo (+) indica diferencia significativa entre las rebanadas incubadas con MEL y LZD+MEL ( $p < 0.05$ ).

Se estudió la participación de la PKC en la dendritogénesis inducida por MEL utilizando un inhibidor específico, la bisindolilmaleimida (BIS), que se une al sitio de unión del ATP. Las rebanadas de hipocampo incubadas con  $10^{-7}$  M de MEL en presencia de la BIS mostraron neuronas estrelladas y bipolares con dendritas cortas y delgadas en el hilus (fig. 40 D). La formación, el alargamiento y la complejidad dendrítica disminuyeron significativamente en relación a los parámetros determinados en presencia del VEH y de los encontrados con la concentración nanomolar de MEL (Tabla 3 y 4, fig. 42 y 43), lo que indica que la PKC participa en la vía de señalización de la dendritogénesis inducida por MEL.

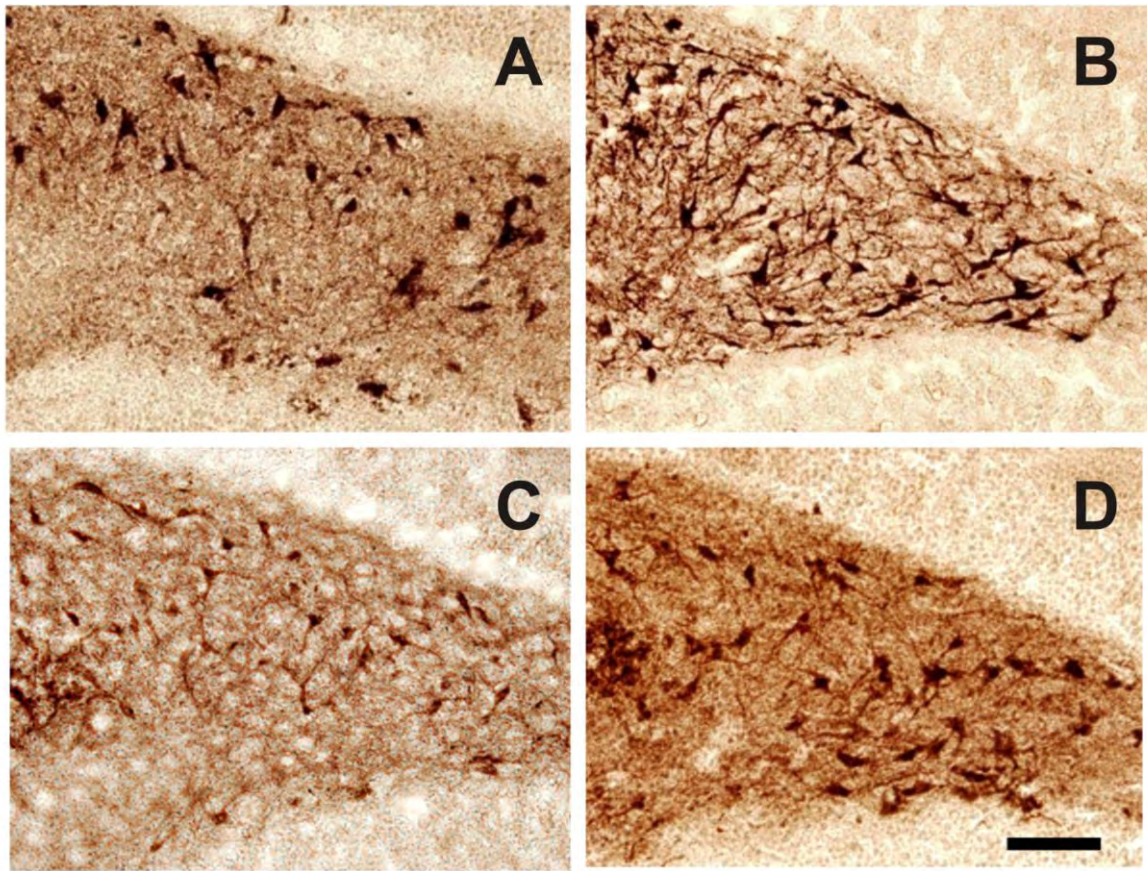
La ROCK es una enzima que se encuentra río abajo de la vía de señalización de la PKC y participa en la dendritogénesis (Bellon *et al.*, 2007), por lo que se utilizó un inhibidor de la enzima, el Y-27632, para explorar su participación en la dendritogénesis inducida por MEL. Las rebanadas incubadas con el agonista de MEL, 8M-PDOT, en presencia del Y-27632 mostraron dendritas más largas, rectas y finas que forman complicadas redes de conexiones entre ellas (fig. 44). Con excepción del grosor de las dendritas primarias, los demás parámetros cuantificados incrementaron significativamente con respecto al VEH (Tabla 3 y 4, fig. 45 y 46). Estos datos indican que la estimulación de los receptores a melatonina aunado a la inhibición de ROCK podría activar otras vías de señalización que probablemente estén involucradas con otras GTPasas pequeñas.

Por el contrario, el Y-27632 bloqueó la mayoría de los efectos de la melatonina en la dendritogénesis, ya que casi todos los parámetros disminuyeron significativamente con respecto al VEH (Tabla 3 y 4, Fig. 44, 45 y 46), lo cual indica que la ROCK participa en la formación de dendritas primarias y secundarias, así como en el grosor de las dendritas primarias, la ramificación de las dendritas y la formación de terminaciones dendríticas.

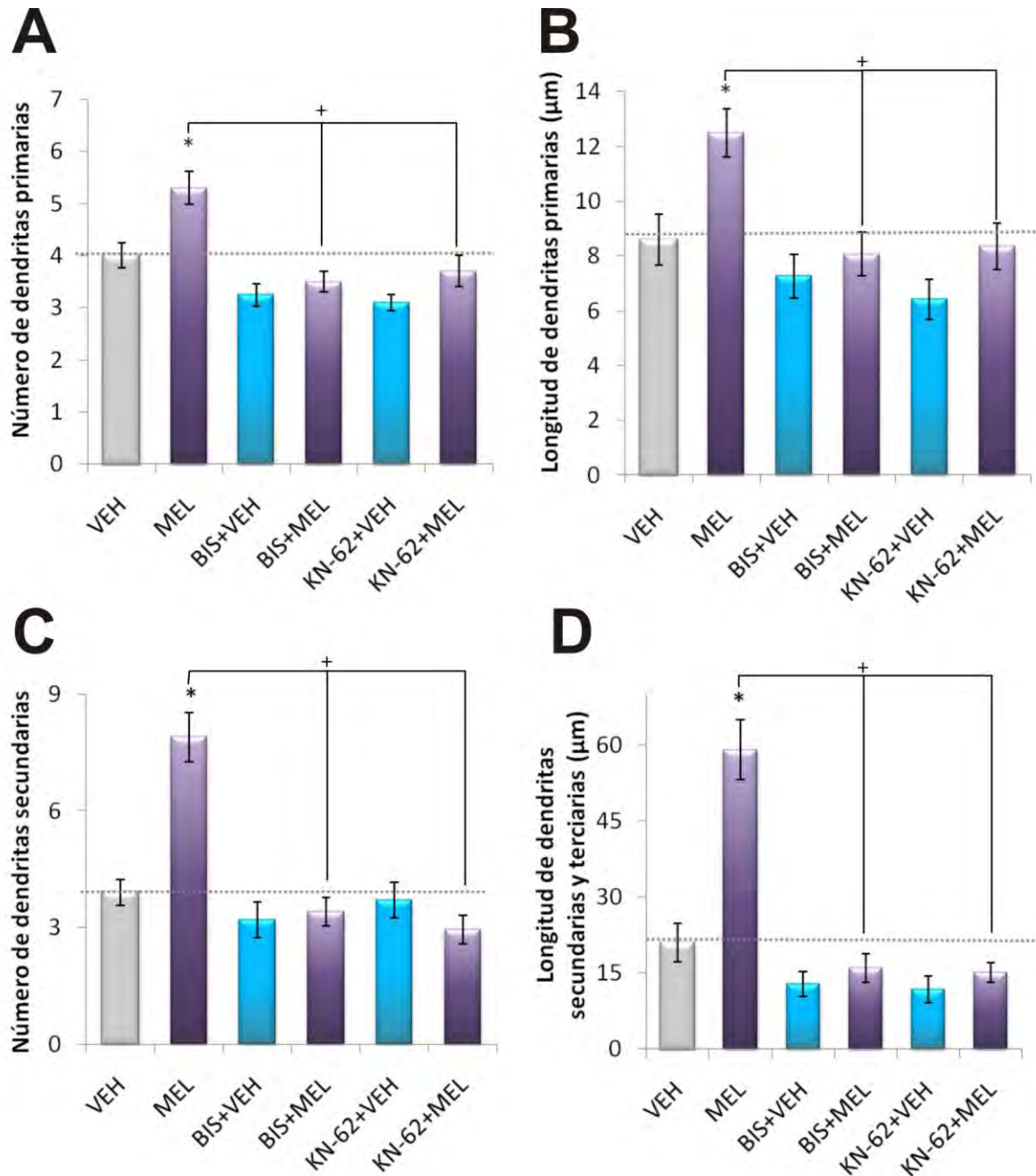
Por último, la participación de la CaM-Cinasa II en la dendritogénesis se determinó con un inhibidor selectivo de esta enzima denominado KN-62, el cual bloquea la unión de la calmodulina activada por calcio. En las rebanadas de hipocampo incubadas en presencia del KN-62 y de  $10^{-7}$  M de MEL se observaron neuronas bipolares y triangulares con dendritas cortas y escasamente gruesas, y carentes de complejidad (Fig. 41 D). Los valores obtenidos fueron significativamente menores para cada parámetro en comparación con el VEH y con el grupo incubado con MEL (Tabla 3 y 4; Fig. 42 y 43). Estos datos indican que la CaM-Cinasa II participa en el proceso de dendritogénesis inducido por la MEL.



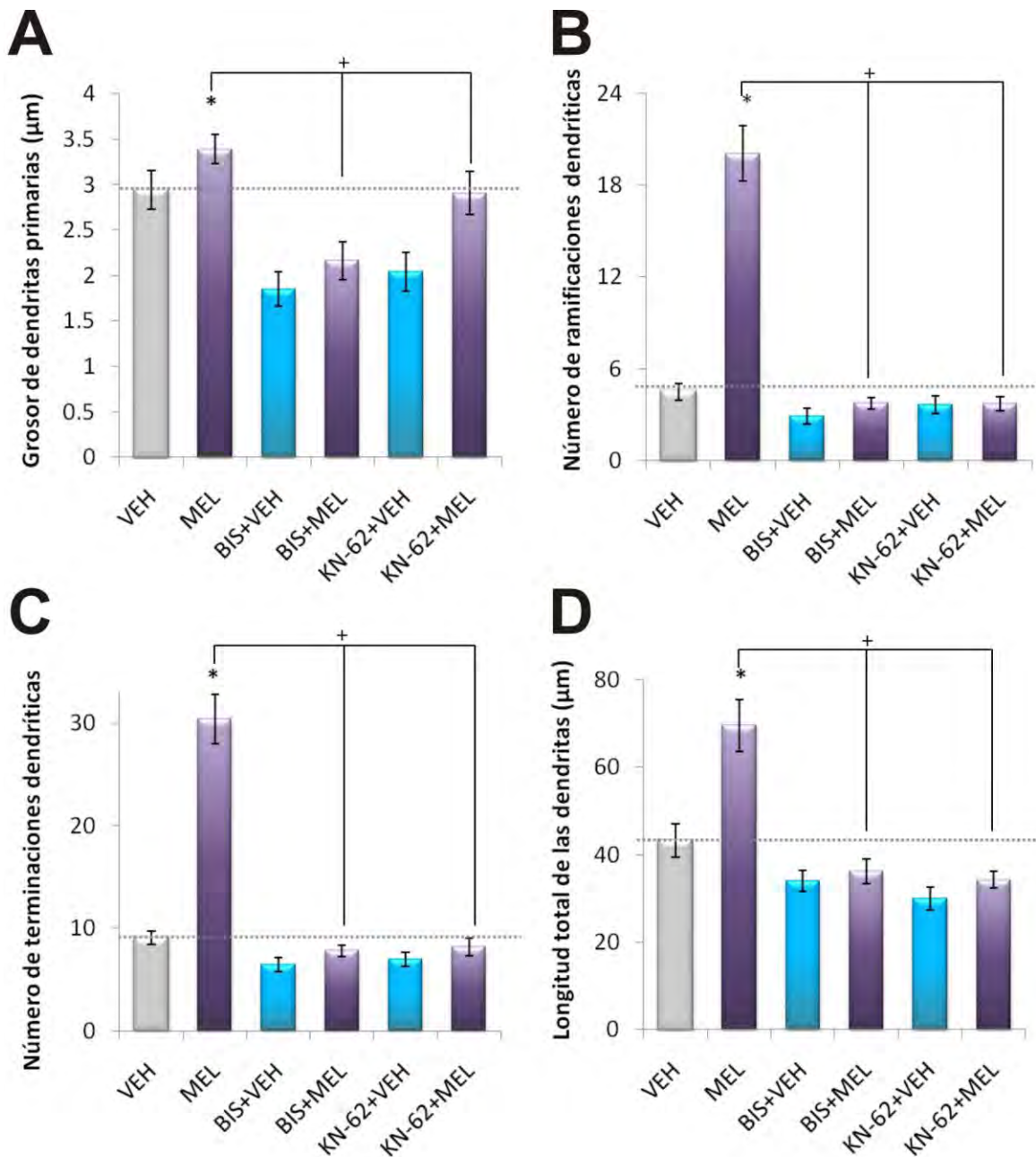
**Figura 40. Participación de la PKC en la dendritogénesis inducida por melatonina.** Las rebanadas de hipocampo con un grosor de 400  $\mu$ m se incubaron por 6 h con el vehículo (VEH, panel **A**) o  $10^{-7}$  M de MEL (panel **B**), o se pre-incubaron con 5  $\mu$ M de bisindolilmaleimida (inhibidor de PKC) seguido de una incubación con el VEH (panel **C**), o  $10^{-7}$  M de MEL (panel **D**) por 6 h. Posteriormente, los cortes de hipocampo de 50  $\mu$ m fueron teñidos con el anticuerpo anti-MAP2 seguido de un anticuerpo anti-ratón acoplado a biotina y peroxidasa de rábano para observar los cambios en la geometría y morfología de las dendritas, barra = 100  $\mu$ m.



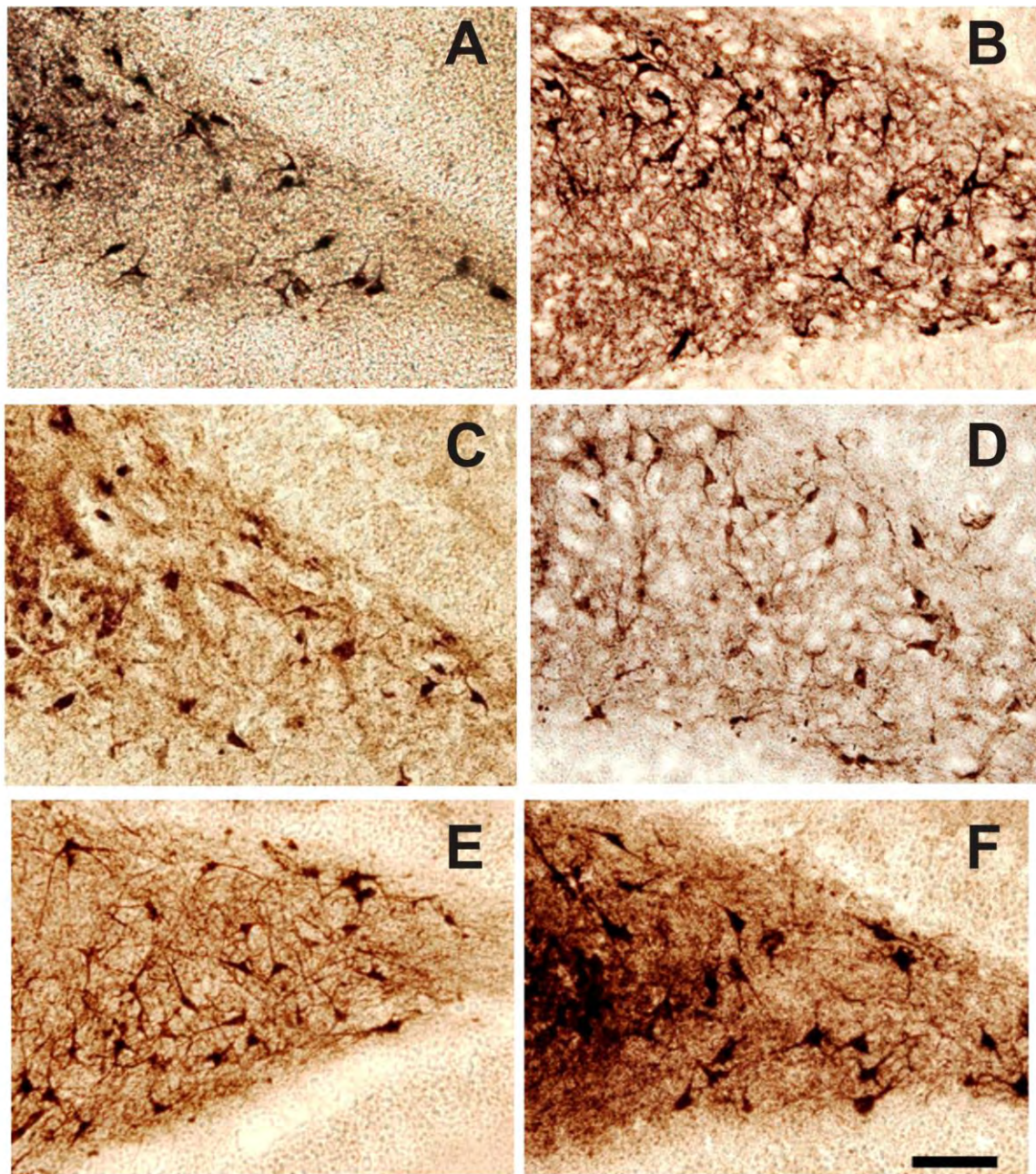
**Figura 41. Participación de la CaM-Cinasa II en la dendritogénesis inducida por melatonina.** Las rebanadas de hipocampo con un grosor de 400  $\mu$ m se incubaron por 6 h con el vehículo (VEH, panel **A**) o  $10^{-7}$  M de MEL (panel **B**), o se pre-incubaron con 10  $\mu$ M de KN-62 (inhibidor de CaM-Cinasa II) seguido de una incubación con el VEH (panel **C**), o  $10^{-7}$  M de MEL (panel **D**). Posteriormente, los cortes de hipocampo de 50  $\mu$ m fueron teñidos con el anticuerpo anti-MAP2 seguido de un anticuerpo anti-ratón acoplado a biotina y peroxidasa de rábano para observar los cambios en la geometría y morfología de las dendritas, barra = 100  $\mu$ m.



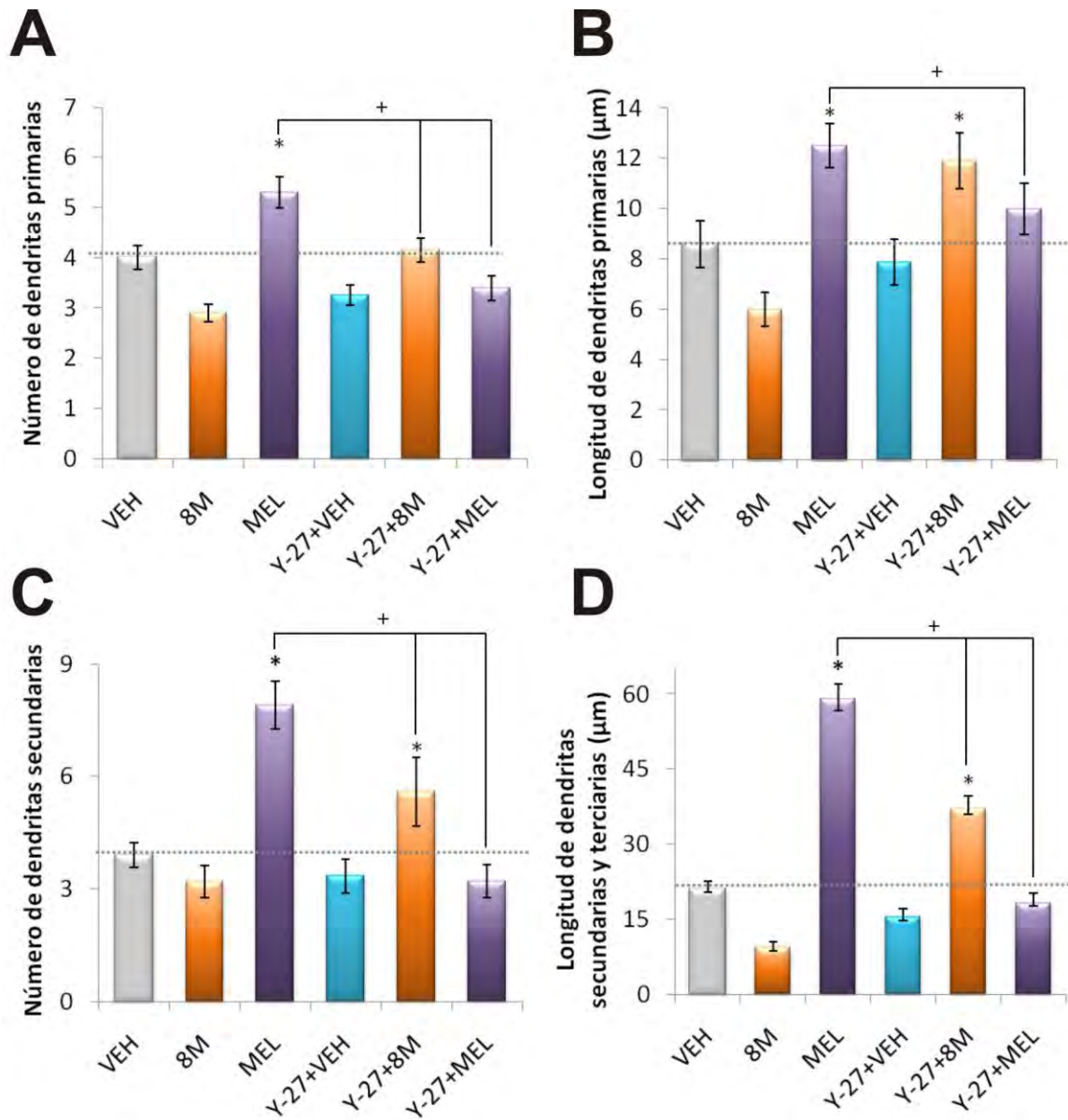
**Figura 42. Participación de la PKC y la CaM-Cinasa II en la formación y crecimiento de las dendritas en neuronas hilares.** Los cortes de hipocampo de 50 µm teñidos con el anticuerpo anti-MAP2 fueron analizadas por el método de Sholl. La formación de las dendritas se determinó por el número de dendritas primarias (panel A) y secundarias (panel B). El crecimiento de las dendritas se demostró con la longitud de las dendritas primarias (panel C) y secundarias (panel D). Los resultados representan la media ± el error estándar de la media de un experimento realizado por cuadruplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas comparadas con las rebanadas incubadas con el VEH ( $p < 0.05$ ), y el signo (+) indica diferencia significativa comparando las rebanadas incubadas con MEL con respecto a las incubadas con BIS+MEL y KN-62+MEL ( $p < 0.05$ ).



**Figura 43. Participación de la PKC y la CaM-Cinasa II en el grosor de las dendritas primarias y la complejidad de las dendritas en neuronas hilares.** Los cortes de hipocampo de 50 µm teñidos con el anticuerpo anti-MAP2 fueron analizadas por el método de Sholl para determinar el grosor de las dendritas primarias (panel **A**). La complejidad dendrítica se demostró con el número de ramificaciones (panel **B**) y el número de terminaciones dendríticas (panel **C**), así como la longitud total de la dendrita (panel **D**). Los resultados representan la media ± el error estándar de la media de un experimento realizado por cuadruplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas comparadas con las rebanadas incubadas con el VEH ( $p < 0.05$ ), y el signo (+) indica diferencia significativa comparando las rebanadas incubadas con MEL con respecto a las incubadas con BIS+MEL y KN-62+MEL ( $p < 0.05$ ).

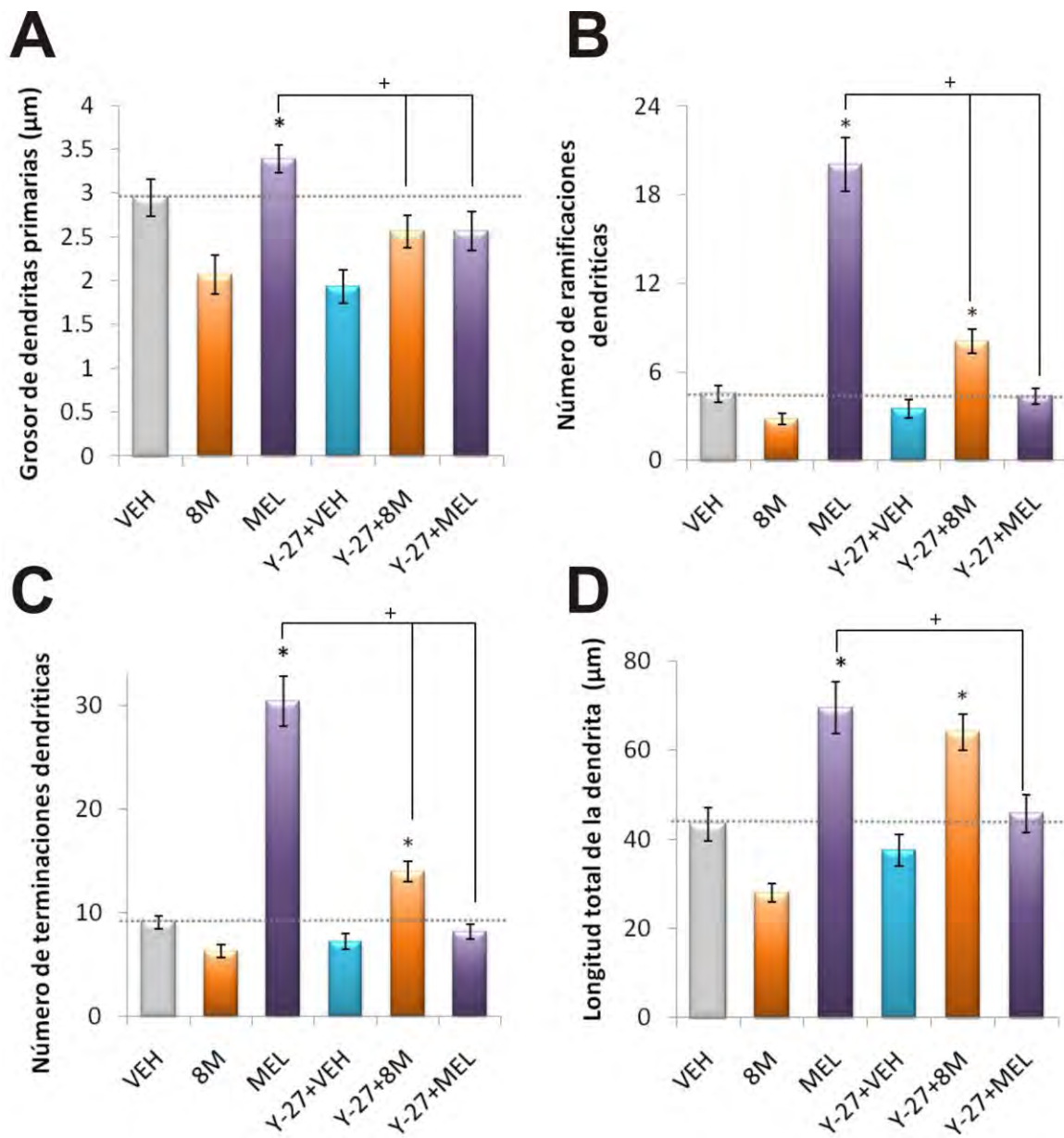


**Figura 44. Efecto del compuesto Y-27632 en la dendritogénesis inducida por melatonina.** Las rebanadas de hipocampo con un grosor de 400  $\mu\text{m}$  se incubaron por 6 h con el vehículo (VEH, panel A) o  $10^{-7}$  M de MEL (panel B) o 10nM del agonista 8M-PDOT (panel C), o se pre-incubaron con 5 $\mu\text{M}$  de Y-27632 (inhibidor de ROCK) seguido de una incubación con el VEH (panel D), o el agonista 8M-PDOT (panel E), o  $10^{-7}$  M de MEL (panel F). Posteriormente, los cortes de hipocampo de 50  $\mu\text{m}$  fueron teñidos con el anticuerpo anti-MAP2 seguido de un anticuerpo anti-ratón acoplado a biotina y peroxidasa de rábano para observar los cambios en la geometría y morfología de las dendritas, barra = 100  $\mu\text{m}$ .



**Figura 45. Participación de la ROCK en la formación y el crecimiento de las dendritas en neuronas hilares.** Los cortes de hipocampo de 50 µm teñidos con el anticuerpo anti-MAP2 fueron analizadas por el método de Sholl. La formación de las dendritas se determinó por el número de dendritas primarias (panel A) y secundarias (panel B). El crecimiento de las dendritas se demostró con la longitud de las dendritas primarias (panel C) y secundarias (panel D). Los resultados representan la media ± el error estándar de la media de un experimento realizado por cuadruplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas comparadas con las rebanadas incubadas con el VEH ( $p < 0.05$ ), y el signo (+) indica diferencia significativa comparando las rebanadas incubadas con MEL con respecto a las incubadas con Y-27+8M y Y-27+MEL ( $p < 0.05$ ).





**Figura 46. Participación de la ROCK en el grosor de las dendritas primarias y la complejidad de las dendritas en neuronas hilares.** Los cortes de hipocampo de 50 µm teñidos con el anticuerpo anti-MAP2 fueron analizadas por el método de Sholl para determinar el grosor de las dendritas primarias (panel **A**). La complejidad dendrítica se demostró con el número de ramificaciones (panel **B**) y el número de terminaciones dendríticas (panel **C**), así como la longitud total de la dendrita (panel **D**). Los resultados representan la media ± el error estándar de la media de un experimento realizado por cuadruplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas comparadas con las rebanadas incubadas con el VEH ( $p < 0.05$ ), y el signo (+) indica diferencia significativa comparando las rebanadas incubadas con MEL con respecto a las incubadas con Y-27+8M y Y-27+MEL ( $p < 0.05$ ).

## XII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se encontró que la concentración fisiológica de MEL ( $10^{-7}$  M) aumenta la formación, el crecimiento y la complejidad de las dendritas de las neuronas hilares en un modelo organotípico de hipocampo de rata. Estos efectos son mediados por la CaM-Cinasa II que no involucra a los receptores membranales de MEL. Los efectos de la MEL estimulan la dendritogénesis temprana, y también involucran la estimulación de la PKC y de la ROCK que en conjunto con la participación de la CaM-Cinasa II, promueven la formación del árbol dendrítico.

Los cultivos organotípicos son un buen modelo para estudiar la dendritogénesis. El uso de éstos se ha incrementado en los últimos años, y se han establecido las condiciones experimentales para cultivar rebanadas de diferentes regiones cerebrales como son el hipocampo, el cerebelo y la corteza, entre otros (Cho *et al.*, 2007). En la región del hipocampo, éstos cultivos se han empleado en el estudio del daño cerebral, neuroprotección y neuroreparación en respuesta a los efectos de moléculas terapéuticas (Noraberg *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2007, Ortiz *et al.*, 2001), hormonas (Prieto-Gómez *et al.*, 2008; Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2010), factores de crecimiento (Tran *et al.*, 2009; Ji *et al.*, 2010) y agentes farmacológicos (Wang *et al.*, 2006). Por otro lado, estos cultivos conservan su viabilidad durante varias semanas, ya que el tejido nervioso hipocampal puede mantenerse adherido a una matriz porosa que forma la interface entre un medio nutritivo y una atmósfera húmeda (Stoppini *et al.*, 1991; Gogolla *et al.*, 2006). También este modelo permite conservar la arquitectura tridimensional de las conexiones sinápticas del hipocampo (Gähwiler *et al.*, 1987, 1997; Gogolla *et al.*, 2006; Galimberti *et al.*, 2006), así como un ambiente *ex vivo* adecuado para estudiar las neuropatologías en el cerebro de animales maduros con una edad de 14-40 días en adelante, sin necesidad de recurrir a los modelos animales, ya que se pueden replicar las condiciones del microambiente que los rodea (Gogolla *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2007). En el presente trabajo se lograron establecer condiciones de cultivo para mantener los cultivos organotípicos de hipocampo obtenidos de ratas machos Wistar con una edad mayor a lo reportado (52-56 días de edad).

En las dendritas de las neuronas del hipocampo, los microtúbulos tienen una polaridad mixta (Kwan *et al.*, 2008, Dombeck *et al.*, 2002), que se estabilizan a través de puentes moleculares formados por las proteínas MAP2. Estas proteínas se expresan en todas las etapas de la morfogénesis neuronal (Cáceres *et al.*, 1986). Sus isoformas interaccionan con los componentes del neurocitoesqueleto, estabilizando los microtúbulos y modificando la organización de los microfilamentos de forma directa o indirecta para iniciar la formación de lamelipodios y de neuritas en las células de

neuroblastoma y en las células aisladas de hipocampo (Dehmelt *et al.*, 2003, Kim *et al.*, 1979 Selden and Pollard, 1983, 1986; Sattilaro, 1986). Esta proteína abandona los axones para reubicarse y acumularse en las dendritas en las etapas tardías del desarrollo neuronal (Bernhardt and Matus, 1984; Caceres *et al.*, 1986). Por lo tanto, la MAP2 actúa en etapas tempranas y tardías de este desarrollo (Dehmelt *et al.*, 2003), y su presencia es importante para la formación de los conos de crecimiento, la organización y densidad de los microtúbulos presentes en las dendritas, así como en la longitud de éstas (Teng *et al.*, 2001; Harada *et al.*, 2002).

La dendritogénesis es un proceso que involucra el brote, el crecimiento y la ramificación de las dendritas (Dailey y Smith *et al.*, 1996; Scott *et al.*, 2001). En este proceso se acumulan las proteínas necesarias en los conos de crecimiento tales como los componentes del citoesqueleto, las proteínas asociadas al citoesqueleto (MAP2 y STOP) (Kaufmann *et al.*, 2000; Dotti *et al.*, 2002; Baratier *et al.*, 2006), y las proteínas de adhesión a la matriz extracelular (Yuh-Nung *et al.*, 2001; Dotti *et al.*, 2002; Lowery *et al.*, 2009). Las MAP2 y STOP se han utilizado como marcadores de dendritas, ya que constituyen la estructura de los filipodios o lamelipodios (Vaillant *et al.*, 2002; Dehmelt y Halpain, 2004; Baratier *et al.*, 2006) que son fenotipos del citoesqueleto característicos de la dendritogénesis temprana. También las MAP2 forman la estructura de las dendritas maduras y sus terminaciones. Debido a lo anterior se empleó un anticuerpo específico que reconoce a la proteína MAP2 para estudiar los efectos de la MEL sobre la dendritogénesis.

En estudios previos realizados se ha demostrado que la MEL tiene un efecto neuroprotector al actuar como un captador de radicales libres (Poeggeler *et al.*, 1993; Reiter, 2000, Tan *et al.*, 1993, 2002) y como un modulador del citoesqueleto (Benítez-King *et al.*, 2006). También, se ha observado que la MEL puede prevenir, proteger y revertir los daños causados por el ácido ocadáico, ya que la indolamina mantiene la estructura del soma y las neuritas de las células N1E-115 en presencia de este compuesto (Benítez-King *et al.*, 2003).

Por otro lado, la MEL ha demostrado que bloquea la desorganización del citoesqueleto, así como la formación de radicales libres y de lipoperóxidos causados por el tratamiento de estas células con el antipsicótico haloperidol (Benítez-King *et al.*, 2010) y el peróxido de hidrógeno (Benítez-King *et al.*, 2005). Esta indolamina reorganiza el citoesqueleto de las células N1E-115 para la formación de conos de crecimiento y de neuritas a través de un mecanismo independiente de receptores a MEL (Benítez-King *et al.*, 2006; Benítez-King *et al.*, 2010). En las células N1E-115 se demostró que la MEL induce la reorganización de los microfilamentos de actina en el proceso de neuritogénesis temprana a través de proteínas calcio dependientes (Anton-Tay *et al.*, 1998; Soto-Vega *et al.*, 2005; Benítez-King *et al.*, 2001) y de la ROCK (Bellon *et al.*, 2007).

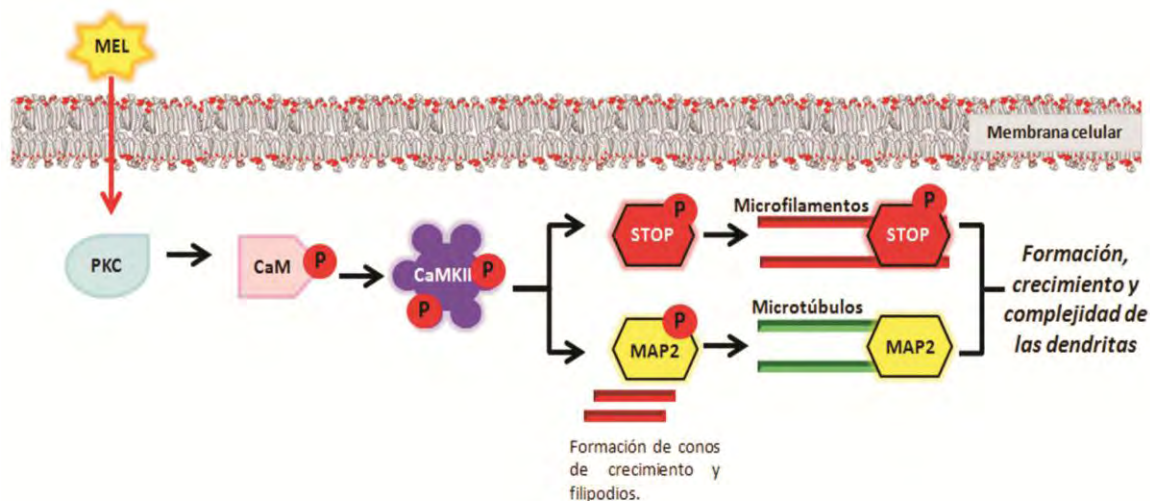
Los resultados presentados en este trabajo demuestran que la concentración nanomolar de  $10^{-7}$  M de MEL aumenta la formación, el crecimiento y la complejidad dendrítica de estas neuronas maduras del hilus del hipocampo obtenidas de ratas adultas. También participa en el inicio de la neuritogénesis, ya que se observó que forma dendritas primarias cortas que emergen del soma neuronal. Además, los datos obtenidos indican que los efectos de la MEL sobre la dendritogénesis se producen con concentraciones semejantes a las que se liberan a través del nicho pineal hacia el fluido cerebroespinal ( $10^{-7}$ M) (Tricoire *et al.*, 2002; Hardeland *et al.*, 2006). Por otro lado, el tiempo óptimo de incubación con MEL para favorecer la dendritogénesis es de 6 h, mientras que su efecto inicial sobre las dendritas se observó a las tres horas y su efecto máximo sobre la longitud de las dendritas se encontró a las 12 h. Estos datos indican que la MEL estimula la dendritogénesis con concentraciones semejantes a la que se producen de manera endógena durante la noche (Arendt, 1998). Una explicación al hecho de que los efectos de la MEL en los cultivos organotípicos persistan a las 12 horas de incubación, podría ser sustentada por el hecho de que el metabolismo de esta indolamina en el cerebro ha demostrado un patrón de eliminación multifásico con tiempos de vida media de 3.04, 36 min y 24 horas (Anton-Tay *et al.*, 1988).

La MEL es una molécula que posee propiedades anfífilas, por lo que atraviesa las barreras biológicas como la membrana plasmática y la barrera hematoencefálica (Reiter, 1990). En consecuencia, la indolamina se distribuye en la fase acuosa y lipídica de los diferentes compartimentos celulares (Tan *et al.*, 2002; Hardeland *et al.*, 2006). En este sentido se sabe que la MEL puede ejercer sus efectos en las neuronas mediante tres mecanismos de acción, vía receptores membranales, receptores nucleares tipo huérfanos retinoidales ROR/RZR (Sharma *et al.*, 2008; Smirnov *et al.*, 2001), o actuando directa o indirectamente sobre proteínas intracelulares calcio dependientes como la calmodulina (CaM) y la proteína cinasa C (PKC) (Menendez-Pelaez y Reiter 1993; Soto-Vega *et al.*, 2004). Estos dos mecanismos de acción desencadenan una cascada de eventos moleculares entre los que se encuentran la fosforilación de enzimas y de proteínas para activar diferentes funciones fisiológicas tanto a nivel citoplasmático como nuclear. En este trabajo se demostró la participación de las enzimas PKC, CaM- Cinasa II y ROCK, ya que los inhibidores específicos de cada una de estas enzimas bloquearon el proceso de dendritogénesis mediado por MEL. Además, se demostró que este mecanismo no es mediado por la estimulación de los receptores membranales de MEL, ya que el agonista de estos receptores, 8M-PDOT, no estimuló la formación, el crecimiento y la complejidad de las dendritas nuevas. Aunado a esto se encontró que el antagonista de los receptores, luzindol, inhibió parcialmente el proceso de dendritogénesis inducido por la MEL. Estos datos apoyan que la acción de la MEL actúa principalmente a nivel intracelular en la dendritogénesis de las neuronas del hilus, ya que el antagonista se empleó 5000 veces por

encima de la constante inhibitoria ( $KI= 20nM$ ). A pesar de lo anterior no se descarta la participación de los receptores membranales a melatonina en este proceso.

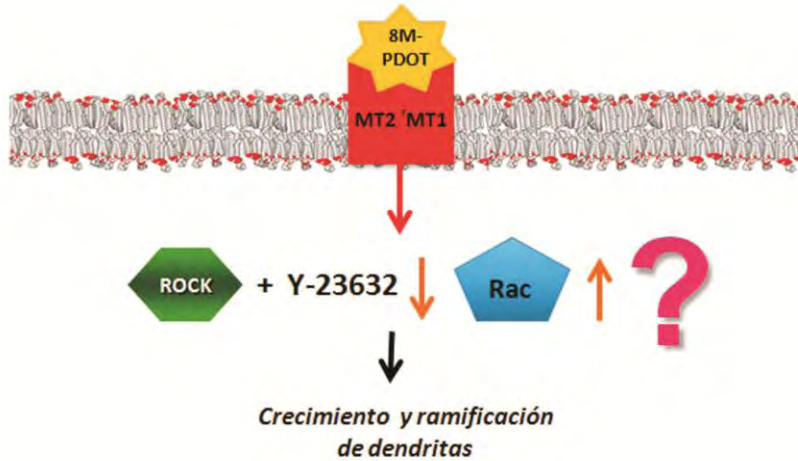
En trabajos anteriores se demostró que la MEL cruza las membranas celulares (Costa *et al.*, 1995) y que modifica el citoesqueleto neuronal a través del antagonismo de CaM (Huerto-Delgadillo *et al.*, 1994) y por medio de la activación de la PKC (Soto-Vega *et al.*, 2005). Además en las células epiteliales MDCK se demostró que la MEL induce la fosforilación de la calmodulina y su traslado de la fracción citoplasmática a la fracción citoesqueleto–membranal a través de la activación de la PKC (Antón-Tay *et al.*, 1998; Soto-Vega *et al.*, 2005). Esta evidencia y los datos encontrados en este trabajo sugieren que existe un lenguaje cruzado entre la vía de señalización de la CaM-Cinasa II y de la PKC desencadenado por la señal de la MEL. Este concepto es apoyado por el hecho de que el inhibidor específico de la PKC bloquea la dendritogénesis inducida por MEL. Además, datos no publicados en las células N1E-115 indican que la CaM-Cinasa II se traslada de la fracción citoplasmática a la fracción citoesqueleto-membranal a través de la MEL. También se ha demostrado que la CaM-Cinasa II se transporta y acumula en las densidades postsinápticas mediante la activación de la PKC y la presencia de la actina filamentosa (Fong *et al.*, 2002).

Este traslado de la CaM-Cinasa II a la fracción citoesqueleto-membranal podría implicar que dicha enzima tuviera contacto con algunos sustratos del citoesqueleto como las MAP2 y la STOP (Fink y Meyer, 2002). La proteína MAP2 tiene un papel dual, ya que al estar fosforilada puede interactuar con los microfilamentos de actina para la formación de filipodios, en tanto que en su estado desfosforilado estabiliza los microtúbulos de las dendritas (Sánchez *et al.*, 2000; Vaillant *et al.*, 2002). Mientras que la proteína STOP, en estado fosforilado se asocia a los microfilamentos de actina para estabilizar los conos de crecimiento y las dendritas (Baratier *et al.*, 2006). Estas evidencias aunadas a lo encontrado en el presente trabajo sobre la participación de la CaM-Cinasa II en la dendritogénesis inducida por MEL sugieren que las proteínas MAP2 y STOP podrían intervenir en la formación, el crecimiento y la complejidad dendrítica. Con base en lo anterior en la figura 47 se presenta un esquema que muestra el probable mecanismo de acción de la MEL a través del cual promueve la formación, el crecimiento y la complejidad de las dendritas en la neuronas hilares del hipocampo.



**Figura 47. Participación de la PKC y CaM-Cinasa II sobre la dendritogénesis en las neuronas hilares de cultivos organotípicos de hipocampo.**

Adicionalmente, en el presente trabajo también se encontraron dos fenómenos de la dendritogénesis, que ocurren por la interacción del antagonista y del agonista con los receptores membranales de MEL. Uno de ellos es un incremento del número de dendritas secundarias causado por el luzindol, un antagonista del receptor a MEL, el cual podría estar relacionado con los efectos anti-depresivos que este antagonista se ha sugerido que ejerce sobre ratones C3H/HeN con una deleción del gen que codifica para cualquiera de los receptores a melatonina MT1 y MT2 (Dubocovich *et al.*, 1990). El otro fenómeno involucra la participación de los receptores membranales de MEL aunado a la inhibición de ROCK. En el crecimiento de las dendritas primarias y secundarias, así como en el aumento de la complejidad del árbol dendrítico a nivel de dendritas secundarias y terciarias (fig. 48). Se ha descrito que la activación de ROCK es antagónica a Rac, es decir cuando se inhibe la actividad de ROCK, se activa Rac y se produce la formación de lamelipodios para la migración y la invasión celular (Salhia *et al.*, 2005). Chan y colaboradores (2002) demostraron la estimulación de c-Jun por los receptores membranales de melatonina, MT1 y MT2. Esto podría sugerir un contacto con la proteína Rac, ya que ésta es dependiente de la vía de señalización de c-Jun (Chan *et al.*, 2002).



**Figura 48. Participación de los receptores de melatonina aunado a la inhibición de ROCK sobre la dendritogénesis en las neuronas hilares de cultivos organotípicos de hipocampo.**

A la fecha existen pocas evidencias sobre los efectos de la MEL sobre la dendritogénesis en neuronas del hipocampo. Sin embargo, se ha demostrado que la MEL participa en la formación de procesos citoplasmáticos en células MDCK, y en las células N1E-115, la MEL induce la formación y el crecimiento de neuritas hasta formar intrincadas redes de conexión (Benítez-King *et al.*, 1990). Además, la MEL induce el rearrreglo de los microfilamentos de actina en etapas tempranas de la neuritogénesis de las células N1E-115 (Bellon *et al.*, 2007). En estas mismas células también se observó que el tratamiento con MEL incrementa la cantidad relativa de la proteína MAP2, así como la longitud y el número de neuritas (Meléndez *et al.*, 1996). Conforme a lo anterior, la administración crónica de MEL también ha demostrado que atenúa la disminución de la proteína MAP2 en la región de CA1 y CA3 del hipocampo en modelo animal durante el proceso de envejecimiento (Prieto-Gómez *et al.*, 2008).

Por otro lado, se ha demostrado el efecto neuroprotector de la MEL en neuronas piramidales de la corteza cerebral en un modelo de isquemia cerebral. En este modelo, el tratamiento con MEL protege la citoarquitectura de éstas células y evita las alteraciones en la longitud y número de bifurcaciones en las dendritas basales y apicales, así como en la densidad y tipo de las espinas dendríticas (García-Chávez *et al.*, 2008). Recientemente, Pascual y colaboradores (2010) demostraron que la MEL protege las neuronas piramidales de las capas II y III de la corteza del daño producido por el vapor de tolueno, e incrementa la complejidad del árbol dendrítico de estas neuronas en un modelo *in vivo* (Pascual y Bustamante, 2010). También se ha observado que el tratamiento crónico con esta indolamina incrementa la complejidad del árbol dendrítico de las células granulares del giro dentado (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2010). Los resultados presentados en este trabajo demostraron que la concentración de MEL encontrada en el fluido cerebroespinal ( $10^{-7}$  M) modificó la geometría y morfología de las neuronas, y aumentó la formación, el

crecimiento y la complejidad de las dendritas de las neuronas hilares en un modelo organotípico de hipocampo de rata.

En las demencias se ha demostrado que los niveles del plasma y del fluido cerebroespinal de la MEL están disminuidos en estos pacientes (Uchida *et al.*, 1996; Ohashi *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999), lo que podría estar relacionado con la atrofia y la integridad funcional del hipocampo (Squire *et al.*, 2008; Andersen *et al.*, 2007), y por lo tanto también con la pérdida de los árboles dendríticos (Buell *et al.*, 1979; Stuart *et al.*, 2008), de las conexiones sinápticas, y de la cognición que es regulada en esta región del cerebro (Samuel *et al.*, 1994; Pasantés *et al.*, 1999; Tiraboshi *et al.*, 2000; Squire *et al.*, 2008). Además, en las demencias se ha observado que las anomalías estructurales de las dendritas podrían explicarse por el colapso del neurocitoesqueleto y la disminución de la proteína MAP2 (Kowall y Kosik, 1987; Squire *et al.*, 2008; Bamburg y Bloom, 2009; Alonso *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2007). Todo lo anterior podría ser la base microanatómica para afectar la circuitería neuronal y provocar el decremento en la memoria, el aprendizaje y de la cognición de los pacientes con demencia (Burns *et al.*, 2002; URL1).

Los hallazgos del presente trabajo sobre la dendritogénesis sugieren que la MEL tiene un efecto neuroprotector sobre las neuronas de la capa polimórfica o hilus del hipocampo. En este proceso, la CaM-Cinasa II es una enzima clave por su participación en los procesos de la memoria y el aprendizaje (Lisman *et al.*, 2002). Además, se ha demostrado que la melatonina previene el colapso del citoesqueleto neuronal causado por el AO en células de neuroblastoma N1E-115 (Benítez-King *et al.*, 2003, 2006). Esta evidencia y los resultados de este trabajo sugieren que la MEL podría proteger la pérdida significativa de las neuronas hilares que se produce por la excitotoxicidad (Buckmaster *et al.*, 1994) y que se presenta por la demencia de tipo Alzheimer (Westa *et al.*, 2004), la enfermedad Parkinson (Galvin *et al.*, 1999) y la epilepsia del lóbulo temporal (Seress *et al.*, 2009).

Además, estos efectos de la MEL sobre el aumento de la dendritogénesis también podrían restablecer el circuito trisináptico del hipocampo por el incremento de las probabilidades de conexión y la estimulación por medio de la formación, el crecimiento y la complejidad dendrítica de las neuronas pre-existentes del hilus del giro dentado. Lo anterior es sustentado dado que la MEL y la proteína MAP2 tienen un papel crucial en las funciones dendrito-sinápticas en la plasticidad neuronal que es necesaria para los procesos de memoria y aprendizaje (Chan *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2000). Asimismo, en un estudio reciente se demostró que el tratamiento crónico de MEL aumento la complejidad dendrítica de las neuronas nuevas que se forman en la capa subgranular del giro dentado en un modelo *in vivo* (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2010). Además, las conexiones axo-dendríticas que van de las neuronas de la capa granular del giro dentado hacia las células musgosas del hilus y a las células piramidales de la región CA3 se



refuerzan por la estimulación de la dendritogénesis (Andersen *et al.*, 2009, Yuh-Nung *et al.*, 2001). También las conexiones dendro-dendríticas que van del hilus a la capa molecular del giro dentado también se refuerzan, teniendo como consecuencia que las señales que se reciben a nivel de la corteza cerebral se podrían integrar adecuadamente obteniendo una notable mejora en las funciones de memoria, aprendizaje y cognición. Estos efectos clínicos de la MEL están apoyados por los estudios realizados por Cardinali y colaboradores, en los cuales un tratamiento con 3 a 9 mg de MEL de liberación rápida mejora los trastornos del sueño y las deficiencias cognitivas en pacientes con Alzheimer (Furio *et al.*, 2007; Brusco *et al.*, 1999). Todo esto sugiere que la MEL podría ser un coadyuvante útil en el tratamiento de las demencias, aunque esto necesitará de otros estudios clínicos sobre los efectos de esta indolamina.

### **XIII. CONCLUSIÓN**

La MEL estimula la dendritogénesis temprana y tardía de las neuronas del hilus del hipocampo con concentraciones fisiológicas ( $10^{-9}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$  M). Estos efectos de la MEL sobre la dendritogénesis incluyen el incremento de la formación, el crecimiento y la complejidad de las dendritas, así como los cambios en la geometría y morfología de éstas. La MEL actúa principalmente a nivel intracelular para inducir la dendritogénesis con la participación de la CaM-Cinasa II; sin embargo, no se descarta la participación de los receptores membranales de MEL en este proceso. Además, la indolamina también involucra la estimulación de la PKC y de la ROCK que en conjunto con la participación de la CaM-Cinasa II promueven la formación del árbol dendrítico.

Estos resultados sugieren que la MEL tiene un efecto neuroprotector en las neuronas pre-existentes de la capa polimórfica o hilus del hipocampo. Además sugieren que esta indolamina podría ser un coadyuvante útil en el tratamiento de las demencias al modificar la citoarquitectura neuronal mediante la reparación de las dendritas perdidas y al aumentar las probabilidades de las dendritas para restablecer conexiones sinápticas del circuito trisináptico produciendo cambios en la plasticidad neuronal del hipocampo.

### **XIV. PERSPECTIVAS**

En este trabajo se encontró que la MEL estimula la dendritogénesis mediante la participación de la CaM-Cinasa II. Además, se sugiere que podría existir un lenguaje cruzado entre la vía de señalización de la CaM-Cinasa II y la PKC desencadenado por la señal de MEL. La CaM es una proteína que une calcio para efectuar sus acciones. Además se ha demostrado que la PKC es capaz de trasladar a la CaM de la fracción citosólica a la fracción citoesqueleto-membranal (Soto-Vega et al. 2005), y que la CaM-Cinasa II es activada por esta misma (Lisman *et al.*, 2002; Fink y Meyer, 2002). Por lo que, en las perspectivas de este trabajo se encuentra el explorar si la fosforilación de CaM mediada por PKC y su traslado a la fracción citoesqueleto-membranal podrían participar en la dendritogénesis, y así, conectar ambas vías de señalización.

Además, en la dendritogénesis inducida por la MEL, se proponen como sustratos de la CaM-Cinasa II a las proteínas MAP2a y a la STOP. Estas proteínas son capaces de asociarse tanto a microtúbulos y a microfilamentos dependiendo de su estado fosforilado o no fosforilado (Sánchez *et al.*, 2000, Baratier *et al.*, 2002). Actualmente, en el laboratorio de Neurofarmacología del INPRF se ha planteado cuantificar el grado de fosforilación de estas proteínas en las rebanadas de hipocampo tratadas con el vehículo o con la melatonina en presencia y ausencia del inhibidor de la CaM-Cinasa II, el KN-62.

## XV. BIBLIOGRAFÍA

1. Abe M, Itoh MT, Miyata M, Ishikawa S, Sumi Y. Detection of Melatonin, Its Precursors and Related Enzyme Activities in Rabbit Lens. *Exp. Eye Res.*, 1999; 68: 255-262.
2. Acuña-Castroviejo D, Coto-Montes A, Gaia MM, Ortíz GG, Reiter RJ. Melatonin is protective against MPTP-induced striatal and hippocampal lesions. *Life Sci.*, 1997; 60: L23-L29.
3. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 1996. *Biología molecular de la célula*. Cuarta edición. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, España. Págs. 843-924.
4. Alonso AC, Grundke-Iqbal I, Barra HS, Iqbal K. Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: Sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 298–303.
5. Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, eds. 2009. *The Hippocampus book*. Chapter 2: Historical Perspective by Andersen *et al.* and Chapter 3 Hippocampal neuroanatomy. Oxford University Press. United States. Pages 3-115
6. Andrieux A, Salin PA, Vernet M, Kujala P, Baratier J, Gory-Faure S, Bosc C, Pointu H, Proietto D, Schweitzer A, Denarier E, Klumperman J, Job D. The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes Dev.*, 2002; 16: 2350–2364.
7. Antón-Tay F, Forray C, Ortega-Corona BG. Subneuronal fate of intracerebroventricular injected 3H-melatonin. *J Pineal Res.*, 1988; 5(2):125-33.
8. Antón-Tay F, Ramírez G, Martínez I, Benítez-King G. In vitro stimulation of protein kinase C by melatonin. *Neurochem. Res.*, 1998; 23: 605-610.
9. Antón-Tay F, Martínez I, Tovar R, Benítez-King G. Modulation of the subcellular distribution of calmodulin in MDCK cells. *J. Pineal Res.*, 1998; 24: 35-42.
10. Arendt T, Holzer M, Brückner MK, Janke C, Gärtner U. The use of okadaic acid in vivo and the induction of molecular changes typical for Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 1998; 85: 1337-1340.
11. Arendt J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Reviews of Reproduction*, 1998; 3, 13–22.

12. Arias C, Sharma N, Davies P, Shafit-Zagardo B. Okadaic Acid Induces Early Changes in Microtubule-Associated Protein 2 and  $\tau$  Phosphorylation Prior to Neurodegeneration in Cultured Cortical Neurons. *Journal of Neurochemistry*, 1993; 61: 673-682.
13. Arias C, Becerra-García F, Arrieta I, Tapia R. The Protein Phosphatase Inhibitor Okadaic Acid Induces Heat Shock Protein Expression and Neurodegeneration in Rat Hippocampus in Vivo. *Experimental Neurology*, 1998; 153: 242-254.
14. Arias C, Montiel T, Peña F, Ferrera P, Tapia R. Okadaic Acid Induces Epileptic Seizures and Hyperphosphorylation of NR2B Subunit of the NMDA Receptor in Rat Hippocampus in Vivo. *Experimental Neurology*, 2002; 177: 284-291.
15. Audesirk G, Cabell L, Kern M. Modulation of neurite branching by protein phosphorylation in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res Dev Brain Res.*, 1997; 102(2):247-60.
16. Avila J. Tau aggregation into fibrillar polymers: taupathies. *FEBS Letters*, 2000; 476: 89-92.
17. Baas PW, Black MM, Banker GA. Changes in microtubule polarity orientation during the development of hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol*, 1989; 109: 3085–3094.
18. Baldereschi M, Di Carlo A, Amaducci L. Epidemiología de las demencias. Prous Science, Thompson Reuters, 2008. Págs. 1-16
19. Bamberg JR, Bloom GS. Cytoskeletal Pathologies of Alzheimer Disease. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2009; 66(8): 635–649.
20. Banco Mundial. Informe sobre el desarrollo mundial 1993. Invertir en salud. Washington: Oxford Press, 1994.
21. Baratier J, Peris L, Brocard J, Gory-Fauré S, Dufour F, Bosc C, Fourest-Lieuvain A, Blanchoin L, Salin P, Job D, Andrieux A. Phosphorylation of microtubule-associated protein stop by calmodulin kinase II. *Journal of Biological Chemistry*, 2006; 281 (28): 19561-19569.
22. Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT. Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical, and Molecular Mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2002; 2, 113-132.
23. Bellon A, Ortíz-López L, Ramírez-Rodríguez G, Antón-Tay F, Benítez-King G. Melatonin induces neuritogenesis at early stages in N1E-115 cells through actin rearrangements via activation of protein kinase C and Rho-associated kinase. *J Pineal Res.*, 2007; 42(3):214-21.

24. 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.*, 1990; 9(3):209-20.
25. Benítez-King G, Ríos A, Martínez A, Antón-Tay F. In vitro inhibition of  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996; 1290: 191-196.
26. Benítez-King G, Hernández ME, Tovar R, Ramírez G. Melatonin activates PKC- $\alpha$  but not PKC- $\epsilon$  in N1E-115 cells. *Neurochemistry International*, 2001; 39: 95–102.
27. Benítez-King G, Túnez I, Bellon A, Ortíz GG, Antón-Tay F. Melatonin prevents cytoskeletal alterations and oxidative stress induced by okadaic acid in N1E-115 cells. *Experimental Neurology*, 2003; 182: 151-159.
28. Benítez-King G, Ortiz-López L, Jiménez-Rubio G. Melatonin precludes cytoskeletal collapse caused by hydrogen peroxide: participation of protein kinase C. *Therapy*, 2005; 2 (5):767-778.
29. Benitez-King G, Ramírez-Rodríguez G, Ortíz L, Meza I. The Neuronal Cytoskeleton as a Potential Therapeutical Target in Neurodegenerative Diseases and Schizophrenia *Current Drug Targets - CNS & Neurological Disorders*, 2006; 3, 515-533.
30. Benítez-King G, Ortíz-López L, Jiménez-Rubio G, Ramírez-Rodríguez G. Haloperidol causes cytoskeletal collapse in N1E-115 cells through tau hyperphosphorylation induced by oxidative stress: Implications for neurodevelopment. *Eur J Pharmacol.*, 2010; 644(1-3):24-31.
31. Benediktsson AM, Schachtele SJ, Green SH, Dailey ME. Ballistic labeling and dynamic imaging of astrocytes in organotypic hippocampal slice cultures. *J. Neurosci. Meth.*, 2005; 141: 41–53.
32. Bernhardt R, Matus A. Light and electron microscopic studies of the distribution of microtubule-associated protein 2 in rat brain: a difference between dendritic and axonal cytoskeleton. *J Comp Neurol.*, 1984; 226:203–221.
33. Bialojan C, Takai A. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem. J.*, 1988; 256: 283-290.
34. Bourne GH, Danielli JF. 1972. *International Review of Cytology*. Volumen 33, Capítulo III: Neuronal microtubules, neurofilaments and microfilaments. El Sevier, Ademic Press Inc. Págs. 46-59.

35. Bosc C, Cronk JD, Pirollet F, Watterson DM, Haiech J, Job D, Margolis RL. Cloning, expression, and properties of microtubule-stabilizing protein STOP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1996; 93: 2125–2130.
36. Bredesen DE, Rao RV, Mehlen P. Cell death in the nervous system. *Nature*, 2006; 443:796-802.
37. Brusco LI, Marquez M, Cardinali DP. Monozygotic twins Alzheimer's disease treated with melatonin: Case report. *J. Pineal Res.*, 1998; 25: 260-263.
38. Brusco LI, Fainstein I, Márquez M, Cardinali DP. Effect of melatonin in selected populations of sleep-disturbed patients. *Biol Signals Recept.*, 1999 ;8(1-2):126-31.
39. Brusco LI, Marquez M, Cardinali DP. Melatonin treatment stabilizes chronobiologic and cognitive symptoms in Alzheimer's disease. *Neuroendocrinol. Lett.*, 2000; 21: 39-42.
40. Buckmaster PS, Strowbridge BW, Schwartzkroin PA. A comparison of rat hippocampal mossy cells and CA3 pyramidal cells. *J Neurophysiol.*, 1993; 70 (4): 1281-99.
41. Buell SJ, Coleman PD. Dendritic growth in the aged human brain and failure of growth in senile dementia. *Science*, 1979; 206 (4420): 854-856
42. Burgin KE, Waxham MN, Rickling S, Westgate SA, et al. In situ hybridization histochemistry of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain. *J. Neurosci.*, 1990; 10: 1788–1798.
43. Burns A, Byrne EJ, Konrad M. Alzheimer's disease. *Lancet*, 2002; 360: 163–65.
44. Cáceres A, Banker GA, Binder L. Immunocytochemical localization of tubulin and microtubule-associated protein 2 during the development of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci.*, 1986; 6(3):714-22.
45. Cardinali DP, Furio AM, Reyes MP, Brusco LI. The use of chronobiotics in the resynchronization of the sleep–wake cycle. *Cancer Causes Control*, 2006; 17: 601–609.
46. Carrillo-Vico A, García-Mauriño S, Calvo JR, Guerrero JM. Melatonin counteracts the inhibitory effect of PGE<sub>2</sub> on IL-2 production in human lymphocytes via its mt1 membrane receptor. *FASEB J.*, 2003; 17(6): 755-7.
47. Caughey B, Baron GS. Prions and their partners in crime. *Nature*, 2006; 443: 803-810.
48. Chan AS, Lai FP, Lo RK, Voyno-Yasenetskaya TA, Stanbridge EJ, Wong YH. Melatonin MT1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. *Cell Signal.*, 2002; 14(3): 249-57.

49. Chen HV, Lipton SA. Mechanism of memantina block of NMDA- activated channels in rat retinal ganglion cells: uncompetitive antagonism. *Journal of physiology*, 1997; 499: 27-46.
50. Cho S, Wood A, Bowlby MR. Brain Slices as Models for Neurodegenerative Disease and Screening Platforms to Identify Novel Therapeutics. *Current Neuropharmacology*, 2007; 5, 19-33.
51. Citron M. Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2004; 5: 677– 685.
52. Colbran RJ, Brown AM. Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase and synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 2004; 14: 318-327.
53. Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni GJM. Evidence for Melatonin Synthesis in Mouse and Human Bone Marrow Cells. *J. Pineal Res.*, 2000; 28: 192-202.
54. Costa EJ, Lopes RH, Lamy-Freund MT. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *J Pineal Res.*, 1995; 19(3):123-126.
55. Da Silva JS, Dotti CG. Breaking the neuronal sphere: regulation of actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nature Reviews in Neuroscience*, 2002; 3: 694-704.
56. Dailey ME, Smith SJ. The Dynamics of Dendritic Structure in Developing Hippocampal Slices. *The Journal of Neuroscience*, 1996; 16(9):2983–2994.
57. Davis RC, Maloney MT, Minamide LS, Flynn KC, Stonebraker MA, Bamburg JR. Mapping cofilin-actin rods in stressed hippocampal slices and the role of cdc42 in amyloid beta-induced rods. *Journal of Alzheimer Disease*, 2009; 18(1): 35-50.
58. Dehmelt L, Smart FM, Ozer RS, Halpain S. The Role of Microtubule-Associated Protein 2c in the Reorganization of Microtubules and Lamellipodia during Neurite Initiation. *The Journal of Neuroscience*, 2003; 23(29):9479 –9490.
59. Dehmelt L and Halpain S. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biology*, 2004; 6:204
60. De Paola V, Arber S, Caroni P. AMPA receptors regulate dynamic equilibrium of presynaptic terminals in mature hippocampal networks. *Nat. Neurosci.*, 2003; 6: 491–500.
61. De Simoni A, Griesinger CB, Edwards FA. Development of rat CA1 neurons in acute versus organotypic slices: role of experience in synaptic morphology and activity. *J. Physiol.*, 2003; 550: 135–147.
62. De Simoni A, MY Yu L. Preparation of organotypic hippocampal slice cultures: interface method. *Nature Protocols*, 2006; 1(3):1439-1445.

63. Dombbeck DA, Kasischke KA, Vishwasrao HD, Ingelsson M, Hyman BT, Webb WW. Uniform polarity microtubule assemblies imaged in native brain tissue by second-harmonic generation microscopy. *PNAS*, 2003; 100 (12): 7081–7086.
64. Dubey M, Chaudhury P, Kabiru H, Shea TB. Tau Inhibits Anterograde Axonal Transport and Perturbs Stability in Growing Axonal Neurites in Part by Displacing Kinesin Cargo: Neurofilaments Attenuate Tau-Mediated Neurite Instability Cell Motility and the Cytoskeleton, 2008; 65: 89–99.
65. Dubocovich ML, Mogilnicka E, Areso PM. Antidepressant-like activity of the melatonin receptor antagonist, luzindole (N-0774), in the mouse behavioral despair test. *Eur J Pharmacol.* 1990; 182(2):313-25.
66. Egile C, Rouiller I, Xu X, Volkmann N, Li R, Hanein D. Mechanism of Filament Nucleation and Branch Stability Revealed by the Structure of the Arp2/3 Complex at Actin Branch Junctions. *PLoS BIOLOGY*, 2005; 3 (11): 1902-1909
67. Fiala JC, Feinberg M, Popov V, Harris KM. Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J Neurosci.*, 1998; 18(21): 8900-8911.
68. Fink CC, Meyer T Molecular mechanisms of CaMKII activation in neuronal plasticity. *Current Opinion in Neurobiology.*, 2002;.12: 293-299.
69. Fink CC, Bayer KU, Myers JW, Ferrell JE, Schulman H, Meyer T. Selective regulation of neurite extension and synapse formation by the beta but not the alpha isoform of CaMKII. *Neuron*, 2003; 39:283-29.
70. Fletcher TL, Cameron P, De Camilli P, Banker G. The distribution of synapsin I and synaptophysin in hippocampal neurons developing in culture. *J Neurosci.* 1991; 11(6): 1617-26.
71. Fletcher TL, De Camilli P, Banker G. Synaptogenesis in hippocampal cultures: evidence indicating that axons and dendrites become competent to form synapses at different stages of neuronal development. *J Neurosci.*, 1994; (11 Pt 1): 6695-706.
72. Fong DK, Rao A, Crump FT, Craig AM. Rapid synaptic remodeling by protein kinase C: reciprocal translocation of NMDA receptors and calcium/calmodulin-dependent kinase II. *J Neurosci.* 2002; 22(6):2153-64.
73. Fuhrberg B, Hardeland R, Poeggeler B, Behrmann G. Dramatic Rises of Melatonin and 5-Methoxytryptamine in *Gonyaulax* exposed to decreased temperature. *Biol. Rhythm. Res.*, 1997; 28, 144-150.
74. Furio AM, Brusco LI, Cardinali DP. Possible therapeutic value of melatonin in mild cognitive impairment: a retrospective study. *J Pineal Res.*, 2007; 43(4): 404-9.



75. Gähwiler BH. Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods*, 1981; 4: 329-342.
76. Gähwiler BH, Capogna M, Debanne D, McKinney RA, Thompson SM. Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci.*, 1997; 20: 471-477.
77. Galimberti I, Gogolla N, Alberi S, Ferrao Santos A, Muller D, Caroni P. Long-term rearrangements of hippocampal mossy fiber terminal connectivity in the adult regulated by experience. *Neuron*, 2006; 50: 749-763.
78. Galvin JE, Uryu K, Lee VM, Trojanowski JQ. Axon pathology in Parkinson's disease and Lewy body dementia hippocampus contains alpha-, beta-, and gamma-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999; 96(23): 13450-5.
79. García-Chávez D, González-Burgos I, Letechipía-Vallejo G, López-Loeza E, Morali G, Cervantes M. Long-term evaluation of cytoarchitectonic characteristics of prefrontal cortex pyramidal neurons, following global cerebral ischemia and neuroprotective melatonin treatment, in rats. *Neurosci Lett.*, 2008; 448(1):148-152.
80. Giannakopoulos P, Hof P.R., Bouras C. Selective vulnerability of neocortical association areas in Alzheimer's disease. *Microsc Res Tech*, 1998; 43:16-23.
81. Giese KP, Fedorov NB, Filipkowski RK, Silva AJ. Autophosphorylation at Thr286 of the  $\alpha$ -calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science*, 1998; 279: 870-873.
82. Gogolla N, Galimberti I, DePaola V, Caroni P. Staining protocol for organotypic hippocampal slice culture. *Nature Protocols*, 2006; 1(5): 2452-2456.
83. Goslin K, Schreyer DJ, Pate Skene JH, Banker G. Changes in the distribution of GAP-43 during development of neuronal polarity. *The Journal of Neuroscience*, 1990; 10 (2): 588-602.
84. Gozzo A, Lesieur D, Duriez P, Fruchart JC, Teissier E. Structure-Activity Relationships in a Series of Melatonin Analogs with the Low-Density Lipoprotein Oxidation Model. *Free. Radic. Biol. Med.*, 1999; 26, 1538-1543.
85. Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin-Immune System Relationships. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2002; 2, 167-179.
86. Guillaud L, Bosc C, Fourest-Lieuvain A, Denarier E, Pirollet F, Lafanechère L, Job D. STOP Proteins are responsible for the high degree of microtubule stabilization observed in neuronal cells. *J. Cell Biol.*, 1998; 142: 167-179.
87. Gutiérrez LM, Ostrosky F, Sánchez S, Villa A. Prevalence of dementia and mild cognitive impairment in subjects 65 years older in Mexico City: An Epidemiological Survey. *Gerontology*, 2001; 47:145.

88. Hamos JE, DeGennaro LJ, Drachman DA. Synaptic loss in Alzheimer's disease and other dementias. *Neurology*, 1989; 39: 355.
89. Harada A, Teng J, Takei Y, Oguchi K, and Hirokawa N. MAP2 is required for dendrite elongation, PKA anchoring in dendrites and proper PKA signal transduction. *The Journal of Cell Biology*, 2002; 158 (3): 541-548.
90. Hardeland, H. Melatonin and 5-Methoxytryptamine in Non-metazoans. *Reprod. Nutr. Dev.*, 1999; 39: 399-408.
91. Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinalli DP. Melatonin. *The international journal of biochemistry and cell biology*, 2006; 38: 313-316.
92. Harms KJ, Dunaevsky A. dendritic spine plasticity: Looking beyond development. *Brain Research*, 2007; 1184: 65-71.
93. Haughey NJ, Nath A, Chan SL, Borchard AC, Rao MS, Mattson MP. Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of alzheimer's disease. *J. Neurochem.*, 2002; 83(6): 1509-1524.
94. Havik B, Rokke H, Bardsen K, Davanger S, Bramham CR. Bursts of high-frequency stimulation trigger rapid delivery of preexisting alpha-CaMKII mRNA to synapses: a mechanism in dendritic protein synthesis during long-term potentiation in adult awake rats. *Eur J Neurosci*, 2003; 17: 2679-2689.
95. He J, Yang Y, Xu H, Li X-M. Olazapine Attenuates the Okadaic Acid-Induced Spatial memory Impairment and Hippocampal Cell Death in Rats. *Neuropsychopharmacology*, 2005; 30: 1511-1520.
96. He J, Yamada K, Zou L, Nabeshima T. Spatial memory deficit and neurodegeneration induced by the direct injection of okadaic acid into the hippocampus in rats. *J. Neural Trans*, 2001; 108: 1435-1443.
97. Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA. Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch. Neurol.*, 2003; 60:1119 –1122.
98. Hely TA, Graham B, Ooyen, AV. A computational model of dendrite elongation and branching based on MAP2 phosphorylation. *J Theoretical Biol.*, 2001; 210: 375-384.
99. Henze DA, Urban NN, Barrionuevo G. The multifarious hippocampal fiber pathway: a review. *Neuroscience*, 2000; 98: 407–427.
100. Huether G, Poeggeler B, Reimer A, George A. Effects of Tryptophan Administration on Circulating Melatonin Levels in Chicks and Rats: Evidence for Stimulation of Melatonin Synthesis and Release in the Gastrointestinal Tract. *Life Sci.*, 1992; 51: 945-953.

101. 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.*, 1994; 17(2):55-62.
102. Itoh MT, Ishizuka B, Kudo Y, Fusama S, Amemiya Y, Sumi Y. Detection of Melatonin and Serotonin Nactyltransferase and Hydroxyindole-O-methyltransferase in Rat Ovary. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1997; 136: 7-13.
103. Jackson AH, Smith P. A New Theory of Electrophilic Substitution in 3-substituted Indoles. *Chem. Comm.*, 1967; 264-266.
104. Jean-Louis G, Zizi F, Von Gizycki H, Taub H. Effects of melatonin in two individuals with Alzheimer's disease. *Percept. Mot. Skills.*, 1998; 87: 331-339.
105. Jelliger KA. Morphology of the aging brain and relation of Alzheimer disease In Calne DB, Horowski R, Mizuno Y, Poewe WH, Riederer P, Youdim MBH, eds. *Advances in Research on Neurodegeneration. Vol. I.* Boston: Birhäuser; 1993: 107-137.
106. Ji Y, Lu Y, Yang F, Shen W, Tang TT, Feng L, Duan S, Lu B. Acute and gradual increases in BDNF concentration elicit distinct signaling and functions in neurons. *Nat Neurosci.*, 2010; 13(3): 302-309.
107. Jiménez-Rubio G, Benítez-King G, Ortiz-López L. 2007. Melatonin Elicits Neuritogenesis and Reverses Tau Hyperphosphorylation in NIE-115 Neuroblastoma Cells Treated with Okadaic Acid. En: Fernández, A.J. ed. *Focus on Neuroblastoma Research.* Hauppauge, N.Y. Nova Science Publisher. pp 99-117.
108. Job D, Fischer EH, and Margolis RL. Rapid disassembly of cold-stable microtubules by calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci.U. S. A.*, 1981; 78: 4679–4682.
109. Jourdain P, Fukunaga K, Muller D. Calcium/calmodulin dependent protein kinase II contributes to activity-dependent filipodia growth and spine formation. *J Neurosci*, 2003; 23: 10645-10649.
110. Kardos R, Pozsonyi K, Nevalainen E, Lappalainen P, Nyitrai M, Hild G. The effects of ADF/cofilin and profilin on the conformation of the ATP-binding cleft of monomeric actin. *Biophys J.*, 2009; 96(6):2335-2343.
111. Kaufmann WE, MacDonald SM, Altamura CR. Dendritic cytoskeletal protein expression in mental retardation: an immunohistochemical study of the neocortex in Rett syndrome. *Cereb Cortex.* 2000; 10(10):992-1004.
112. Kennaway DJ, Wright H. Melatonin and circadian rhythms. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2002; 2: 199-209.

113. Kermer P, Liman J, Weishaupt JH, Bähr M. Neuronal Apoptosis in Neurodegenerative Diseases: From Basic Research to Clinical Application. *Neurodegenerative Dis*, 2004;1:9–19
114. Ketzoian C, Romero S, Dieguez E, Cairolo G, Rega Y, Caseres R, et al. Prevalence of demencial síndromes in a population of Uruguay. Study of “Villa del Cerro”. *J Neurol Sci*, 1997; 150-155.
115. Kim H, Binder LI, Rosenbaum JL. The periodic association of MAP2 with brain microtubules in vitro. *J Cell Biol.*, 1979; 80:266 –276.
116. Kowall NW, Kosi KS. Axonal disruption and aberrant localization of tau protein characterize the neuropil pathology of Alzheimer’s disease. *Ann. Neurol.*, 1998; 22: 639-643.
117. Kwan AC, Dombeck DA, Webb WW. Polarized microtubule arrays in apical dendrites and axons. *PNAS*, 2008; 105 (32): 11370–11375.
118. Lansbury PT, Lashuel HA. A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic. *Nature*, 2006; 443: 774-779
119. Lassmann H, Fischer P, Jellinger K. Synaptic pathology of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.*, 1993; 695: 59-64.
120. Lee J-H, Hong H-N, Im J-O, Byun H-S, Kim D. The formation of PHF-1 and SMI-31 positive dystrophic neurites in rat hippocampus following acute injection of okadaic acid. *Neuroscience Letters*, 2000; 282: 49-52.
121. Lengyel I, Fieuw-Makaroff S, Hall A, Sim A, Rostas J, Dunkley P. Modulation of the phosphorylation and activity of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II by zinc. *J. Neurochem.*, 2000; 75: 594-605.
122. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y. Isolation of melatonin, a pineal factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc*, 1958; 80: 2587.
123. Lerner AB, Case JD, Heintzelmann RV. Structure of melatonin. *J Am Chem Soc*, 1959; 81: 6084-6085.
124. Li H-L, Wang H-H, Liu S-J, Deng Y-Q, Zhang Y-J, et al. Phosphorylation of tau antagonizes apoptosis by stabilizing beta-catenin, a mechanism involved in Alzheimer’s neurodegeneration. *PNAS*, 104 (9): 3591- 3596.
125. Li B, Yamamori H, Tatebayashi Y, Shafit-Zagardo B, Tanimukai H, Chen S, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Failure of Neuronal Maturation in Alzheimer Disease Dentate Gyrus. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2008; 67 (1): 78-84
126. Lin MT, Beal F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 2006; 443: 787-795.
127. Linke R, Heimrich B, Frotscher M. Axonal regeneration of identified septohippocampal projection neurons in vitro. *Neuroscience*, 1995; 68: 1–4.

128. Lisman J, Schulman H, Cline H. The Molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nature Reviews, Neuroscience*, 2002; 3: 175-190.
129. Lissoni P, Barni S, Cattaneo G, Tancini G, Esposti G, Fraschini F. Clinical results with the pineal hormone melatonin in advanced cancer resistant to standard antitumor therapies. *Oncology*, 1991; 48:448-50.
130. Lissoni P, Malugani F, Malysheva O, Kozlov V, Laudon M, Conti A, Maestroni G. Neuroimmunotherapy of untreatable metastatic solid tumors with subcutaneous low-dose interleukin-2, melatonin and naltrexone: modulation of interleukin-2-induced antitumor immunity by blocking the opioid system. *Neuro Endocrinol Lett.*, 2002; 23(4):341-4.
131. Liu RY, Zhou JN, Van Heerikhuizen J, Hoffman MA, Swaab DF. Decreased melatonin levels in postmortem cerebrospinal fluid in relation to aging, Alzheimer's disease, and apolipoprotein E-epsilon 4/4 genotype. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1999; 84: 323-327.
132. Lo DC, McAllister AK, Katz LC. Neuronal transfection in brain slices using particle-mediated gene transfer. *Neuron*, 1994; 13: 1263–1268.
133. Lowery LA, Van Vactor D. The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009; 10(5):332-43.
134. Lozano R, Amaro G. El impacto de la demencia en México: Trabajo presentado y publicado en las memorias del Simposio: Enfermedad de Alzheimer, del diagnóstico al abordaje terapéutico integral. México, D.F. 1998.
135. Lundstrom K, Schweitzer C, Rotmann D, Hermann D, Schneider EM, Ehrengruber MU. Semliki Forest virus vectors: efficient vehicles for in vitro and in vivo gene delivery. *FEBS Lett.*, 2001; 504: 99–103.
136. Luo L. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nature Reviews in Neuroscience*, 2000;(1): 173 – 180
137. Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 2004; 25: 177-195.
138. Madison D, Edson EB. 1997. Preparation of Hippocampal Brain Slices. *Current Protocols in Neuroscience*, pp 6.4.1-6.4.7.
139. Manchester LC, Poeggeler B, Alvares FL, Ogden GB, Reiter RJ. Melatonin Immunoreactivity in the Photosynthetic Prokaryote, *Rhodospirillum rubrum*: Implications for an Ancient Antioxidant System. *Cell Mol. Biol. Res.*, 1995; 41: 391-395.

140. Manchester LC, Tan DX, Reiter RJ, Park W, Monis K, Qi W. High Levels of Melatonin in the Seeds of Edible Plants: Possible Function in Germ Tissue Protection. *Life Sci.*, 2000; 67: 3023-3029.
141. Manubens JM, Marínez-Lage JM, Lacruz F, Muruzabal J, Larumbe R, Guarch C. Prevalence of Alzheimer's disease and other dementing disorders in Pamplona, Spain. *Neuroepidemiology*, 1995; 14 (4):155-164.
142. Mayo JC, Sainz RM, Uria H, Antolin I, Esteban M, Rodríguez M. Inhibition of cell proliferation: a mechanism likely to mediate the prevention of neuronal cell death by melatonin. *J. Pineal Res.*, 1998; 25: 12-18.
143. Meléndez J, Maldonado V, Ortega A. Effect of melatonin on beta-tubulin and MAP2 expression in NIE-115 cells. *Neurochem Res.*, 1996; 21(6):653-8.
144. Menendez-Pelaez A, Howes KA, Gonzalez-Brito A, Reiter RJ. N-Acetyltransferase Activity Hydroxyindole-O-methyltransferase Activity, and Melatonin Levels in the Harderian Glands of the Female Syrian Hamster: Changes During the Light: Dark Cycle and the Effects of 6-chlorophenylalanine Administration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987; 145: 1231-1238.
145. Menendez-Pelaez A, Reiter RJ. Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J Pineal Res.* 1993; 15(2): 59-69.
146. Meyer T, Shen K. In and out of the postsynaptic region: signalling proteins on the move. *Trends Cell Biol.*, 2000; 10: 238-244.
147. Miller FD, Kaplan DR. Signaling mechanisms underlying dendrite formation. *Current Opinion in Neurobiology*, 2003; 13:391-398.
148. Minagar A, Ed. *International Review of Neurobiology: Neurobiology of Dementia*. Volumen 48. USA, 2009. Academic Press, El Sevier. Pages. 11-14.
149. Moore RY, Lenn NJ. A retinohypothalamic projection in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 1972; 146, (1): 1-14.
150. Mucke L. Alzheimer's disease. *Nature*, 2009; 461: 895-897
151. Nagerl UV, Eberhorn N, Cambridge SB, Bonhoeffer T. Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron*, 2004; 44: 759-767.
152. Navarrete H, Rodríguez-Leyva I. La demencia: ¿subdiagnosticada o ignorada?. *Rev Mex de Neurociencias*, 2003; 4:11-12.
153. Ng TB, Liu F, Zhao L. Antioxidative and Free Radical Scavenging Activities of Pineal Indoles. *J. Neural Transm.*, 2000; 107: 1243-1251.

154. Nikonenko, I. et al. Integrins are involved in synaptogenesis, cell spreading, and adhesion in the postnatal brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 2003; 140: 185–194.
155. Nogués MR, Giralt M, Romeu M, Mulero M, Sánchez-Martos V, Rodríguez E, Acuña-Castroviejo D, Mallol J. Melatonin reduces oxidative stress in erythrocytes and plasma of senescence-accelerated mice. *J Pineal Res.*, 2006; 41(2):142-9.
156. Noraberg J, Poulsen FR, Blaabjerg M, Kristensen BW, Bonde C, Montero M, Meyer M, Gramsbergen JB, Zimmer J. Organotypic Hippocampal Slice Cultures for Studies of Brain Damage, Neuroprotection and Neurorepair. *Current Drug Targets - CNS & Neurological Disorders*, 2005; 4, 435-452.
157. Nowak JZ, Zawilska JB. Melatonin and its physiological and therapeutic properties. *Pharmacy World & Science*, 1998; 20(1): 18-27.
158. Ohashi Y, Okamoto N, Uchida K, Iyo M, Mori N, Morita Y. Daily rhythm of serum melatonin levels and effect of light exposure in patients with dementia of the Alzheimer's type. *Biol Psychiatry.*, 1999; 45(12):1646-52.
159. Ortiz GG, Sánchez-Ruiz Y, Tan DX, Reiter RJ, Benítez-King G, Beas-Zárate C. Melatonin, vitamin E, and estrogen reduce damage induced by kainic acid in the hippocampus: potassium-stimulated GABA release. *J Pineal Res.*, 2001; 31(1):62-67.
160. Pan SF, Allen AE. 1986. Extra-pineal Melatonin in the Retina: Its Regulation and Physiological Function, In: *Pineal Research Review*; Reiter RJ; Ed.; Alan R. Liss. New York, USA. vol. 4, pp. 55-59.
161. Palop JJ, Chin J, Mucke L. A network dysfunction perspective on neurodegenerative diseases. *Nature*, 2006; 443: 768-773.
162. Parsons CG, Stöffler A, Danysz W. Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system- too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacology*, 2007; 53: 699-723.
163. Pasantes H, Arias C, Massieu L, Zentella A, Tapia R. 1999. Enfermedades neurodegenerativas: Mecanismos celulares y moleculares. Fondo de Cultura Económica. México,. Págs. 13-80
164. Pascual R, Bustamante C. Melatonin promotes distal dendritic ramifications in layer II/III cortical pyramidal cells of rats exposed to toluene vapors. *Brain Res.*, 2010; 1355:214-20.

165. Paxinos G, ed. 1995. The Rat Nervous System. Chapter 21: Hippocampal Formation by David G. Amaral and Menno P. Witter. Second Edition. Academic Press, Inc. Pages 637-687.
166. Petersen JD, Chen X, Vinade L, Dosemeci A, Lisman JE, Reese TS. Distribution of postsynaptic density (PSD)-95 and Ca<sup>2+</sup>/ calmodulin-dependent protein kinase II at the PSD. *J Neurosci*, 2003; 23:11270-11278.
167. Pichugin Y, Fahy GM, Morin R. Cyopreservation of rat hippocampal slices by vitrification. *Cryobiology*, 2006; 52: 228-240.
168. Poeggeler B, Balzer I, Hardeland R, Lerchl A. Pineal Hormone Melatonin Oscillates also in the Dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Naturwissenschaften*, 1991; 78: 268-269.
169. Poeggeler B, Reiter RJ, Tan DX, Chen L-D, Manchester LC. Melatonin, Hydroxyl Radical-mediated Oxidative Damage, and Aging: A Hypothesis. *J. Pineal Res.*, 1993; 14: 151-168.
170. Poeggeler B, Thuermann S, Dose A, Schoenke M, Burkhardt S, Hardeland R. Melatonin's Unique Radical Scavenging Properties - Roles of Its Functional Substituents as Revealed by a Comparison with Its Structural Analogs. *J. Pineal Res*, 2002; 33 (1): 20-30.
171. Pratt KG, Watt AJ, Griffith LC, Nelson SB, Turrigiano GG. Activity-dependent remodeling of presynaptic inputs by postsynaptic expression of activated CaMKII. *Neuron*, 2003; 39:269-281.
172. Prieto-Gómez B, Velázquez-Paniagua M, Cisneros LO, Reyes-Vázquez C, Jiménez-Trejo F, Reyes ME, Mendoza-Torreblanca J, Gutiérrez-Ospina G. Melatonin attenuates the decrement of dendritic protein MAP-2 immunostaining in the hippocampal CA1 and CA3 fields of the aging male rat. *Neurosci Lett.*, 2008; 448(1): 56-61.
173. Raineteau O, Rietschin L, Gradwohl G, Guillemot F, Gahwiler, BH Neurogenesis in hippocampal slice cultures. *Mol. Cell. Neurosci.*, 2004; 26: 241-25.
174. Ramírez-Munguía N, Vera G, Tapia R. Epilepsy, Neurodegeneration, and extracellular glutamate in hippocampus of awake and anesthetized rats treated with okadaic acid. *Neurochem Res*, 2003; 28: 1517-1524.
175. Ramírez-Rodríguez G, Ortíz-López L, Domínguez-Alonso A, Benítez-King GA, Kempermann G. Chronic treatment with melatonin stimulates dendrite maturation and complexity in adult hippocampal neurogenesis of mice. *J Pineal Res.*, 2011; 50 (1): 29-37.
176. Reiter RJ. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1991; 79: C153-C158.



177. Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Progr. Neurobiol.*, 1998; 56: 359-384.
178. Reiter RJ. Melatonin: Lowering the high price of free radical. *News Physiol. Sci.*, 2000; 15: 247-250.
179. Reiter RJ, Tan DX, Burkhardt S, Manchester LC. Melatonin in Plants. *Nutrition Rev.*, 2001; 59, 286-290.
180. Reiter RJ, Tan DX, Terron P, Flores LJ, Czarnocki Z. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochimica Polonica*, 2007; 54 (1):1-9.
181. Rhoades RA, Bell DR. 2009. *Medical Physiology: Principles for Clinical Medicine*. Third Edition. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer. Págs. 60-62.
182. Roger B, Gerry H. Realistic expectations: The management of severe Alzheimer disease. *Alzh. Dis. Assoc, Disor.*, 2003; 17(3): S80-S85.
183. Rook MS, Lu M, Kosik KS. CaMKII $\alpha$  3-untranslated region-directed mRNA translocation in living neurons: visualization by GFP linkage. *J. Neurosci.*, 2000; 20: 6385–6393.
184. Rubinsztein DC. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*, 2006; 443: 780-786.
185. Salhia B, Rutten F, Nakada M, Beaudry C, Berens M, Kwan A, Rutka JT. Inhibition of Rho-kinase affects astrocytoma morphology, motility, and invasion through activation of Rac1. *Cancer Res.*, 2005; 65(19):8792-800.
186. Samuel W, Masliah E, Hill LR, Butters N, Terry R. Hippocampal connectivity and Alzheimer's dementia: effects of synapse loss and tangle frequency in a two-component model. *Neurology.*, 1994; 44(11): 2081-2088.
187. Sánchez C, Díaz-Nido J, Avila J. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 and its relevance for the regulation of neuronal cytoskeleton function. *Progress in Neurobiology*, 2000; 61: 133-168.
188. Sattilaro W. Interaction of microtubule-associated protein 2 with actin filaments. *Biochemistry*, 1986; 25:2003–2009.
189. Sharp DJ, Yu W, Ferhat L, Kuriyama R, Rueger DC, Baas PW. Identification of microtubule-associated motor protein essential for dendritic differentiation. *The Journal of Cell Biology*, 1997; 138: 833-843.
190. Scheffa SW, Pricea DA, Schmitta FA, Mufsonb EJ. Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiology of aging*, 2006; 27(10): 1372-1384.

191. Schulman H, Braun A. 1999. Calcium/calmodulin-dependent protein kinases. In: Carafoli, E., Klee, C. (eds) *Calcium as a Cellular Regulator*. Oxford University Press, New York, pp 311–343.
192. Scott EK, Luo L. How do dendrites take their shape? *Nature in Neuroscience*, 2001; 4 (4): 359-365.
193. Seegar H, Mueck AO, Lippert TH. Effect of Melatonin and Metabolites on Copper-mediated Oxidation of Low Density Lipoprotein. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1997; 44: 283-284.
194. Selden SC, Pollard TD. Phosphorylation of microtubule-associated proteins regulates their interaction with actin filaments. *J Biol. Chem.*, 1983; 258:7064 – 7071.
195. Selden SC, Pollard TD. Interaction of actin filaments with microtubules is mediated by microtubule-associated proteins and regulated by phosphorylation. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 1986; 466: 803- 812.
196. Seress L, Abrahám H, Horváth Z, Dóczi T, Janszky J, Klemm J, Byrne R, Bakay RA. Survival of mossy cells of the hippocampal dentate gyrus in humans with mesial temporal lobe epilepsy. *J Neurosurg.*, 2009; 111(6): 1237-1247.
197. Sharma R, Ottenhof T, Rzeczowska PA, Niles PL. Epigenetic targets for melatonin: induction of histone H3 hyperacetylation and gene expression in C17.2 neural stem cells. *J Pineal Res.*, 2008; 45: 277-284.
198. Shen K, Meyer T. Dynamic control of CaMKII translocation and localization in hippocampal neurons by NMDA receptor stimulation. *Science*, 1999; 284: 162-166.
199. Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of the Melatonin Endocrine Message in Mammals: A Review of the Complex Regulation of Melatonin Synthesis by Norepinephrine, Peptides, and Other Pineal Transmitters. *Pharmacol Rev*, 2003; 55 (2):325–395, 2003.
200. Soto-Vega E, Meza I, Ramírez-Rodríguez G, Benítez-King G. Melatonin stimulates calmodulin Phosphorylation by protein kinase C. *J. Pineal. Res.*, 2004; 37: 98-106.
201. Smirnov AN. Nuclear Melatonin Receptors. *Biochemistry*, 2001; 66 (1): 19-26.
202. Squire L, Berg D, Bloom F, Du Lac S, Ghosh A, Spitzer N. 2008. *Fundamental Neuroscience*. Third Edition. Academic Press, El Sevier. Canadá. Pages. 1048-1055, 1063-1065.
203. Stasica P, Paneth P, Rosiak JM. Hydroxyl Radical Reaction with Melatonin Molecule: A Computational Atudy. *J. Pineal Res.*, 2000; 29: 125-127.

204. Steward O, Schuman EM. Compartmentalized synthesis and degradation of proteins in neurons. *Neuron*, 2003; 40: 347-359.
205. Stuart G, Spruston N, Häusser M, Eds. 2008. *Dendrites*. Second Edition. Oxford University Press. P.p. 551.
206. Stoppini L, Buchs PA, Müller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Meth.*, 1991; 37: 173–182.
207. Stricker C. 1997. In *Neuroscience Methods*. Martin R., Ed. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Holland.
208. Suetsugu S, Miki H, Takenawa T. Spatial and temporal regulation of actin polymerization for cytoskeleton formation through Arp2/3 complex and WASP/WAVE proteins. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 2002; 51: 113-122.
209. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Kim SJ, El Sakkary GH. Melatonin protects hippocampal neurons in vivo against kainic acid- induced damage in mice. *J. Neurosci. Res.*, 1998; 54: 382-389.
210. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Zhang M, Weintraub ST, Cabrera J, Sainz RM, Mayo JC. Identification of Highly Elevated Levels of Melatonin in Bone Marrow: Its Origin and Significance. *Biochem. Biophys. Acta*, 1999; 1472, 206-214.
211. Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan M-T, El-Sawi M, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Allegra M, Hardeland R. Chemical and Physical Properties and Potential Mechanisms: Melatonin as Broad Spectrum Antioxidant and Free Radical Scavenger. *Current Topics in medicinal Chemistry*, 2002; 2:181-197.
212. Tan DX, Manchester LC, Hardeland R, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM, Reiter RJ. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res*, 2003; 34:75-78.
213. Teng J, Takei Y, Harada A, Nakata T, Chen J, Hirokawa N. Synergistic effects of MAP2 and MAP1B knockout in neuronal migration, dendritic outgrowth, and microtubule organization. *J Cell Biol.*, 2001; 155:65–76.
214. Tijmes M, Pedraza R, Valladares L. Melatonin in the Rat Testis: Evidence for Local Synthesis. *Steroids*, 1996; 61, 65-68.
215. Tiraboschi P, Hansen LA, Alford M, Masliah E, Thal L, Corey-Bloom J. The decline in synapses and cholinergic activity is asynchronous in Alzheimer's disease. *Neurology*, 2000; 55: 1278-1283.
216. Thompson PM, Hayashi KM, Zubicaray G, Janke AL, Rose SE, Semple J, Herman D, Hong MS, Dittmer SS, Doddrell DM, Toga AW. Dynamics of Gray Matter Loss in Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience*, 2003; 23(3):994 –1005.

217. Tran TS, Rubio ME, Clem RL, Johnson D, Case L, Tessier-Lavigne M, Haganir RL, Ginty DD, Kolodkin AL. Secreted semaphorins control spine distribution and morphogenesis in the postnatal CNS. *Nature.*, 2009;462(7276):1065-1069.
218. Tricoire H, Locatelli A, Chemineau P, Malpoux B. Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. *Endocrinology*, 2002; 143(1): 84-90.
219. Turjanski AG, Saenz DA, Doctorovich F, Estrin DA, Rosenstein RE. Nitrosation of Melatonin by Nitric Oxide: A Computational Study. *J. Pineal Res.*, 2001; 31: 97-101.
220. Uchida K, Okamoto N, Ohara K, Morita Y. Daily rhythm of serum melatonin in patients with dementia of the degenerate type. *Brain Res.*,1996; 717(1-2):154-9.
221. Vaillant AR, Zanassi P, Walsh GS, Aumont A, Alonso A, Miller FD. Signaling mechanisms underlying reversible, activity dependent dendrite formation. *Neuron*, 2002; 34:985-998.
222. Van Strien NM, Cappaert NLM, Witter MP. The anatomy of memory: an interactive overview of parahippocampal-hippocampal network. *Nature Reviews Neuroscience*, 2009; 10:272-282
223. Walaas SI et al. Cell-specific localization of the  $\alpha$ -subunit of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in Purkinje cells in rodent cerebellum. *Brain Res.*, 1988; 464: 233–242.
224. Wang ZJ, Liang CL, Li GM, Yu CY, Yin M. Neuroprotective effects of arachidonic acid against oxidative stress on rat hippocampal slices. *Chem Biol Interact.* 2006; 163(3):207-217.
225. Wayman GA, Kaech S, Grant WF, Monika D, Impey S, Tokumitsu H, Nozaki N, Banker G, Soderling TR. Regulation of Axonal Extension and Growth Cone Motility by Calmodulin-Dependent Protein Kinase I. *The Journal of Neuroscience*, 2004; 24(15):3786 –3794.
226. Wayman GA, Lee Y-S, Tokumitsu H, Silva A, Soderling TR. Calmodulin-Kinases: Modulators of Neuronal Development and Plasticity. *Neuron*, 2008; 59: 914-931.
227. West MJ, Kawas CH, Stewart WF, Rudow GL, Troncoso JC. Hippocampal neurons in pre-clinical Alzheimer's disease, 2004; 25(9): 1205-12.
228. Wiffler A, Abuja PM, Schauenstein K, Liebmann PM. N-acetylserotonin is a Better Extra- and Intracellular Antioxidant than Melatonin. *FEBS Lett.*, 1999; 449: 206-210.

229. Williams DR. Tauopathies: classification and clinical update on neurodegenerative diseases associated with microtubule-associated protein tau. *Internal Medicine Journal*, 2006; 36: 652-660.
230. Wu G-Y, Cline HT. Stabilization of dendritic arbor structure in vivo by CaMKII. *Science*, 1998; 279: 222-226.
231. Yamada M, Wada Y, Tsukagoshi H, Otomo E-I, Hayakawa M. A quantitative Golgi study of basal dendrites of hippocampal CA1 pyramidal cells in senile dementia of Alzheimer type. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 1988; 51: 1088-1090.
232. Yuh-Nung J, Jan LY. Dendrites. *Genes & Dev.*, 2001; 15: 2627-2641.
233. Zhang Z, Casey DM, Julien JP, Xu Z. Normal dendritic arborization in spinal motoneurons requires neurofilament subunit L. *J Comp. Neurol.*, 2002; 450 (2): 144-52.

*Páginas Web consultadas*

- URL1. Psychiatry Online. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: Delirium, Dementia, and Amnesic and Other Cognitive Disorders Tucker GJ, Popkin M, Douglas E, Folstein M, Lloyd G, Grant I, Liptzin B, 2000. Fourth Edition, Text Revision (DSM-IV-TR) American Psychiatric Association DOI: 10.1176/appi.books.9780890423349 **American Psychiatric Publishing, Inc.08-03-10.URL**  
<http://www.psychiatryonline.com/resourceTOC.aspx?resourceID=1>
- URL2. National Institute on Deafness and Other Communication Disorders (NIDCD), National Institute of Health (2009). A-Z Site Index: Aphasia. 08-03-10. URL:  
[http://www.nidcd.nih.gov/health/spanish/aphasia\\_span.asp](http://www.nidcd.nih.gov/health/spanish/aphasia_span.asp)
- URL3. MedlinePlus 2009. 08-03-10.  
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003203.htm>
- URL4. Secretaría de Salud (SSA). México Sano. Enero de 2008. Año 1, Núm. 1, Pág. 11. Disponible en línea, Google:  
[http://portal.salud.gob.mx/descargas/pdf/period\\_mexsano/mexicosano\\_ene08.pdf](http://portal.salud.gob.mx/descargas/pdf/period_mexsano/mexicosano_ene08.pdf), 05 de marzo de 2010.

- URL5. Secretaría de Salud (SSA). Programa Nacional de Salud 2007-2012, Por un México sano: construyendo alianzas para una mejor salud. Disponible en línea, Google: <http://portal.salud.gob.mx/descargas/pdf/pnscap1.pdf>, 05 de marzo de 2010.
- URL6. Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INPRF). Treatment of Patients With Alzheimer's Disease and Other Dementias. Segunda edición. American Psychiatric Association Practice Guidelines. Disponible en línea, Google: <http://www.psychiatryonline.com/pracGuide/loadGuidelinePdf.aspx?file=AlzPG101007>, 05 de marzo de 2010.
- URL7. Chandra V, Pandav R, Laxminarayan R, Tanner C, Manyam B, Rajkumar S, Silberberg D, Brayne C, Chow J, Herman S, Hourihan F, Kasner S, Morillo L, Ogunniyi A, Theodore W, and Zhang Z-X. Neurological Disorders. Chapter 32. Págs. 627-644 Disponible en línea, Google: [http://www.searo.who.int/LinkFiles/Mental\\_Health\\_Resources\\_DCP32.pdf](http://www.searo.who.int/LinkFiles/Mental_Health_Resources_DCP32.pdf), 05 de marzo de 2010.
- URL8. World Health Organization (WHO). Mathers C, Leonardi M. Global burden of dementia in the year 2000: summary of methods and data sources, 2000. Disponible en línea, Google: [http://www.who.int/healthinfo/statistics/bod\\_dementia.pdf](http://www.who.int/healthinfo/statistics/bod_dementia.pdf), 05 de marzo de 2010.
- URL9. World Health Organization (WHO). Mental Health: New Understanding, New Hope, 2001. Disponible en línea, Google: [http://www.who.int/whr/1997/media\\_centre/executive\\_summary1/en/index14.html](http://www.who.int/whr/1997/media_centre/executive_summary1/en/index14.html), 05 de marzo de 2010.
- URL10. Alzheimer's disease International. Fact Sheet 3 The prevalence of dementia, Abril 1999. Disponible en línea, Google: <http://www.alz.co.uk>, 05 de marzo de 2010.
- URL11. Alzheimer's disease International. Fact Sheet 3 The prevalence of dementia worldwide, Diciembre 2008. Disponible en línea, Google: <http://www.alz.co.uk/adi/pdf/prevalence.pdf>, 18 octubre 2010.

- URL12. Alzheimer's Disease Education and Referral (ADEAR) Center and Alzheimer's Association. Alzheimer's Disease Medications Fact Sheet. November, 2008. NIH Publication No. 08-3431. Disponible en línea, Google: <http://www.nia.nih.gov/nr/rdonlyres/5178456b-4e16-4a71-a704-46637c6fe61b/10967/adearmedicationsfactsheet.pdf>, 19 de octubre del 2010.
- URL13. Online Newspaper of Professor Yasser Metwally. Disponible en línea, Google: <http://yassermetwally.wordpress.com/dementia-alzheimer-type-and-others/neuroimaging-of-dementia/>, 02 de noviembre del 2010.