

Salud Mental

Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente

perezrh@imp.edu.mx

ISSN (Versión impresa): 0185-3325

MÉXICO

2008

Graciela Jiménez Rubio / Oscar Ugalde / Leonardo Ortíz López / Gerardo Ramírez
Rodríguez / Gloria Benitez King

LA MELATONINA: UN COADYUVANTE POTENCIAL EN EL TRATAMIENTO DE LAS
DEMENCIAS

Salud Mental, mayo-junio, año/vol. 31, número 003
Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente
Distrito Federal, México
pp. 221-228

La melatonina: un coadyuvante potencial en el tratamiento de las demencias

Graciela Jiménez-Rubio,¹ Oscar Ugalde,² Leonardo Ortíz-López,¹
Gerardo Ramírez-Rodríguez,¹ Gloria Benítez-King¹

Artículo original

SUMMARY

Alzheimer's disease is characterized by a progressive neuronal death and a loss of memory and cognition that unable the patient to perform daily tasks. Cytoskeleton alterations, identified as a major histopathologic hallmark of neurodegenerative diseases, occur in dementia. In this disease, neurons have pathologic inclusions containing fibrillar aggregates of hyperphosphorylated tau protein in absence of amyloid deposits. Abundant senile plaques and neurofibrillary tangles constitute the two major neuropathologic lesions present in hippocampal, neocortical, and forebrain cholinergic brain regions of Alzheimer's patients. Hyperphosphorylated tau and the subsequent formation of paired helical filaments loses the capabilities for maintaining highly asymmetrical neuronal polarity. Thus, in brains with a high content of hyperphosphorylated tau, microtubules are disassembled, the highly asymmetrical neural shape is lost and an impairment of axonal transport is produced together with a loss of dendrite arborizations. In addition, brain damage caused by free radicals occurs in Alzheimer's disease. This illness involves a reduction of the endogenous antioxidant enzyme system, increased senile-plaque formation, cytoskeletal collapse, and neuronal apoptosis induced by oxidative stress.

Acetylcholinesterase inhibitors are the most commonly used compounds in the treatment of neurodegenerative diseases. However, despite their wide use in the treatment of Alzheimer's disease, these compounds have limited therapeutic effects and cause undesirable effects. Therefore it is necessary to investigate new alternatives in the Alzheimer's disease treatment. Considering that neurodegenerative diseases are cytoskeleton disorders, this cellular structure could be a drug target for therapeutic approaches by restoring normal cytoskeleton structure and by precluding damage caused by oxygen-reactive species. In this regard, melatonin, the indole secreted by the pineal gland during the dark phase of the photoperiod, has two important properties that may be useful for the treatment of mental disorders. One is that melatonin is a potent free-radical scavenger and the other is that this indole is a cytoskeletal modulator.

A neuroprotective role for melatonin was initially suggested due to its free-radical scavenger properties. Melatonin detoxifies the highly toxic hydroxyl radical as well as the peroxy radical, peroxy nitrite anion, nitric oxide, and singlet oxygen, all of which can damage

brain macromolecules. Moreover, melatonin stimulates the activity of antioxidative enzymes including superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase. Also, it is a lipophilic molecule able to cross the blood-brain barrier. All these properties make melatonin a highly effective pharmacologic agent against free-radical damage in the brain. Also, it is a useful neuroprotector in dementia because it synchronizes the body rhythms with the photoperiod, which are altered in Alzheimer's disease and because normal circadian secretion of melatonin and sleep-wake cycle can be restored by the indolamine administration.

Additionally, cytoskeletal modulation by melatonin is another relevant property of the indole for neurodegenerative diseases treatment. Direct assessment of melatonin effects on cytoskeletal organization in neuronal cells indicated that the indole promotes neuritogenesis in N1E-115 neuroblastoma cells at plasma melatonin concentration. Neurite formation is a complex process critical to establish synaptic connectivity that is lost in Alzheimer's disease. Neuritogenesis takes place by a dynamic cytoskeletal organization that involves microtubule enlargement, microfilament arrangement, and intermediate-filament reorganization. In particular, microtubule assembly participates in neurite formation elicited by melatonin through antagonism to calmodulin. Also, selective activation of protein kinase C (PKC) alpha by melatonin participates in vimentin intermediate filament rearrangements and actin dynamics for neurite outgrowth in neuroblastoma cells. In N1E-115 cells, melatonin at plasma and cerebrospinal fluid concentration caused an increase in microfilament arrays in stress fibers and their thickening, as well as increased growth cone formation, and augmented number of cells with microspikes. Recently, it was demonstrated that melatonin increased both the number of N1E-115 cells with filopodia and with long neurites through both PKC activation and Rho-associated kinase (ROCK) stimulation.

The utility of melatonin to prevent damage in the cytoskeletal structure produced by neurodegenerative processes was demonstrated in N1E-115 neuroblastoma cells cultured with okadaic acid (OA), a specific inhibitor of the serine/threonine proteins phosphatases 1 and 2A that induces molecular and structural changes similar to those found in Alzheimer's disease. Melatonin prevented microtubule disruption followed by cell-shape changes and increased lipid peroxidation and apoptosis induced by OA. Melatonin effects on

¹ Departamento de Neurofarmacología, Subdirección de Investigaciones Clínicas. Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente.

² Dirección de Servicios Clínicos. I.N.P.R.F.

Correspondencia: Dra. Gloria Benítez-King. Departamento de Neurofarmacología. Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz. Calzada México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, Tlalpan, 14370 México D.F. Teléfono: (52 55) 5573 2437, Fax: (5255) 5513 3722. E-Mail: bekin@imp.edu.mx

Recibido: 25 de enero de 2008. Aceptado: 2 de abril de 2008.

altered cytoskeletal organization induced by OA are dose-dependent and effects were observed at plasma -and cerebrospinal-fluid concentrations of the indole. These data support that melatonin can be useful in the treatment of neurodegenerative diseases by both its action on the cytoskeleton and by its free-radical scavenger properties.

At present, it is known that melatonin prevents cytoskeletal damage by reducing oxidative stress and reestablishing the normal organization of disturbed neurocytoskeletons. Our group found recently that melatonin precludes cytoskeletal damage produced by high levels of free radicals produced by hydrogen peroxide and antipsychotics. Additionally, hyperphosphorylation of tau has been shown to occur associated with high levels of oxidative stress and is considered as an important hallmark of most neurodegenerative diseases. Okadaic acid causes an extensive tau phosphorylation and paired helical filament formation in animal models and in N1E-115 cells, similarly to the ones found in neurodegeneration. Our group found that melatonin prevents these changes since, when the indole was added before, simultaneously or after OA treatment, tau hyperphosphorylation was abolished. The results strongly suggest that melatonin acts as a neurocytoskeletal protector by decreasing tau hyperphosphorylation preserving the cytoskeletal structure and also they suggest that melatonin may improve cognition by impeding neuronal damage by hyperphosphorylation and through establishing new neuronal circuits. In addition, it has been shown that melatonin modulates new neuron formation from embryonic precursor cells. New neurons formation induced by melatonin was corroborated by our group using adult hippocampal precursor cells and adult animals. We have found that melatonin modulates the survival of newly formed cells and that the surviving cells could correspond to immature neurons which could lead to a pronounced augmentation in the total number of new neurons in the adult hippocampus.

In conclusion, polarity is intrinsic to neuronal function. Current knowledge indicates that the cytoskeleton participates in the maintenance of both cell shape and polarity. Progressive loss of neuronal polarity is a major histopathologic event in the neurodegenerative diseases that precedes neuronal death and the disappearance of synaptic connectivity. Drugs that prevent the loss of polarity and cytoskeleton retraction intrinsic to these diseases as well as damage in cytoskeletal structure produced by oxidative stress can be extremely useful in treatment of neurodegenerative diseases. Melatonin is a potent free-radical scavenger that at the same time acts as a cytoskeleton regulator; thus, it is tempting to speculate that this indole could prove useful in the prevention and alleviation of these diseases. Clinical trials show that melatonin administration is followed by an alleviation of circadian disturbances and cognitive function in neurodegenerative diseases. As suggestive as this information appears, extreme and controlled clinical trials will be necessary to investigate the beneficial effects of melatonin and other drugs in the treatment of dementias.

Key words. Cytoskeletal, Alzheimer's, melatonin, tau protein, oxidative stress.

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que cursa con una deficiencia en las capacidades cognitivas, así como con la presencia de síntomas psiquiátricos y alteraciones conductuales. Las características histopatológicas más importantes en la enfermedad de Alzheimer son la formación de placas seniles, los ovillos neurofibrilares y un incremento en el estrés oxidativo.

La polaridad estructural y la morfología neuronal se pierden en la enfermedad de Alzheimer. La proteína tau se encuentra anormalmente fosforilada, los microtúbulos se despolimerizan, se pierden la forma asimétrica de las neuronas y la conectividad sináptica, y se interrumpe el transporte axoplasmático.

Asimismo, se ha sugerido que la inhibición o la pérdida en el balance de la formación de neuronas en el hipocampo puede participar en la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer debido a que el cerebro no puede reparar el daño neuronal y consecuentemente induce la pérdida de la cognición.

Los agentes colinérgicos son los medicamentos más aceptados en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en una etapa en que los síntomas se clasifican de medios a moderados. Sin embargo, el tratamiento de pacientes con enfermedad de Alzheimer grave es limitado. Por lo anterior se requiere la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de esta enfermedad.

La melatonina es una indolamina que actúa como un potente antioxidante, como un modulador de la organización del citoesqueleto así como un factor de diferenciación celular.

Diversos estudios han sugerido que la melatonina tiene un efecto neuroprotector por su capacidad de captar radicales libres. La melatonina disminuye la lipoperoxidación y la apoptosis producida por la administración de ácido ocaídico (AO) o peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Se sabe que las especies reactivas de oxígeno producen alteraciones en la organización del citoesqueleto e influyen el estado de fosforilación de la proteína tau y que la melatonina previene la fosforilación de la proteína tau debido a su actividad antioxidante.

Se ha descrito que la melatonina modula el arreglo de los microfilamentos de actina y la formación de fibras de tensión en las células Madin-Darby canine kidney (MDCK) por medio de una interacción concertada de la indolamina con la calmodulina y con la proteína cinasa C (PKC) y la participación de la proteína cinasa dependiente de Rho (ROCK). Asimismo, la melatonina participa en las etapas tempranas de la formación de neuritas en las células N1E-115 por medio de ROCK.

Otros estudios han indicado que la melatonina previene el daño en el citoesqueleto producido por el AO en las células N1E-115. El AO se ha utilizado para reproducir en células en cultivo las alteraciones en el citoesqueleto y el incremento en el estrés oxidativo que ocurren en las neuronas de pacientes con enfermedad de Alzheimer.

La melatonina en estas células previene la retracción del citoesqueleto, efecto del AO. La red del citoesqueleto se mantiene en el citoplasma y en las neuritas de las células N1E-115 cultivadas con melatonina, no obstante que sean tratadas con el AO posteriormente. Recientemente, se demostró que en las células de neuroblastoma N1E-115 incubadas con melatonina se previene la hiperfosforilación de la proteína tau causada por el AO.

Aunado a lo anterior, se ha demostrado que la melatonina modula la formación de neuronas nuevas en un modelo *in vitro* utilizando células embrionarias y de corteza cerebral de ratón. La formación de neuronas inducida por la melatonina se corroboró utilizando células precursoras aisladas de animales adultos así como en animales adultos, y se encontró que la indolamina moduló la sobrevivencia de las células nuevas formadas, así como la diferenciación de éstas en neuronas nuevas.

Las evidencias presentadas en esta revisión indican que la melatonina puede ser útil como un coadyuvante en el tratamiento de las demencias.

Palabras clave: Citoesqueleto, Alzheimer, melatonina, proteína tau, estrés oxidativo.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer es un padecimiento progresivo, neurodegenerativo, que se caracteriza por: la pérdida de la memoria y de la cognición, el detrimento de las capacidades para ejecutar actividades de la vida cotidiana, y cambios en la personalidad y en la conducta. Los inhibidores de la acetilcolinesterasa son los medicamentos más aceptados en el tratamiento de esta enfermedad en una etapa en que los síntomas se clasifican de medios a moderados.

Sin embargo, el tratamiento de pacientes con enfermedad de Alzheimer grave es limitado. Por ello se requiere la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de esta enfermedad.¹

En la enfermedad de Alzheimer están afectadas regiones específicas del Sistema Nervioso Central como el hipocampo, la corteza frontal, el cerebelo y los lóbulos parietales y temporales. En estos sitios se encuentran alterados circuitos neuronales específicos, con una disminución en el número de sinapsis² y de las arborizaciones dendríticas, así como una disminución en la cantidad de receptores estriatales dopaminérgicos; también se ha sugerido una disminución en la neurogénesis hipocampal.^{3,4} A nivel subcelular, en las neuronas se producen anormalidades en el citoesqueleto.⁵

La organización del citoesqueleto tiene una participación clave en la fisiología neuronal ya que cambia dinámicamente durante el proceso de la formación de las conexiones sinápticas, en la formación de las neuritas que se diferencian a dendritas y axones, proceso conocido como neuritogénesis, así como en la neurogénesis. Además, el citoesqueleto mantiene la polaridad morfofuncional en las neuronas. El dominio somatodendrítico que recibe y decodifica la información entrante está constituido principalmente por microfilamentos de actina, por los neurofilamentos y las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs). A su vez, el dominio axonal, que transmite la información a las neuronas postsinápticas, está constituido por microtúbulos, neurofilamentos y la proteína tau que se asocia a los microtúbulos.⁶

La polaridad estructural y la morfología neuronal se pierden en las enfermedades neurodegenerativas como la de Alzheimer y en otras demencias conocidas como tauopatías, como la demencia senil, la enfermedad de Pick, la degeneración corticobasal y la parálisis progresiva supranuclear.⁷ En la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, la proteína tau se encuentra muy fosforilada y ensamblada en filamentos helicoidales apareados.⁸ Se ha sugerido que los defectos en una sola célula comienzan con la modificación de tau por fosforilación, lo que da lugar a un estado preovillo.⁹ Después, los polímeros filamentosos (filamentos helicoidales apareados) son ensamblados y la agregación aberrante de estos filamentos helicoidales apareados participa en la formación de ovillos

neurofibrilares citoplasmáticos (intracelular). Como consecuencia de esto, se ha sugerido que las neuronas se degeneran y mueren, exportando a los ovillos neurofibrilares al espacio extracelular. En las neuronas normales, la proteína tau se une a los microtúbulos, estabiliza su estructura y promueve la polimerización de la tubulina.¹⁰ La proteína tau anormalmente hiperfosforilada pierde estas capacidades y por lo tanto se despolimerizan los microtúbulos, se pierde la forma asimétrica de las neuronas¹¹ y la conectividad sináptica y se interrumpe el transporte axoplásmico.¹²

La fosforilación de tau es regulada por un grupo de proteínas fosfatasa (PP) y proteínas cinasas, y el balance en la fosforilación-defosforilación determina la estimulación o estabilización de la polimerización de tubulina en células neuronales necesaria para el mantenimiento de la estructura del axón y las dendritas.¹³ Se ha descrito que las cinasas que fosforilan a la tau son la cinasa II dependiente de calmodulina, la proteína cinasa C (PKC), la glicógeno sintetasa-cinasa-3-beta, la proteína cinasa dependiente de AMPc, entre otras.¹⁴ Por otro lado, se ha establecido que las fosfatasas que defosforilan a la proteína tau son las PP fosfoseril/fosfotreonil, como la PP1, PP2-A, PP2B y PP2C.¹⁵ Por su parte, se ha descrito que en el cerebro de pacientes con Alzheimer la actividad de la PP2A y PP1 se encuentra disminuida.¹⁵

En la enfermedad de Alzheimer, la patología de tau (pérdida de unión a los microtúbulos) y la formación de agregados aberrantes (los ovillos neurofibrilares) se han correlacionado con el nivel de demencia.¹⁶ Además, se ha descrito el proceso de desarrollo de la patología de tau filamentosos en regiones específicas del cerebro. Este comienza en las regiones transentorrinal y entorrinal. Posteriormente se extiende al hipocampo y a las regiones corticales.^{17,18}

Otro proceso que tiene una participación importante en la fisiopatología de las demencias es el estrés oxidativo. La producción de una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno afecta la estructura de las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos causando daño tisular y apoptosis.¹⁹ Además, se ha descrito que el estrés oxidativo causa una desorganización del citoesqueleto^{20,21} y produce un incremento en el estado de fosforilación de la proteína tau.^{22,23} A una concentración de 100 μ M, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) causa en la línea celular de feocromocitoma PC12 la despolimerización de los microtúbulos y una retracción de las neuritas.²⁴ Los microfilamentos de actina también se despolimerizan en presencia del H_2O_2 en células de epitelio intestinal.²⁵ A la fecha hay poca información acerca de los mecanismos por medio de los cuales los compuestos oxidantes causan daño neuronal. Sin embargo, la evidencia existente sugiere que se produce un desequilibrio en los procesos de fosforilación y defosforilación de proteínas. Se sabe que el H_2O_2 inhibe la actividad de la PP1 tanto en células en cultivo como en sistemas enzimáticos reconstituidos *in vitro*.²⁶ Además, los antagonistas de la cinasa II dependiente de calmodulina, W-7, KN-92 y K252,

bloquean la fosforilación de NFkappaB inducida por el estrés oxidativo en los linfocitos T Jurkat.²⁷ También se ha demostrado, que asociada al estrés oxidativo, ocurre una pérdida de la actividad de la PKC y que el éster del forbol, acetato de tetradecanoilforbol (TPA), inhibe la neurodegeneración al activar la PKC y las enzimas relacionadas con esta vía de señalización. El tratamiento con TPA produce la activación de las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs) y la cinasa c-Jun amino terminal en una línea celular inmortalizada obtenida del hipocampo.²⁸ Además, se ha demostrado que la PKC inhibe a la glicógeno sintetasa cinasa 3, una de las enzimas que fosforila extensamente a la tau y por esto se ha sugerido también que la activación de la PKC tiene un papel neuroprotector.²⁹

Recientemente, se ha sugerido que la inhibición o la pérdida en el balance de la formación de neuronas en el hipocampo pueden participar en la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer debido a que el cerebro no puede reparar el daño neuronal y consecuentemente induce la pérdida de la cognición.⁴ Mediante modelos animales que sobreexpresan proteínas mutadas relacionadas a la enfermedad de Alzheimer, se ha demostrado que éstos presentan alteraciones conductuales y neuropatológicas similares a las observadas en pacientes con esta enfermedad.³⁰ Por ejemplo, en los ratones mutados para la proteína precursora amiloide existe acumulación de la proteína beta amiloide con la consecuente formación de placas, activación de astrocitos y microglia. En roedores que expresan la proteína tau mutada, se han encontrado agregados neurofibrilares.³⁰ De tal modo que hallazgos derivados de diversos estudios realizados en este tipo de modelos animales indican la presencia de anomalías en el proceso para la formación de neuronas en el hipocampo.

Hallazgos reportados por Zhang et al.³¹ indican que la neurogénesis hipocámpal se ve afectada por depósitos de la proteína amiloide. En este estudio, los investigadores utilizan un modelo animal modificado que presenta mutaciones en la proteína precursora amiloide y en la presenilina 1. Este modelo desarrolla depósitos de proteína amiloide mutada alrededor de los seis meses de edad y a los nueve meses se observa actividad de la microglia asociada con la proteína amiloide. En este tiempo los roedores presentaron una disminución en el número de neuroblastos en el giro dentado del hipocampo. Esta reducción persiste hasta los 18 meses de edad. Esto sugiere que la neuroinflamación mediada por la microglia debido a la proteína amiloide contribuye al daño cognitivo en la enfermedad de Alzheimer,³¹ debido a que los depósitos amiloideos pueden afectar la sobrevivencia de neuronas nuevas en el hipocampo de animales adultos.³²

Los compuestos que tienen un efecto sobre la mejora en la calidad de la vida cotidiana en pacientes con la enfermedad de Alzheimer incluyen la cerebrolisina, la cual estimula la neurogénesis en el hipocampo de roedores.³³

Los agentes colinérgicos son los medicamentos más aceptados en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Existen tres tipos de colinérgicos: los que aumentan la producción de acetilcolina, los inhibidores de la acetilcolinesterasa y los agonistas de la acetilcolina. Los primeros, como la lecitina, tienen un efecto débil y no resultan prácticos. Los inhibidores de la acetilcolinesterasa revolucionaron el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.¹ Entre éstos están el donepecilo, la rivastigmina y la galantamina. Aunque estos medicamentos no curan la enfermedad, mejoran los síntomas como son la memoria, la movilidad y la conducta, sobre todo al inicio del tratamiento. El donepecilo (Eranz) es una piperidina con efecto inhibitorio de la acetilcolinesterasa de acción prolongada, relativamente selectivo y reversible.³⁴ Los resultados de dos estudios básicos mostraron los beneficios de este compuesto sobre la función cognitiva.³⁵ La rivastigmina (Exelon) es un subtipo de inhibidor de la acetilcolinesterasa selectivo y pseudoirreversible. Después de los ensayos de fase II de prueba de concepto, se realizaron cuatro ensayos clínicos de fase III con diseño similar, diferenciándose principalmente en el método de dosificación. Los cuatro ensayos principales fueron de 26 semanas de duración y aleatorizados doble ciego, controlados frente a placebo y con grupo paralelo. Estos ensayos fueron generalmente significativos en cuanto a efectos positivos globales y cognitivos con dosis variables entre 6 y 12 mg/día administradas dos veces al día.³⁶

La galantamina (Reminyl), un alcaloide extraído de la *amarillidaceae*, actúa como un inhibidor reversible competitivo de la acetilcolinesterasa.³⁷ Este compuesto es un modulador alostérico de los receptores colinérgicos, y por medio de este mecanismo es posible que mejore la transmisión colinérgica.³⁸ Los primeros ensayos clínicos³⁹ incluyeron uno de dosificación de fase II, doble ciego de tres meses de duración, en que se compararon dosis de 18, 24 y 36 mg/día de galantamina frente a placebo. En este estudio se observó tanta mayor eficacia como elevada tasa de abandono al tratamiento.

A pesar de que los inhibidores de la acetilcolinesterasa producen una mejoría en la cognición, también producen efectos colaterales. Los más frecuentes producidos por el donepecilo, la rivastigmina y la galantamina son náuseas, vómitos, diarrea y anorexia. Algunos pacientes desarrollan también calambres musculares, cefalea, mareos, síncope, sofocos, insomnio, debilidad, somnolencia, astenia y agitación.⁴⁰

Otra alternativa en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer es el empleo de antagonistas de los receptores NMDA. El daño en las neuronas colinérgicas produce una sobreexcitación por glutamato que puede ser anterior o independiente de la lesión colinérgica.² El transportador anormal EAAT2 de glutamato astroglial está presente en cerebros con enfermedad de Alzheimer.⁴¹ Las subunidades del receptor NMDA —fundamentales para los mecanismos sinápticos del aprendizaje y la memoria— están selectiva y diferencialmente disminuidos en las áreas lesiona-

das en la enfermedad de Alzheimer.⁴² Para evitar la excitación por hiperactividad del glutamato, se neutralizan los receptores de NMDA. La memantina (Ebixa, Akatinol) es un antagonista de los receptores NMDA. Tiene propiedades neuroprotectoras, antiexcitotóxicas y potenciadoras de memoria. Se han llevado a cabo ensayos clínicos en fase III durante 28 semanas, aleatorizados, doble ciego frente a placebo, en grupos paralelos, multicéntricos, durante seis meses, de tipo abierto en enfermos en fase grave o moderadamente grave.⁴³ El medicamento fue superior al placebo con resultados estadísticamente significativos en el cambio clínico global, el grado funcional y la cognición. La dosis recomendada es de 10 mg/12 horas. Este medicamento también produce efectos colaterales semejantes a los que producen los inhibidores de la acetilcolinesterasa.⁴³ En general, las dosis más altas de estos medicamentos producen una mejoría y es mayor su eficacia. Sin embargo, producen efectos colaterales más frecuentes y potencialmente graves por lo que es necesario estudiar su seguridad y eficacia.

La evidencia obtenida hasta ahora indica que el estrés oxidativo, las alteraciones en el citoesqueleto y la pérdida en la formación de neuronas son procesos importantes que participan en la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer. Además, los medicamentos existentes para el tratamiento de esta enfermedad producen efectos colaterales potencialmente graves. Por ello resulta importante la búsqueda de fármacos que disminuyan el estrés oxidativo, que reestablezcan la estructura del citoesqueleto, que estimulen la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo y que no produzcan efectos colaterales adversos, como nuevas alternativas en el tratamiento de las demencias.

La melatonina (5-metoxi-N-acetilriptamina) es una indolamina que actúa como un potente antioxidante, como un modulador de la organización del citoesqueleto y como un factor de diferenciación celular. Esta indolamina es un antagonista de la calmodulina y es capaz de inhibir la actividad de la cinasa II dependiente de la calmodulina.⁴⁴ Además, se ha demostrado que estimula la actividad de la PKC *in vitro*.⁴⁵

Diversos estudios han sugerido que la melatonina tiene un efecto neuroprotector por su capacidad de captar radicales libres.⁴⁶ La melatonina actúa como un captador de radicales libres y aumenta la actividad de varias enzimas antioxidantes, entre ellas la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa.⁴⁷ En neuronas del hipocampo y en neuronas en cultivo, la indolamina disminuye los niveles de lipoperoxidación causados por la 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina (MPTP),⁴⁸ la 6-hidroxidopamina (6-OHDA)⁴⁹ y el ácido káinico.⁵⁰ Estudios recientes han mostrado que la melatonina disminuye la lipoperoxidación y la apoptosis producida por la administración de ácido ocaadáico (AO)⁵¹ o H₂O₂.⁵² Se ha planteado que la posible prevención de la melatonina en la fosforilación de tau se debe parcialmente a su actividad antioxidante.⁵³

El mecanismo por medio del cual la melatonina modula el arreglo del citoesqueleto se conoce parcialmente y a la fecha se sabe que las interacciones de la melatonina con la calmodulina y la PKC participan en este proceso.^{54,55} Estudios realizados en sistemas enzimáticos reconstituidos *in vitro*, en preparaciones de citoesqueletos *in situ* y en células en cultivo han sido útiles para entender el mecanismo por el cual la melatonina induce rearrreglos en el citoesqueleto.

La polimerización de la tubulina *in vitro* depende de GTP. En presencia de las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs), el efecto inhibitor del calcio sobre la polimerización de los microtúbulos se incrementa por la adición de calmodulina.⁵⁶ La melatonina antagoniza este efecto inhibitor de la calmodulina en un margen de concentraciones fisiológicas, lo que causa un alargamiento de los microtúbulos.⁵⁷ La PKC es una enzima que se encuentra asociada a los filamentos intermedios.⁵⁸ La enzima activa fosforila la vimentina y modifica la distribución de los filamentos intermedios.⁵⁹ En las células del neuroblastoma N1E-115, la melatonina activa la PKC, incrementa dos veces la fosforilación de la vimentina y causa un rearrreglo en la organización, tanto de los filamentos intermedios de vimentina como de la PKC con un curso temporal semejante al producido por el agonista de la PKC, el 12-13 miristato acetato de forbol (PMA).⁶⁰ La indolamina, además, activa selectivamente la isoforma alfa de la PKC, pero no la PKC epsilon, en las células N1E-115.⁶¹

La melatonina modula también el arreglo de los microfilamentos de actina en las células Madin-Darby *canine kidney* (MDCK) por medio de una interacción concertada de la indolamina con la calmodulina y con la PKC. Tanto la calmodulina como la PKC se encuentran asociadas a los microfilamentos y ambas proteínas intervienen en la modulación de la polimerización de actina.^{58,62} En las células MDCK se ha descrito que la melatonina aumenta la formación de microfilamentos organizados en fibras de tensión con un tiempo óptimo de seis horas. Mediante la utilización de inhibidores específicos de la PKC (bisindolilmaleimida y calfofostina C) y de un antagonista específico de la calmodulina (opiobiolina) se demostró también que el mecanismo que subyace a la reorganización de los microfilamentos en anillos corticales y en fibras de tensión está mediado por la interacción de la indolamina con la PKC y la calmodulina, respectivamente.⁶³ Recientemente hemos demostrado la participación de la proteína cinasa dependiente de Rho (ROCK) en la formación de fibras de tensión causadas por la melatonina en las células MDCK,⁶⁴ así como su participación en las etapas tempranas de la formación de neuritas causadas por la melatonina en las células N1E-115.⁶⁵

Estudios de nuestro grupo indicaron que la melatonina previene el daño producido por el AO en las células N1E-115.⁵¹ El AO se ha utilizado para reproducir en células en

cultivo las alteraciones en el citoesqueleto y el incremento en el estrés oxidativo, que ocurren en las neuronas de pacientes con enfermedad de Alzheimer.⁶⁶ Este compuesto inhibe las PP1 y PP2A,⁶⁷ y por lo tanto causa la hiperfosforilación de la proteína tau, la formación de filamentos helicoidales apareados y la retracción del citoesqueleto alrededor del núcleo.⁶⁸ En las células N1E-115 cultivadas durante dos horas con 50 nM de AO, el citoesqueleto se observa colapsado alrededor del núcleo. La melatonina en estas células previene 100% el efecto del AO. La red del citoesqueleto se mantiene en el citoplasma y en las neuritas de las células N1E-115 cultivadas dos horas con melatonina, previas a la adición del AO. Además, la indolamina 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, fueron dependientes de la dosis con que se trataron los cultivos.⁵¹ Recientemente demostramos que la incubación durante seis horas con melatonina, a una concentración de 100nM en células del neuroblastoma N1E-115, previene la hiperfosforilación de la proteína tau causada por el AO (15 nM -24h-).⁶⁹ Otros estudios han señalado que el tratamiento con melatonina (25 y 50 uM) produce una disminución de los niveles de tau hiperfosforilada y un incremento de tau no fosforilada en células tratadas con otro inhibidor de las PP1 y 2, la caliculina.⁷⁰ Además, otros autores mostraron, en un modelo experimental de rata que el tratamiento con haloperidol produce una disminución en los niveles de melatonina circulantes en plasma asociado con una hiperfosforilación de la proteína tau y un decremento en la cantidad de PP2A. El tratamiento posterior con melatonina impide la hiperfosforilación de tau y restaura la actividad de la PP2A.⁷¹ Estos datos sugieren la participación de la melatonina en el balance fosforilación-defosforilación de la proteína tau.

Aunado a lo anterior, se ha demostrado que la melatonina modula la formación de neuronas nuevas en un modelo *in vitro* utilizando células embrionarias y de corteza cerebral.^{72,73} Datos obtenidos por nuestro grupo, en estudios en que utilizamos células madre aisladas del hipocampo de animales adulto, indican que la melatonina modula la supervivencia y diferenciación de nuevas neuronas a partir de las células madre. Este efecto fue corroborado utilizando animales adultos a los que se administró la hormona y que reflejaron un aumento en el número de células nuevas que sobreviven debido a la melatonina.* Estos datos sugieren la posible utilización de la melatonina como un coadyuvante en el tratamiento de las demencias.

* Ramírez-Rodríguez G, Klempin F, Babu H, Benítez-King G, Kempermann G: Melatonin modulates cell survival of new born neurons in the adult hippocampus. *En preparación*.

CONCLUSIONES

Estos resultados sugieren la hipótesis de 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, por medio de la estimulación de la PKC 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 indolamina⁷⁴ y por escasos estudios clínicos en que se ha demostrado que la administración de la melatonina a sujetos que padecen esta enfermedad causa una mejoría en los trastornos de los ritmos circadianos,^{75,76} así como una reducción en la disfunción cognocitiva.^{77,78}

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por CONACYT, México. Donativo 46593-M.

REFERENCIAS

1. Roger B, Gerry H. Realistic expectations: The management of severe alzheimer disease. *Alzh Dis Assoc Disor* 2003; 17(3):S80-S85.
2. Tiraboschi P, Hansen LA, Alford M, Masliah E, Thal L et al. The decline in synapses and cholinergic activity is asynchronous in Alzheimer's disease. *Neurology* 2000; 55:1278-1283.
3. Haughey NJ, Nath A, Chan SL, Borchard AC, Rao MS et al. 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.
4. Kuhn HG, Cooper-Kuhn CM, Boekhoorn K, Lucassen PJ. Changes in neurogenesis in dementia and alzheimer Mouse models: are they functionally relevant. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2007; 257(5):281-289.
5. Kowall NW, Kosik KS. Axonal disruption and aberrant localization of tau protein characterize the neuropil pathology of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1987; 22:639-643.
6. Cid-Arregui A, De Hoop M, Dotti CG. Mechanism of neuronal polarity. *Neurobiol Aging* 1995; 16:239-243.
7. Avila J. Tau aggregation into fibrillar polymers: taupathies. *FEBS Lett* 2000; 30:89-92.
8. Eidenmuller J, Fath T, Hellwing A, Reed J, Sontag E et al. Structural and functional implications of tau hyperphosphorylation: information from phosphorylation-mimicking mutated tau proteins. *Biochemistry* 2000; 39:13166-13175.
9. Braak E, Braak H, Mandelkow EM. A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol* 1994; 87:554-567.
10. Brandt R, Lee G. Orientation, assembly, and stability of microtubule bundles induced by a fragment of tau protein. *Cell Motil Cytoskeleton* 1994; 28:143-154.
11. Alonso AD, 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 Nat Acad Sci USA* 1997; 94:298-303.
12. Griffin JW, Watson DF. Axonal transport in neurological disease. *Ann Neurol* 1988; 23:3-13.
 13. Benítez-King G, Ortíz-López L, Morales-Mulia S, Jiménez-Rubio G, Ramírez-Rodríguez G et al. Phosphorylation-Dephosphorylation imbalance of cytoskeletal associated proteins in neurodegenerative diseases. *Recent Patents CNS Drug Discovery* 2006; 1:1-12.
 14. Singh TJ, Grundke-Iqbal I, Wu WQ, Chauhan V, Novak M et al. Protein kinase C and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylate three-repeat and four-repeat tau isoforms at different rates. *Mol Cell Biochem* 1997; 168(1-2):141-148.
 15. Bennecib M, Gong C-X, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Role of protein phosphatase-2A and -1 in the regulation of GSK-3, cdk5 and cdc2 and the phosphorylation of tau in rat forebrain. *FEBS Lett* 2000; 485:87-93.
 16. Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. Distribution of Alzheimer-type pathologic changes in nondemented elderly individuals matches the pattern in Alzheimer's disease. *Neurology* 1992; 42:631-639.
 17. Braak H, Braak E. Diagnostic criteria for neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1997; 18:351-357.
 18. Delacourte A, David JP, Sergeant N, Buee L, Wattez A et al. The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 1999; 52:1158-1165.
 19. Smith MA, Rottkamp CA, Nunomura A, Raina AK, Perry G. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Acta* 2000; 1502:139-144.
 20. Borg J, London J. Copper/zinc superoxide dismutase overexpression promotes survival of cortical neurons exposed to neurotoxins in vitro 2. *J Neurosci Res* 2002; 70:180-189.
 21. Milzani A, Dalledonne I, Colombo R. Prolonged oxidative stress on actin 3. *Arch Biochem Biophys* 1997; 339:267-274.
 22. Lovell MA, Xiong S, Xie C, Davies P, Markesbery WR. Induction of hyperphosphorylated tau in primary rat cortical neuron cultures mediated by oxidative stress and glycogen synthase kinase-3. *J Alzheimers Dis* 2004; 6:659-671.
 23. Zhu X, Rottkamp CA, Boux H, Takeda A, Perry G et al. Activation of p38 kinase links tau phosphorylation, oxidative stress, and cell cycle-related events in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59:880-888.
 24. Hinshaw DB, Miller MT, Omann GM, Beals TF, Hyslop PA. A cellular model of oxidant-mediated neuronal injury. *Brain Res* 1993; 25:13-26.
 25. Banan A, Fields JZ, Zhang Y, Keshavarzian A. iNOS upregulation mediates oxidant-induced disruption of F-actin and barrier of intestinal monolayers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280:1234-1246.
 26. O'Loughlin A, Perez-Morgado MI, Salinas M, Martin ME. Reversible inhibition of the protein phosphatase 1 by hydrogen peroxide Potential regulation of eIF2alpha phosphorylation in differentiated PC12 cell. *Arch Biochem Biophys* 2003; 417:194-202.
 27. Howe CJ, Lahair MM, Maxwell JA, Lee JT, Robinson PJ et al. Participation of the calcium/calmodulin-dependent kinases in hydrogen peroxide-induced I κ B phosphorylation in human T lymphocytes. *J Biol Chem* 2002; 277:30469-30476.
 28. Maher P. How protein kinase C activation protects nerve cells from oxidative stress-induced cell death. *J Neurosci* 2001; 21:2929-2938.
 29. Forlenza OV, Spink JM, Dayanandan R, Anderton BH, Olesen OF et al. Muscarinic agonists reduce tau phosphorylation in non-neuronal cells via GSK-3beta inhibition and in neurons. *J Neural Transm* 2000; 107:1201-1212.
 30. German DC, Eisch AJ. Mouse models of Alzheimer's disease: insight into treatment. *Rev Neurosci* 2004; 15(5):353-369.
 31. Zhang C, McNeil E, Dressler L, Siman R. Long lasting impairment in hippocampal neurogenesis associated with amyloid deposition in a knock-in mouse model of familial Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 2007; 177:77-87.
 32. Verret L, Jankowsky JL, Xu GM, Borchelt DR, Rampon C. Alzheimer's type amyloidosis in transgenic mice impairs survival of newborn neurons derived from adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 2007; 27(25):6771-6780.
 33. Tatebayashi Y, Lee MH, Li L, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. The dentate gyrus neurogenesis: a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2003; 105(3):225-232.
 34. Rogers SL, Doody RS, Mohs RC, Friedhoff LT. Donepezil improves cognition and global function in Alzheimer disease: a 15-week, double blind placebo-controlled study. Donepezil Study Group (see comments). *Arch Intern Med* 1998a; 158(9):1021-1031.
 35. Burns A, Rossor M, Hecker J, Gauthier S, Petit H et al. The effects of donepezil in Alzheimer's disease -results from a multinational trial. *Dementia Ger Cog Disor* 1999; 10:327-244.
 36. Schneider LS, Farlow AR. Systematic review of the efficacy of rivastigmine for the patients with Alzheimer's disease. *Inter J Ger Psychophar* 1998; 1(Suppl 1):S26-S34.
 37. Harvey AL. The pharmacology of galantamine and its analogues. *Pharmacol Therap* 1995; 68(1):113-128.
 38. Maelicic A, Coban T, Storch A, Schrattenholz A, Pereira EF et al. Alos-teric modulation of Torpedo nicotinic acetylcholine receptor ion channel activity by noncompetitive agonists. *J Recep Signal Trans Res* 1997; 17(1-3):11-28.
 39. Wilcock GK, Scott M, Pearsall T, Neubauer K. Galanthamine and the treatment of Alzheimer's disease. *Int J Ger Psych* 1993; 8:781-782.
 40. Rogers SL, Farlow MR, Doody RS, Mohs R, Friedhoff LT. A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. Donepezil Study Group. *Neurology* 1998b; 50(1):136-145.
 41. Honig LS, Chamblis DD, Bigio EH, Carroll SL, Elliot JL. Glutamate transporter EAAT2 splice variants occur not only in ALS but also in AD and controls. *Neurology* 2000; 55:1082-1088.
 42. Sze C, Bi H, Kleinschmidt-Demasters BK, Martin LJ. N-Methyl-D-aspartate receptor subunit proteins and their phosphorylation status are altered selectively in Alzheimers disease. *J Neurol Sci* 2000; 182:151-159.
 43. Reisenberg B, Windscheif V, Ferris SH, Hingorani VN, Stoeffler A et al. Memantine in moderately severe to severe Alzheimer's disease (AD): results of a placebo-controlled 6-month trial. *Neurobiol Aging* 2000; 21(Suppl 1):S275.
 44. Benítez-King G, Ríos A, Martínez A, Anton-Tay F. In vitro inhibition of Ca⁺⁺/calmodulin dependent protein kinase II activity. *Biochem Biophys Acta* 1996; 1290:191-196.
 45. Anton-Tay F, Ramirez G, Martinez I, Benítez-King G. In vitro stimulation of protein kinase C by melatonin. *Neurochem Res* 1998; 23:605-610.
 46. Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Progr Neurobiol* 1998; 56:359-384.
 47. Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S. Free radical-mediated molecular damage: mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann NY Acad Sci* 2001; 939:200-215.
 48. 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.
 49. Mayo JC, Sainz RM, Uria H, Antolin I, Esteban 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.
 50. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Kim SJ et al. Melatonin protects hippocampal neurons in vivo against kainic acid- induced damage in mice. *J Neurosci Res* 1998; 54:382-389.
 51. Benítez-King G, Tunez I, Bellon A, Ortiz GG, Anton-Tay F. Melatonin prevents cytoskeletal alterations and oxidative stress induced by okadaic acid in N1E-115 cells. *Exp Neurol* 2003; 182:151-159.
 52. Benítez-King G, Ortíz-López L, Jiménez-Rubio G. Melatonin precludes cytoskeletal collapse caused by hydrogen peroxide: participation of protein kinase C. *Therapy* 2005; 2:762-778.
 53. Wang J, Wang Z. Role of melatonin in Alzheimer-like neurodegeneration. *Acta Pharmacol Sinica* 2006; 27:41-49.
 54. Benítez-King G, Anton-Tay F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia* 1993; 49:635-641.
 55. Benítez-King G, Anton-Tay F. Calmodulin and protein kinase C á are two Ca⁺⁺ binding proteins that mediate intracellular melatonin signa-

- ling. En: Webb SM, Puig-Domingo M, Moller M, Pevet P (eds). Pineal gland update: 1996 From molecular mechanisms to clinical implications. New York: PJD Publications Limited; 1997; p.13-20.
56. Kumagai HE, Nishida E, Kotani S, Sakai H. On the mechanism of calmodulin-induced inhibition of microtubule assembly in vitro. *J Biochem* 1986; 99:521-525.
 57. Huerto-Delgadillo L, Anton-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; 17:55-62.
 58. Murti KG, Kaur K, Goorha RM. Protein kinase C associates with intermediate filaments and stress fibers. *Exp Cell Res* 1992; 202:36-44.
 59. Ando S, Tanabek K, Gonda Y, Sato C, Inagaki M. Domain and sequence specific phosphorylation of vimentin induced disassembly of the filament structure. *Biochemistry* 1989; 28:2974-2979.
 60. Benítez-King G. PKC activation by melatonin modulates vimentin intermediate filament organization in N1E-115 cells. *J Pineal Res* 2000; 29:8-14.
 61. Benítez-King G, Hernández ME, Tovar R, Ramírez G. Melatonin activates PKC alpha but not PKC epsilon in N1E-115 cells. *Neurochem Int* 2001; 39:95-102.
 62. Glenney JR, Weber K. Calmodulin-binding proteins of the microfilaments present in isolated brush borders and microvilli of intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 1980; 255:10551-10554.
 63. Ramírez-Rodríguez G, Meza I, Hernández ME, Castillo A, Benítez-King G. Melatonin induced cyclic modulation of vectorial water transport in kidney derived MDCK cells. *Kidney Int* 2003; 63:1356-1364.
 64. Ramírez-Rodríguez G, Ortíz-López L, Benítez-King G. Melatonin increases stress fibers and focal adhesions in MDCK cells: participation of Rho-associated kinase and protein kinase C. *J Pineal Res* 2007; 42:180-190.
 65. Bellon A, Ortíz-López L, Ramírez-Rodríguez G, Anton-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 Research* 2007; 42:214-221.
 66. 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.
 67. 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.
 68. Lee J, Hong H, Im J, Byun H, Kim D. The formation of PHF-1 and SMI-31 positive dystrophic neurites in rat hippocampus following acute injection of okadaic acid. *Neurosci Lett* 2000; 282:49-52.
 69. Jiménez-Rubio G, Benítez-King G, Ortíz-López L. Melatonin elicits neuritogenesis and reverses tau hyperphosphorylation in N1E-115 neuroblastoma cells treated with okadaic acid. En: Fernández AJ (ed). *Focus in Neuroblastoma Research*. Hauppauge, NY: Nova Science Publishers; 2007; p.99-117.
 70. Li XC, Wang ZF, Zhang JX, Wang Q, Wang JZ. Effect of melatonin on calyculin A-induced tau hyperphosphorylation. *Eur J Pharmacol* 2005; 510:25-30.
 71. Zhu LQ, Wang SH, Ling ZQ, Wang DL, Wang JZ. Effect of inhibiting melatonin biosynthesis on spatial memory retention and tau phosphorylation in rat. *J Pineal Res* 2004; 37:71-77.
 72. Kong X, Li X, Cai Z, Yang N, Liu Y et al. Melatonin Regulates the Viability and Differentiation of Rat Midbrain Neural Stem Cells. *Cell Mol Neurobiol* 2007; 28:569-579.
 73. Moriya T, Horie N, Mitome M, Shinohara K. Melatonin influences the proliferative and differentiative activity of neural stem cells. *J Pineal Res* 2007; 42:411-418.
 74. Liu RY, Zhou JN, Van Heerikhuizen J, Hoffman MA, Swaab DF et al. 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.
 75. Brusco LI, Marquez M, Cardinali DP. Monozygotic twins Alzheimer's Disease treated with melatonin: Case report. *J Pineal Res* 1998; 25:260-263.
 76. 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.
 77. Asayama K, Yamadera H, Ito T, Suzuki H, Kudo Y et al. Double blind study of melatonin effects on the sleep-wake rhythm, cognitive and non-cognitive functions in alzheimer type dementia. *J Nippon Med Sch* 2003; 70(4):334-341.
 78. Brusco LI, Marquez M, Cardinali DP. Melatonin treatment stabilizes chronobiologic and cognitive symptoms in Alzheimer's disease. *Neuroendocrinol Lett* 2000; 21:39-42.