

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Interacción calmodulina-melatonina: efectos sobre la oxidación de la calmodulina y la actividad de la calmodulina cinasa II

T E S I S

Que para obtener el grado de
Doctor en Biología Experimental

P R E S E N T A

José de Jesús Argueta Donohué

Comité de tutores:

Dra. Gloria Benítez King

Dr. Javier Velázquez Moctezuma

Dr. Alessio Franci

Diciembre de 2022

El programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020.

Dra. Gloria Benítez King

Codirectora

Laboratorio de Neurofarmacología, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz

Dr. Javier Velázquez Moctezuma

Biología de la Reproducción, DCBS, UAM-I

Dr. Alessio Franci

Departamento de Matemáticas, Facultad de Ciencias, UNAM

Resumen

Las especies reactivas de oxígeno son las moléculas más reactivas que, entre otras características, tienen diferentes vidas medias, concentraciones celulares y blancos de reacción. Están presentes en diferentes compartimentos y reaccionan con diferentes gradientes de moléculas en la célula. En particular las proteínas pueden reaccionar con casi todos los radicales de oxígeno presentes en la célula y al final, estas reacciones de oxidación producen cambios conformacionales en estas moléculas debido a la carbonilación y a la sulfoxidación que impacta diferentes funciones celulares. En el caso de la calmodulina, una proteína que actúa como un sensor de Ca^{2+} , se puede oxidar por radicales libres de oxígeno y puede experimentar modificaciones en su estructura secundaria y en consecuencia se puede alterar su función hasta llegar a su degradación.

Los radicales libres son regulados en la célula por mecanismos antioxidantes los cuales se pueden clasificar en enzimáticos como la superóxido dismutasa y no enzimáticos como el glutatión. Existen otras moléculas que pueden captar radicales libres y por lo tanto participar en la regulación de la oxidación, como lo es la melatonina, que es una hormona de múltiples funciones además de actuar como una señal que sincroniza el medio interno con el fotoperiodo.

En las enfermedades psiquiátricas, en particular en la esquizofrenia, están desregulados los mecanismos antioxidantes y se han encontrado altos niveles de oxidación en tejido cerebral, así como la presencia de metabolitos que de manera indirecta muestran el incremento de radicales libres. En esta tesis se estudió la interacción calmodulina melatonina y su impacto en la actividad

enzimática en un microambiente oxidante, así como también se caracterizó el perfil de oxidación en células de pacientes con esquizofrenia.

Abstract

Reactive oxygen species are the most reactive molecules that, among other characteristics, have different half-lives, cellular concentrations, and reaction targets. They are present in different compartments and react with different gradients of molecules in the cell. In particular, proteins can react with almost all oxygen radicals present in the cell, and ultimately, these oxidation reactions produce conformational changes in these molecules due to carbonylation and sulfoxidation that impact different cellular functions. In the case of calmodulin, a protein that acts as a Ca^{2+} sensor, it can be oxidized by oxygen free radicals and can undergo modifications in its secondary structure, and consequently, its function can be altered until it is degraded.

Free radicals are regulated in the cell by antioxidant mechanisms which can be classified as enzymatic such as superoxide dismutase and non-enzymatic such as glutathione. Other molecules can capture free radicals and therefore participate in the regulation of oxidation, such as melatonin, which is a hormone with multiple functions in addition to acting as a signal that regulates the circadian rhythm.

In psychiatric diseases, particularly schizophrenia, antioxidant mechanisms are deregulated and high levels of oxidation have been found in brain tissue, as well as the presence of metabolites that indirectly show an increase in free radicals. In this dissertation work, the calmodulin-melatonin interaction and its impact on enzyme activity in an oxidative microenvironment were studied, as well as the oxidation profile in cells of patients with schizophrenia.

Índice	
1. Introducción	1
1.1. Enfermedades neuropsiquiátricas	1
1.1.2. Esquizofrenia	2
1.2. Calmodulina	3
1.3. Melatonina	6
1.4. Oxidación	8
1.4.1. Especies reactivas de oxígeno	8
1.4.2. Oxidación de proteínas	9
1.4.3. Oxidación en la regulación de las funciones celulares	10
1.4.4. Oxidación y esquizofrenia	11
2. Antecedentes	12
3. Justificación	14
4. Planteamiento del problema	15
5. Hipótesis	16
6. Objetivo general	16
7. Objetivos particulares	16
8. Material y métodos	17
8.1. Reactivos	17
8.2. Espectroscopía UV-visible de la calmodulina y la melatonina	18
8.3. Espectroscopía de Raman de la calmodulina y la melatonina	18
8.4. Separación de la calmodulina por electroforesis unidimensional	19
8.5. Separación de la calmodulina y de la melatonina por electroforesis bidimensional	20
8.6. Colocalización de la calmodulina y la melatonina	21
8.7. Actividad enzimática de la CaMKII	22
8.8. Cuantificación de la calmodulina oxidada	23
8.9. Actividad enzimática de la CaMKII en un microambiente prooxidante	24
8.10. Presencia de radicales libres de oxígeno y lipoperoxidación en células vivas	24
8.11. Análisis estadístico	25
9. Resultados	26
9.1. Caracterización de la movilidad electroforética de la calmodulina activada por Ca^{2+} y de la calmodulina sin Ca^{2+}	26
9.2. Caracterización de las conformaciones que adopta la calmodulina con la interacción de la melatonina	28
9.2.1. Electroforesis 2D nativa	28
9.2.2. Espectroscopía UV-visible	31
9.2.3. Espectroscopía Raman	32
9.2.4. Colocalización de la calmodulina y la melatonina por microscopía confocal	35
9.3. Actividad de la calmodulina en su interacción con la melatonina	37
9.4. Efecto antioxidante de la melatonina sobre la calmodulina en un ambiente prooxidante	39
9.4.1. Efecto de la melatonina sobre la actividad de la CaMKII en un ambiente prooxidante	42
9.5. Radicales libres de oxígeno y lipoperoxidación en los precursores neuronales olfatorios derivados de sujetos control y con esquizofrenia	44
10. Discusión	46
11. Conclusiones	58

12. Referencias 58

1. Introducción

La esquizofrenia es una enfermedad neuropsiquiátrica que presenta niveles elevados de moléculas prooxidantes, así como problemas en la actividad de sus mecanismos antioxidantes, por lo que las funciones de distintas proteínas están desreguladas, entre ellas, la calmodulina (CaM). Esta proteína participa en una gran cantidad de procesos que regulan la fisiología de la célula. Así, las funciones celulares son reguladas por innumerables mecanismos que van desde la interacción reversible con moléculas hasta la modificación estructural de la proteína. De nuestro interés son el efecto de la hormona melatonina (MEL) y el microambiente que va desde condiciones hidrofóbicas e hidrofílicas hasta la modificación postraduccional de la proteína por especies reactivas de oxígeno.

1.1. Enfermedades neuropsiquiátricas

Las enfermedades psiquiátricas son un conjunto de desórdenes mentales que se pueden clasificar en cuatro grupos: a) Los desórdenes de ansiedad como pueden ser el desorden de pánico, postraumático, de ansiedad, b) Los desórdenes del estado de ánimo, como la depresión mayor, el desorden bipolar, etc., c) Los desórdenes del control de impulsos, en los que encontramos el desorden la conducta, el de déficit de atención, d) Los desórdenes del abuso de sustancias (Medina-Mora et al., 2007). En particular y en el contexto de la tesis, la esquizofrenia es una enfermedad neuropsiquiátrica que presenta niveles elevados de moléculas prooxidantes, así como deficiencias en los mecanismos antioxidantes, por lo que las funciones de distintas proteínas podrían estar desreguladas, entre ellas, la CaM (Robison et al., 2007; Vidal-Domènech et al.,

2020a). La CaM, que es una proteína aceptora de Ca^{2+} , participa en una gran cantidad de procesos que regulan la fisiología de la célula. Tiene múltiples proteínas blanco entre las que se encuentra la CaM cinasa II (CaMKII) que tiene un papel clave en la conectividad neuronal y por lo tanto en las enfermedades neuropsiquiátricas. Así, las funciones celulares son reguladas por innumerables mecanismos que van desde la interacción reversible con moléculas hasta la modificación estructural de la proteína.

1.1.2 Esquizofrenia

La esquizofrenia de manera general presenta una prevalencia anual del 1% a nivel mundial, sin embargo, algunos estudios presentan que esta enfermedad tiene una prevalencia de 4-7 casos por cada 1000 sujetos y una incidencia de 15.2 casos por cada 10,000 sujetos por año, esto relacionado al número anual de nuevos casos (Saha et al., 2005). En México con los datos de la encuesta nacional de ingresos y gastos de los hogares 2018 se reportó que la prevalencia de la esquizofrenia es del 0.48% (Cabello-Rangel et al., 2022).

La esquizofrenia, según el DSM-5, es un espectro de condiciones psicóticas que pueden presentar una o más anormalidades como lo son: delirios, alucinaciones, pensamiento y lenguaje desorganizado, anormalidades del comportamiento y síntomas negativos, como lo son la disminución de expresiones emocionales, la abulia, etc.

En esta enfermedad se ha observado que está presente un incremento en la cantidad de radicales libres de oxígeno (ROS) y una disminución en la actividad y

concentración de moléculas antioxidantes, así como una disminución y modificación de la sincronía en la secreción y concentración de la MEL (Duan et al., 2021; Morera-Fumero & Abreu-Gonzalez, 2013).

Por otro lado, hay estudios en donde algunas condiciones asociadas a la cognición y otros síntomas presentes en la esquizofrenia se han asociado a la desregulación de la vía de la CaM, CaMKII (Brown et al., 2021; Frankland et al., 2008).

1.2. Calmodulina

En la década de los 70's se encontró una proteína con la capacidad de unir Ca^{2+} . Desde entonces se le describe como la proteína que es el principal aceptor y modulador del Ca^{2+} , por lo que se le llamó calmodulina. Esta es una proteína de 148 aminoácidos que pertenece a la familia de proteínas que unen Ca^{2+} . La CaM puede unir Ca^{2+} debido a dos zonas tipo "EF hand" (Sasagawa et al., 1982) y por esto, esta proteína adopta de manera general dos conformaciones funcionales, la CaM unida a Ca^{2+} u holo-CaM y la CaM que no está unida a Ca^{2+} o apo-CaM (Jurado et al., 1999). La holo-CaM tiene una conformación que presenta dos estructuras globulares opuestas unidas por una estructura alfa, toda esta conformación que es abierta asemeja a una "mancuernilla". La apo-CaM presenta una conformación globular aleatoria, una forma cerrada (Mccarthy et al., 2015). Dichas estructuras pueden estar presentes de manera independiente al gradiente de concentración de Ca^{2+} , sin embargo, cuando la concentración de Ca^{2+} aumenta en el microambiente de la CaM, este catión favorece la estructura de "mancuernilla" (Junker & Rief, 2009). Se puede encontrar otra conformación de la

holo-CaM que es cuando esta proteína se une a su enzima blanco, como lo puede ser la CaMKII, cuando ocurre este evento la doble unión favorece la activación de la enzima y se genera una respuesta. En la actualidad se han descrito al menos 45 conformaciones estructurales que puede adoptar la CaM dependiendo de su microambiente (Chen et al., 2006) (figura c1).

Es importante señalar que la holo- y la apo-CaM presentan funciones diferentes. Algunas de las funciones de la holo-CaM, cuando esta se une a determinada enzima, son la inhibición de la polimerización de actina F, la disminución de la concentración de Ca^{2+} citosólico como en la regulación de la concentración en el músculo liso, la regulación del metabolismo del glucógeno, etc. Algunas de las funciones de la apo-CaM están relacionadas a la síntesis de óxido nítrico, a la producción de AMPc, así como también en la participación del mecanismo de liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico, etc.

Las principales modificaciones postraduccionales encontradas en la CaM son la fosforilación, la acetilación y la ubiquitinación. Otras son la metilación, la carbonilación, la sulfoxidación, la succinilación, la glicosilación, etc. Esta puede unirse a casi 300 proteínas diferentes con una gran cantidad de efectos en diferentes compartimentos celulares. Algunas de las proteínas que podrían unirse a la calmodulina son las proteínas de membrana, las proteínas nucleares, las de citoesqueleto, de citoplasma, mitocondriales, de Golgi y las ribosómicas. Una de las interacciones más comunes que ocurren en el cerebro es con la enzima calmodulina cinasa II alfa ($\text{CaMKII}\alpha$). También se han descrito interacciones con la

actina, la calmodulina cinasa IV, entre otras proteínas blanco. (O'Connell et al., 2010).

En la actualidad se sabe que la CaM interacciona con diferentes fármacos que se han utilizado en el tratamiento de la esquizofrenia como el haloperidol y la trifluoperazina que además de actuar como antagonistas del receptor D2 dopaminérgico, también actúan como antagonistas de la actividad de la CaM (Hempel et al., 2013). En este sentido es importante señalar que también ciertas moléculas endógenas pueden unirse a la CaM. Una de estas moléculas es la MEL.

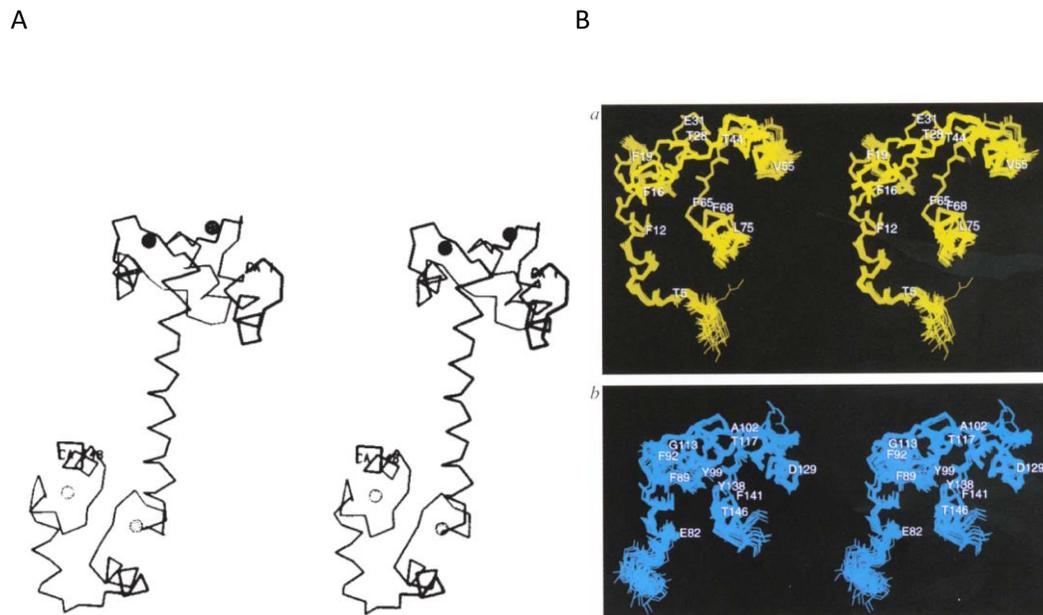


Figura c1. Estructura de la calmodulina. A) Estructura en estéreo de la holo o Ca²⁺-calmodulina (CaM), se muestran cuatro esferas correspondientes a los cuatro átomos de Ca²⁺ que se unen. B) Estructura en estéreo de la apo o EGTA-CaM, donde se muestran en amarillo la zona amino-terminal (a) y en azul la zona

carboxilo-terminal (b). Se muestran diferentes conformaciones apiladas y las posiciones de los diferentes aminoácidos. Imágenes tomadas de (Babu et al., 1988; Kuboniwa et al., 1995).

1.3. Melatonina

La MEL, N-acetil-5-metoxitriptamina (figura c2), es una hormona que se sintetiza y se secreta en la glándula pineal durante la noche. Cuando el organismo se expone a la luz dicha secreción se suprime (Weitzman et al., 1980). Sus principales precursores son el triptófano y la serotonina. Las enzimas más importantes que participan en su biosíntesis son la aralquilamina N-acetil transferasa (AANAT) o serotonina N-acetil transferasa (SNAT), hidroxil indol-O-metil transferasa (HIOMT) o acetil serotonina N-metil transferasa (ASMT) (Singh & Jadhav, 2014). La MEL también se puede sintetizar en otros órganos incluidos el tracto gastrointestinal, la piel, la retina, las glándulas salivales, las plaquetas y los linfocitos. También es posible que se presente su síntesis en el cerebro (Acuña-Castroviejo et al., 2014). La MEL es un modulador biológico del estado de ánimo, del sueño, del comportamiento sexual y del ritmo circadiano. Su metabolismo se lleva a cabo principalmente en el hígado por la vía de las quinureninas. Esta hormona es una molécula anfifílica y es soluble en un microambiente acuoso o lipídico por lo que presenta una alta permeabilidad. Por lo que esta hormona difunde a todos los compartimentos subcelulares en los que puede actuar por interacción con sus proteínas blanco (Yu et al., 2016). De manera general los efectos de la MEL en el microambiente celular se pueden llevar a cabo a través de cuatro mecanismos: a) mediante la unión a sus receptores en la membrana plasmática, b) mediante la

unión a proteínas intracelulares, c) mediante la unión a receptores nucleares, d) y como un donador de electrones a los radicales libres.

Es importante señalar la función antioxidante de la MEL ya que esta hormona puede reaccionar con diferentes enzimas (antioxidantes), especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno con las cuales se generan diferentes catabolitos de la MEL que pueden seguir reaccionando con las especies reactivas. Algunos de los agentes oxidantes con los que reacciona la MEL son el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo, el óxido nítrico, el radical alcoxi, el singlete de oxígeno, etc. Así, la MEL aparte de reaccionar con los agentes oxidantes, puede modificar la actividad de las enzimas involucradas en los mecanismos antioxidantes, tales como son la enzima superóxido dismutasa, el glutatión, la enzima óxido nítrico sintasa, etc. (Manchester et al., 2015). Algunos de los metabolitos de la MEL que se generan cuando esta reacciona con las especies reactivas son la hidroximelatonina, la melatonina cíclica, la nitrosomelatonina y la quinuramina. Cuando la MEL reacciona con radicales libres, por ejemplo, se genera 3-hidroximelatonina cíclica (C-3HOM), después se genera N-acetil-N-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK), siguiendo con 5-acetil-metoxiquinuramina (AMK), entre otros (Tan et al., 2015). En resumen, la MEL es una hormona que puede tener efectos antioxidantes ya que puede reaccionar con radicales libres de oxígeno y nitrógeno y también puede modificar y regular mecanismos antioxidantes conservados durante la evolución. Puede “proteger” biomoléculas tales como proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. Así, se logran todos estos efectos sin la

restricción de compartimentos subcelulares y por la acción de su unión directa (o no) a algunas biomoléculas.

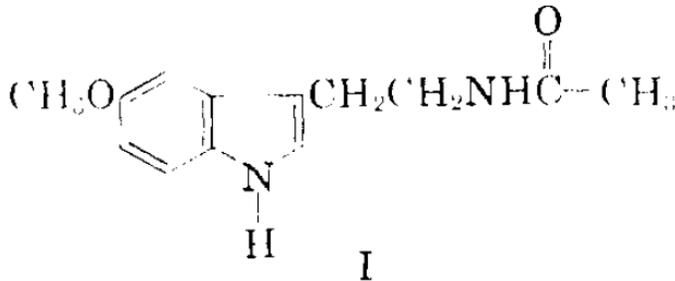


Figura c2. Estructura de la melatonina. Se muestra la estructura de la melatonina, N-acetil-5-metoxitriptamina. Imagen tomada de (Lerner et al., 1959).

1.4. Oxidación

La oxidación es un evento molecular que ocurre cuando las especies reactivas de oxígeno (ROS) donan electrones a diferentes compuestos o moléculas. Así, las ROS son un grupo de moléculas derivadas del oxígeno que de manera general son producidos en la células, por las mitocondrias y la vía de la NADPH oxidasa. Los dos principales donadores de electrones son el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Quiney et al., 2011).

1.4.1. Especies reactivas de oxígeno

El oxígeno es un átomo con número atómico 8 y una masa atómica de 16, así su número de electrones es 8. En su último orbital tiene dos electrones no apareados o de valencia, los cuales reaccionan con otros átomos para formar diferentes compuestos que van desde radicales libres inestables hasta derivados de oxígeno con característica de estables (Decker & van Holde, 2011). Las especies reactivas

de oxígeno están presentes en diferentes compartimentos de la célula, los sitios donde estos se pueden generar de manera masiva son la mitocondria y los endosomas. Los radicales libres son: el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el hidroxilo ($\cdot OH$), el hidroperóxido (HO_2^{\cdot}), etc. Como no radicales: el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ácido hipobromoso ($HOBr$) y el ácido hipocloroso ($HOCl$). Es importante señalar que los radicales libres regulan algunas vías de señalización y por lo tanto tienen un impacto importante como reguladores de la actividad de las proteínas (Rocco-Machado et al., 2022).

1.4.2. Oxidación de proteínas

En las células uno de los mecanismos más comunes que generan radicales libres de oxígeno, es la reacción de Fenton (Lloyd et al., 1997) y la de Haber-Weis.

Estas reacciones se llevan a cabo cuando el H_2O_2 interactúa con iones metálicos tales como el hierro (Fe^{2+}), el resultado de esta reacción es el radical $\cdot OH$ (Davies et al., 2016). También está presente otra reacción, que se da cuando el radical $\cdot OH$ reacciona con carbonatos o moléculas de bicarbonato, en la que se generan radicales de carbonato ($CO_3^{\cdot-}$).

Una vez que se han formado las especies reactivas de oxígeno, estas pueden reaccionar con moléculas biológicas, tales como las proteínas. Algunas de estas reacciones pueden ser reversibles, así estas reacciones promueven cambios o modificaciones en las funciones propias de determinadas proteínas. Si la reacción de oxidación es irreversible esto nos puede llevar a la inactivación y posterior degradado de dichas proteínas.

La oxidación de las proteínas puede clasificarse en dos grupos, en los péptidos que se carbonilan y/o los que se sulfoxidan. La carbonilación es una reacción química que introduce un grupo carbonilo en ciertos residuos de la proteína ya sea por escisión de la proteína por la vía de la alfa-amidación o por la oxidación de las cadenas laterales de glutamilo. Además, pueden generarse por la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados, así como con la reacción de carbohidratos reductores (Møller et al., 2011). La sulfoxidación solo es posible que suceda cuando un radical de oxígeno reacciona con los aminoácidos cisteína o metionina. Ocurre cuando un radical de oxígeno reacciona con el grupo tiol de tales aminoácidos.

La mayoría de los grupos carbonilo presentes en las proteínas pueden ser formados por la reacción con los residuos de lisina, arginina, treonina y prolina. La tendencia a ser oxidados estos aminoácidos puede deberse a su posición en la superficie de las distintas proteínas (Maisonneuve et al., 2009).

Cuando los aminoácidos cisteína o metionina son objeto de los radicales de oxígeno, en un microambiente celular, estos reaccionan con los grupos sulfonilo ($O=S=O$), y pueden generar puentes disulfuro, ácidos sulfenico, sulfinico sulfónico, etc.

1.4.3. Oxidación en la regulación de las funciones celulares

Los efectos de la oxidación han sido propuestos como segundos mensajeros, esto es, que estas reacciones de oxidación participan en los procesos de transducción de señales, tales como el crecimiento y desarrollo celular, producción de citocinas,

etc. (Wong et al., 2010). Entonces, es importante hacer notar que los eventos de oxidación pueden presentarse como reguladores de la actividad de ciertas proteínas y cuando estos procesos son desregulados pueden formar parte de la etiología de las enfermedades neuropsiquiátricas (Dalle-Donne et al., 2003, 2006).

1.4.4. Oxidación y esquizofrenia

En algunos estudios se ha mostrado que los pacientes con esquizofrenia tienen un sistema antioxidante dañado, una secreción anormal de MEL (Findikli et al., 2015), una desregulación del Ca^{2+} y una disfunción mitocondrial, lo cual lleva a procesos metabólicos anómalos, un exceso de radicales libres en la célula y por lo tanto un incremento en la peroxidación de lípidos, daños y disfunciones en la membrana plasmática, desregulación en la transducción de señales y defectos en las funciones de los neurotransmisores. Así, todos estos efectos pueden participar en la fisiopatología y la sintomatología de la esquizofrenia (Yao et al., 2001).

Los pacientes con esquizofrenia presentan bajas concentraciones de moléculas antioxidantes, tales como el glutatión, la superóxido dismutasa, la neurotrofina 4/5, la albúmina, la bilirrubina y el ácido úrico. Por otro lado, también presentan altos niveles de especies reactivas, tales como los radicales $\cdot\text{OH}$, el óxido nítrico, el malón-dialdehído, etc. (Gonzalez-Lienres et al., 2014).

En realidad, son pocos los estudios en donde se relaciona a la CaM con la esquizofrenia (Broadbelt & Jones, 2008; Vidal-Domènech et al., 2020b), sin embargo, existe evidencia que muestra la importancia de esta proteína, ya que se ha visto que en enfermedades neuropsiquiátricas la función de la CaMKII, que es

activada en presencia de la Ca^{2+} -CaM, está alterada, lo que sugiere que puede existir una relación importante con la CaM (Robison, 2014).

Aunado a lo anterior se sabe que la MEL modula diversos eventos que van desde la regulación del Ca^{2+} como segundo mensajero, la regulación de los mecanismos antioxidantes hasta las funciones de distintas proteínas. Así, es importante señalar que la MEL puede ser un regulador de amplio espectro que modifica las funciones de la CaM, así como de los mecanismos prooxidantes y antioxidantes en diferentes microambientes. Al final todos estos mecanismos pueden converger y participar en la fisiopatología de la esquizofrenia.

2. Antecedentes

Se ha mostrado que la CaM puede interactuar con la MEL. En un primer acercamiento se observó que la MEL inhibe la función de una fosfodiesterasa dependiente de CaM (Benítez-King et al., 1991a). Posteriormente, de manera directa, por ensayos de unión ligando-receptor, se observó que la unión de 3H-MEL con CaM es saturable, reversible, dependiente de Ca^{2+} , selectiva del ligando y con una alta afinidad. En ese trabajo se encontró que la MEL se puede unir a un solo sitio de la CaM con una $K_d = 188 \text{ pM}$ y con una capacidad de unión $B_{\text{max}} = 35 \text{ pM}/\mu\text{g}$ de CaM (Benítez-King et al., 1993).

La interacción CaM-MEL se ha abordado con diferentes aproximaciones, una de ellas ha sido mediante el uso de resonancia magnética nuclear (RMN) y por

simulación *in-silico* de dicha interacción (“docking”) En estos trabajos se mostró que en efecto la MEL interactúa con la CaM y se une a esta por un mecanismo dependiente de Ca^{2+} . Además, se encontró que la región indol de la MEL se une por separado a dos sitios en la CaM, dichos sitios son las regiones globulares (estructura “F-hand”) que unen los dos átomos de Ca^{2+} cada una. También mostraron que la unión es débil por lo que no pudieron obtener una K_d ya que la RMN solo nos puede proveer información útil para complejos relativamente fuertes (K_d , $<10\mu\text{M}$) (Turjanski et al., 2004).

Dos grupos de investigación se aproximaron con la RMN para analizar la unión CaM-MEL, el primero concluyó que no es posible asignar una función biológica a dicha unión (Ouyang & Vogel, 1998). Por otro lado, el segundo grupo concluye que esta unión puede presentar alguna importancia biológica (Turjanski et al., 2004).

Inicialmente se describió que el efecto de la unión de MEL a la CaM fue antagonizar el efecto de esta proteína al inhibir la activación de sus proteínas blanco (Benítez-King et al., 1996).

Un ejemplo de esto es el efecto que tiene la MEL sobre la polimerización de los microtúbulos estimulada por la Ca^{2+} -CaM. El ensamble de los microtúbulos es inhibido por la holo-CaM. En presencia de MEL y de la holo-CaM se incrementa la polimerización de los microtúbulos, debido a que la unión de MEL a la CaM antagoniza la actividad de la CaM (Benítez-King, 2006; Benítez-King & Antón-Tay, 1993; Huerto-Delgadillo et al., 1994). Otro ejemplo del efecto de MEL como antagonista de la holo-CaM es la inhibición de la actividad de la enzima

calmodulina cinasa II (CaMKII). Para que esta enzima se active es necesaria que se le una la CaM. En presencia de MEL unida a CaM la activación de la CaMKII se inhibe en un 30% (Benítez-King et al., 1996). En este mismo sentido también se mostró que la MEL inactiva el receptor de estrógeno desregulando la función de la holo-CaM (del Río et al., 2004).

3. Justificación

La mayoría de las vías de señalización están moduladas por diferentes niveles de activación, que pueden modificarse dependiendo de las necesidades y microambientes celulares. No obstante, una vía muy conservada a lo largo de la evolución es la del Ca^{2+} que actúa como un segundo mensajero en respuesta a un primer mensajero cuya señal es captada por un sensor (receptor) externo, presente en la membrana plasmática, o interno, presente en membranas intracelulares como el retículo endoplásmico. Así, la CaM como proteína que censa y une Ca^{2+} participa en las vías de señalización. La CaM se puede ser modulada por diferentes moléculas y por lo tanto generar diferentes respuestas en las vías de señalización en la que esté involucrada. Una de las moléculas que interactúa con la CaM es la MEL por lo que esta puede modificar su actividad y generar toda una gama de respuestas celulares que pueden ser contrastantes. Además de unirse a la CaM, la MEL es captadora radicales libres, en particular de oxígeno, por lo que esta molécula es una molécula antioxidante. Aunado a esto,

esta hormona modifica la actividad de proteínas reguladas por oxidación. En la esquizofrenia se ha observado que los mecanismos antioxidantes están desregulados. Por ejemplo, la expresión de proteínas antioxidantes como el glutatión y las enzimas antioxidantes que remueven los radicales libres tales como la glutatión transferasa, superóxido dismutasa, etc. se encuentran disminuidas.

4. Planteamiento del problema

En las células se presentan distintos microambientes los cuales podemos identificar como hidrófobos e hidrofílicos. En dichos microambientes se favorecen de manera diferencial distintas interacciones, reacciones y funciones o actividades, como en el caso de las modificaciones postraduccionales. Un ejemplo de esto es la oxidación de proteínas que está regulada por mecanismos antioxidantes y en menor grado, pero de manera importante, por la hormona MEL. En los pacientes con esquizofrenia está presente una desregulación en la secreción de la MEL y en los mecanismos antioxidantes lo cual puede participar en la fisiopatología de la enfermedad. En dichos mecanismos reguladores, este proceso puede darse en parte al nivel de interacción entre MEL y algunas proteínas como la CaM y a su vez en la actividad de la enzima CaMKII. Con esto la interacción CaM-MEL es un punto importante en la regulación de algunas vías implicadas en la enfermedad de la esquizofrenia.

5. Hipótesis

La oxidación en la calmodulina disminuye debido a la interacción con la melatonina.

6. Objetivo general

Analizar la oxidación de la calmodulina en condiciones de interacción con la melatonina.

7. Objetivos particulares

- Caracterizar los cambios estructurales inducidos por la melatonina en la Ca^{2+} -calmodulina en un microambiente lipídico y acuoso.
- Caracterizar los cambios en la actividad de la CaMKII inducidos por la interacción melatonina - Ca^{2+} -calmodulina en un microambiente lipídico y acuoso.

- Caracterizar la oxidación de la calmodulina en sus conformaciones Ca^{2+} -calmodulina en presencia de la melatonina en un microambiente lipídico y acuoso.
- Caracterizar los cambios en la actividad de la CaMKII en un microambiente prooxidante en presencia de melatonina y Ca^{2+} -calmodulina.
- Analizar la oxidación en células del neuroepitelio olfatorio de sujetos sanos y de pacientes con esquizofrenia.

8. Material y métodos

8.1. Reactivos

Se utilizó calmodulina purificada de cerebro bovino (Calbiochem, 208694, lot. D00161715), melatonina (Sigma Aldrich, M5250), anhidrasa carbónica (Sigma Aldrich, C-2273), EGTA (Sigma Aldrich, E4778), CaCl_2 (Sigma Aldrich, C1016), fosfatidilcolina (Sigma Aldrich, P2772) y agua desionizada Milli-Q® (Millipore, Direct-Q3 UV). También se utilizó la solución SYPRO™ ruby para teñir proteínas en gel de acrilamida (ThermoFisher Scientific, S21900) y para teñir proteínas adsorbidas en membrana (ThermoFisher Scientific, S11791) de baja fluorescencia de PVDF (Millipore, IPFL00010). Los anticuerpos que se usaron son IgG de ratón

anti-CaM (Sigma Aldrich, C7055) para Western Blot, IgG de ratón anti-CaM (Abcam, ab2860) para inmunofluorescencia, IgG de conejo anti-MEL (Serotec, 0100-0203). Los anticuerpos secundarios son IgG de burro anti-IgG de ratón acoplado a Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A32723) o acoplado a DyLight 488 (SA5-10166). Para la otra tinción se utilizó el anticuerpo secundario IgG de burro anti-IgG de conejo acoplado a DyLight 680 (Invitrogen, SA5-10042). Para el ensayo de actividad de cinasa se utilizó el kit ADP-Glo (Promega, V6930) con el sistema para la actividad específica de CaMKII γ (Promega, V3531).

8.2. Espectroscopía UV-visible de la calmodulina y la melatonina

Para analizar la CaM (4 μ M) con la MEL (1.3 μ M) se utilizó la técnica de espectroscopía UV-visible y se realizó en un espectrofotómetro modelo i3 (Hanon instruments Co., Ltd.). También, por la misma técnica, la interacción CaM (120 μ M) (Stateva et al., 2015) y MEL (0.1 μ M) se analizó a diferente pH (3.5, 4.5, 6.5 y 7.5). La absorbancia se determinó en un rango de longitud de onda de 250-320 nm en un espectrofotómetro EnSpire (PerkinElmer). Se utilizaron placas de 96 pozos compatibles con lecturas en el rango UV (Santa Cruz Biotechnology, Inc., sc-213228). Se realizaron las lecturas de tres experimentos independientes a temperatura ambiente.

8.3. Espectroscopía de Raman de la calmodulina y la melatonina

El espectro de Raman de la CaM (5 ng/ μ L) y la MEL (10^{-7} y 10^{-9} M) en solución fue obtenido por el método de muestreo por gota de Raman (drop coating deposition Raman, DCDR). De cada condición se agregaron 10 μ L en el soporte, un espejo

de vidrio con sustrato de aluminio, la solución se dejó secar a temperatura ambiente hasta que se formó un tipo “anillo de café”. Los espectros de Raman fueron obtenidos para cada gota y se adquirieron usando un microscopio confocal WitecAlpha 300 Raman-AFM (WITec GmbH) con un objetivo 100X de Zeiss (apertura numérica de 0.9), para excitar la muestra se utilizó un láser de longitud de onda de 532 nm generado por un diodo de onda continua y para capturar los espectros se utilizó un detector enfriado (-60 °C) CCD con una rejilla de 672 l/mm. Para todos los espectros de las muestras se utilizaron 3 segundos de tiempo de integración y una potencia de 20 mW para el láser.

Se adquirió el espectro de Raman del buffer (Tris 20 mM, MgCl₂ 10mM, CaCl₂ 0.5 mM) y del espejo de aluminio para ajustar el fondo de los espectros de las muestras. Los espectros de Raman fueron adquiridos con los mismos parámetros en por lo menos 10 zonas al azar, del anillo formado por la solución de CaM y de CaM-MEL, para al final obtener un total de por lo menos 10 espectros Raman por condición. Para el análisis de los espectros se obtuvieron sus promedios, las curvas se suavizaron utilizando el método del promedio adyacente y se normalizaron por máximos y mínimos. Para el análisis comparativo de los espectros por componentes principales (PCA), se consideró la región de 550 a 1650 cm⁻¹ de las tres condiciones. Todo el análisis de los espectros se realizó en el programa OriginPro, versión 2022b como se describió previamente (Mendoza-Figueroa et al., 2019).

8.4. Separación de la calmodulina por electroforesis unidimensional

La CaM (0.5 μ g) en presencia o ausencia (EGTA) de Ca^{2+} se separó por electroforesis unidimensional y la interacción de la CaM en sus dos condiciones con la MEL se estudió determinando su movilidad relativa en geles de poliacrilamida y SDS en un gel de gradiente (4-20% de poliacrilamida) para la Ca^{2+} (CaCl_2 0.5 mM)-CaM y la EGTA (0.5 mM)-CaM. Se utilizó buffer de corrida (Trizma base 25 mM, glicina 192 mM y SDS 3 mM). Las proteínas en el gel se transfirieron a la membrana de PVDF. Posteriormente se incubaron con un anticuerpo primario anti-CaM (1:500) a 4°C durante toda la noche. Después la membrana se incubó con un anticuerpo secundario IgG anti-ratón acoplado a Alexa Fluor 488 (1:15,000) durante 20 min. Las imágenes de la membrana se obtuvieron en el foto-documentador ChemiDoc MP (BIO-RAD), y se cuantificó la movilidad relativa (Rf) de la CaM en el programa Image Lab (BIO-RAD) versión 5.2.1.

8.5. Separación de la calmodulina y de la melatonina por electroforesis bidimensional

La CaM fue incubada con Ca^{2+} (CaCl_2 10mM) o con EGTA (10 mM) durante 15 min a temperatura ambiente, en presencia de la MEL (10^{-7} M) o con el vehículo (Veh) en buffer acuoso (Trizma 10 mM pH 7.4) o lipídico (Trizma 10 mM pH 7.4 y 200 μ g de fosfatidilcolina). Las muestras se separaron por electroforesis de dos dimensiones (Wittig & Schägger, 2008). La separación en la primera dimensión se realizó en tiras de acrilamida que contiene anfolitos que generan un gradiente de pH lineal (IPG, BIO-RAD, 1632000) con un rango de pH de 3 a 10. La segunda dimensión se realizó en geles de gradiente de 4-20% de poliacrilamida. Los geles

se tiñeron con SYPRO[®] Ruby durante 15 minutos. Las imágenes de los geles fueron adquiridas en el foto-documentador ChemiDoc MP. La distribución e intensidad de fluorescencia de los puntos de CaM fueron analizados con el programa DECODON DELTA2D ver. 2.8.2, versión Demo. Se realizó el análisis estadístico con este programa con un modelo de ANOVA de una vía y una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Los puntos de CaM significativos en todas las condiciones experimentales fueron utilizados para generar un mapa de calor y un dendrograma con el programa R ver. 3.6.1.

8.6. Colocalización de la calmodulina y la melatonina

La interacción CaM-MEL se estudió en el hipocampo de ratones macho de la cepa Swiss Webster (25-30 g). Estos fueron acomodados en grupos de 8 ratones por caja (44 x 21 x 21 cm) en una habitación con temperatura controlada (20-21°C), en el cual los ratones tienen libre acceso a comida y agua. El ciclo de los ratones se controló como invertido de 12 h luz/oscuridad (ZT 0 = luz). Los ratones se concentraron en dos grupos, el que es tratado con el Veh y el que es tratado con MEL. La administración de MEL (16 mg/Kg) se realizó en tres instantes. La primera administración se realizó 24 h antes el sacrificio, la segunda y tercera administraciones se realizaron 11 h y 30 min, respectivamente, antes de la administración de la anestesia y del sacrificio. Después los ratones se perfundieron con paraformaldehído al 2% con CaCl₂ al 0.02%. Al final los cerebros se guardaron en sacarosa al 30% a 4°C.

Los cerebros fijados se rebanaron para obtener cortes coronales de dicho tejido en un criotomo (Microm HM 25). El grosor de los cortes fue de aproximadamente 6

μm . Las rebanadas se montaron en portaobjetos de vidrio y se marcaron con los anticuerpos anti-CaM (1:50) y anti-MEL (1:50) y se incubaron toda la noche a 4°C . Posteriormente las rebanadas se incubaron con los anticuerpos secundarios a una dilución de 1:250 durante 1 h a temperatura ambiente. Los cortes de tejido fueron montados con el medio ProLong Diamond (ThermoFisher Scientific, P36961). Las preparaciones se dejaron reposar durante 24 h y después se analizaron en un microscopio confocal LSM 700 (Carl Zeiss microscopy). Se obtuvieron dos imágenes al azar de la zona del hipocampo en dos rebanadas obtenidas del cerebro de dos ratones tratados con el Veh, y de tres ratones tratados con MEL. Las imágenes se obtuvieron con el objetivo de 63X más un aumento digital de 4X con un tamaño de 512 x 512 píxeles, para los parámetros x, y cada píxel presenta un tamaño de $0.05 \mu\text{m}$, y para los planos en el parámetro z el tamaño es de $1 \mu\text{m}$. Las imágenes fueron modificadas con el algoritmo de mínimos cuadrados no lineal para deconvolución en el programa ImageJ con el plugin DeconvolutionLab2. Las imágenes con la deconvolución se analizaron con el algoritmo basado en objetos para identificar sitios de colocación entre CaM y MEL, esto con el plugin para ImageJ JACoP. Para el análisis estadístico de los resultados se aplicó una prueba de t anidada.

8.7. Actividad enzimática de la CaMKII

La actividad enzimática de CaMKII γ se determinó con el ensayo ADP-Glo™ que mide la actividad de cinasa cuantificando la disminución de ATP. La CaM ($5 \text{ ng}/\mu\text{L}$) se solubilizó en un buffer Tris (Tris 20 mM, MgCl_2 10mM, y si aplica, BSA 1 mg/mL) con CaCl_2 0.5 mM o EGTA 0.5 mM, el péptido Autocamtide-2

(KKALRRQETVDAL-amida derivado del sitio de autofosforilación (aminoácidos 283-290) de la CaMKII) a una concentración de $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. La concentración de la enzima CaMKII fue de $0.6 \text{ ng}/\mu\text{L}$ y como fuente de energía $50 \mu\text{M}$ ATP. Las mezclas de reacción se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente en presencia del Veh o diferentes concentraciones de MEL (10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} y 10^{-5} M) en medio acuoso o lipídico ($80 \text{ ng}/\mu\text{L}$ de fosfatidilcolina). La reacción se detuvo y el ADP generado se transformó en ATP. Este nucleótido se utilizó como cofactor junto con el Mg^{2+} para llevar a cabo la reacción de la luciferasa, la señal resultante (quimioluminiscencia) se cuantificó en el foto-documentador ChemiDoc MP (BIO-RAD).

8.8. Cuantificación de la calmodulina oxidada

La CaM se oxidó con especies reactivas de oxígeno ($\cdot\text{OH}$) que fueron generadas por la reacción de Fenton (FeSO_4 1mM, H_2O_2 100 mM) durante 10 min a temperatura ambiente. Para este experimento la CaM se oxidó con los radicales de oxígeno (Ox) o con el Veh durante 10 min. La reacción de oxidación se detuvo con L-metionina (5 mM). Todas la muestras fueron derivatizadas con la solución de dinitrofenil hidrazina (DNPH) y fueron separadas por electroforesis en gel de gradiente de poliacrilamida (4-20%) con SDS. Como control de carga se utilizó la proteína anhidrasa carbónica. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de baja fluorescencia de PVDF. Las membranas se tiñeron con SYPRO™ Ruby. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios anti-DNPH y anti-CaM durante toda la noche a 4°C . Después la membrana se incubó con los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón acoplado a Alexa Fluor 488 y

anti-IgG de conejo acoplado a DyLight 680 durante 60 minutos a temperatura ambiente. La imagen de la membrana se adquirió con el foto-documentador ChemiDoc MP (BIO-RAD) y fue analizada con el programa Image Lab (BIO-RAD) versión 5.2.1.

8.9. Actividad enzimática de la CaMKII en un microambiente prooxidante

La actividad enzimática de la CaMKII fue obtenida de la misma manera que en la sección 7.7. Las muestras obtuvieron con las mismas condiciones y además con la condición extra en donde la CaM fue oxidada con radicales libres de oxígeno durante 10 min a temperatura ambiente, dicha reacción fue detenida con L-metionina (5 mM). La señal de quimioluminiscencia fue detectada en el foto-documentador ChemiDoc MP (BIO-RAD).

8.10. Presencia de radicales libres de oxígeno y lipoperoxidación en células vivas

Se utilizaron células de sujetos control y con esquizofrenia que fueron cultivadas hasta el pase 5 con al menos 3 cambios de medio. Las células se cultivaron en DMEM/F12 (Gibco, 12400-024) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco, 10082-147), penicilina, estreptomycin y anfotericina B al 1% (anti-anti (100X), Gibco, 15240-062), a 37°C con 5% CO₂. Para marcar los radicales libres de oxígeno en las células vivas se utilizó el compuesto CellROX™ (Invitrogen, C10448) que emite a una longitud de onda de 680 nm. Para identificar la lipoperoxidación en las células vivas se utilizó el compuesto fluorescente BODIPY™ 581/591 C11 (Invitrogen, D3861) con el cuál se identificaron los lípidos de la membrana plasmática (600 nm) y la oxidación de los lípidos (520 nm). Las

células se incubaron con estos compuestos durante 30 min a 37°C y 5% de CO₂, se lavaron y se dejaron reposar 60 min en medio DMEM sin rojo de fenol al 10% de suero fetal bovino. Después se observaron en el microscopio confocal LSM900 (Carl Zeiss). Se obtuvieron imágenes de 8 bits de por lo menos 3297 x 1529 píxeles. Para el análisis se tomaron dos imágenes por cultivo de dos cultivos y el análisis de t para muestras no pareadas se realizó con un número de repeticiones de n=2.

8.11. Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron realizados por duplicado y se repitieron al menos tres veces. Excepto con el experimento de separación de la CaM en presencia de MEL por electroforesis 2D que se realizó una vez por duplicado. Los datos se analizaron con la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y se consideró una distribución normal con un valor de $p > 0.05$. Las comparaciones fueron realizadas con las siguientes pruebas: prueba t para dos muestras, la prueba t para muestras anidadas y la prueba de ANOVA para una vía, también se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. En todas las pruebas se considera un valor de $p < 0.05$ como significativo. Las gráficas y los análisis estadísticos fueron realizados con el programa GraphPad Prism 9.4 para Windows. Algunos de los paneles gráficos fueron realizados con el programa Affinity Publisher ver.

1.10.4.1198.

9. Resultados

9.1. Caracterización de la movilidad electroforética de la calmodulina activada por Ca^{2+} y de la calmodulina sin Ca^{2+}

Se determinó por Western blot el corrimiento electroforético (Rf) de la Ca^{2+} -CaM y la EGTA-CaM separada en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida SDS (figura 1A) y en geles nativos de poliacrilamida (figura 1B). El efecto del Ca^{2+} (media=0.838, EEM=0.010) y la ausencia de este (EGTA, media=0.833, EEM=0.016) modificó muy poco el corrimiento electroforético de la CaM y no hubo cambios significativos del Rf en condiciones desnaturalizantes. En contraste, en condiciones nativas, la CaM mostró un Rf diferente y significativo (Ca^{2+} media=0.719, EEM=0.029, EGTA, media=0.854, EEM=0.031). Por el resultado anterior, se decidió continuar con los experimentos utilizando la técnica nativa.

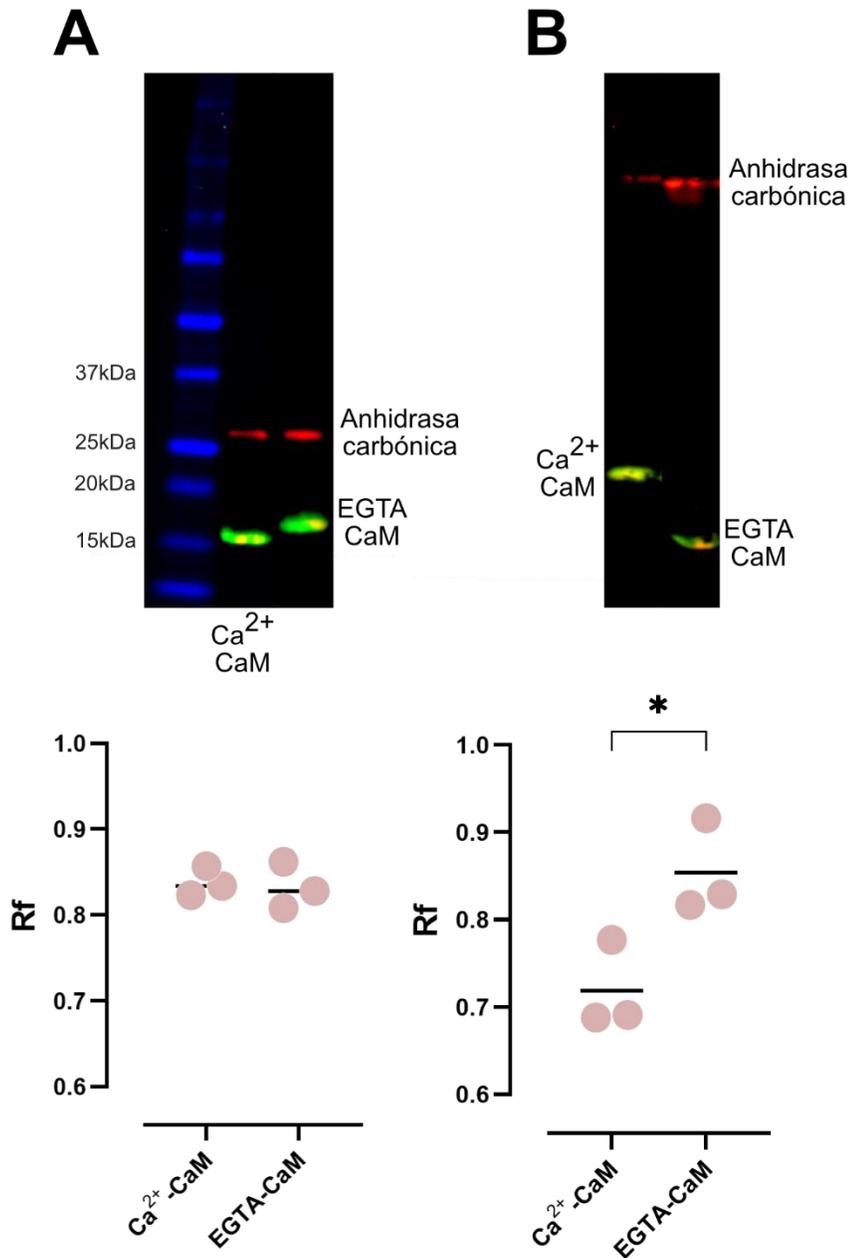


Figura 1. Diferencias en la movilidad relativa de la Ca²⁺-calmodulina y la EGTA-calmodulina. La calmodulina (CaM) se separó por electroforesis unidimensional en geles desnaturizantes (A) y nativos (B) y se transfirieron a PVDF por Western blot. La CaM se identificó con un anticuerpo anti-CaM y un segundo anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a Alexa Fluor 488 (verde) En azul se muestran las

bandas de proteínas de diferentes pesos moleculares. Como control de carga externo se muestra la proteína anhidrasa carbónica (rojo). Las gráficas de puntos muestran la movilidad relativa (Rf) del Wb desnaturizante (A) y del nativo (B). La línea horizontal representa la media aritmética y cada punto representa una experimento. Los datos provienen de tres experimentos independientes, los cuales fueron analizados con la prueba t para dos grupos, * $p < 0.05$.

9.2. Caracterización de las conformaciones que adopta la calmodulina con la interacción de la melatonina

Para caracterizar los cambios conformacionales que adopta la CaM en presencia de la MEL, se utilizaron las siguientes técnicas: Electroforesis 2D nativa, espectroscopía UV-visible y de Raman.

9.2.1. Electroforesis 2D nativa

En el caso de la electroforesis 2D nativa (figura 2), se consideraron dos condiciones de microambiente, acuoso y lipídico, esto debido a los tipos de interacción posibles entre residuos de la CaM, con cierta exposición e impedimento estérico, y moléculas que dependen de condiciones hidrófobas o hidrofílicas. Así, se incubó la CaM con Ca^{2+} , con el vehículo o con 10^{-7} M de MEL y se separó por un punto isoelectrico y movilidad relativa en geles nativos. Se obtuvo un gel “maestro” en donde se muestra a la CaM en todas las condiciones experimentales (EGTA-CaM, Ca^{2+} -CaM y Ca^{2+} -CaM-MEL). Se encontraron en el gel 9 marcas de proteína con diferente peso molecular y punto isoelectrico lo que sugirió que su conformación cambió de manera significativa con respecto a un

valor global (gel maestro) (figura 2A). Con las 9 marcas de proteína que migraron con un punto isoeléctrico (PI) en el rango de 3.5 a 4.5 y con una movilidad relativa en el rango de 0.25 a 0.75. Se elaboró un mapa de calor y un dendrograma para mostrar las diferencias entre las condiciones estudiadas (figura 2B). Se muestran imágenes representativas de los geles de CaM en condiciones acuosas (figura 2C) y lipídicas (figura 2D). Los datos relacionados con las marcas de proteína, que se observan entre los valores de PI de 3.7 a 4.7 y con un Rf de 0.37 a 0.65, muestran diferentes intensidades de fluorescencia dependiendo del microambiente o las condiciones de interacción, de la presencia de Ca^{2+} , así como también de la presencia de MEL. La Interacción de Ca^{2+} -CaM-MEL en condiciones acuosas presentó un desplazamiento de aproximadamente 2 unidades de pH (de 4.5 a 6.5) en el PI, con esto se sugiere que la Ca^{2+} -CaM adopta una conformación estable cuando el pH es cercano al fisiológico (figura 3C). Además, la CaM en ausencia de Ca^{2+} con EGTA induce cambios en la intensidad de fluorescencia de las diferentes marcas de proteína en el microambiente lipídico (figura 3D). Con estos datos se sugiere que la incubación de la Ca^{2+} -CaM con la MEL promueve la presencia de diferentes conformaciones de la proteína favorecidas por el microambiente.

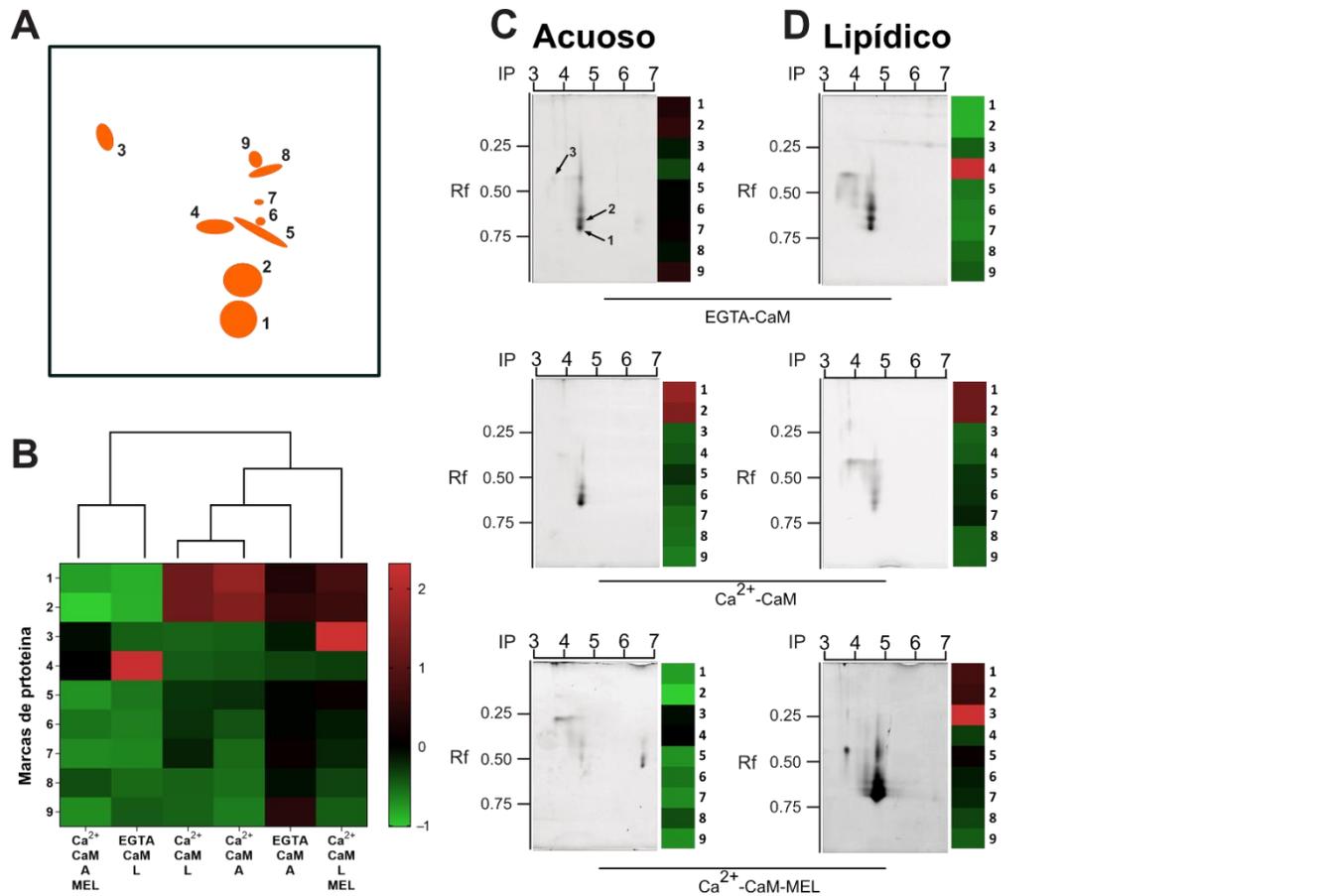


Figura 2. Conformación de la CaM en presencia de MEL. Para la electroforesis en dos dimensiones, la calmodulina (CaM) se incubó con Ca²⁺ o con EGTA en presencia del vehículo (Veh) o con melatonina (MEL) 10⁻⁷ M en medio acuoso o lipídico. Posteriormente, las mezclas se separaron por un punto isoeléctrico y movilidad relativa en geles nativos. Para el análisis se generó un gel maestro (con todas las condiciones) en el que se identificaron 9 puntos de proteína diferentes de un promedio global (A). Las diferencias entre las condiciones se muestran en un mapa de calor, la escala de valores se muestra en desviaciones estándar con respecto a una media global (valores Z). Un valor de cero significa que no hubo cambios con respecto a la media global (B). En (C) se muestran los puntos de

proteína (cambios conformacionales) de la CaM en medio acuoso. En (D) se muestran los cambios conformacionales de la CaM en medio lipídico. A: medio acuoso, B: medio lipídico. Los datos fueron analizados con un modelo de ANOVA de una vía y una prueba de Bonferroni de comparaciones múltiples. Los datos provienen de dos geles por condición. Las diferencias se consideraron significativas con una $p < 0.05$.

9.2.2. Espectroscopía UV-visible

Las diferentes conformaciones que adopta la CaM en las diferentes condiciones se analizaron con la técnica de espectroscopía UV-visible. Los espectros de la Ca^{2+} -CaM y la Ca^{2+} -CaM incubada con la MEL fueron obtenidos con las lecturas de la absorbancia desde 250 nm hasta 350 nm (figura 3). Las lecturas de la Ca^{2+} -CaM mostraron un pico desde 260 nm hasta aproximadamente 280 nm como ya se ha publicado (Stateva et al., 2015). De manera interesante se observó que ocurren cambios en la absorbancia de la Ca^{2+} -CaM-MEL con respecto a la Ca^{2+} -CaM. Los espectros de las dos condiciones se analizaron con diferentes niveles de pH: 3.5 (figura 3A), 4.5 (figura 3B), 6.5 (figura 3C), y 7.5 (figura 3D) que es donde se observaron diferentes conformaciones de la CaM por electroforesis 2D. A pH 4.5 no se observaron cambios en la absorbancia en presencia de MEL. Sin embargo, en las otras condiciones la absorbancia disminuyó en presencia de MEL con respecto a la Ca^{2+} -CaM. Estos resultados sugieren que la MEL puede favorecer cambios conformacionales en la Ca^{2+} -CaM.

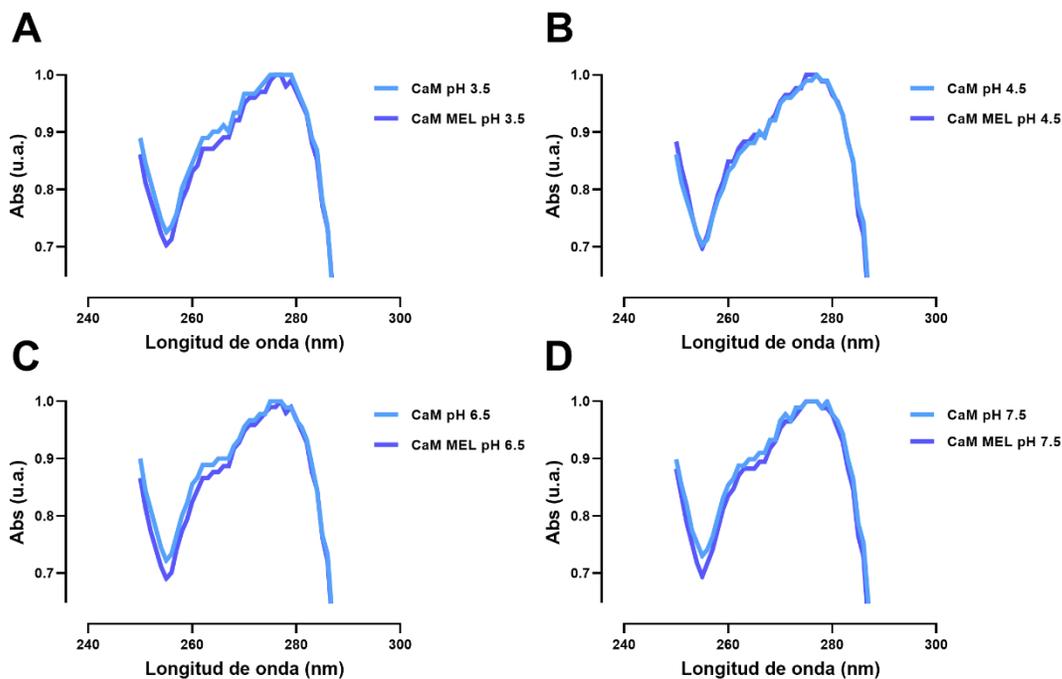


Figura 3. Cambios conformacionales de la Ca^{2+} -calmodulina producidos por la interacción con la melatonina. Se analizó por espectroscopía UV-visible el espectro de absorbancia de la Ca^{2+} -calmodulina (Ca^{2+} -CaM, $120 \mu\text{M}$) y de la Ca^{2+} -CaM-melatonina (MEL, $0.1 \mu\text{M}$) en diferentes valores de pH A) 3.5, B) 4.5, C) 6.5 y D) 7.5. Las muestras se incubaron con 0.1 mM de CaCl_2 en buffer Tris (20 mM) con 10 mM de Cl_2Mg . Los valores de absorbancia fueron normalizados. En las gráficas se muestran los valores representativos.

9.2.3. Espectroscopía Raman

La espectroscopía de Raman es una técnica que nos permite analizar cambios conformacionales en la estructura de las moléculas, las cuales presentan una huella particular que depende las vibraciones y torciones de cada uno de sus enlaces. En el caso de las proteínas es posible obtener su huella específica

identificando las diferentes zonas detectadas por Raman (Jones et al., 2014; Rygula et al., 2013). Así, se obtuvieron los espectros de Ca^{2+} -CaM, Ca^{2+} -CaM-MEL 10^{-7} M y Ca^{2+} -CaM-MEL 10^{-9} M (figura 4A). En cada uno de los espectros se aprecian zonas relacionadas a las de la amida tipo I enriquecidas para la conformación α -hélice con número de onda 1654 cm^{-1} , y se complementa con la zona de la amida tipo III que para la conformación de α -hélice se encuentran los picos en el número de onda de 1270 a 1300 cm^{-1} . Dichas zonas coinciden con los experimentos de la conformación de la CaM de (Seaton et al., 1983).

Para analizar cuáles son las conformaciones que adopta la CaM en presencia de diferentes concentraciones de MEL (10^{-7} y 10^{-9} M) se realizó un análisis de componentes principales (PCA) que permite identificar los cambios en cada uno de los números de onda de la CaM en presencia de las diferentes concentraciones de MEL. Se obtuvieron dos componentes principales CP1 y CP2 que representan el 51.5% y el 24.7% respectivamente (para un total de 76.2%) de la variabilidad total del experimento. En la figura 4B se observa que por lo menos la condición de Ca^{2+} -CaM y Ca^{2+} -CaM-MEL 10^{-7} M forman cada una su grupo y la condición con MEL 10^{-9} M presenta un grupo intermedio. También se analizó en los componentes (CP1 y CP2) cuales son las zonas en las que se identificaron los cambios y a que componente pertenecen. Se observó que hay cambios en las zonas pertenecientes a las amidas I y III y que están enriquecidas principalmente en el componente 2 (figura 4C). Estos resultados indican que la Ca^{2+} -CaM adopta diferentes conformaciones en función de la concentración de la MEL. Además,

apoyan que existe una interacción entre la Ca^{2+} -CaM y la MEL gradual y dependiente de la concentración de MEL.

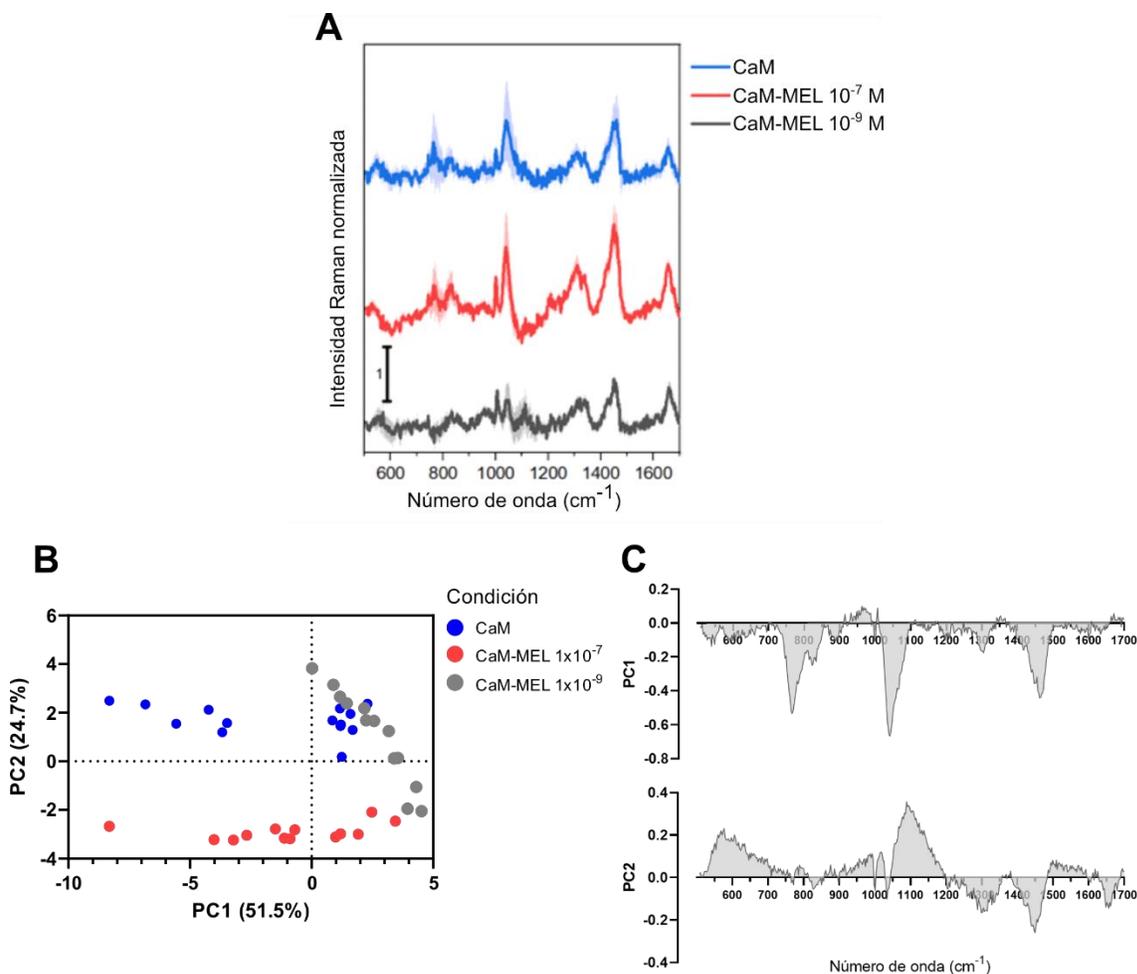


Figura 4. Espectros de la calmodulina en presencia de la melatonina obtenidos por espectroscopía de Raman. La Ca^{2+} -calmodulina (Ca^{2+} -CaM) se analizó por espectroscopía de Raman en presencia de dos concentraciones de melatonina (MEL, 10^{-7} y 10^{-9} M) o el vehículo (A). Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) y en (B) se muestran dos de estos componentes con los grupos de las tres condiciones. También se muestra la variación explicada del PCA para los dos componentes del número de onda (C). En la gráfica A se muestra la media

aritmética (línea gruesa) para cada espectro y la desviación estándar (parte sombreada). Por lo menos se obtuvieron 13 espectros por cada condición con las mismas características de muestreo.

9.2.4. Colocalización de la calmodulina y la melatonina por microscopía confocal

Para discernir si la interacción de la CaM-MEL ocurre *in vivo* se analizaron cortes coronales de cerebro de ratón. En particular se estudió la región del hipocampo.

Para probar si había una coincidencia espacial (colocalización) entre la molécula de MEL y la de CaM como una aproximación para mostrar su interacción. Los ratones fueron inyectados de manera intraperitoneal con MEL (16 mg/Kg) y con el Veh en la fase oscura del fotoperiodo. Los cortes se marcaron con los anticuerpos anti-MEL y anti-CaM. En la imagen de la figura 5 la CaM se observa en color verde y la MEL en color rojo. Para el análisis de colocalización se buscaron de manera automática dichos sitios, mismos que en la figura se aprecian en color amarillo. De manera general se encontraron más sitios de colocalización en el ratón tratado con MEL (figura 5B) que con el Veh (figura 5A). En el ratón tratado con MEL (media=10.9, EEM=1.50) los sitios de colocalización fueron 77% (figura 5C) más abundantes que aquellos que fueron tratados con el Veh (media=2.5, EEM=0.98). Los sitios identificados como de colocalización se consideraron válidos si presentaron un coeficiente de correlación de Pearson mayor o igual a 0.5. El análisis estadístico de t anidado nos mostró que no hubo diferencias significativas entre ratones con el mismo tratamiento, sin embargo, si se encontraron diferencias significativas entre tratamientos. Con estos resultados se sugiere que la CaM y la

MEL pueden compartir el mismo espacio, y con esto existe la posibilidad de que ambas moléculas estén unidas.

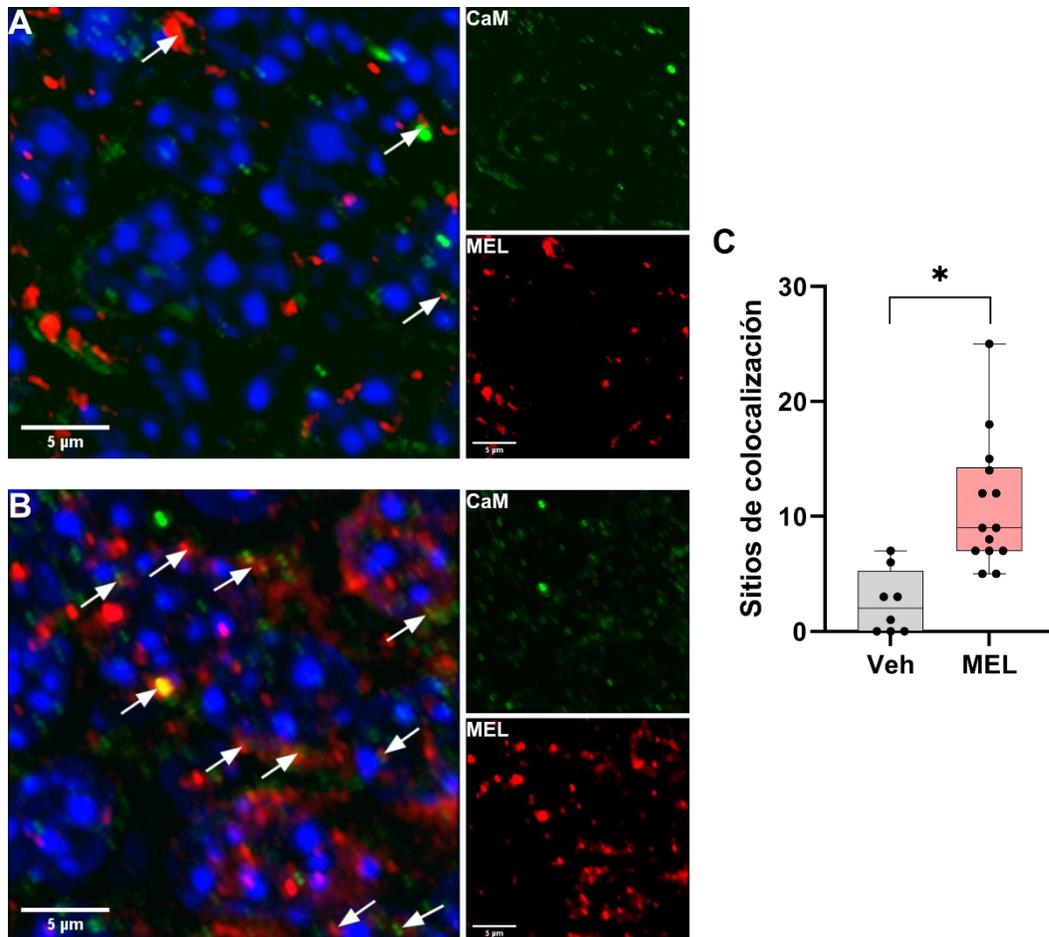


Figura 5. Estudio de la colocalización de la CaM con la MEL *in vivo*. Las rebanadas coronales de hipocampo de ratón se incubaron con anticuerpos anti-calmodulina (CaM) (verde) y anti-melatonina (MEL) (rojo) y se marcaron con anticuerpos secundarios para inmunofluorescencia. En (A) se muestra una imagen representativa de una zona de una rebanada de hipocampo marcada con anticuerpos que reconocen a la CaM y MEL con los sitios de colocalización (flechas y puntos amarillos) en los cortes tratados con el vehículo (Veh) y en la sección (B) se muestran los sitios de colocalización (flechas y puntos amarillos) en

los cortes tratados con MEL. Se muestran las imágenes simples con la señal de CaM en verde y en rojo la señal de la MEL. La señal azul corresponde a la tinción de los núcleos con DAPI. Los sitios de colocación en el hipocampo fueron cuantificados en las dos condiciones Veh y MEL (C). La gráfica de caja y bigote (mediana, máximos y mínimos) muestra datos obtenidos de ratones inoculados, de manera intraperitoneal, con el Veh y con MEL. Los datos se tomaron de dos imágenes obtenidas al azar de dos rebanadas coronales de dos ratones para el caso del Veh. Para la condición con MEL se utilizaron tres ratones con la misma estrategia de muestreo. Los resultados fueron analizados con una prueba anidada de t, * $p < 0.05$.

9.3. Actividad de la calmodulina en su interacción con la melatonina

Después de analizar las conformaciones que adopta la CaM al interactuar con la MEL en los microambientes acuoso y lipídico se estudiaron los posibles efectos de las conformaciones que adoptó la CaM sobre la funcionalidad de esta proteína.

Para esto, se determinó la capacidad de la CaM de activar a una de sus proteínas blanco, la CaMKII en ambiente acuoso y lipídico. Se observó que la CaMKII activada en el medio acuoso por la Ca^{2+} -CaM incrementó dos veces su actividad con respecto a la CaM sin Ca^{2+} (EGTA) (figura 6A). La actividad basal de la EGTA-CaM (media=46,519, EEM=12,704) presentó una actividad mínima con respecto a la actividad de la CaMKII en presencia de Ca^{2+} -CaM en ambiente acuoso (media=443,671, EEM=12,704) y lipídico (media=205,251, EEM=37,757).

La actividad de la CaMKII se determinó en presencia de diferentes concentraciones de MEL. Se observaron cambios significativos en la actividad de

la CaMKII con MEL 10^{-7} y 10^{-5} M en el microambiente acuoso. La concentración de 10^{-5} M no se tomó en cuenta, ya que nosotros buscamos un efecto fisiológico y la concentración de 10^{-5} M se considera como efecto farmacológico (Cecon et al., 2021). La MEL a una concentración de 10^{-7} M, que es la observada en el líquido cefalorraquídeo durante la noche, incrementó la actividad 31.6% con respecto al basal o vehículo (figura 6B). En el microambiente lipídico la concentración de MEL que produjo cambios significativos fue de 10^{-7} M en la cual se observó que la actividad de la CaMKII disminuyó un 70% con respecto a su basal (figura 6B). Con estos resultados observamos que la MEL puede regular de manera contrastante la actividad de la CaM dependiendo del microambiente en el que se encuentre.

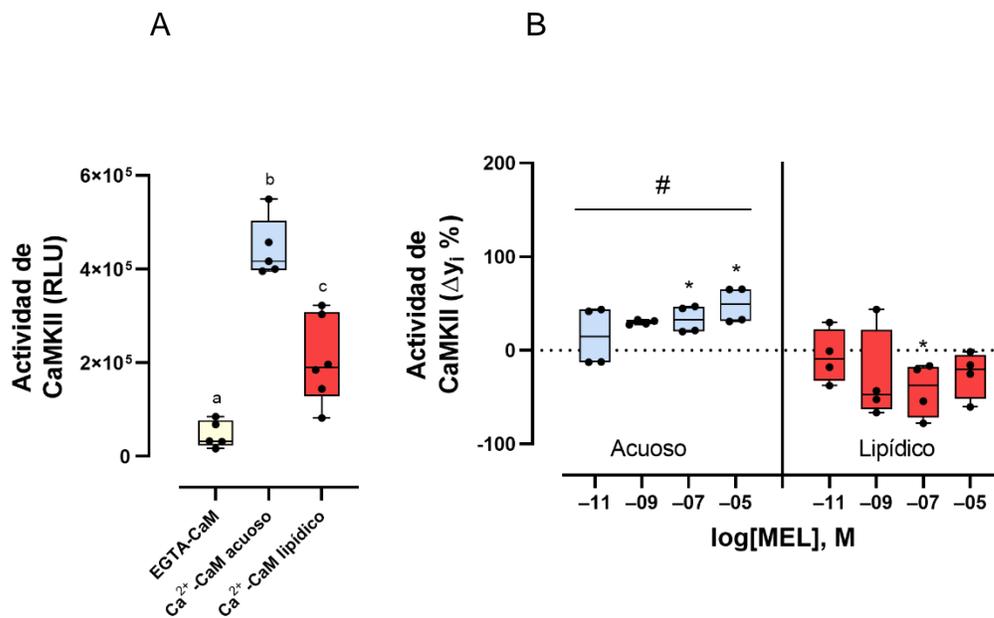


Figura 6. Efecto de la melatonina sobre la actividad de la CaMKII. Se muestra la actividad basal de la CaMKII en presencia de la calmodulina (CaM) activada con Ca^{2+} o sin activar en presencia de EGTA en un ambiente acuoso o lipídico (A). La actividad de Ca^{2+} -CaM-CaMKII se cuantificó como la diferencia entre la actividad

basal de la Ca^{2+} -CaM-CaMKII y la Ca^{2+} -CaM-CaMKII-melatonina (MEL) expresadas como porcentajes ($\Delta y_i\%$) con diferentes concentraciones de MEL en el rango 10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-5} M en medio acuoso o lipídico. El valor de cero en la gráfica es la actividad media basal de la Ca^{2+} -CaM-CaMKII en cada ambiente, ilustrado con una línea punteada (B). Para el análisis se aplicó un modelo de ANOVA de una vía y una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el vehículo (acuoso o lipídico) y las diferentes concentraciones de MEL están indicadas con un asterisco (*). (#) indica la diferencia significativa entre el valor global de los ambientes lipídico y acuoso. En la gráfica A, literales diferentes muestran una significancia de $p < 0.05$. Los resultados están representados como gráficas de caja y bigote con la mediana, el primer y el tercer cuartil con valores máximos y mínimos. Para cada experimento por lo menos se realizaron 4 réplicas experimentales.

9.4. Efecto antioxidante de la melatonina sobre la calmodulina en un ambiente prooxidante

Una vez que se analizó la interacción de la CaM-MEL y sus efectos sobre la actividad de la CaMKII en los microambientes lipídico y acuoso, se estudió el efecto de la MEL sobre la oxidación de la CaM activada con Ca^{2+} y en ausencia de Ca^{2+} y en presencia del quelante EGTA. La oxidación se determinó mediante la detección de la carbonilación de la CaM en sus dos conformaciones (Ca^{2+} y EGTA) por WB en las siguientes condiciones: CaM-vehículo (CaM-Veh), CaM-MEL, CaM-especies reactivas de oxígeno (CaM-Ox) y Ca^{2+} -CaM-Ox-MEL. En verde se identificó la señal de la CaM, en rojo la señal de la proteína oxidada

(carbonilada) y en amarillo la combinación de las dos señales (figura 7A). Las moléculas se incubaron en un ambiente prooxidante con 10 mM H₂O₂. La CaM se separó en geles de poliacrilamida del 4 al 20%. La CaM carbonilada se detectó con un anticuerpo anti-DNPH y la CaM total con un anticuerpo anti-CaM. La Ca²⁺-CaM en presencia de especies reactivas de oxígeno (Ca²⁺-CaM-Ox, media: 8.7x10⁷, EEM=1.3x10⁷) mostró un aumento de aproximadamente 5 veces en la señal de carbonilación con respecto al Veh (Ca²⁺-CaM-Veh, media=1.7x10⁷, EEM=0.4x10⁷). La Ca²⁺-CaM pre-incubada con MEL expuesta al ambiente prooxidante (Ca²⁺-CaM-MEL-Ox, media=4.4x10⁷, EEM=0.8x10⁷) mostró una disminución de la señal de carbonilación del 50% de manera significativa (figura 7B). En el caso de la EGTA-CaM, no se observó ningún cambio significativo en la señal de carbonilación en ninguna de las condiciones. Con esto se sugiere que la MEL puede aminorar la oxidación de la Ca²⁺-CaM y que cuando adopta esta conformación es más susceptible de ser oxidada.

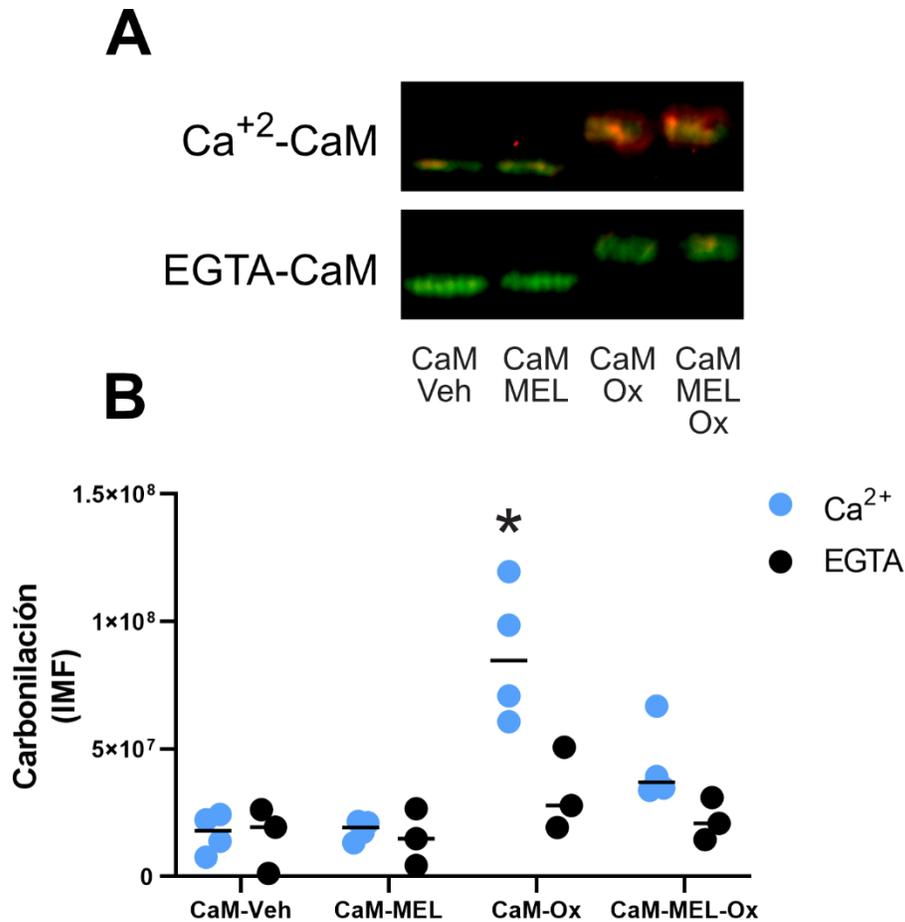


Figura 7. Efecto de la melatonina en la oxidación de la calmodulina. La calmodulina (CaM) se incubó en un medio prooxidante (10 mM H₂O₂) y se determinaron los niveles relativos de la carbonilación por Western blot (WB) (A). Se determinó la oxidación de la CaM con la conformación de mancuernilla que adopta en presencia de Ca²⁺ (azul) y la CaM con una conformación al azar que adopta sin Ca²⁺ y con EGTA (negro). Esas conformaciones de CaM se incubaron con el vehículo (Veh), con MEL, con radicales libres de oxígeno (Ox) y la combinación MEL-Ox (B). Se muestra una imagen representativa del WB con las diferentes condiciones y una gráfica de puntos (con la media) con cada uno de los experimentos. Se aplicó un modelo de ANOVA de dos vías y una prueba de

comparaciones múltiples de Tukey. * $p < 0.05$ de la condición CaM-Ox con respecto a CaM-MEL-Ox.

9.4.1. Efecto de la melatonina sobre la actividad de la CaMKII en un ambiente prooxidante

Se cuantificó la actividad de la CaMKII activada por CaM en condiciones libres de Ca^{2+} (EGTA), en presencia de Ca^{2+} y, con Ca^{2+} -MEL (1×10^{-7} M). La reacción se llevó a cabo en medio acuoso y en medio lipídico (figura 8A y 8B). En ausencia de Ca^{2+} y con EGTA no hubo una activación de la enzima. En presencia de la CaM activada por Ca^{2+} incrementa la actividad de la CaMKII. En tanto que en presencia de MEL (Ca^{2+} -CaM-MEL) la actividad aumentó 74.4% con respecto a la condición de Ca^{2+} -CaM. En medio lipídico (figura 8B) y en presencia de MEL (Ca^{2+} -CaM-MEL) se observó una disminución del 65.4% con respecto a la actividad determinada en presencia del Veh y Ca^{2+} -CaM. Se cuantificó el efecto de los radicales libres de oxígeno sobre la actividad de la Ca^{2+} -CaM-CaMKII con concentraciones de H_2O_2 (10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} y 10^{-2} M). Esta aumentó 42.5% en un microambiente acuoso con respecto a la condición sin H_2O_2 (basal) y al microambiente lipídico (50.7%). En este último se observó una ligera disminución (8.25%) en la actividad enzimática con respecto a la basal (figura 8C). En presencia de MEL (1×10^{-7} M) se observó que no hubo diferencias con respecto al basal y entre microambientes (figura 8D).

La actividad enzimática de Ca^{2+} -CaM-CaMKII se analizó en presencia de BSA y con la condición de MEL (1×10^{-7} M) en ambiente acuoso. En la condición basal (sin H_2O_2) no se observó diferencia entre las condiciones de BSA con y sin MEL

(figura 8E). Con las concentraciones de 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} y 10^{-2} M de H_2O_2 y BSA con y sin MEL (1×10^{-7} M) se observó que en ausencia de MEL hubo una ligera disminución (5.5%) en la actividad enzimática con respecto al basal y una diferencia del 4% con respecto a las condiciones con MEL (figura 8F).

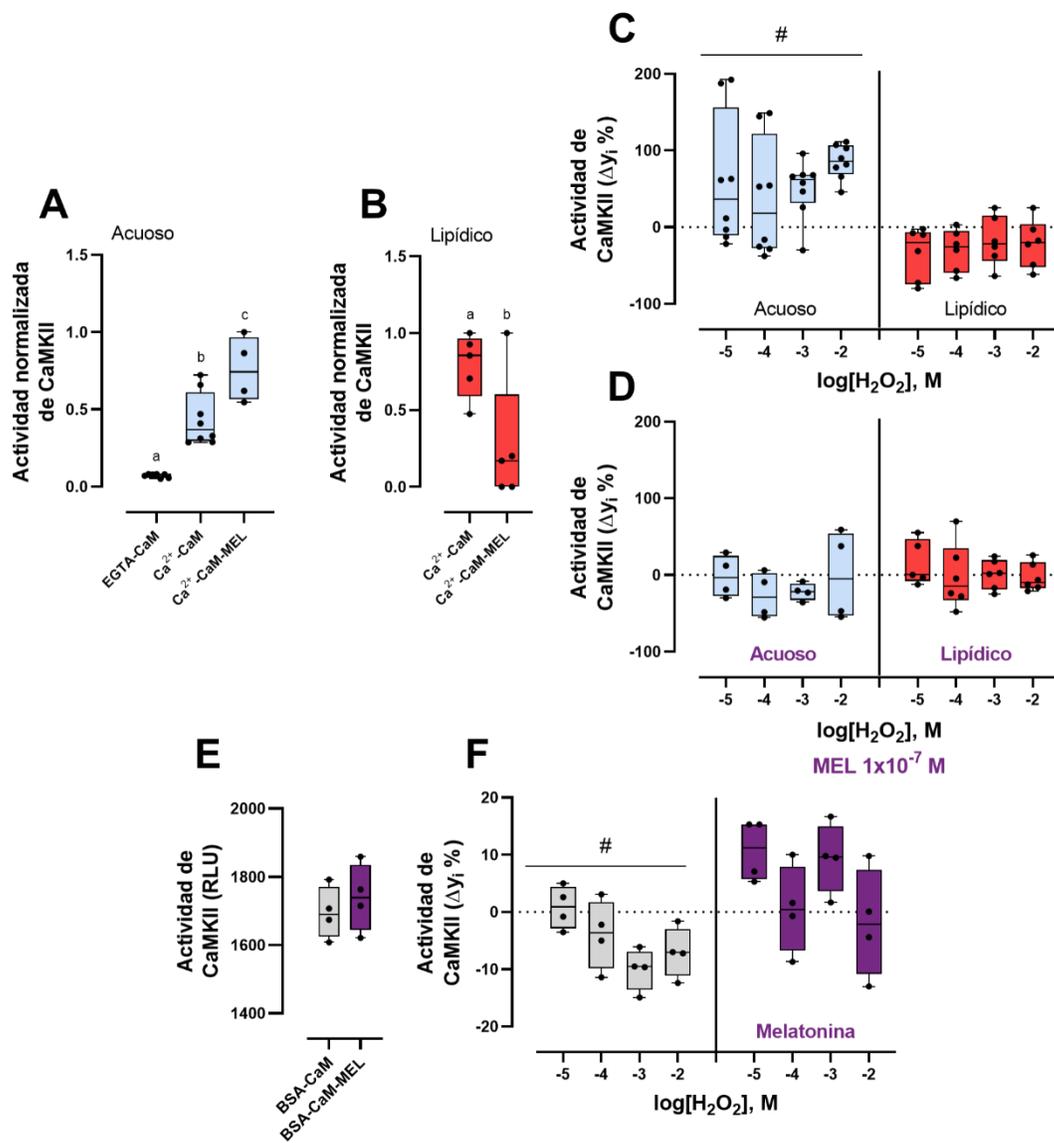


Figura 8. Efecto de la melatonina en la actividad de la CaMKII en un ambiente prooxidante. Se cuantificó la actividad enzimática basal de la CaMKII en presencia

de EGTA o Ca^{2+} y melatonina (MEL) en un ambiente acuoso (A) o de Ca^{2+} y MEL en un ambiente lipídico (B). El efecto de la MEL sobre la actividad enzimática de Ca^{2+} -CaM-CaMKII se probó con diferentes concentraciones (10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} M) de radicales de H_2O_2 en ambiente acuoso y lipídico (C). Se analizó el efecto de la melatonina (MEL, 10^{-7} M) sobre la actividad enzimática de Ca^{2+} -CaM-CaMKII con las mismas concentraciones de radicales de H_2O_2 en ambos ambientes (D). Finalmente, en presencia de BSA se cuantificó de manera basal la actividad de Ca^{2+} -CaM-CaMKII (E) y el efecto, sobre esta misma actividad enzimática, de las concentraciones de radicales de H_2O_2 en el ambiente acuoso (F).

9.5. Radicales libres de oxígeno y lipoperoxidación en los precursores neuronales olfatorios derivados de sujetos control y con esquizofrenia

Se cuantificó por microscopía la presencia de radicales libres de oxígeno con CellROX™ y la lipoperoxidación con el compuesto BODIPY™ 581/591 C11 en células vivas de un sujeto control (figura 9A) y uno con esquizofrenia (figura 9B). Se cuantificó su intensidad de fluorescencia en por lo menos 10 células por imagen y se compararon las condiciones. Se observó que no hubo diferencia en la intensidad de los radicales libres de oxígeno entre los sujetos control (media=106, DE=36) y los sujetos con esquizofrenia (media=109, DE=29).(figura 9C). Para la lipoperoxidación se observó que los sujetos con esquizofrenia presentaron una lipoperoxidación con media=17 y DE=5 y los sujetos control presentaron una media=12 y DE=3. Se realizó una prueba de t, donde $p < 0.05$ se consideró significativa y dichos niveles de lipoperoxidación entre las dos condiciones no fueron significativas.

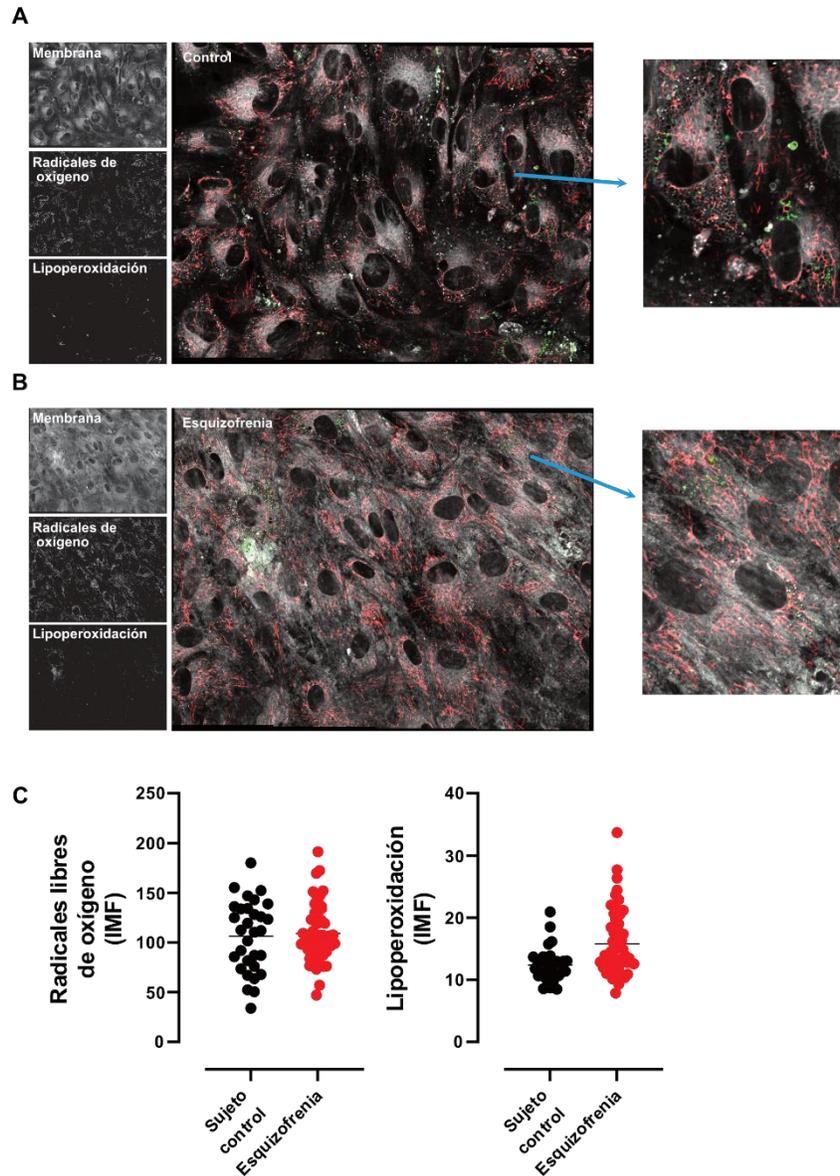


Figura 9. Detección de radicales libres de oxígeno y lipoperoxidación en células de pacientes con esquizofrenia. Se obtuvieron imágenes de la presencia de radicales libres de oxígeno (rojo) y de lipoperoxidación (verde) de células de sujeto control (A) y con esquizofrenia (B). Se comparó la intensidad media de fluorescencia (IMF) y se graficó cada una de las células que fue analizada (C). Los datos se obtuvieron de un sujeto control y de uno con esquizofrenia con dos repeticiones de

las cuales se tomaron dos imágenes por repetición y el análisis se realizó en por lo menos de 10 células. Se marcó la membrana (gris) como forma de referencia. Se realizó un prueba de t para muestras no pareadas y se consideró una $n=2$, *, $p<0.05$.

10. Discusión

En 1993 se demostró por primera vez, por ensayos de unión ligando receptor que la MEL se une a la CaM. Años después, esta unión y su dependencia de la presencia de Ca^{2+} se corroboró por medio de resonancia magnética nuclear (RMN) (Benítez-King et al., 1993; Ouyang & Vogel, 1998; Turjanski et al., 2004). La unión de MEL a CaM se observó en el primer caso en el rango nanomolar y en un microambiente lipídico y en el segundo caso, en el rango milimolar y en un ambiente acuoso. Aunada a esta información, se demostró en la década de los noventa que la unión de MEL a CaM con concentraciones en el rango de 10^{-9} M a 10^{-5} M, antagoniza la actividad de la fosfodiesterasa de AMPc, la de la CaMKII *in vitro*, así como la polimerización de los microtúbulos. Años después se demostró que la actividad de la CaM se estimulaba en un sistema más complejo. En los cultivos organotípicos de cerebro de rata incubados con MEL y en particular en el hipocampo se observó la formación de nuevas dendritas y un aumento en su complejidad. Estos resultados, desde la perspectiva de la fisiología, son aparentemente opuestos y contradictorios. Sin embargo, el análisis de las

condiciones de estos ensayos sugirió que los efectos de MEL sobre la actividad de CaM, aparentemente contradictorios podrían obedecer al microambiente (Benítez-King et al., 1993). Por lo anterior, en este trabajo se consideró analizar la unión de la MEL a la CaM en dos microambientes que se encuentran en el interior de las células: El microambiente acuoso que está localizado en el citosol y el microambiente lipídico que está localizado principalmente en la membrana plasmática y las membranas intracelulares como son el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, los lisosomas y los exosomas. También, se estudió el efecto de los gradientes de concentración de diferentes potenciales de hidrógeno (pH) sobre la unión de la MEL con la CaM. Se estudió además las consecuencias fisiológicas de la unión de MEL con CaM evaluando la actividad de la CaMKII en los dos tipos de microambiente. Finalmente, se definió si esta interacción ocurre *in vivo* en un modelo murino y en el giro dentado del hipocampo en donde la CaMKII se encuentra en gran abundancia y participa en la neuroplasticidad, así como en la cognición y la memoria.

En una primera etapa se caracterizaron las conformaciones que adopta la CaM en presencia de diferentes concentraciones de la MEL en un rango de 10^{-11} a 10^{-5} M. En este sentido, es importante señalar que el rango estudiado es el que se ha observado en diversos organismos. La concentración de MEL que circula en el plasma durante la noche es de 10^{-9} M. En tanto que la que circula en el líquido cefalorraquídeo en la misma etapa del fotoperíodo es de 10^{-7} M. La concentración tisular de MEL que se alcanza por síntesis mitocondrial extrapineal y que no depende de la oscuridad se ha descrito que alcanza una concentración de 10^{-5} M.

La estructura tridimensional de la CaM se ha estudiado ampliamente por varios métodos (Chou et al., 2001; Hye et al., 2008; Johnson, 2006; Shukla et al., 2016). Estos estudios indican que la CaM adopta un gran número de conformaciones y diferentes subestados que son inducidos principalmente por el Ca^{2+} y sus proteínas blanco (Junker & Rief, 2009; Meyer et al., 1992; Stigler et al., 2011). Las conformaciones de CaM se han caracterizado por medio de su separación electroforética en geles nativos (Chou et al., 2001; Johnson, 2006; Shukla et al., 2016) debido a que la movilidad de las proteínas en un campo eléctrico depende de las fuerzas electrostáticas conductoras en un campo hidrodinámico, así como de la composición de aminoácidos, la carga, la forma, la masa, así como las características del ambiente como la viscosidad. De manera importante se ha descrito que los gradientes de pH pueden inducir cambios en la estructura de la CaM (Atilgan et al., 2011) y que la movilidad electroforética de la Ca^{2+} -CaM y de EGTA-CaM es diferente en buffers acuosos como se mostró en este trabajo y que como mencionamos anteriormente dependen de los cambios en la conformación estructural de la CaM (Benítez-King et al., 1991b; Heydorn et al., 1987; Juhász et al., 2020).

Basados en estas evidencias, en este trabajo caracterizamos los cambios conformacionales de la Ca^{2+} -CaM y la EGTA-CaM inducidos por MEL en un ambiente acuoso y lipídico mediante su separación por electroforesis 2D en geles nativos. Los resultados obtenidos indican que la MEL induce modificaciones estables en la conformación de la Ca^{2+} -CaM en los microambientes, lipídico y acuoso. Es importante señalar, que el buffer lipídico está formado por

fosfatidilcolina, un lípido que tiene la capacidad de formar liposomas los cuales se han utilizado como un modelo experimental para estudiar la actividad de proteínas que son dependientes de los lípidos de la membrana (Tamkun et al., 1984).

Estudios previos indican que el cambios conformacional que adopta la CaM en presencia de Ca^{2+} (estructura de mancuernilla) produce un incremento en la movilidad relativa de esta proteína con respecto a la CaM sin Ca^{2+} que tiene una estructura al azar cuando se separa por electroforesis unidimensional (Ohya', 1987). En este trabajo encontramos que la movilidad relativa de la CaM activada por Ca^{2+} y separada en geles de poliacrilamida SDS PAGE se incrementó con respecto a la CaM en presencia del quelante de Ca^{2+} EGTA. Esta diferencia fue más aparente en geles nativos no desnaturizantes. Sin embargo, se observó que disminuyó la movilidad relativa de la CaM activada por Ca^{2+} . Estos resultados apoyan estudios previos en los que se demostró que los cambios conformacionales que adopta la CaM son evidenciados por cambios en la movilidad electroforética de esta proteína. En el mismo sentido, se ha demostrado que los antagonistas de la CaM que se unen en la hendidura hidrofóbica de la CaM también modifican la movilidad relativa de la CaM.

En este trabajo, para validar el método de separación de la CaM por electroforesis separamos a la CaM de cerebro de bovino en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE. Se observó una sola banda con un peso molecular de 16 KDa indicando que el cambio en la movilidad electroforética no se debió a degradación de la proteína. Estos resultados sugieren que los cambios en la movilidad relativa de CaM se deben a la interacción de la CaM con MEL y de los efectos del microambiente. Además de

estos resultados, se observaron cambios en los puntos isoeléctricos y movilidad relativa de la CaM en presencia de Ca^{2+} y MEL por electroforesis en 2D confirmando que la unión de MEL a CaM induce cambios conformacionales de la proteína, entre estas se observó que la conformación de CaM con PI de 3.5 fue la más abundante en el microambiente lipídico. Además, en presencia de MEL, la Ca^{2+} -CaM adoptó 5 conformaciones de PI 4.7 y diferente peso molecular. Las diferencias en la movilidad relativa de la CaM separada por electroforesis unidimensional se relacionan con el tamaño de la proteína y la carga neta. En cambio, la separación de la CaM por isoelectroenfoque se relaciona con los cambios conformacionales que exponen los grupos cargados de aminoácidos a lo largo del gradiente de pH. Por lo anterior, los cambios en movilidad electroforética y PI se pueden asociar con cambios conformacionales estables que esta proteína adquiere por la unión de MEL.

Con respecto al complejo CaM-MEL podemos resaltar los siguientes hallazgos: 1) Se observó el mayor efecto del PI sobre la interacción de MEL con Ca^{2+} -CaM en microambiente acuoso. 2) Los cambios mínimos se producen en las conformaciones de CaM en ausencia de Ca^{2+} en el microambiente acuoso. 3) Se produjo un incremento de algunas conformaciones del complejo CaM-MEL en buffer lipídico.

Es importante señalar que en nuestro estudio encontramos 9 conformaciones estables que se forman en presencia de MEL y que pueden ser explicadas por algunas propiedades estructurales y fisicoquímicas de la CaM.

Se han descrito al menos 45 estructuras conformacionales de CaM (Chen et al., 2006). Además, se ha documentado la formación simultánea en un microambiente acuoso de dos subestadios de CaM marcada con grupos fluorescentes en los dos

sitios opuestos de los dominios EF-hand (Johnson, 2006). Estos subestadios de CaM están relacionados con variaciones en el tamaño de la proteína, con cambios que varían de una forma cerrada en la CaM sin Ca^{2+} a una forma abierta en la CaM con forma de mancuernilla por la unión de Ca^{2+} (Kuboniwa et al., 1995). Además, los antagonistas de la CaM se unen en las bolsas hidrofóbicas de la CaM localizados en los dominios EF-hand y también producen cambios conformacionales importantes en esta proteína en presencia de Ca^{2+} . Es importante señalar que la MEL se une en los dominios hidrofóbicos a los que se unen los antagonistas de la CaM, con la diferencia de que la MEL es un compuesto endógeno que se produce en la glándula pineal y tejidos extrapineales y que antagoniza a la Ca^{2+} -CaM (Cinar & Czeslik, 2018). La evidencia sugiere que la interacción del ion Ca^{2+} -CaM con MEL en un microambiente acuoso modifica la conformación de la proteína posiblemente como un estabilizador de la conformación adoptada en estas condiciones.

Para corroborar que la MEL induce diferentes conformaciones de la CaM en presencia de Ca^{2+} se realizaron ensayos de espectroscopía UV-vis (Stateva et al., 2015). Se analizaron grupos funcionales en los péptidos que conforman a la CaM, y se identificaron patrones relacionados con la conformación de esta proteína. Los resultados nos identificaron que la presencia de MEL genera un cambio en los patrones previamente descritos para la CaM y que, de manera adicional, estos cambios dependen del pH. Con estos resultados identificamos que la presencia de la MEL modifica la conformación de la Ca^{2+} -CaM por lo menos en los grupos sensibles a la espectroscopía. Además, las conformaciones adoptadas por la CaM son dependientes del pH. Los resultados aquí apoyan el concepto de que la CaM

adopta conformaciones multivariadas que dependen del microentorno y de las moléculas que se le unen.

La interacción Ca^{2+} -CaM-MEL también se estudió con la técnica de espectrometría de Raman, con la cual es posible generar una “huella” particular mediante un espectro de la conformación/estructura de la CaM (de Gelder et al., 2007; Jones et al., 2014; Rygula et al., 2013; Seaton et al., 1983). Con la huella es posible identificar cambios conformacionales de las proteínas en presencia de los ligandos que se le unen. Cuando la MEL interactúa con la Ca^{2+} -CaM, observamos que hubo cambios en la zona de la estructura α las cuales son abundantes en esta proteína.

Con los espectros de Raman obtenidos, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con el cual identificamos que los cambios conformacionales en rangos específicos de los cambios en la longitud de onda de la Ca^{2+} -CaM con la MEL dependen de la concentración de la MEL (10^{-9} y 10^{-7} M), ya que es posible identificar tres grupos en los que uno de ellos se considera intermedio entre la concentración más alta de MEL y la CaM basal. Con esto podemos corroborar que la MEL interactúa de manera gradual con la Ca^{2+} -CaM y que también genera cambios conformacionales en dicha proteína. Por lo tanto, con estas tres formas de abordar la interacción de CaM con la MEL podemos concluir que la MEL se une a la CaM y que genera cambios conformacionales que dependen del microambiente y de la concentración de la MEL.

La relevancia biológica de la interacción entre la proteína más versátil y estudiada que une Ca^{2+} , la CaM, con la MEL se exploró en un microambiente lipídico y

acuoso evaluando la actividad de un importante blanco de la CaM, la enzima CaMKII *In vitro*.

Los efectos de la MEL sobre la conformación de la Ca²⁺-CaM que se forman en los dos microambientes probados se correlacionan con la actividad de la CaMKII. En el buffer acuoso, observamos un incremento en la actividad CaMKII, en tanto que en el microambiente lipídico la interacción de Ca²⁺-CaM con MEL disminuye la actividad de esta enzima. Estos datos concuerdan con estudios previos en los que la actividad de la enzima se estimuló en cultivos organotípicos y se inhibió en ensayos de reconstitución en el tubo de ensayo. Estos datos indican que existe una regulación opuesta en la actividad de la enzima que depende del microambiente, el cual favorece de distintas formas la interacción de la MEL (molécula anfifílica (Dies et al., 2015; Yu et al., 2016)) con los residuos hidrofóbicos o hidrofílicos de la CaM (Follenius & Gerard, 1984; Jensen et al., 2015; LaPorte et al., 1980; Tanaka & Hidaka, 1980), es decir, se favorecen diversas conformaciones según el microambiente, que activan o inhiben a la CaMKII.

Para discernir si la MEL se une a la CaM *in vivo* se administró de forma intraperitoneal la MEL a ratones. La interacción de la MEL con la CaM se estudió por microscopía confocal que permite observar la colocalización entre dos moléculas utilizando anticuerpos específicos acoplados a un fluorocromo (Dunn et al., 2011).

Se determinaron los sitios de colocalización en el hipocampo de ratón en donde la CaMKII y la CaM se encuentran con relativa abundancia. Además, la CaMKII

participa en la dendritogenesis y la neurogénesis desencadenada por MEL en esta región del cerebro (Domínguez-Alonso et al., 2012).

Los resultados obtenidos mostraron zonas “enriquecidas” de CaM y de MEL, así como sitios de colocalización de las dos moléculas. Es importante señalar que dichos sitios señalan la coincidencia espacial entre las dos moléculas, sin embargo, dado el tamaño de la MEL (aproximadamente dos aminoácidos 0.232 kDa) y el tamaño de los anticuerpos involucrados (en promedio 150 kDa) para identificar a las moléculas, es posible que la MEL unida a la CaM no se pueda identificar por medio de los anticuerpos debido al impedimento estérico. Sin embargo, las zonas de colocalización nos muestran el lugar donde existe una alta posibilidad de la interacción CaM-MEL.

La oxidación de la Ca²⁺-CaM y de la EGTA-CaM produce un cambio conformacional debido a que se oxidan las zonas hidrofóbicas que contienen MEL (Sharp & Tomer, 2007). Se realizaron experimentos de WB para caracterizar el nivel relativo de carbonilación (oxidación de los residuos prolina, arginina, lisina y treonina), así como el corrimiento electroforético y se observó que en un ambiente prooxidante, la oxidación de la Ca²⁺-CaM en presencia de MEL disminuye su nivel de oxidación, con esto pueden suceder dos situaciones, 1) la MEL capta los radicales libres de oxígeno (Fischer et al., 2008; Pieri et al., 1994; Purushothaman et al., 2020; Reina & Martínez, 2018; Reiter et al., 2000) y por lo tanto no hay una oxidación mayor en la Ca²⁺-CaM, 2) la MEL al unirse a la Ca²⁺-CaM modifica su conformación y los residuos sensibles a carbonilación no lo son más, cualquier situación intermedia entre los puntos se considera. Por otro lado, la CaM con

EGTA (sin Ca^{2+}) no presenta cambios en sus niveles de carbonilación en un microambiente prooxidante, así, con eso la EGTA-CaM no presenta grandes cambios en la carbonilación y no es posible identificar un efecto antioxidante de la MEL ya que 1) no expone los mismos residuos que la Ca^{2+} -CaM (Finn et al., 1993; Zhang et al., 1995), es decir, presenta otra conformación que no permite los mismos niveles de carbonilación y, 2) la EGTA-CaM, no interactúa de la misma manera con la MEL, de hecho en algunas condiciones no se une a esta (Turjanski et al., 2004), por lo que el efecto antioxidante de la MEL no se da, o sucede a niveles ínfimos. Al final, la carbonilación de la CaM depende del microambiente prooxidante, de su conformación y de la interacción que se logra con la MEL.

La caracterización de la función de la CaMKII en un ambiente prooxidante se realizó en condiciones acuosas, lipídicas y en presencia de MEL. Se observó que la presencia de radicales libres de oxígeno aumenta la actividad enzimática de la CaMKII en un ambiente acuoso, en un ambiente lipídico dicha actividad disminuye. La actividad de la CaMKII que se observa opuesta, en el caso del microambiente acuoso, lo podemos relacionar a la interacción con las conformaciones presentes de la Ca^{2+} -CaM y de la auto activación que tiene la enzima por los radicales libres (Erickson et al., 2011; Lučić et al., n.d.; Luczak & Anderson, 2014; Zhao et al., 2020). En el ambiente lipídico posiblemente los cambios conformacionales en las proteínas no favorecen de la misma manera a la actividad de la enzima, así como, la presencia del lípido también puede estar captando radicales libres. Una vez que se agregó la MEL, los niveles de actividad de la CaMKII en un ambiente prooxidante se mantuvieron similares a los del basal en los dos microambientes,

con este resultado podemos decir que la MEL más allá de que presente un efecto antioxidante como captador o como estabilizador de ciertas conformaciones en la Ca^{2+} -CaM, de manera global funciona como un regulador de la actividad enzimática a la alta o a la baja que depende de distintos factores como el pH, la presencia de radicales libres de oxígeno, el ambiente hidrofóbico o hidrofílico. La presencia de MEL favorece ciertas conformaciones en la Ca^{2+} -CaM que dependen del microambiente. Se abordó el efecto de una proteína captadora de radicales libres, la BSA (Kouoh et al., 1999), y se observó que en ambiente acuoso la actividad de la CaMKII tiende a disminuir con respecto al basal y en presencia de MEL la actividad en promedio se comporta como el basal. Con esto tenemos que más allá del efecto antioxidante de la MEL, como ya se comentó, es también el de una molécula reguladora que impacta en diferentes niveles de organización.

La esquizofrenia es un padecimiento neuropsiquiátrico cuya etiología está relacionada con alteraciones y el neurodesarrollo, así como con altos niveles de radicales libres, ya que estos presentan poca regulación en sus mecanismos antioxidantes (Chowdari et al., 2011; Yao et al., 2001; Yao & Keshavan, 2011) así como también en sus niveles de MEL (Anderson & Maes, 2012; Baandrup et al., 2016; Lai et al., 2011; Park et al., 2011; Uguz et al., 2016). Por lo que en la última parte del proyecto como una primera aproximación para estudiar las posibles interacciones entre la MEL y la CaM en un modelo traslacional de esquizofrenia caracterizamos los niveles de radicales libres de oxígeno y la lipoperoxidación en células del neuroepitelio olfatorio de pacientes con esquizofrenia. Se observó por medio de microscopía confocal que las células de pacientes con esquizofrenia

(comparadas con las células de los sujetos control) presentaron los mismos niveles de radicales libres de oxígeno. Otra condición que se cuantificó fueron los niveles de lipoperoxidación mediante la tinción de estos sitios, los cuales presentan un ligero aumento en los pacientes con esquizofrenia (dicha diferencia no fue significativa). Es importante señalar que solo se analizó un sujeto control y un sujeto con esquizofrenia, sin embargo, es posible identificar ciertas diferencias en los niveles de lipoperoxidación, queda la idea de identificar dicha lipoperoxidación con más sujetos. Aun así, podemos sugerir que la repercusión de estas condiciones, con los experimentos *in vitro* de MEL antes mencionados, nos lleva a sugerir que la regulación que genera la MEL en zonas de mayor oxidación es deficiente ya que los mecanismos reguladores de la oxidación enzimáticos (SOD, CAT, GPx) o no enzimáticos (GSH, MBPs, UA) están desregulados. El impacto en la oxidación de los lípidos nos lleva a presentar funciones alteradas en la membrana mismas que dado el daño en las neuronas, impactan en su actividad. Participando así en las características de la enfermedad (Dietrich-Muszalska & Kontek, 2010; Joshi & Praticò, 2014; Murray et al., 2021).

Es importante señalar que aún falta caracterizar la oxidación de la CaM en las células de pacientes, ya que los efectos de los radicales libres pueden estar modificando las vías y zonas en las que se encuentra y participa la CaM, así como todas las demás proteínas, como la CaMKII, que al final convergen en diferentes respuestas.

11. Conclusiones

La unión de la MEL a la Ca^{2+} -CaM depende del microambiente y de su concentración. Dicha unión regula la conformación, la oxidación, así como la actividad de la CaM; lo cual impacta en la función de sus enzimas blanco, como la CaMKII. Estos eventos están involucrados en diferentes respuestas celulares, mismos que si bien no son el origen de enfermedades como la esquizofrenia, si pueden participar en sus características patológicas.

12. Referencias

- Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Venegas, C., Díaz-Casado, M. E., Lima-Cabello, E., López, L. C., Rosales-Corral, S., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2014). Extrapineal melatonin: Sources, regulation, and potential functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *71*(16), 2997–3025. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1579-2>
- Anderson, G., & Maes, M. (2012). Melatonin: An overlooked factor in schizophrenia and in the inhibition of anti-psychotic side effects. *Metabolic Brain Disease*, *27*(2), 113–119. <https://doi.org/10.1007/s11011-012-9307-9>
- Atilgan, A. R., Aykut, A. O., & Atilgan, C. (2011). Subtle pH differences trigger single residue motions for moderating conformations of calmodulin. *Journal of Chemical Physics*, *135*(15). <https://doi.org/10.1063/1.3651807>
- Baandrup, L., Glenthøj, B. Y., & Jennum, P. J. (2016). Objective and subjective sleep quality: Melatonin versus placebo add-on treatment in patients with schizophrenia or bipolar disorder withdrawing from long-term benzodiazepine use. *Psychiatry Research*, *240*, 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2016.04.031>
- Babu, Y. S., Bugg, C. E., & Cook, W. J. (1988). Structure of calmodulin refined at 2.2 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, *204*(1), 191–204. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90608-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90608-0)
- Benítez-King, G. (2006). Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *Journal of Pineal Research*, *40*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/J.1600-079X.2005.00282.X>

- Benítez-King, G., & Antón-Tay, F. (1993). Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia*, *49*(8), 635–641. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8359270>
- Benítez-King, G., Huerto-Delgadillo, L., & Antón-Tay, F. (1991a). Melatonin modifies calmodulin cell levels in MDCK and N1E-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity in vitro. *Brain Research*, *557*(1), 289–292. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90146-M](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90146-M)
- Benítez-King, G., Huerto-Delgadillo, L., & Antón-Tay, F. (1991b). Melatonin modifies calmodulin cell levels in MDCK and N1E-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity in vitro. *Brain Research*, *557*(1–2), 289–292. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90146-M](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90146-M)
- Benítez-King, G., Huerto-Delgadillo, L., & Antón-Tay, F. (1993). Binding of 3H-melatonin to calmodulin. *Life Sciences*, *53*(3), 201–207. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(93\)90670-X](https://doi.org/10.1016/0024-3205(93)90670-X)
- Benítez-King, G., Ríos, A., Martínez, A., & Antón-Tay, F. (1996). In vitro inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1290*(2), 191–196. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(96\)00025-6](https://doi.org/10.1016/0304-4165(96)00025-6)
- Broadbelt, K., & Jones, L. B. (2008). Evidence of altered calmodulin immunoreactivity in areas 9 and 32 of schizophrenic prefrontal cortex. *Journal of Psychiatric Research*, *42*(8), 612–621. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2007.07.006>
- Brown, C. N., Cook, S. G., Allen, H. F., Crosby, K. C., Singh, T., Coultrap, S. J., & Bayer, K. U. (2021). Characterization of six CaMKII α variants found in patients with schizophrenia. *iScience*, *24*(10). <https://doi.org/10.1016/j.iisci.2021.103184>
- Cabello-Rangel, H., Arredondo, A., Díaz-Castro, L., Reyes-Morales, H., & Medina-Mora, E. (2022). An estimate of the economic burden of schizophrenia in Mexico: a retrospective study in the psychiatric hospital setting. *Journal of Global Health Neurology and Psychiatry*, 1–10.
- Cecon, E., Legros, C., Boutin, J. A., & Jockers, R. (2021). Journal of pineal research guideline for authors: Defining and characterizing melatonin targets. *Journal of Pineal Research*, *70*(2). <https://doi.org/10.1111/JPI.12712>
- Chen, K., Ruan, J., & Kurgan, L. A. (2006). Prediction of Three Dimensional Structure of Calmodulin. *The Protein Journal*, *25*(1), 57–70. <https://doi.org/10.1007/s10930-006-0011-7>
- Chou, J. J., Li, S., Klee, C. B., & Bax, A. (2001). Solution structure of Ca²⁺-calmodulin reveals flexible hand-like properties of its domains. *Nature Structural Biology*, *8*(11), 990–997. <https://doi.org/10.1038/nsb1101-990>
- Chowdari, K. v, Bamne, M. N., & Nimgaonkar, V. L. (2011). Genetic association studies of antioxidant pathway genes and schizophrenia. *Antioxidants & Redox Signaling*, *15*(7), 2037–2045. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3508>
- Cinar, S., & Czeslik, C. (2018). Inhibitor and peptide binding to calmodulin characterized by high pressure Fourier transform infrared spectroscopy and Förster resonance energy transfer. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, *1866*(5–6), 617–623. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2018.03.007>

- Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., & Milzani, A. (2003). Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Molecular Medicine*, *9*(4), 169–176.
[https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(03\)00031-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(03)00031-5)
- Dalle-Donne, I., Scaloni, A., & Butterfield, D. A. (2006). Redox Proteomics: From Protein Modifications to Cellular Dysfunction and Diseases. *Redox Proteomics: From Protein Modifications to Cellular Dysfunction and Diseases*, *33*(1), 1–944.
<https://doi.org/10.1002/0471973122>
- Davies, M. J. M. J., Winterbourn, C. C., Ferrer-Sueta, G., Radi, R., Carballal, S., Radi, R., Kirk, M. C., Barnes, S., Freeman, B. A., Alvarez, B., Ogunucu, R., Rettori, D., Munhoz, D. C., Netto, L. E., Augusto, O., Peskin, A. V., Low, F. M., Paton, L. N., Maghzal, G. J., ... Davies, M. J. M. J. (2016). Protein oxidation and peroxidation. *The Biochemical Journal*, *473*(7), 805–825.
<https://doi.org/10.1042/BJ20151227>
- de Gelder, J., de Gussem, K., Vandenabeele, P., & Moens, L. (2007). Reference database of Raman spectra of biological molecules. *Journal of Raman Spectroscopy*, *38*(9), 1133–1147.
<https://doi.org/10.1002/JRS.1734>
- Decker, H., & van Holde, K. E. (2011). Oxygen and the evolution of life. In *Oxygen and the Evolution of Life*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-13179-0>
- del Río, B., García Pedrero, J. M., Martínez-Campa, C., Zuazua, P., Lazo, P. S., & Ramos, S. (2004). Melatonin, an endogenous-specific inhibitor of estrogen receptor α via calmodulin. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(37), 38294–38302. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403140200>
- Dies, H., Cheung, B., Tang, J., & Rheinstädter, M. C. (2015). The organization of melatonin in lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1848*(4).
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.01.006>
- Dietrich-Muszalska, A., & Kontek, B. (2010). Lipid peroxidation in patients with schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, *64*(5). <https://doi.org/10.1111/j.1440-1819.2010.02132.x>
- Domínguez-Alonso, A., Ramírez-Rodríguez, G., & Benítez-King, G. (2012). Melatonin increases dendritogenesis in the hilus of hippocampal organotypic cultures. *Journal of Pineal Research*, *52*(4), 427–436. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00957.x>
- Duan, C., Jenkins, Z. M., & Castle, D. (2021). Therapeutic use of melatonin in schizophrenia: A systematic review. *World Journal of Psychiatry*, *11*(8), 463.
<https://doi.org/10.5498/WJP.V11.I8.463>
- Dunn, K. W., Kamocka, M. M., & McDonald, J. H. (2011). A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *300*(4). <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00462.2010>
- Erickson, J. R., He, B. J., Grumbach, I. M., & Anderson, M. E. (2011). CaMKII in the Cardiovascular System: Sensing Redox States. *Physiological Reviews*, *91*(3), 889–915.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2010>

- Finn, B. E., Drakenberg, T., & Forsén, S. (1993). The structure of apo-calmodulin. A ^1H NMR examination of the carboxy-terminal domain. *FEBS Letters*, *336*(2).
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80839-M](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80839-M)
- Fischer, T. W., Slominski, A., Zmijewski, M. A., Reiter, R. J., & Paus, R. (2008). Melatonin as a major skin protectant: From free radical scavenging to DNA damage repair. In *Experimental Dermatology* (Vol. 17, Issue 9). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00767.x>
- Findıklı, E., Inci, M. F., Gökçe, M., Findıklı, H. A., Altun, H., Karaaslan, M. F., Findikli, E., Inci, M. F., Gökçe, M., Findikli, H. A., Altun, H., & Karaaslan, M. F. (2015). Pineal gland volume in schizophrenia and mood disorders. *Psychiatria Danubina*, *27*(2), 153–158.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26057310>
- Follenius, A., & Gerard, D. (1984). Fluorescence investigations of calmodulin hydrophobic sites. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *119*(3).
[https://doi.org/10.1016/0006-291X\(84\)90896-9](https://doi.org/10.1016/0006-291X(84)90896-9)
- Frankland, P. W., Sakaguchi, M., & Arruda-Carvalho, M. (2008). Starting at the endophenotype: A role for alpha-CaMKII in schizophrenia? *Molecular Brain*, *1*, 5. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-1-5>
- Gonzalez-Lienres, C., Tas, C., Brown, E. C., Erdin, S., Onur, E., Cubukcoglu, Z., Aydemir, O., Esen-Danaci, A., & Brüne, M. (2014). Oxidative stress in schizophrenia: A case-control study on the effects on social cognition and neurocognition. *BMC Psychiatry*, *14*(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1186/s12888-014-0268-x>
- Hempel, C., Nörenberg, W., Sobottka, H., Urban, N., Nicke, A., Fischer, W., & Schaefer, M. (2013). The phenothiazine-class antipsychotic drugs prochlorperazine and trifluoperazine are potent allosteric modulators of the human P2X7 receptor. *Neuropharmacology*, *75*, 365–379.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.07.027>
- Heydorn, W. E., Creed, G. J., & Jacobowitz, D. M. (1987). Observations and implications on the migration of calmodulin in a two-dimensional gel system. *Electrophoresis*, *8*(5), 251–252.
<https://doi.org/10.1002/elps.1150080511>
- Huerto-Delgado, L., Antón-Tay, F., & Benitez-King, G. (1994). Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: Role of melatonin as a calmodulin antagonist. *Journal of Pineal Research*, *17*(2), 55–62. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1994.tb00114.x>
- Hye, Y. P., Kim, S. A., Korlach, J., Rhoades, E., Kwok, L. W., Zipfel, W. R., Waxham, M. N., Webb, W. W., & Pollack, L. (2008). Conformational changes of calmodulin upon Ca^{2+} binding studied with a microfluidic mixer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(2), 542–547. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710810105>
- Jensen, D., Reynolds, N., Yang, Y. P., Shakya, S., Wang, Z. Q., Stuehr, D. J., & Wei, C. C. (2015). The exchanged EF-hands in calmodulin and troponin C chimeras impair the Ca^{2+} -induced hydrophobicity and alter the interaction with Orai1: A spectroscopic, thermodynamic and kinetic study. *BMC Biochemistry*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s12858-015-0036-7>

- Johnson, C. K. (2006). Calmodulin, conformational states, and calcium signaling. A single-molecule perspective. *Biochemistry*, 45(48), 14233–14246. <https://doi.org/10.1021/bi061058e>
- Jones, E. M., Balakrishnan, G., Squier, T. C., & Spiro, T. G. (2014). Distinguishing unfolding and functional conformational transitions of calmodulin using ultraviolet resonance Raman spectroscopy. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 23(8), 1094–1101. <https://doi.org/10.1002/PRO.2495>
- Joshi, Y. B., & Praticò, D. (2014). Lipid peroxidation in psychiatric illness: Overview of clinical evidence. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2014). <https://doi.org/10.1155/2014/828702>
- Juhász, T., Kardos, J., Dürvanger, Z., Harmat, V., & Liliom, K. (2020). Comparison of ligand binding and conformational stability of human calmodulin with its homolog from the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *FASEB BioAdvances*, 2(8), 489–505. <https://doi.org/10.1096/fba.2020-00013>
- Junker, J. P., & Rief, M. (2009). Single-molecule force spectroscopy distinguishes target binding modes of calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(34), 14361–14366. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904654106>
- Jurado, L. A., Chockalingam Sethu, P., & Jarrett, H. W. (1999). Apocalmodulin. *Physiological Reviews*, 79(3), 661–682. <http://physrev.physiology.org/content/79/3/661.long>
- Kouoh, F., Gressier, B., Luyckx, M., Brunet, C., Dine, T., Cazin, M., & Cazin, J. C. (1999). Antioxidant properties of albumin: effect on oxidative metabolism of human neutrophil granulocytes. *Farmaco (Societa Chimica Italiana : 1989)*, 54(10), 695–699. [https://doi.org/10.1016/s0014-827x\(99\)00082-8](https://doi.org/10.1016/s0014-827x(99)00082-8)
- Kuboniwa, H., Tjandra, N., Grzesiek, S., Ren, H., Klee, C. B., & Bax, A. (1995). Solution structure of calcium-free calmodulin. *Nature Structural Biology*, 2(9), 768–776.
- Lai, I. C., Chen, M. L., Wang, Y. C., Chen, J. Y., Liao, D. L., Bai, Y. M., Lin, C. C., Chen, T. T., & Liou, Y. J. (2011). Analysis of genetic variations in the human melatonin receptor (MTNR1A, MTNR1B) genes and antipsychotics-induced tardive dyskinesia in schizophrenia. *World Journal of Biological Psychiatry*, 12(2), 143–148. <https://doi.org/10.3109/15622975.2010.496870>
- LaPorte, D. C., Wierman, B. M., & Storm, D. R. (1980). Calcium-Induced Exposure of a Hydrophobic Surface on Calmodulin. *Biochemistry*, 19(16). <https://doi.org/10.1021/bi00557a025>
- Lerner, A. B., Case, J. D., & Heinzelman, R. v. (1959). Structure of melatonin. *Journal of the American Chemical Society*, 81(22), 6084–6085. https://doi.org/10.1021/JA01531A060/ASSET/JA01531A060.FP.PNG_V03
- Lloyd, R. v, Hanna, P. M., & Mason, R. P. (1997). The origin of the hydroxyl radical oxygen in the fenton reaction. *Free Radical Biology & Medicine*, 22(5), 885–888. http://ac.els-cdn.com/S0891584996004327/1-s2.0-S0891584996004327-main.pdf?_tid=c9d67068-251e-11e7-8f31-00000aab0f26&acdnat=1492620162_beb5349f9615157afe8c4d671b09c375

- Lučić, V., Greif, G. J., & Kennedy, M. B. (n.d.). *Detailed State Model of CaMKII Activation and Autophosphorylation*. <https://doi.org/10.1007/s00249-008-0362-4>
- Luczak, E. D., & Anderson, M. E. (2014). CaMKII oxidative activation and the pathogenesis of cardiac disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *73*, 112–116. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.02.004>
- Maisonneuve, E., Ducret, A., Khoueiry, P., Lignon, S., Longhi, S., Talla, E., & Dukan, S. (2009). Rules governing selective protein carbonylation. *PLoS ONE*, *4*(10), e7269. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007269>
- Manchester, L. C., Coto-Montes, A., Boga, J. A., Andersen, L. P. H., Zhou, Z., Galano, A., Vriend, J., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2015). Melatonin: An ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. *Journal of Pineal Research*, *59*(4), 403–419. <https://doi.org/10.1111/jpi.12267>
- Mccarthy, M. R., Thompson, A. R., Nitu, F., Moen, R. J., Olenek, M. J., Klein, J. C., & Thomas, D. D. (2015). Impact of Methionine Oxidation on Calmodulin Structural Dynamics. *Biochem Biophys Res Commun. Biochem Biophys Res Commun. January*, *9*(4562), 567–572. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.11.091>
- Medina-Mora, M. E., Borges, G., Benjet, C., Lara, C., & Berglund, P. (2007). Psychiatric disorders in Mexico: Lifetime prevalence in a nationally representative sample. *The British Journal of Psychiatry*, *190*(6), 521–528. <https://doi.org/10.1192/BJP.BP.106.025841>
- Mendoza-Figueroa, J. S., Badillo-Ramírez, I., Kvarnheden, A., Rosas-Ramírez, D. G., Rodríguez-Negrete, E. A., Méndez-Lozano, J., Saniger, J. M., & Soriano-García, M. (2019). The Peptide AmPep1 Derived from Amaranth Recognizes the Replication Hairpin of TYLCV Disturbing Its Replication Process in Host Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *67*(33), 9241–9253. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.9B02526/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF9B02526_0006.GIF
- Meyer, T., Hanson, P. I., Stryer, L., & Schulman, H. (1992). Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. *Science*, *256*(5060), 1199–1202. <https://doi.org/10.1126/science.256.5060.1199>
- Møller, I. M., Rogowska-Wrzesinska, A., & Rao, R. S. P. (2011). Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective. *Journal of Proteomics*, *74*(11), 2228–2242. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.004>
- Morera-Fumero, A. L., & Abreu-Gonzalez, P. (2013). Role of Melatonin in Schizophrenia. *International Journal of Molecular Sciences 2013, Vol. 14, Pages 9037-9050*, *14*(5), 9037–9050. <https://doi.org/10.3390/IJMS14059037>
- Murray, A. J., Rogers, J. C., Katshu, M. Z. U. H., Liddle, P. F., & Upthegrove, R. (2021). Oxidative Stress and the Pathophysiology and Symptom Profile of Schizophrenia Spectrum Disorders. In *Frontiers in Psychiatry* (Vol. 12). <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.703452>

- O'Connell, D. J., Bauer, M. C., O'Brien, J., Johnson, W. M., Divizio, C. A., O'Kane, S. L., Berggård, T., Merino, A., Åkerfeldt, K. S., Linse, S., & Cahill, D. J. (2010). Integrated Protein Array Screening and High Throughput Validation of 70 Novel Neural Calmodulin-binding Proteins. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9(6), 1118–1132. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900324-MCP200>
- Ohya', Y. (1987). Purification and biochemical properties of calmodulin from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem*, 168.
- Ouyang, H., & Vogel, H. J. (1998). Melatonin and serotonin interactions with calmodulin: NMR, spectroscopic and biochemical studies. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1383(1), 37–47. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(97\)00157-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(97)00157-X)
- Park, H. J., Park, J. K., Kim, S. K., Cho, A. R., Kim, J. W., Yim, S. V., & Chung, J. H. (2011). Association of polymorphism in the promoter of the melatonin receptor 1A gene with schizophrenia and with insomnia symptoms in schizophrenia patients. *Journal of Molecular Neuroscience*, 45(2), 304–308. <https://doi.org/10.1007/s12031-011-9522-6>
- Pieri, C., Marra, M., Moroni, F., Recchioni, R., & Marcheselli, F. (1994). Melatonin: A peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sciences*, 55(15). [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(94\)00666-0](https://doi.org/10.1016/0024-3205(94)00666-0)
- Purushothaman, A., Sheeja, A. A., & Janardanan, D. (2020). Hydroxyl radical scavenging activity of melatonin and its related indolamines. *Free Radical Research*, 54(5). <https://doi.org/10.1080/10715762.2020.1774575>
- Quiney, C., Finnegan, S., Groeger, G., & Cotter, T. G. (2011). Protein oxidation. *Protein Reviews*, 13, 57–78. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6382-6_3
- Reina, M., & Martínez, A. (2018). A new free radical scavenging cascade involving melatonin and three of its metabolites (3OHM, AFMK and AMK). *Computational and Theoretical Chemistry*, 1123. <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2017.11.017>
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Osuna, C., & Gitto, E. (2000). Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: A review. In *Journal of Biomedical Science* (Vol. 7, Issue 6). <https://doi.org/10.1007/BF02253360>
- Robison, A. J. (2014). Emerging role of CaMKII in neuropsychiatric disease. *Trends in Neurosciences*, 37(11), 653–662. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.07.001>
- Robison, A. J., Winder, D. G., Colbran, R. J., & Bartlett, R. K. (2007). Oxidation of calmodulin alters activation and regulation of CaMKII. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 356(1), 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.02.087>
- Rocco-Machado, N., Lai, L., Kim, G., He, Y., Luczak, E. D., Anderson, M. E., & Levine, R. L. (2022). Oxidative stress–induced autonomous activation of the calcium/calmodulin-dependent kinase II involves disulfide formation in the regulatory domain. *Journal of Biological Chemistry*, 298(11), 102579. <https://doi.org/10.1016/J.JBC.2022.102579>

- Rygula, A., Majzner, K., Marzec, K. M., Kaczor, A., Pilarczyk, M., & Baranska, M. (2013). Raman spectroscopy of proteins: a review. *Journal of Raman Spectroscopy*, *44*(8), 1061–1076. <https://doi.org/10.1002/JRS.4335>
- Saha, S., Chant, D., Welham, J., & McGrath, J. (2005). A systematic review of the prevalence of schizophrenia. *PLoS Medicine*, *2*(5), 0413–0433. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020141>
- Sasagawa, T., Ericsson, L. H., Walsh, K. A., Schreiber, W. E., Fischer, E. H., & Titani, K. (1982). Complete amino acid sequence of human brain calmodulin. *Biochemistry*, *21*(10), 2565–2569. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7093203>
- Seaton, B. A., Lord, R. C., Petsko, G. A., & Head, J. F. (1983). Studies of Calmodulin Structure: Laser Raman Spectroscopy of Biomolecules. *Biochemistry*, *22*(4), 973–978. https://doi.org/10.1021/BI00273A041/ASSET/BI00273A041.FP.PNG_V03
- Sharp, J. S., & Tomer, K. B. (2007). Analysis of the oxidative damage-induced conformational changes of apo- and holocalmodulin by dose-dependent protein oxidative surface mapping. *Biophysical Journal*, *92*(5). <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.099093>
- Shukla, D., Peck, A., & Pande, V. S. (2016). Conformational heterogeneity of the calmodulin binding interface. *Nature Communications*, *7*. <https://doi.org/10.1038/ncomms10910>
- Singh, M., & Jadhav, H. R. (2014). Melatonin: functions and ligands. *Drug Discovery Today*, *19*(9), 1410–1418. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.04.014>
- Stateva, S. R., Salas, V., Benaim, G., Menéndez, M., Solís, D., & Villalobo, A. (2015). Characterization of Phospho-(Tyrosine)-Mimetic Calmodulin Mutants. *PLOS ONE*, *10*(4), e0120798. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0120798>
- Stigler, J., Ziegler, F., Gieseke, A., Gebhardt, J. C. M., & Rief, M. (2011). The complex folding network of single calmodulin molecules. *Science*, *334*(6055), 512–516. <https://doi.org/10.1126/science.1207598>
- Tamkun, M. M., Talvenheimo, J. A., & Catterall, W. A. (1984). The sodium channel from rat brain. Reconstitution of neurotoxin-activated ion flux and scorpion toxin binding from purified components. *Journal of Biological Chemistry*, *259*(3), 1676–1688. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)43461-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)43461-2)
- Tan, D.-X., Manchester, L., Esteban-Zubero, E., Zhou, Z., & Reiter, R. (2015). Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and Metabolism. *Molecules*, *20*(10), 18886–18906. <https://doi.org/10.3390/molecules201018886>
- Tanaka, T., & Hidaka, H. (1980). Hydrophobic regions function in calmodulin-enzyme(s) interactions. *Journal of Biological Chemistry*, *255*(23). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)70253-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)70253-1)
- Turjanski, A. G., Estrin, D. A., Rosenstein, R. E., McCormick, J. E., Martin, S. R., Pastore, A., Biekofsky, R. R., & Martorana, V. (2004). NMR and molecular dynamics studies of the

- interaction of melatonin with calmodulin. *Protein Science*, 13(11), 2925–2938.
<https://doi.org/10.1110/ps.04611404>
- Uguz, A. C., Demirci, K., & Espino, J. (2016). The Importance of Melatonin and Mitochondria Interaction in Mood Disorders and Schizophrenia: A Current Assessment. *Current Medicinal Chemistry*, 23(20), 2146–2158. <https://doi.org/10.2174/092986732366616031612505>
- Vidal-Domènech, F., Riquelme, G., Pinacho, R., Rodriguez-Mias, R., Vera, A., Monje, A., Ferrer, I., Callado, L. F., Meana, J. J., Villén, J., & Ramos, B. (2020a). Calcium-binding proteins are altered in the cerebellum in schizophrenia. *PLoS ONE*, 15(7).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0230400>
- Vidal-Domènech, F., Riquelme, G., Pinacho, R., Rodriguez-Mias, R., Vera, A., Monje, A., Ferrer, I., Callado, L. F., Meana, J. J., Villén, J., & Ramos, B. (2020b). Calcium-binding proteins are altered in the cerebellum in schizophrenia. *PLOS ONE*, 15(7), e0230400.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0230400>
- Weitzman, E. D., York, N., Moore-edde, M. C., & Knauer, R. S. (1980). Light Suppresses Melatonin Secretion in Humans. *Science*, 210(September), 1267–1268.
- Wittig, I., & Schägger, H. (2008). Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. *Proteomics*, 8(19), 3974–3990. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800017>
- Wong, C. M., Marcocci, L., Liu, L., & Suzuki, Y. J. (2010). Cell Signaling by Protein Carbonylation and Decarbonylation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(3), 393–404.
<https://doi.org/10.1089/ars.2009.2805>
- Yao, J. K., & Keshavan, M. S. (2011). Antioxidants, redox signaling, and pathophysiology in schizophrenia: an integrative view. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(7), 2011–2035.
<https://doi.org/10.1089/ars.2010.3603>
- Yao, J. K., Reddy, R. D., & van Kammen, D. P. (2001). Oxidative damage and schizophrenia: An overview of the evidence and its therapeutic implications. *CNS Drugs*, 15(4), 287–310.
<https://doi.org/10.2165/00023210-200115040-00004>
- Yu, H., Dickson, E. J., Jung, S.-R., Koh, D.-S., & Hille, B. (2016). High membrane permeability for melatonin. *The Journal of General Physiology*, 147(1), 63–76.
<https://doi.org/10.1085/jgp.201511526>
- Zhang, M., Tanaka, T., & Ikura, M. (1995). Calcium-induced conformational transition revealed by the solution structure of apo calmodulin. *Nature Structural Biology*, 2(9).
<https://doi.org/10.1038/nsb0995-758>
- Zhao, N., Li, Q., Sui, H., & Zhang, H. (2020). Role of Oxidation-Dependent CaMKII Activation in the Genesis of Abnormal Action Potentials in Atrial Cardiomyocytes: A Simulation Study. *BioMed Research International*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/1597012>

La liga del artículo: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/5/2479>

Declaración de originalidad

El (La) que suscribe José de Jesús Argueta Donohué, alumno (a) del posgrado de Biología Experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor(a) de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: "Interacción calmodulina-melatonina: efectos sobre la oxidación de la calmodulina y la actividad de la calmodulina cinasa II",

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. Jurado para la obtención del grado de doctorado es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 13 de diciembre del 2022.

Atentamente



José de Jesús Argueta Donohué

Nombre y firma del alumno

Este documento debe ser firmado con tinta azul y debe anexarse copia en la tesis o idónea comunicación de resultados (tesina, reporte, etc.), el documento original será conservado por el Coordinador del Posgrado.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00145

Matrícula: 2173801595

Interacción
calmodulina-melatonina:
efectos sobre la oxidación de la
calmodulina y la actividad de la
calmodulina cinasa II

En la Ciudad de México, se presentaron a las 8:00 horas del día 20 del mes de diciembre del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. BEATRIZ GOMEZ GONZALEZ
DRA. ROSA ESTRADA REYES
DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA
DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: JOSE DE JESUS ARGUETA DONOHUE

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



JOSE DE JESUS ARGUETA DONOHUE
ALUMNO

REVISÓ
MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSÉ LUIS GÓMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. BEATRIZ GOMEZ GONZALEZ

VOCAL

DRA. ROSA ESTRADA REYES

VOCAL

DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA

SECRETARIO

DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ