

# Mecanismo de acción intracelular del neuromodulador melatonina: Estado actual y perspectivas

Gloria Benitez-King\*

## Summary

Melatonin is a hormone secreted by the pineal gland according to the light-dark cycle. Despite that its pharmacological and physiological effects are well known, its mechanism of action still remains to be elucidated. In this article we review the evidence about melatonin interactions with calmodulin. The kinetics of melatonin-calmodulin binding suggest that the hormone modulates cell activity through intracellular binding to the protein at physiological concentration ranges. The melatonin antagonism to calmodulin may allow the hormone to rhythmically modulate many cellular functions. Melatonin tubulin polymerization studies, and cytoskeletal changes in MDCK and N1E-115 cells cultured with melatonin, suggest that at low concentration ( $10^{-9}$  M), cytoskeletal melatonin effects are mediated by its antagonism to  $Ca^{2+}$ -calmodulin. At higher concentrations ( $10^{-5}$  M), non-specific binding of melatonin to tubulin occurs, thus overcoming the melatonin antagonism to  $Ca^{2+}$ -calmodulin. Since melatonin and calmodulin are chemical structures phylogenetically well preserved, calmodulin-melatonin interaction probably represents a primary mechanism for both regulation and synchronization of cell physiology.

## Resumen

La melatonina es una hormona que es secretada por la glándula pineal durante el periodo de oscuridad. A pesar de que se conocen sus efectos farmacológicos y fisiológicos, su mecanismo de acción no se conoce con exactitud. En este artículo se revisó la evidencia que apoya que la melatonina interacciona con la calmodulina. La unión de la melatonina a la calmodulina sugiere que la hormona modula la actividad celular por medio de su unión intracelular a esta proteína. El antagonismo de la melatonina por la calmodulina podría modular rítmicamente muchas funciones celulares. Los efectos de la melatonina sobre el citoesqueleto microtubular sugieren que a bajas concentraciones ( $10^{-9}$  M), los efectos de la hormona sobre el citoesqueleto son mediados por un antagonismo de  $Ca^{2+}$ -calmodulina. A concentraciones farmacológicas ( $10^{-5}$  M) ocurre una unión inespecífica a la tubulina que prevalece sobre el antagonismo a la calmodulina. Dado que la melatonina y la calmodulina son estructuras filogenéticamente bien conservadas, la interacción melatonina-calmodulina probablemente represente un mecanismo primario para la regulación y la sincronización de la fisiología celular.

## Introducción

En 1958, Lerner aisló la melatonina (MEL) de extractos de glándula pineal. Desde entonces se han realizado múltiples esfuerzos por tratar de dilucidar su papel fisiológico (32).

La síntesis y liberación de MEL se lleva a cabo por medio de un sistema circadiano que en los mamíferos comprende la retina, el núcleo supraquiasmático y la glándula pineal (34). Los niveles circulantes de MEL plasmática actúan como una señal que tiene un papel central en la regulación de los ritmos circadianos de varias especies de reptiles, aves y mamíferos (para una revisión ver ref. 20). En los vertebrados (20), los invertebrados (20), las plantas (7) y en algunos organismos unicelulares (6), la administración de MEL exógena modifica los ritmos circadianos. En los seres humanos se ha postulado que la hormona puede estar involucrada en la regulación del sueño (3, 24), en los trastornos afectivos (37), en el envejecimiento (36) y en el cáncer (33).

A pesar del conocimiento obtenido en los últimos años acerca de los efectos fisiológicos y farmacológicos de la MEL, no se conoce con exactitud su mecanismo de acción. No hay un acuerdo general acerca del tipo celular que reconoce la señal de la MEL, o el mecanismo que desencadena la cascada metabólica que resulta en una respuesta celular.

En los últimos 20 años se ha demostrado que uno de los órganos blanco de la MEL es el sistema nervioso central (SNC), en donde actúa como un neuromodulador (19). Hasta la fecha hay múltiples estudios que sugieren la existencia de receptores membranales a MEL en las neuronas del SNC (30,41) y en los órganos periféricos (23). Sin embargo, los efectos pleiotrópicos de la MEL han sugerido que la hormona podría actuar a través de otros mecanismos. En este trabajo se revisará la evidencia que apoya la hipótesis de que la MEL actúa intracelularmente por medio de su interacción con la calmodulina (CaM).

## Accesibilidad al interior de las células

El primer paso en el reconocimiento de una señal hormonal es su acceso a las células blanco. La MEL (5-

\* Departamento de Neurofarmacología. División de Investigaciones Clínicas. Instituto Mexicano de Psiquiatría. Calz. México-Xochimilco 101, San Lorenzo Huipulco, 14370 México, D.F.

metoxy-N-acetilriptamina) es una molécula pequeña y lipofílica que por sus características fisicoquímicas atraviesa las membranas biológicas (2,18,43). La MEL se ha localizado en prácticamente todos los tejidos después de su administración sistémica (29). La mayor proporción de MEL permanece en el citosol y proporciones decrecientes en el núcleo, la fracción microsomal y los microsomas (4). En el modelo experimental donde estudiamos la interacción intracelular de la MEL, demostramos que la MEL es capaz de entrar a las células. La distribución intracelular de la MEL se estudió con la técnica de inmunofluorescencia de doble marcaje de las células MDCK y N1E-115. La hormona no se detectó en las células controles. En las células tratadas con la hormona durante 3 horas, la MEL se localizó como puntos fluorescentes en aposición con la membrana plasmática y en el citoplasma (25). Esta evidencia apoya que debido a su lipofílicidad, la MEL puede entrar en diferentes tipos celulares, cruzando la membrana plasmática hacia el espacio intracelular.

### Interacción melatonina-calmodulina

Aun cuando la MEL entra al espacio intracelular, las células blanco de la hormona deben reconocer su presencia y traducir la señal en sucesos metabólicos que resulten en una respuesta biológica.

Inicialmente se determinó el reconocimiento de la señal de MEL por CaM con métodos indirectos. Cuando se midió la actividad de la fosfodiesterasa dependiente de CaM, en presencia de MEL, se encontró que la hormona inhibió la activación de la enzima por CaM (9). Además, con métodos electroforéticos se demostró que la  $^3\text{H}$ -MEL comigra con la CaM en presencia de  $\text{Ca}^{++}$ . La hormona también modificó la movilidad relativa de esta proteína en geles desnaturizantes de poliacrilamida (9).

La evidencia directa de la interacción de MEL con CaM se obtuvo estudiando la unión de  $^3\text{H}$ -MEL a CaM incorporada a liposomas con un método de ultrafiltración rápida (12). Con esta metodología se encontró que la unión de MEL a CaM cumple con los criterios requeridos para considerar a CaM como un receptor de MEL.

La unión es saturable, reversible, estereoselectiva, dependiente de  $\text{Ca}^{++}$  y de alta afinidad. Los estudios de saturación y de asociación disociación revelaron que la  $^3\text{H}$ -MEL se une a un solo sitio con una  $K_d$  de 188 pM y una  $B_{\text{max}}$  de 35 pM/ $\mu\text{g}$  de CaM (12).

Una vez demostrado que la MEL tiene acceso al espacio intracelular y su alta afinidad por la CaM, surgen dos preguntas: 1) ¿La unión de la MEL a la CaM ocurre en las células? y 2) ¿Cuáles son los sucesos bioquímicos que siguen a la unión de MEL a CaM y que resultan en una respuesta biológica?

La evidencia que apoya que la unión de MEL a CaM ocurre en el interior de las células se obtuvo por la localización simultánea de la hormona y de la proteína con el método de inmunofluorescencia de doble marcaje (10). Las células MDCK sembradas a subconfluencia se incubaron durante 12 h con vehículo o MEL. Pos-

teriormente se tiñeron secuencialmente con un anticuerpo anti-MEL desarrollado en conejo, seguido de un anticuerpo anti-CaM desarrollado en el borrego. Como segundos anticuerpos se utilizaron inmunoglobulinas específicas acopladas a fluoresceína o rodamina. En las células tratadas con MEL, la hormona y la proteína se localizaron en los mismos sitios subcelulares: en la periferia celular, en el citoplasma y en la región nuclear. Estos resultados apoyan que la MEL y la CaM se unen en el espacio intracelular.

En las células MDCK y N1E-115 se han demostrado cambios metabólicos y estructurales relacionados con la interacción MEL-CaM. En las células MDCK incubadas durante 6, 12, 24 h o 4 días, la distribución de CaM se modifica (10,25). En las células incubadas con vehículo, la CaM se localiza en la periferia celular, mientras que en las células tratadas con la hormona, la CaM se localiza como una red fina en el citoplasma. Los cambios en la distribución de CaM inducidos por la MEL, se confirmaron mediante la cuantificación de la CaM en diferentes fracciones subcelulares con el método de radioinmunoensayo (10,25). Las células MDCK incubadas con MEL durante 4 días mostraron un incremento del 40 % en el contenido de CaM unida a membrana y una disminución del 40 % en la cantidad de CaM en la fracción citosólica. No se detectaron cambios en la fracción nuclear. Los cambios en la distribución de CaM inducidos por la MEL son reversibles. Doce horas después de retirar la MEL del medio de cultivo, el patrón de distribución de CaM fue semejante al de las células controles. Se obtuvieron cambios semejantes en la distribución de CaM en las células N1E-115 incubadas con MEL (10,25).

Los cambios metabólicos inducidos por MEL en las células MDCK y N1E-115 se relacionan con el crecimiento celular y los niveles de CaM. La hormona incrementa la proliferación celular y los niveles de CaM en la fase logarítmica del crecimiento (9,11). En la fase estacionaria, la concentración de CaM disminuye 40 % y el crecimiento celular se inhibe en un 50 %. La concentración de CaM en un tiempo dado depende de la relación entre su síntesis y su degradación. Los experimentos de recambio efectuados en las células MDCK incubadas hasta por seis días con MEL, han sugerido que tanto la síntesis como la degradación de CaM se modifican (11). Se ha demostrado que los niveles de mRNA específicos de CaM se incrementan dos veces en la fase logarítmica y regresan a niveles normales en la fase estacionaria tanto en las células MDCK como en las N1E-115 (35). Sin embargo la vida media de la CaM cambia de 19 h en las células control a 16 h en las células tratadas con MEL (11). Estos resultados sugieren que la MEL podría incrementar los niveles de mRNA de CaM modulando la expresión del gen de CaM.

Recientemente encontramos que la MEL en las células MDCK y N1E-115 incrementa la unión de AP-1 a DNA, lo que sugiere que la hormona, además de cambiar los niveles de CaM y modificar su distribución subcelular, puede actuar a nivel nuclear modificando la expresión genética.

## Antagonismo de la calmodulina por la melatonina

Los cambios estructurales inducidos por MEL se han relacionado con un efecto antagonista de la hormona sobre CaM. En las células MDCK y N1E-115, la MEL produce cambios en la forma celular y en el arreglo del citoesqueleto (8). En presencia de concentraciones fisiológicas de la hormona ambas líneas celulares crecen formando una red fina. En las células MDCK incubadas con MEL se forman prolongaciones citoplasmáticas, y los microfilamentos de actina localizados en la periferia se tornan más gruesos (8). En las células de neuroblastoma la MEL actúa como un factor de diferenciación. En las N1E-115 cultivadas con la hormona, se incrementa significativamente el número de células con neuritas, y los microtúbulos se alargan formando redes muy largas (8).

Los estudios efectuados en un sistema reconstituido de polimerización de tubulina *in vitro*, han sido útiles para entender el mecanismo por el cual la MEL causa cambios en el citoesqueleto. La polimerización de tubulina *in vitro* depende de GTP (27). En presencia de las proteínas asociadas con los microtúbulos (MAPs), el efecto inhibitorio del Ca<sup>2+</sup> sobre la polimerización de los microtúbulos se incrementa por la adición de CaM (17,31). La MEL evita este efecto inhibitorio de CaM a concentraciones fisiológicas, causando un alargamiento de los microtúbulos. Este efecto es muy semejante al producido por la trifluoperazina (TFP) a una concentración de 10 µM, un antagonista de CaM conocido, y por el compuesto 48/80 (30 µg/ml) (26). Se han obtenido resultados similares en una preparación de citoesqueletos *in situ* de células MDCK y N1E-115 incubados con 10<sup>-9</sup> M de MEL (26). La hormona protege a la red de microtúbulos del efecto disruptor de Ca<sup>2+</sup>/CaM. Los microtúbulos en los citoesqueletos *in situ*, tratados con MEL, son más largos y gruesos que los de los citoesqueletos controles rotos por la activación de la CaM endógena por Ca<sup>2+</sup> (26).

En ausencia de una CaM activa, la MEL con concentraciones farmacológicas (10<sup>-5</sup> M) inhibe la polimerización de microtúbulos tanto *in vitro* como en los citoesqueletos *in situ* (26).

Estos resultados sugieren que los efectos de MEL dependen de la concentración de la hormona y de la presencia de CaM. A concentraciones fisiológicas (10<sup>-9</sup> M) la MEL se une a la CaM y bloquea la formación de los complejos MAPs/CaM y tubulina/CaM y se incrementa el tamaño de los microtúbulos. En ausencia de CaM o en concentraciones farmacológicas de la hormona (10<sup>-5</sup> M), MEL se une a la tubulina, altera su estructura secundaria y evita el ensamble de la tubulina, favoreciendo la ruptura de los microtúbulos. Esta hipótesis da una explicación plausible a los efectos contradictorios de MEL sobre el citoesqueleto de diferentes especies y bajo diferentes condiciones experimentales (para una revisión ver 13).

La evidencia adicional que apoya que la MEL actúa como un antagonista de CaM ha sido obtenida *in vitro*. La hormona inhibe la actividad de la fosfodiesterasa

dependiente de CaM (9), a la multiproteína cinasa II (14,16) y a la ATPasa dependiente de CaM (5) con una potencia 10 000 veces mayor que la TFP.

Dado que la MEL actúa de manera semejante a la TFP pero con una potencia mayor, surgió la pregunta de si la hormona, y al igual que la TFP, es capaz de unirse a los receptores D2 (39) o de inhibir a la proteína cinasa C (1). Por experimentos de desplazamiento de la espiperona radioactiva, un ligando selectivo de los receptores dopaminérgicos, se encontró que la MEL no se une a los receptores D2 (21). Sin embargo estimula a la proteína cinasa C tanto *in vitro* (14) como *in vivo* (15). Estos resultados indican que la MEL tiene propiedades diferentes a los antagonistas de CaM. Además, sugieren que la hormona interacciona con otras proteínas intracelulares que tienen actividad funcional.

## Conclusiones y perspectivas

Los resultados descritos sugieren que la MEL puede modular procesos activados por CaM de tres formas diferentes: por unión a CaM inhibiendo su actividad; por incremento de los niveles totales de CaM; por concentración de CaM en compartimientos celulares específicos. Estos dos últimos procesos aumentarían el nivel de respuesta de las funciones activadas por CaM.

La CaM es una proteína ubicua que es activada por Ca<sup>2+</sup> (22,42). El complejo Ca<sup>2+</sup>/CaM activa diferentes enzimas blanco por unión directa (38,40,42); indirectamente, activa a algunas enzimas por medio de su fosforilación por cinasas específicas dependientes de CaM (28). De esta manera la CaM modula la actividad de enzimas y proteínas estructurales. Dado que la CaM es un modulador multifuncional, surge una pregunta obvia. ¿De qué manera la MEL podría regular una función celular específica? La modulación específica de MEL dependería del tipo celular; de las características cinéticas de su unión a CaM, y de la coexistencia de Ca<sup>2+</sup>, CaM, MEL, enzima blanco de CaM y sustrato, en un mismo compartimiento celular a un tiempo determinado.

Las hormonas actúan estimulando la producción de otras hormonas o ejerciendo efectos permisivos. Esto con el objeto de preservar las funciones celulares y la homeostasis. A diferencia de estos mecanismos, la MEL actúa por interacción con la CaM modulando el nivel de respuesta celular, es decir, es una hormona reostática. De acuerdo con el ritmo de secreción de MEL, variaría el nivel de actividad de sus células blanco, oscilando con el ciclo luz-oscuridad.

Hasta ahora el conocimiento acerca del mecanismo intracelular de acción de MEL se ha basado en el citoesqueleto, por lo que es necesario explorar el efecto de MEL sobre otras funciones celulares moduladas por CaM.

## Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por Conacyt por medio de los donativos PO28CCOX891680, DIII-904693 y 1781-N9210.

## REFERENCIAS

1. AFTAB DT, BALLAS LM, LOOMIS CR, HAIT WN: Structure activity relationships of phenothiazines and related drugs for inhibition of protein kinase C. *Mol Pharmacol*, 40:798-805, 1991.
2. ANTON-TAY F, WURTMAN RJ: Regional uptake of  $^3\text{H}$ -melatonin from blood or cerebrospinal fluid by rat brain. *Nature*. (Londres), 221:474-475, 1969.
3. ANTON-TAY F, DIAZ JL, FERNANDEZ-GUARDIOLA A: On the effect of melatonin upon human brains: Its possible therapeutic implications. *Life Sci*, 10:841-850, 1971.
4. ANTON-TAY F, FORRAY C, ORTEGA-CORONA BG: Subneuronal fate of intracerebroventricular injected  $^3\text{H}$ -Melatonin. *J Pineal Res*, 5:125-133, 1988.
5. ANTON-TAY F, HUERTO-DELGADILLO L, ORTEGA-CORONA BG, BENITEZ-KING G: Melatonin antagonism to calmodulin may modulate multiple cellular functions. En: *Melatonin and the Pineal Gland From Basic Science to Clinical Application*. Touitou Y, Arendt J, Pevet P, (eds). Elsevier, Amsterdam, 41-46, 1993.
6. ARNOLD JD, BERGER AE, MARTIN DC: Chemical agents effective in mediating control of growth and division synchrony of plasmodium berghei in pinealectomized mice. *J Parasitol*, 55:617-625, 1969.
7. BALZER I, HARDELAND R: Photoperiodism and effects of indoleamines in a unicellular alga, *Gonyaulax polyedra*. *Science*, 253:795-797, 1991.
8. BENITEZ-KING G, HUERTO-DELGADILLO L, ANTON-TAY F: Melatonin effects on the cytoskeletal organization of MDCK and neuroblastoma N1E-115 cells. *J Pineal Res*, 9:209-220, 1990.
9. BENITEZ-KING G, HUERTO-DELGADILLO L, ANTON-TAY F: Melatonin modifies calmodulin cell levels in MDCK and N1E-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity in vitro. *Brain Res*, 557:289-292, 1991.
10. BENITEZ-KING G, HUERTO-DELGADILLO L, ANTON-TAY F: Changes in calmodulin compartmentalization in MDCK cells induced by melatonin. *Proc Neurosci Soc*, 17:1193 Abstr. 473.19, 1991.
11. BENITEZ-KING G, HUERTO-DELGADILLO L, SAMANO-CORONEL L, ANTON-TAY F: Melatonin effects on cell growth and calmodulin synthesis in MDCK and N1E-115 cell lines. *Adv. Pineal Res*, 7:57-61, 1994.
12. BENITEZ-KING G, HUERTO-DELGADILLO L, ANTON-TAY F: Binding of  $^3\text{H}$ -Melatonin to calmodulin. *Life Sci*, 53:201-207, 1993.
13. BENITEZ-KING G, ANTON-TAY F: Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia*, 49:635-641, 1993.
14. BENITEZ-KING G, HUERTO-DELGADILLO L, MARTINEZ-HERNANDEZ A, ANTON-TAY F: Efecto de la melatonina sobre la actividad de la proteína cinasa C y la multiproteína cinasa II dependiente de calmodulina. *Anales. IMP*, 5:191-197, 1994.
15. BENITEZ-KING G, RIOS A, GRIMALDO C, ANTON-TAY F: Efecto de la melatonina sobre la actividad de la proteína cinasa C y la distribución de filamentos intermedios de vimentina en las células N1E-115. *Anales 6. IMP*, 1995.
16. BENITEZ-KING G, MARTINEZ A, RIOS A, ANTON-TAY F: Melatonin effects on the multiprotein kinase II  $\text{Ca}^{++}$  calmodulin dependent. *Brain Res*. (En prensa).
17. BERKOWITZ SA, WOLFF J: Intrinsic calcium sensitivity of tubulin polymerization. *J Biol Chem*, 256:112-116, 1981.
18. CARDINALI DP, HYPPA MT, WURTMAN RJ: Fate of intracisternally injected melatonin in rat brain. *Neuroendocrinology*, 12:30-40, 1973.
19. CARDINALI DP: Melatonin a mammalian pineal hormone. *Endocr Rev*, 2:327-354, 1981.
20. CASSONE VM: Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. *Trends Neurosci*, 13:457-463, 1990.
21. CHAVEZ JL, ANTON-TAY F, BENITEZ-KING G: Melatonin binding to D2 receptors in rat striatum: A comparative study with calmodulin antagonists. *Proc West Pharmacol Soc*, 34:413-416, 1991.
22. CHEUNG WY: Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science*, 207:19-27, 1980.
23. COHEN M, ROSELLE D, CHABNER B, SCHMIDT TJ, LIPPMAN M: Evidence for a cytoplasmic melatonin receptor. *Nature*. 274:894-895, 1978.
24. FERNANDEZ-GUARDIOLA A, ANTON-TAY F: Modulation of subcortical inhibitory mechanisms by melatonin. En: *Neurohumoral Coding of Brain Function*, Myers RD, Drucker-Colin R, (eds). pp. 121-135. Plenum Press, Nueva York, 1974.
25. HUERTO-DELGADILLO L, SAMANO-CORONEL L, ANTON-TAY F, BENITEZ-KING G: La melatonina como modulador de la distribución y la síntesis de calmodulina en la línea celular MDCK. *Anales. IMP*, 2:18-24, 1991.
26. HUERTO-DELGADILLO L, ANTON-TAY F, BENITEZ-KING G: Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: Role of melatonin as a calmodulin antagonist. *J Pineal Res*, 17:55-62, 1994.
27. KEITH CH, BAJER AS, RATAN R, MAXFIELD FR, SHELANSKI ML: Calcium and calmodulin in the regulation of microtubular cytoskeleton. *Ann NY Acad Sci*, 466:375-378, 1986.
28. KLEE CB: Concerted regulation of protein phosphorylation dephosphorylation by calmodulin. *Neurochem Res*, 16:1059-1065, 1991.
29. KOPIN IJ, PARE CM, AXELROD J, WEISSBACH H: The fate of melatonin in animals. *J Biol Chem*, 236:3072-3075, 1961.
30. KRAUSE DN, DUBOCOVICH ML: Melatonin receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 31:549-568, 1991.
31. KUMAGAI HE, NISHIDA E, KOTANI S, SAKAI H: On the mechanism of calmodulin-induced inhibition of microtubule assembly in vitro. *J Biochem*, 99:521-525, 1986.
32. LERNER AB, CASE JD, TAKAHASHI Y, LEE TH, MORI W: Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Amer Chem Soc*, 80:2587, 1958.
33. LISSONI P, BARNI S, TANCINI G, CRISPINO S, PALLOROSI F, LUCINI V, MARIANI M, CATTANEO G, ESPOSTI D, ESPOSTI G, FRASCHINI F: Clinical study of melatonin in untreatable advanced cancer patients. *Tumori*, 73:475-480, 1987.
34. MOORE RY: Organization and function of a central nervous system circadian oscillator. *Fed Proc*, 42:2783-2789, 1983.
35. ORTEGA A, LOPEZ I, BENITEZ-KING G, ANTON-TAY F: Melatonin increases calmodulin mRNA levels in MDCK and N1E-115 cell lines. 1st Locarno International Meeting on Neuroendocrinology. *The Pineal Gland in Relation with the Immune System and Cancer*, Abstr. 65, 1993.
36. PIERPAOLI W, MAESTRONI GJN: Melatonin: A principal neuroimmunoregulatory and anti-stress hormone: its antiaging effects. *Immuno Lett*, 16:355, 1987.
37. ROSENTHAL NE, SACK DA, JACOBSEN FM, JAMES SP, PARRY BL, ARENDT J, TAMARKIN L, WEHR TA: Melatonin in seasonal affective disorder and phototherapy. *J Neural Transm*, [suppl] 21:257-268, 1986.
38. SALTER RS, KRINCKS MH, KLEE CB, NEER EJ: Calmodulin activates the isolated catalytic unit of brain adenylate cyclase. *J Biol Chem*, 256:9830-9833, 1981.
39. SEEMAN P: Brain dopamine receptors. *Pharmacol Rev*, 32: 229-313, 1980.
40. SHARMA RK, WANG JH: Regulation of cAMP concentration by Calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem Cell Biol*, 64:1072-1080, 1986.
41. STANKOV B, FPASCHINI F, REITER RJ: Melatonin binding sites in the central nervous system. *Brain Res Rev*, 16:245-246, 1991.
42. STOCLET JC, GERARD D, KILHOFFER MC, LUGNIER C, MILLER R, SCHAFFER P: Calmodulin and its role in intracellular calcium regulation. *Progr Neurobiol*, 29:321-364, 1987.
43. WURTMAN RJ, AXELROD J, PHILLIPS L: The uptake of  $^3\text{H}$ -Melatonin in endocrine and nervous tissues and the effects of constant light exposure. *J Pharmacol Exp Ther*, 143:314-318, 1964.