

Daño cerebral y neurodegeneración: Papel protector de la melatonina y su aplicación clínica

A. Romero¹, E. Ramos.

Departamento de Farmacología y Toxicología. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Avda Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, España.

Presentación

La esperanza de vida a nivel global está experimentando un notable incremento lo cual se traduce en una mayor predisposición de la población a sufrir algún tipo de trastorno neurodegenerativo. Los tratamientos actuales mitigan, parcialmente, el comienzo y progreso de la neurodegeneración. Sin embargo, una molécula altamente conservada, versátil y ubicua como la melatonina podría entrar en escena y emerger como opción terapéutica frente a diferentes patologías neurodegenerativas e isquemia cerebral. A pesar de las prometedoras evidencias preclínicas con esta indolamina, su excelente perfil de seguridad y sus múltiples acciones, hacen necesaria la puesta en marcha de ensayos clínicos para determinar las dosis y el momento óptimo de la administración.

Resumen

Las patologías neurodegenerativas representan un grave problema de salud pública que afecta a millones de personas en todo el mundo. Actualmente, la comunidad científica apunta a distintas dianas biológicas, pero la causa de estos trastornos sigue sin estar clara. En este complejo escenario, la melatonina emerge como una opción terapéutica para contrarrestar la mayor parte de los eventos fisiopatológicos que desencadenan los trastornos neurodegenerativos e isquemia cerebral. Puesto que su producción endógena se reduce durante el proceso de envejecimiento, esta indolamina puede tener un significado particular en las enfermedades relacionadas con la edad. Además, la multifuncionalidad y ubicuidad de la melatonina en el sistema nervioso central, reduciendo la acumulación y agregación de proteínas aberrantes, modulando la respuesta inmune y la neuroinflamación, así como mejorando la biogénesis mitocondrial y neurogénesis, entre otras, convierten a esta indolamina en un agente prometedor frente a la neurodegeneración y daño cerebral por isquemia. La aplicación terapéutica de melatonina se ha visto reforzada por su bajo coste y su toxicidad reducida. Sin embargo, los mecanismos moleculares y celulares subyacentes a las acciones de la melatonina deben explorarse con mayor detalle y, en consecuencia, esto debería trasladarse al uso de melatonina en ensayos clínicos con pacientes que sufren patologías neurodegenerativas o isquemia cerebral.

Palabras clave

Neurodegeneración, isquemia cerebral, melatonina, neuroinflamación, estrés oxidativo, neurogénesis.

Conflicto de intereses

Este artículo no presenta conflicto de interés.

Summary

Brain damage and neurodegeneration: Protective role of melatonin and its clinical application

Neurodegeneration is a public health concern affecting millions of people worldwide. The scientific community is pointing several biological targets nowadays, thought these disorders cause remains unclear. In this complex scenario, melatonin arises as a valuable therapeutic resource to counteract most of the physiopathological events trigger by neurodegenerative disorders and cerebral ischemia. Aging reduces the endogenous release of melatonin, and according to this reduction, it may have an essential significance in age-related dysfunctions. Melatonin is ubiquitous in the central nervous system. Indeed, its functionality is related to a decrease in the accumulation and aggregation of aberrant proteins. In this way modulating immune response and neuroinflammation and at the same time improving mitochondrial biogenesis and neurogenesis. In light of these properties, this indolamine is a promising agent against neurodegeneration and brain damage due to ischemia, reinforced by its low cost and non-toxic profile. Nonetheless, the molecular and cellular mechanisms underlying the actions of melatonin should be deeply explored consequently, these should lead to melatonin clinical trials with patients suffering from neurodegenerative disorders and cerebral ischemia.

Key words

Neurodegeneration, brain ischemia, melatonin, neuroinflammation, oxidative stress, neurogenesis.

Conflict of interests

This article does not present a conflict of interest.

Mecanismos de neurodegeneración y acción moduladora de la melatonina

Neurodegeneración es el término referido para describir cualquier condición patológica que afecta principalmente a las células neuronales (Przedborski et al., 2003). El número de enfermedades neurodegenerativas reconocidas alcanza alrededor de unos pocos cientos, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Huntington (EH) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), entre otras. Sin embargo, todas ellas tienen un factor en común, carecen de opciones terapéuticas. En este complejo escenario, la EA representa más del 60% de los casos diagnosticados de demencia en todo el mundo y constituye un problema socio-económico y familiar (Alzheimer's, 2015). Esta situación ha generado una enorme preocupación entre la comunidad científica, claramente consciente de explorar nuevos enfoques terapéuticos frente a la multiplicidad de eventos fisiopatológicos y mecanismos moleculares relacionados con la muerte de células neuronales.

La comprensión actual de los mecanismos celulares y moleculares que participan en los trastornos degenerativos asociados con la edad y patologías cerebrales continúa siendo escasa y necesita ser explorada en mayor profundidad. Sólo entendiendo estos eventos podríamos pensar en opciones terapéuticas para hacer frente a las características más comunes de los principales trastornos neurodegenerativos: i) Disrupción de la red de la proteostasis (Klaips et al., 2018), lo que conduce a un incremento de agregados proteicos, como el péptido β -amiloide ($A\beta$) en placas extracelulares e hiperfosforilación de la proteína Tau en ovillos neurofibrilares intraneuronales (Wang y Mandelkow, 2016); ii) la disfunción mitocondrial (Zhao et al., 2019) y abundante generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERON) que son factores críticos en el desarrollo de un ambiente oxidativo y que afectan a la homeostasis proteica, metabólica y redox de la célula (Angelova y Abramov, 2018); iii) La alteración intracelular del Ca^{2+} (Glaser et al., 2018) y excitotoxicidad por glutamato (Bano y Ankarcrona, 2018) que inducen procesos de muerte neuronal; iv) La perturbación de la integridad y regulación autofágica, factor destacado en la disfunción neuronal y deterioro de la neurogénesis (Menzies

et al., 2017); v) el aumento de los mediadores proinflamatorios (Nichols et al., 2019) y la desregulación de la respuesta inmune (Fakhoury, 2016), son todos ellos factores cruciales que regulan el inicio y progreso de la neurodegeneración.

En medio de esta compleja encrucijada, la pregunta que surge es: ¿Sería posible contrarrestar los eventos celulares y moleculares asociados con la neurodegeneración con una terapia basada en una sola molécula? En este contexto, La melatonina (*N*-acetil-5-methoxitriptamina), ha emergido en los últimos años como un destacado agente frente a patologías asociadas con la edad. La glándula pineal es el órgano principal que sintetiza la melatonina, aunque también se sintetiza en varios órganos extra-pineales incluyendo células del sistema inmune, cerebro, epitelio de las vías respiratorias, médula ósea, tracto gastrointestinal, ovario, testículos, piel y probablemente otros (Menendez-Pelaez y Reiter, 1993). En este sentido, es importante tener en cuenta que la producción de melatonina disminuye drásticamente con la edad, lo cual puede ser causa de numerosas disfunciones y cambios fisiológicos (Waldhauser et al., 1998).

La mayor parte de las funciones moleculares ejercidas por la melatonina frente a eventos implicados en la neurodegeneración se reflejan en que: i) su pequeño tamaño y naturaleza anfipática permite su difusión a través de cualquier membrana, alcanzando compartimentos citosólicos, mitocondriales y nucleares (Menendez-Pelaez y Reiter, 1993); ii) la melatonina es un potente secuestrador de radicales libres, tanto directa como indirectamente, inhibiendo la actividad de las enzimas prooxidativas y estimulando las enzimas antioxidantes (Rodríguez et al., 2004); iii) a través de su interacción con dos receptores acoplados a proteínas G de alta afinidad, ejerce acciones reguladoras sobre vías de señalización cruciales en la protección y supervivencia celular (Liu et al., 2016) iv) Desempeña además, un papel destacado como transductor neuroendocrino, favoreciendo la respuesta inmune y actuando como un agente antiinflamatorio eficaz (Hardeland, 2018); v) la melatonina también ejerce múltiples acciones epigenéticas directas en el envejecimiento y enfermedades asociadas a la edad (Hardeland, 2014); y finalmente vi)

la melatonina no es un agente tóxico, incluso a dosis elevadas, y no se han notificado efectos secundarios adversos graves (Andersen et al., 2016).

Concentraciones endógenas de melatonina en el SNC y orgánulos subcelulares

Las alteraciones del ritmo circadiano pueden contribuir a acelerar el envejecimiento y enfermedades asociadas (Logan y McClung, 2019). En este sentido, la melatonina se considera un marcador de ritmicidad circadiana. Descrita inicialmente como reguladora del ciclo de sueño/vigilia, sin embargo, la melatonina modula otros muchos procesos biológicos y puede detectarse en casi cualquier fluido corporal y tejido, de hecho, se sintetiza en la mayor parte de órganos, tejidos y células (Tan et al., 2018). Se estima que el contenido de melatonina a nivel del tracto gastrointestinal es aproximadamente 400 veces mayor que el detectado en la glándula pineal, y que está controlado por ciclos de ingesta de alimentos y no por ritmos circadianos (Raikhlin et al., 1975). Por lo tanto, la melatonina extrapineal no sigue un patrón circadiano, y sus funciones también difieren de la melatonina secretada desde la glándula pineal (Venegas et al., 2012).

La alteración de los niveles de melatonina en el sistema nervioso central (SNC) están, de alguna manera, relacionadas con procesos neurodegenerativos (Hardeland et al., 2015). Por lo tanto, las funciones de la melatonina en el SNC son de gran interés a la hora de explorar nuevas estrategias terapéuticas frente a la neurodegeneración.

Las concentraciones subcelulares más elevadas de melatonina en la corteza cerebral se detectaron en mitocondrias seguidas de membrana, núcleo y citosol (Venegas et al., 2012). La elevada tasa metabólica mitocondrial hace que se genere un exceso de ERON y, por lo tanto, la melatonina a nivel cerebral puede reflejar la adaptación evolutiva de la célula a este entorno oxidativo (Venegas et al., 2012). Siguiendo esta línea, cada mitocondria es probable que produzca melatonina como un factor autocrino o paracrino, protegiendo las células del ambiente oxidativo (Reiter et al., 2017).

Melatonina y actividad mitocondrial en neurodegeneración

Las acciones de melatonina en las mitocondrias se evidenció por primera vez en 2001 (Acuña-Castroviejo et al., 2001) y ha continuado en los últimos años (Ruiz et al., 2018). En la neurodegeneración, la disfunción mitocondrial es un factor relevante que favorece el daño neuronal (Golpich et al., 2017). Estos orgánulos son cruciales en el cerebro, donde existe una elevada demanda de oxígeno (Wongprayoon y Govitrapong, 2017) y sirven como lugar de síntesis y metabolismo de la melatonina (Tan et al., 2013). En las mitocondrias, la cadena de transporte de electrones (CTE), localizada en la membrana interna, es considerada como la principal fuente celular de ERON. En este proceso, la producción y acumulación de ERON puede alterar tanto la estructura como la función mitocondrial. Por lo tanto, parece razonable pensar que se precisen mecanismos de protección a nivel subcelular donde se genera la mayor cantidad de ERON. La melatonina juega un doble papel en las mitocondrias cerebrales, actuando como secuestrador de radicales libres a la vez que inhibe la activación de las caspasas (Suofu et al., 2017), preservando la integridad de este orgánulo (Hardeland et al., 2003) (Figura 1). En condiciones tanto fisiológicas como patológicas, la melatonina mejora la eficiencia proteica de la CTE y modula el flujo de electrones reduciendo su fuga (Acuña-Castroviejo et al., 2003). Estas dos acciones, junto con el mantenimiento de la integridad mitocondrial, protegiendo la membrana de alteraciones de permeabilidad y procesos de peroxidación lipídica (Reiter et al., 2014) o regulando el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPM) (Andrabi et al., 2004) hacen de la melatonina, un valioso agente para el óptimo mantenimiento de la función mitocondrial.

Melatonina y regulación de la respuesta inflamatoria en neurodegeneración

En las enfermedades neurodegenerativas, la neuroinflamación es un factor subyacente, que también se asocia con el envejecimiento normal. La inflamación a nivel del cerebro implica una reducción en la concentración de melatonina (Hardeland, 2012;

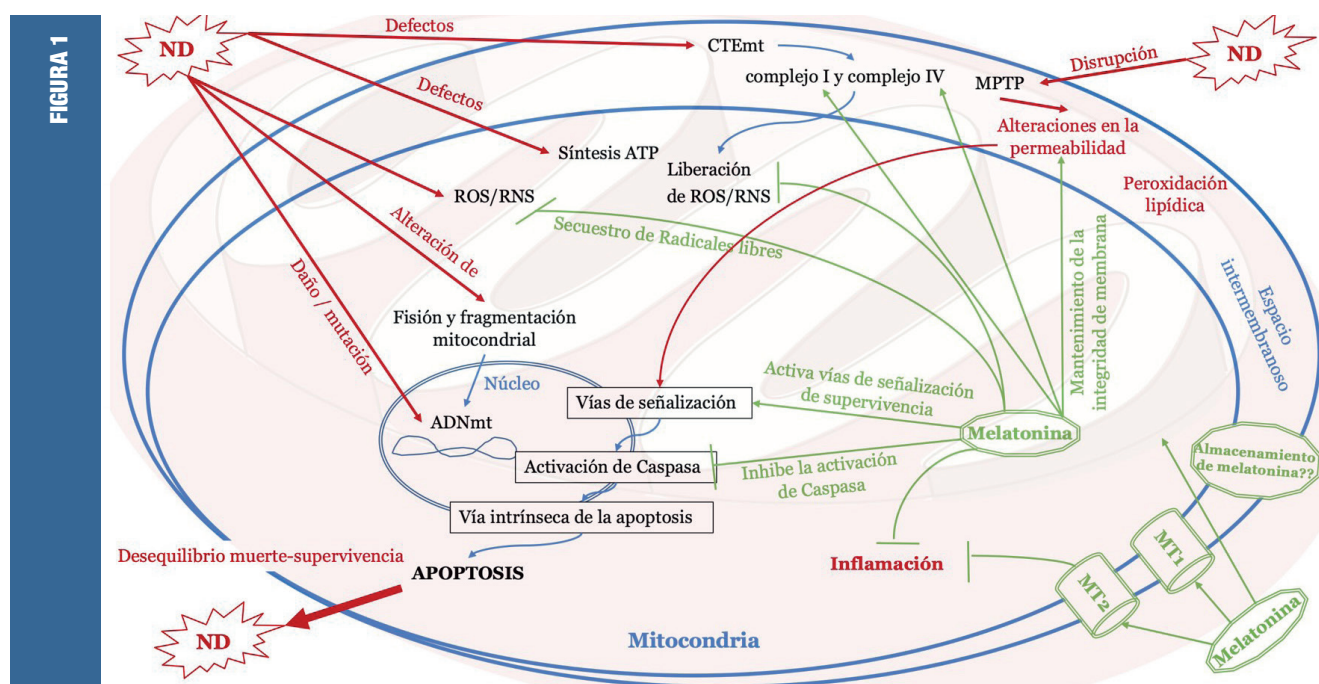


Figura 1. Mecanismos de acción de la melatonina en la mitocondria frente a la neurodegeneración (ND).

2013). Además de su acción circadiana, esta indolamina actúa como modulador un endocrino, paracrina o autocrino (Markus et al., 2013) de la respuesta inmuno-inflamatoria (Carrascal et al., 2018). Los receptores tipo toll (TRLs), expresados muchos de ellos a nivel del SNC, se activan en respuesta a la inflamación dando lugar a factores proinflamatorios (Goodall et al., 2014). La melatonina inhibe la actividad de estos receptores, regulando la respuesta inmuno-inflamatoria (Tamtaji et al., 2019). Además, las ERON activan la cascada inflamatoria (Reuter et al., 2010) Por lo tanto, la capacidad antioxidante de la melatonina puede reducir el estrés oxidativo generado, relacionado con la senescencia celular y la inflamación (Nopparat et al., 2017). Además, en modelos de ratón de la EA el tratamiento con melatonina fue capaz de reducir los marcadores inflamatorios (NF- κ B e IL-1 β), y de modular la expresión génica de genes relacionados con la inflamación, tanto en la corteza como en el hipocampo (Corpas et al., 2018). La regulación de enzimas antioxidantes en la microglía por parte de la melatonina en respuesta a la inflamación, tales como la hemo oxigenasa 1 (HO-1), la NADPH quinona oxidoreductasa-1 (NQO-1) y la γ -glutamilcisteina sintasa (γ -GCLC), preservaría el balance redox (Jumnongprakhon et al., 2015). En

este contexto, la microglía juega un papel fundamental y, más concretamente, la activación del inflammasoma (NLRP3) constituye uno de los puntos clave del inicio del proceso inflamatorio mediante la liberación de las citocinas IL-1 β e IL-18. La modulación/inhibición de NLRP3 por parte de melatonina podría erigirse como un tratamiento novedoso para inhibir procesos de inflamación en el SNC (Liu et al., 2017). En conjunto, estos resultados evidencian la capacidad de la melatonina para mitigar el ambiente inflamatorio y proteger frente a la neurodegeneración.

Cómo la melatonina modula y mejora la neurogénesis

Los eventos moleculares subyacentes a la neurodegeneración afectan a un gran número de poblaciones de células, incluyendo neuronas, astrocitos y células madre neuronales (CMNs). Las CMNs están presentes en el SNC adulto, más específicamente, en la zona subgranular (ZSG) en el giro dentado del hipocampo (GD) y la zona subventricular (ZSV) que recubren el ventrículo lateral, con potencial para generar autoreparación y a través de la proliferación, migración y diferenciación, originar nuevas poblaciones neuronales (Lledo et al., 2006). La neurogénesis en

el cerebro envejecido es un tema de enorme importancia que merece ser explorado. En este contexto, la melatonina podría ser un modulador de la neurogénesis a nivel hipocampal, induciendo un aumento significativo de la supervivencia de las células progenitoras neuronales en el giro dentado tras administrar esta indolamina (8 mg/kg i.p.) en ratones C57/BL/6 durante 14 días. Por el contrario, a los 12 meses no se observó que la melatonina indujera neurogénesis (Ramírez-Rodríguez et al., 2009). Estos hallazgos hacen que nos planteemos i) si la proliferación de células precursoras por acción de la melatonina está mediado a través de sus receptores de membrana (MT1 y MT2) acoplados a proteínas G; ii) que la melatonina actúe parcialmente a través de mecanismos dependientes de los receptores de membrana que regulan las vías de señalización pro-supervivencia en el hipocampo (Chu et al., 2016); ii) La falta de regulación neurogénica por melatonina puede deberse a una disminución en la expresión de receptores de membrana de melatonina durante el envejecimiento.

La melatonina puede promover la diferenciación y proliferación celular mediante mecanismos dependientes de sus receptores de membrana vía MEK/ERK1/2 y PI3K/Akt (Shu et al., 2016). Sin embargo, el carácter anfipático de la melatonina facilita su paso a través de todas las barreras morfofisiológicas promoviendo la diferenciación de oligodendrocitos (Ghareghani et al., 2017) así como la dendritogénesis en el hipocampo por mecanismos mediados por receptores o bien a través de la Ca^{2+} /CaMKII (Dominguez-Alonso et al., 2015).

Estudios recientes sugieren la capacidad de la melatonina para restaurar el deterioro y reducción de la memoria inducida por ácido valproico (Aranarochana et al., 2019) metotrexato (Sirichoat et al., 2019) y/o escopolamina (Chen et al., 2018). Por lo tanto, estos hallazgos apoyan el uso de esta indolamina como un adyuvante neuroterapéutico.

Una de las vías de señalización que mejora la plasticidad sináptica y la consolidación de la memoria, y regula la diferenciación de las CMNs en varios trastornos neuropatológicos, entre ellos la EA (Inestrosa y Varela-Nallar, 2014), EP (Singh et al., 2018) y EH (Dupont et al., 2012) es la Wnt/ β -catenina (Kalani et al., 2008). En este escenario, la melatonina ha dem-

ostrado un aumento de la expresión de β -catenina y activación de la vía Wnt/ β -catenina en las células neuronales (Jeong et al., 2014). Por lo tanto, la modulación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina a través de melatonina puede contribuir tanto a mantener la homeostasis celular, como a aliviar la neurogénesis adulta deteriorada asociada con enfermedades neurodegenerativas.

Otra estrategia clave para preservar la homeostasis neuronal sería modulando la tasa de fosforilación/desfosforilación que ocurre en etapas tempranas de la neurodegeneración (Arribas et al., 2018). Así, se ha encontrado una reducción sustancial (alrededor del 50%) en la desfosforilación de la proteína Tau, en la corteza y el hipocampo de pacientes con EA (Gong y Iqbal, 2008), donde la proteína fosfatasa 2A (PP2A), implicada en la dinámica de citoesqueleto, el desarrollo, proliferación y muerte celular, así como en la regulación de numerosas vías de señalización, es la enzima más vulnerable. En esta línea, se ha hipotetizado recientemente que la unión directa de la melatonina a PP2A puede explicar su efecto modulador en los ciclos de fosforilación/desfosforilación (Arribas et al., 2018).

Papel de la melatonina en isquemia cerebral

Entre las principales causas de muerte a nivel mundial, el accidente cerebrovascular es la segunda y la principal causa de discapacidad (Guzik y Bushnell, 2017). Sin embargo, la prevalencia y la incidencia no son fáciles de interpretar debido a la falta de estudios globales disponibles. En cuanto al tratamiento, el accidente cerebrovascular no tiene una terapia eficaz para prevenir el daño cerebral. Se acepta que el activador tisular de plasminógeno (t-PA) reduce el daño neuronal después de un accidente cerebrovascular (Zivin et al., 1985). Sin embargo, debe administrarse inmediatamente, por su reducida ventana terapéutica (3,5 horas). Entre los procesos a los que hacer frente en las áreas de penumbra isquémica se incluyen, entre otros, la excitotoxicidad y la alteración homeostática del Ca^{2+} , el daño mitocondrial, el estrés oxidativo, la inflamación y apoptosis (Paschen, 2000; Chan, 2001; Iadecola y Alexander, 2001; Lo et al., 2005; Niizuma et al., 2010). Se han testado clínicamente varios fármacos que, desafortunadamente,

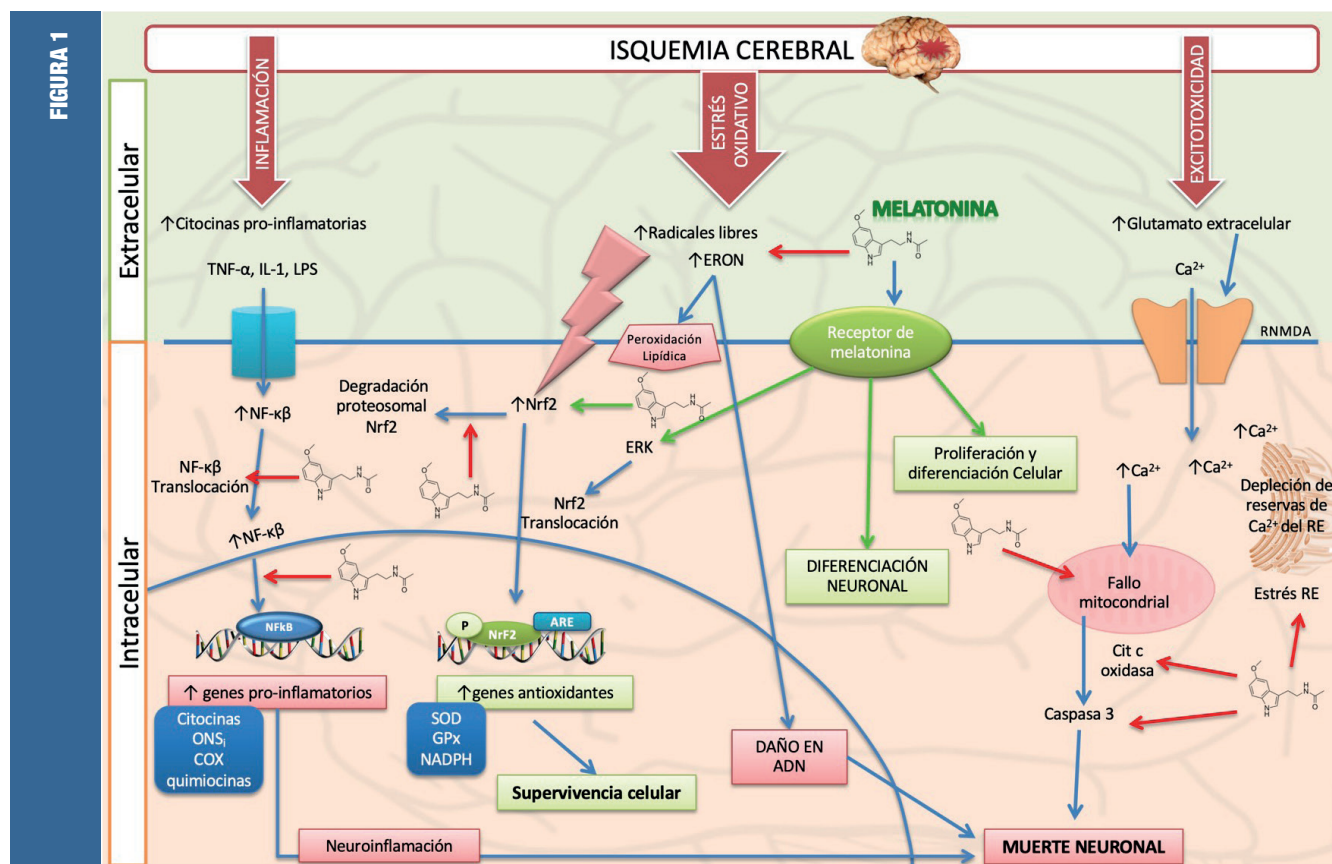


Figura 2. Representación esquemática de los principales eventos fisiopatológicos posteriores a la isquemia cerebral y dianas biológicas donde la melatonina ejerce sus efectos neuroprotectores.

sólo modulan uno o dos de estos complejos eventos patológicos relacionados con accidentes cerebrovasculares.

Como consecuencia de la edad, la glándula pineal acumula depósitos de calcio, que pueden correlacionarse con la disminución de los niveles del principal metabolito de melatonina en orina, la 6-sulfatoximetatonina (Uduma et al., 2011). En 2007, se notificó una elevada incidencia de calcificación pineal en pacientes que experimentaron un accidente cerebrovascular en comparación con sujetos sanos (Makomela, 2007). Esta observación es consistente con estudios posteriores (Kitkhuandee et al., 2014), en los que se evidenció una correlación entre calcificación pineal y hemorragia intracerebral, concluyéndose que la calcificación pineal podría representar un potencial factor de riesgo de infarto cerebral.

Una estrategia interesante para reducir el daño por isquemia cerebral se basaría en el trasplante intracerebral de células madre. En el año 2000 se real-

izó el primer ensayo clínico con células neuronales derivadas del ser humano trasplantadas cerca del área isquémica de los pacientes con accidente cerebrovascular (Kondziolka et al., 2000). Posteriormente se examinó la eficacia de la melatonina liberada en un modelo de accidente cerebrovascular isquémico agudo de oclusión de arteria cerebral media (OACM) en ratas que recibieron injertos de glándula pineal. Los resultados evidenciaron una menor asimetría motora y volumen de infarto respecto al grupo que no recibió injerto. Además, se observaron niveles más elevados de melatonina en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Borlongan et al., 2003). El potencial neuroterapéutico de melatonina en isquemia cerebral ha surgido fundamentalmente gracias al uso de ratas pinealectomizadas sometidas a OAMC, las cuales presentan un incremento significativo en el volumen infarto, y mayores puntuaciones de discapacidad en la evaluación neurológica (Kilic et al., 1999). La melatonina a dosis de 4 u 8 mg/kg redujo el volumen infarto en un 40% y mejoró significativamente el

déficit neurológico. La pinealectomía se asocia con una marcada reducción en los niveles circulantes de melatonina, y cuando se administra exógenamente a ratas pinealectomizadas, esta indolamina induce neuroprotección (Kilic et al., 1999).

La isquemia cerebral inicia una plétora de acciones en cascada moduladas a través de múltiples vías de señalización. Entender este complejo *status quo* molecular es perentorio con el fin de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. En este escenario, la melatonina ha surgido como un agente versátil capaz de regular un gran número de procesos fisiopatológicos implicados en la isquemia (Ramos et al., 2017) (Figura 2).

En el abordaje de estudios preclínicos, el diseño experimental es un punto crítico para obtener datos sólidos que sean trasladables a seres humanos. La selección de la dosis, la vía de administración, el tiempo, así como el modelo animal de elección tienen una importancia capital. En este sentido, es significativo el uso de ratones C57BL-6J (Kilic et al., 2013). Esta cepa tiene un déficit en la producción endógena de melatonina (Kasahara et al., 2010). Si bien esto puede limitar la traslación a los seres humanos, proporciona un escenario más similar a lo observable en seres humanos de avanzada edad con una exigua producción de melatonina (Waller et al., 2016). Asimismo, las dosis experimentales no sólo deben extrapolarse mediante una simple conversión de peso corporal a una dosis equivalente humana (DEH), el área de la superficie corporal (ASC) también debe utilizarse como método de normalización (Reagan-Shaw et al., 2008).

En los últimos años, muchos científicos han dedicado sus esfuerzos a investigar los mecanismos moleculares para detener el comienzo y la progresión de la cascada isquémica. La melatonina tiene una amplia variedad de acciones conocidas como secuestradora de radicales libres, propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, neuromoduladoras y efectos antiexcitotóxicos. También ha emergido como un modulador versátil y eficiente de múltiples vías de señalización implicadas en el daño del tejido neuronal. En este artículo, hemos tratado de proporcionar una visión general de la complejidad de los mecanismos mole-

culares y celulares involucrados en la neurodegeneración. La primera pregunta a responder sobre este asunto debe ser la causa o causas de la neurodegeneración, que sin embargo todavía, a día de hoy, no se han elucidado. Además, los tratamientos disponibles sólo alían los síntomas o dificultan la progresión de la enfermedad. En este sentido, el perfil farmacológico de la melatonina, caracterizado por su baja toxicidad y alta eficacia, podría facilitar su administración en trastornos neurodegenerativos. A la vista de todas estas observaciones, es imprescindible que se desarrollen ensayos clínicos más ambiciosos para determinar la eficacia de la terapia melatoninérica en patologías neurodegenerativas.

Referencias

1. Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Leon, J., Carazo, A., Khaldy, H., 2003. Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites. *Adv Exp Med Biol* 527, 549-557.
2. Acuña-Castroviejo, D., Martin, M., Macias, M., Escames, G., Leon, J., Khaldy, H., Reiter, R.J., 2001. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J Pineal Res* 30, 65-74.
3. Alzheimer's, A., 2015. 2015 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 11, 332-384.
4. Andersen, L.P., Gogenur, I., Rosenberg, J., Reiter, R.J., 2016. The Safety of Melatonin in Humans. *Clin Drug Investig* 36, 169-175.
5. Andrabi, S.A., Sayeed, I., Siemen, D., Wolf, G., Horn, T.F., 2004. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin. *FASEB J* 18, 869-871.
6. Angelova, P.R., Abramov, A.Y., 2018. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. *FEBS Lett* 592, 692-702.
7. Aranarochana, A., Chaisawang, P., Sirichoat, A., Pannangrong, W., Wigmore, P., Welbat, J.U., 2019. Protective effects of melatonin against valproic acid-induced memory impairments and reductions in adult rat hippocampal neurogenesis. *Neuroscience*.
8. Arribas, R.L., Romero, A., Egea, J., de Los Rios, C., 2018. Modulation of serine/threonine phosphatases by melatonin: therapeutic approaches in neurodegenerative diseases. *Br J Pharmacol* 175, 3220-3229.
9. Bano, D., Ankarcrona, M., 2018. Beyond the critical point: An overview of excitotoxicity, calcium overload and the downstream consequences. *Neurosci Lett* 663, 79-85.
10. Borlongan, C.V., Sumaya, I., Moss, D., Kumazaki, M., Sakurai, T., Hida, H., Nishino, H., 2003. Melatonin-secreting pineal gland: a novel tissue source for neural transplantation therapy in stroke. *Cell Transplant* 12, 225-234.
11. Carrascal, L., Nunez-Abades, P., Ayala, A., Cano, M., 2018. Role of Melatonin in the Inflammatory Process and its Therapeutic Potential. *Curr Pharm Des* 24, 1563-1588.
12. Chan, P.H., 2001. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21, 2-14.
13. Chen, B.H., Ahn, J.H., Park, J.H., Choi, S.Y., Lee, Y.L., Kang, I.J., Hwang, I.K., Lee, T.K., Shin, B.N., Lee, J.C., Hong, S., Jeon, Y.H., Shin, M.C., Cho, J.H., Won, M.H., Lee, Y.J., 2018. Effects of Scopolamine and Melatonin Cotreatment on Cognition, Neuronal Damage, and Neurogenesis in the Mouse Dentate Gyrus. *Neurochem Res* 43, 600-608.
14. Chu, J., Tu, Y., Chen, J., Tan, D., Liu, X., Pi, R., 2016. Effects of melatonin and its analogues on neural stem cells. *Mol Cell Endocrinol* 420, 169-179.
15. Corpas, R., Grinan-Ferre, C., Palomera-Avalos, V., Porquet, D., Garcia de Frutos, P., Franciscato Cozzolino, S.M., Rodriguez-Farre, E., Pallas, M., Sanfeliu, C., Cardoso, B.R., 2018. Melatonin induces mechanisms of brain resilience against neurodegeneration. *J Pineal Res* 65, e12515.
16. Dominguez-Alonso, A., Valdes-Tovar, M., Solis-Chagoyan, H., Benitez-King, G., 2015. Melatonin stimulates dendrite formation and complexity in the hilar zone of the rat hippocampus: participation of the Ca⁺⁺/Calmodulin complex. *Int J Mol Sci* 16, 1907-1927.
17. Dupont, P., Besson, M.T., Devaux, J., Lievens, J.C., 2012. Reducing canonical Wntless/Wnt signaling pathway confers protection against mutant Huntingtin toxicity in *Drosophila*. *Neurobiol Dis* 47, 237-247.
18. Fakhoury, M., 2016. Immune-mediated processes in neurodegeneration: where do we stand? *J Neurol* 263, 1683-1701.
19. Ghareghani, M., Sadeghi, H., Zibara, K., Danaei, N., Azari, H., Ghanbari, A., 2017. Melatonin Increases Oligodendrocyte Differentiation in Cultured Neural Stem Cells. *Cell Mol Neurobiol* 37, 1319-1324.
20. Glaser, T., Arnaud Sampaio, V.F., Lameu, C., Ulrich, H., 2018. Calcium signalling: A common target in neurological disorders and neurogenesis. *Semin Cell Dev Biol*.
21. Golpich, M., Amini, E., Mohamed, Z., Azman Ali, R., Mohamed Ibrahim, N., Ahmadiani, A., 2017. Mitochondrial Dysfunction and Biogenesis in Neurodegenerative diseases: Pathogenesis and Treatment. *CNS Neurosci Ther* 23, 5-22.
22. Gong, C.X., Iqbal, K., 2008. Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: a promising therapeutic target for Alzheimer disease. *Curr Med Chem* 15, 2321-2328.
23. Goodall, K.J., Poon, I.K., Phipps, S., Hulett, M.D., 2014. Soluble heparan sulfate fragments generated by heparanase trigger the release of pro-inflammatory cytokines through TLR-4. *PLoS One* 9, e109596.
24. Guzik, A., Bushnell, C., 2017. Stroke Epidemiology and Risk Factor Management. *Continuum (Minneapolis)* 23, 15-39.
25. Hardeland, R., 2012. Melatonin in aging and disease -multiple consequences of reduced secretion, options and limits of treatment. *Aging Dis* 3, 194-225.
26. Hardeland, R., 2013. Melatonin and the theories of aging: a critical appraisal of melatonin's role in anti-aging mechanisms. *J Pineal Res* 55, 325-356.
27. Hardeland, R., 2014. Melatonin, noncoding RNAs, messenger RNA stability and epigenetics--evidence, hints, gaps and perspectives. *Int J Mol Sci* 15, 18221-18252.
28. Hardeland, R., 2018. Melatonin and inflammation-Story of a double-edged blade. *J Pineal Res* 65, e12525.
29. Hardeland, R., Cardinali, D.P., Brown, G.M., Pandi-Perumal, S.R., 2015. Melatonin and brain inflammation. *Prog Neurobiol* 127-128, 46-63.

30. Hardeland, R., Coto-Montes, A., Poeggeler, B., 2003. Circadian rhythms, oxidative stress, and antioxidative defense mechanisms. *Chronobiol Int* 20, 921-962.
31. Iadecola, C., Alexander, M., 2001. Cerebral ischemia and inflammation. *Curr Opin Neurol* 14, 89-94.
32. Inestrosa, N.C., Varela-Nallar, L., 2014. Wnt signaling in the nervous system and in Alzheimer's disease. *J Mol Cell Biol* 6, 64-74.
33. Jeong, J.K., Lee, J.H., Moon, J.H., Lee, Y.J., Park, S.Y., 2014. Melatonin-mediated beta-catenin activation protects neuron cells against prion protein-induced neurotoxicity. *J Pineal Res* 57, 427-434.
34. Jumnongprakhon, P., Govitrapong, P., Tocharus, C., Pinkaew, D., Tocharus, J., 2015. Melatonin Protects Methamphetamine-Induced Neuroinflammation Through NF-kappaB and Nrf2 Pathways in Glioma Cell Line. *Neurochem Res* 40, 1448-1456.
35. Kalani, M.Y., Cheshier, S.H., Cord, B.J., Bababeygy, S.R., Vogel, H., Weissman, I.L., Palmer, T.D., Nusse, R., 2008. Wnt-mediated self-renewal of neural stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 16970-16975.
36. Kasahara, T., Abe, K., Mekada, K., Yoshiki, A., Kato, T., 2010. Genetic variation of melatonin productivity in laboratory mice under domestication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 6412-6417.
37. Kilic, E., Ozdemir, Y.G., Bolay, H., Kelestimur, H., Dalkara, T., 1999. Pinealectomy aggravates and melatonin administration attenuates brain damage in focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 19, 511-516.
38. Kilic, U., Yilmaz, B., Reiter, R.J., Yuksel, A., Kilic, E., 2013. Effects of memantine and melatonin on signal transduction pathways vascular leakage and brain injury after focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience* 237, 268-276.
39. Kitkhuandee, A., Sawanyawisuth, K., Johns, N.P., Kanpittaya, J., Johns, J., 2014. Pineal calcification is associated with symptomatic cerebral infarction. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 23, 249-253.
40. Klaips, C.L., Jayaraj, G.G., Hartl, F.U., 2018. Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *J Cell Biol* 217, 51-63.
41. Kondziolka, D., Wechsler, L., Goldstein, S., Meltzer, C., Thulborn, K.R., Gebel, J., Jannetta, P., DeCesare, S., Elder, E.M., McGrogan, M., Reitman, M.A., Bynum, L., 2000. Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. *Neurology* 55, 565-569.
42. Liu, J., Clough, S.J., Hutchinson, A.J., Adamah-Biasi, E.B., Popovska-Gorevski, M., Dubocovich, M.L., 2016. MT1 and MT2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 56, 361-383.
43. Liu, Z., Gan, L., Xu, Y., Luo, D., Ren, Q., Wu, S., Sun, C., 2017. Melatonin alleviates inflammasome-induced pyroptosis through inhibiting NF-kappaB/GSDMD signal in mice adipose tissue. *J Pineal Res* 63.
44. Lledo, P.M., Alonso, M., Grubb, M.S., 2006. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 7, 179-193.
45. Lo, E.H., Moskowitz, M.A., Jacobs, T.P., 2005. Exciting, radical, suicidal: how brain cells die after stroke. *Stroke* 36, 189-192.
46. Logan, R.W., McClung, C.A., 2019. Rhythms of life: circadian disruption and brain disorders across the lifespan. *Nat Rev Neurosci* 20, 49-65.
47. Makomela, N.M., 2007. [Elements of system semiotics of the brain and head with cranial vessels of patients with stroke and with risk of stroke development]. *Lik Sprava*, 47-50.
48. Markus, R.P., Cecon, E., Pires-Lapa, M.A., 2013. Immune-pineal axis: nuclear factor kappaB (NF-kB) mediates the shift in the melatonin source from pinealocytes to immune competent cells. *Int J Mol Sci* 14, 10979-10997.
49. Menendez-Pelaez, A., Reiter, R.J., 1993. Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J Pineal Res* 15, 59-69.
50. Menzies, F.M., Fleming, A., Caricasole, A., Bento, C.F., Andrews, S.P., Ashkenazi, A., Fullgrabe, J., Jackson, A., Jimenez Sanchez, M., Karabiyik, C., Licitra, F., Lopez Ramirez, A., Pavel, M., Puri, C., Renna, M., Ricketts, T., Schlotawa, L., Vicinanza, M., Won, H., Zhu, Y., Skidmore, J., Rubinsztajn, D.C., 2017. Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Neuron* 93, 1015-1034.
51. Nichols, M.R., St-Pierre, M.K., Wendeln, A.C., Makoni, N.J., Gouwens, L.K., Garrad, E.C., Sohrabi, M., Neher, J.J., Tremblay, M.E., Combs, C.K., 2019. Inflammatory mechanisms in neurodegeneration. *J Neurochem*.
52. Niizuma, K., Yoshioka, H., Chen, H., Kim, G.S., Jung, J.E., Katsu, M., Okami, N., Chan, P.H., 2010. Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia. *Biochim Biophys Acta* 1802, 92-99.
53. Nopparat, C., Chantadol, V., Permpoonputtana, K., Govitrapong, P., 2017. The anti-inflammatory effect of melatonin in SH-SY5Y neuroblastoma cells exposed to sublethal dose of hydrogen peroxide. *Mech Ageing Dev* 164, 49-60.
54. Paschen, W., 2000. Role of calcium in neuronal cell injury: which subcellular compartment is involved? *Brain Res Bull* 53, 409-413.
55. Przedborski, S., Vila, M., Jackson-Lewis, V., 2003. Neurodegeneration: what is it and where are we? *J Clin Invest* 111, 3-10.
56. Raikhlin, N.T., Kvetnoy, I.M., Tolkachev, V.N., 1975. Melatonin may be synthesised in enterochromaffin cells. *Nature* 255, 344-345.
57. Ramirez-Rodriguez, G., Klempin, F., Babu, H., Benitez-King, G., Kempermann, G., 2009. Melatonin modulates cell survival of new neurons in the hippocampus of adult mice. *Neuropsychopharmacology*

- 34, 2180-2191.
58. Ramos, E., Patino, P., Reiter, R.J., Gil-Martin, E., Marco-Contelles, J., Parada, E., de Los Rios, C., Romero, A., Egea, J., 2017. Ischemic brain injury: New insights on the protective role of melatonin. *Free Radic Biol Med* 104, 32-53.
 59. Reagan-Shaw, S., Nihal, M., Ahmad, N., 2008. Dose translation from animal to human studies revisited. *Faseb j* 22, 659-661.
 60. Reiter, R.J., Rosales-Corral, S., Tan, D.X., Jou, M.J., Galano, A., Xu, B., 2017. Melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant: one of evolution's best ideas. *Cell Mol Life Sci* 74, 3863-3881.
 61. Reiter, R.J., Tan, D.X., Galano, A., 2014. Melatonin reduces lipid peroxidation and membrane viscosity. *Front Physiol* 5, 377.
 62. Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, B.B., 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med* 49, 1603-1616.
 63. Rodriguez, C., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Antolin, I., Herrera, F., Martin, V., Reiter, R.J., 2004. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 36, 1-9.
 64. Ruiz, M., Begou, M., Launay, N., Ranea-Robles, P., Bianchi, P., Lopez-Erauskin, J., Morato, L., Guileria, C., Petit, B., Vauris-Barriere, C., Gueret-Gonthier, C., Bonnet-Dupeyron, M.N., Fourcade, S., Auwerx, J., Boespflug-Tanguy, O., Pujol, A., 2018. Oxidative stress and mitochondrial dynamics malfunction are linked in Pelizaeus-Merzbacher disease. *Brain Pathol* 28, 611-630.
 65. Shu, T., Wu, T., Pang, M., Liu, C., Wang, X., Wang, J., Liu, B., Rong, L., 2016. Effects and mechanisms of melatonin on neural differentiation of induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 474, 566-571.
 66. Singh, S., Mishra, A., Bharti, S., Tiwari, V., Singh, J., Parul, Shukla, S., 2018. Glycogen Synthase Kinase-3beta Regulates Equilibrium Between Neurogenesis and Gliogenesis in Rat Model of Parkinson's Disease: a Crosstalk with Wnt and Notch Signaling. *Mol Neurobiol* 55, 6500-6517.
 67. Sirichoat, A., Krutsri, S., Suwannakot, K., Arana-rochana, A., Chaisawang, P., Pannangrong, W., Wigmore, P., Welbat, J.U., 2019. Melatonin protects against methotrexate-induced memory deficit and hippocampal neurogenesis impairment in a rat model. *Biochem Pharmacol* 163, 225-233.
 68. Suofu, Y., Li, W., Jean-Alphonse, F.G., Jia, J., Khattar, N.K., Li, J., Baranov, S.V., Leronni, D., Mihalik, A.C., He, Y., Cecon, E., Wehbi, V.L., Kim, J., Heath, B.E., Baranova, O.V., Wang, X., Gable, M.J., Kretz, E.S., Di Benedetto, G., Lezon, T.R., Ferrando, L.M., Larkin, T.M., Sullivan, M., Yablonska, S., Wang, J., Minnigh, M.B., Guillaumet, G., Suzenet, F., Richardson, R.M., Poloyac, S.M., Stolz, D.B., Jockers, R., Witt-Enderby, P.A., Carlisle, D.L., Vilardaga, J.P., Friedlander, R.M., 2017. Dual role of mitochondria in producing melatonin and driving GPCR signaling to block cytochrome c release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E7997-e8006.
 69. Tamtaji, O.R., Mobini, M., Reiter, R.J., Azami, A., Gholami, M.S., Asemi, Z., 2019. Melatonin, a toll-like receptor inhibitor: Current status and future perspectives. *J Cell Physiol* 234, 7788-7795.
 70. Tan, D.X., Manchester, L.C., Liu, X., Rosales-Corral, S.A., Acuna-Castroviejo, D., Reiter, R.J., 2013. Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: a hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes. *J Pineal Res* 54, 127-138.
 71. Tan, D.X., Xu, B., Zhou, X., Reiter, R.J., 2018. Pineal Calcification, Melatonin Production, Aging, Associated Health Consequences and Rejuvenation of the Pineal Gland. *Molecules* 23.
 72. Uduma, F.U., Fokam, P., Okere, P.C.N., Motah, M., 2011. Incidence of physiological pineal gland and choroid plexus calcifications in cranio-cerebral computed tomograms in Douala, Cameroon. *Global Journal of Medical Research* 11, 5-11.
 73. Venegas, C., Garcia, J.A., Escames, G., Ortiz, F., Lopez, A., Doerrier, C., Garcia-Corzo, L., Lopez, L.C., Reiter, R.J., Acuna-Castroviejo, D., 2012. Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *J Pineal Res* 52, 217-227.
 74. Waldhauser, F., Kovacs, J., Reiter, E., 1998. Age-related changes in melatonin levels in humans and its potential consequences for sleep disorders. *Exp Gerontol* 33, 759-772.
 75. Waller, K.L., Mortensen, E.L., Avlund, K., Fagerlund, B., Lauritzen, M., Gammeltoft, S., Jennum, P., 2016. Melatonin and cortisol profiles in late midlife and their association with age-related changes in cognition. *Nat Sci Sleep* 8, 47-53.
 76. Wang, Y., Mandelkow, E., 2016. Tau in physiology and pathology. *Nat Rev Neurosci* 17, 5-21.
 77. Wongprayoon, P., Govitrapong, P., 2017. Melatonin as a mitochondrial protector in neurodegenerative diseases. *Cell Mol Life Sci* 74, 3999-4014.
 78. Zhao, X.Y., Lu, M.H., Yuan, D.J., Xu, D.E., Yao, P.P., Ji, W.L., Chen, H., Liu, W.L., Yan, C.X., Xia, Y.Y., Li, S., Tao, J., Ma, Q.H., 2019. Mitochondrial Dysfunction in Neural Injury. *Front Neurosci* 13, 30.
 79. Zivin, J.A., Fisher, M., DeGirolami, U., Hemenway, C.C., Stashak, J.A., 1985. Tissue plasminogen activator reduces neurological damage after cerebral embolism. *Science* 230, 1289-1292.