

2 ej
30

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.
FACULTAD DE CIENCIAS.

PAPEL DE LA GLANDULA PINEAL Y LA MELATONINA EN EL
DESARROLLO DE CRISIS CONVULSIVAS PROVOCADAS EN LA RATA.

TESIS PROFESIONAL.

Para obtener el grado de

BIOLOGO.

Presenta

IGNACIO CAMACHO ARROYO.

MEXICO.

1986.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE.

PRIMERA PARTE.

PAGINA.

I. INTRODUCCION.....	3
II. MARCO TEORICO.	
II.1. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA GLANDULA PINEAL.	
II.1.1. Desarrollo Ontogenético y Filogenético de la Glándula Pineal.....	5
II.1.2. Aspectos Morfológicos de la Glándula Pineal.....	7
II.2. METABOLISMO DE LA MELATONINA.	
II.2.1. Síntesis de Melatonina.....	8
II.2.2. Secreción de Melatonina.....	9
II.2.3. Regulación de la Producción Circadiana de Melatonina.....	10
II.2.4. Degradación de Melatonina.....	13
II.3. PARTICIPACION DE LA GLANDULA PINEAL Y LA MELATO_ NINA EN EVENTOS FISIOLOGICOS RITMICOS DE LOS MAMIFEROS.....	13
III. ANTECEDENTES RELEVANTES DEL PROBLEMA.	
III.1. Crisis Convulsivas.....	16
III.2. Modelos Experimentales de Epilepsia.....	17
III.3. Relación entre la Glándula Pineal, la Melatonina y la Excitabilidad del Sistema Nervioso Central..	19

SEGUNDA PARTE.

IV.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
IV.2. OBJETIVOS.....	23
IV.3. HIPOTESIS DE TRABAJO.....	24

V. MATERIALES Y METODOS.	
V.1. Condiciones Generales.....	25
V.2. Administración Exógena de Melatonina.....	26
V.3. Manipulación Quirúrgica y Depleción de los niveles de Melatonina.....	27
V.4. Estimulaciones Diurna y Nocturna con Pentileneta_ trazol.....	29
V.5. Análisis de los Datos.....	29
VI. RESULTADOS.....	31
VII. DISCUSION.....	35
VIII. CONCLUSIONES.....	41
IX. REFERENCIAS.....	42
X. APENDICE A.....	49

I. INTRODUCCION.

La glándula pineal (GP) es un órgano multifuncional que interviene en el acoplamiento de varios eventos fisiológicos a las condiciones medioambientales existentes en los diferentes ecosistemas. De esta manera la GP ha tenido una gran importancia en la adaptación y evolución de los vertebrados.

El estudio intensivo de la GP se inició a principios de la década de 1960 y aunque se ha relacionado con eventos tales como la reproducción, el sueño, la analgesia y la actividad eléctrica del Sistema Nervioso Central (SNC), a diferencia de otras glándulas endócrinas, no se ha determinado qué papel fisiológico desempeña ni cuáles son las sustancias responsables de su participación en la fisiología de los mamíferos.

Entre las sustancias secretadas por la GP una de las más estudiadas es la melatonina (MEL), un metoxi-indol al que se le han atribuido algunas de las posibles funciones de la GP. Aunque dichos atributos no se han corroborado plenamente ni se conoce el mecanismo de acción por el cual actúa en la comunicación celular, en lo que se refiere a la excitabilidad del SNC, algunos autores la han propuesto como un agente anticonvulsivante.

Por otro lado, la epilepsia es uno de los trastornos neurológicos más comunes en la población humana. En nuestro país la incidencia de este padecimiento es del 1%. Durante varios siglos esta enfermedad se trató de manera empírica y no fue sino hasta mediados del siglo pasado cuando Jackson hace el primer intento por establecer las bases neuropatológicas de la epilepsia.

En 1914 Cybulsky registra por primera vez los cambios del electroencefalograma (EEG) en la epilepsia experimental. A partir de entonces y hasta nuestros días, se han intensificado los estudios en todas las áreas de las Neurociencias para tratar de conocer las causas y los mecanismos mediante los cuales se produce la epilepsia, con el fin de contar con un mejor conocimiento que permita atacar este padecimiento.

Se han determinado algunos factores causales de la epilepsia, se conoce el patrón de disparo neuronal de los animales o personas afectadas por esta enfermedad y se tienen determinadas algunas de las estructuras y sustancias endógenas que participan o se ven alteradas en este trastorno.

De esta manera se ha avanzado en el tratamiento de pacientes epilépticos, se han ideado modelos experimentales de epilepsia, se han producido tanto convulsivantes como anticonvulsivantes en

el laboratorio, etc. Sin embargo, falta por conocer toda la red de estructuras cerebrales que intervienen en este fenómeno, las vías neuronales implicadas en el mismo, la participación de varias sustancias endógenas en dicho proceso, la identificación de las sinápsis que tienen un papel clave en el establecimiento de la epilepsia, las células que contienen las alteraciones moleculares que llevan a la producción del fenómeno y la determinación de cómo tales alteraciones se traducen, en última instancia, en una función neuronal anormal.

Dado que los estudios sobre la actividad convulsiva han proporcionado valiosa información acerca de la organización morfo-fisiológica del SNC y con el propósito de aportar ciertos conocimientos acerca de la participación de la GP y la MEL en la excitabilidad del SNC de los mamíferos y de corroborar el probable efecto anticonvulsivo de la MEL, en el presente trabajo se utilizó uno de los modelos animales más estudiados en la epilepsia experimental, que consiste en la inducción del comportamiento epiléptico por la estimulación subumbral repetida con un agente convulsivante en roedores.

En la primera parte de esta tesis se revisan las características generales de la GP, el metabolismo de la MEL, así como las evidencias que se tienen acerca del papel que ejercen la GP y la MEL en la fisiología de los mamíferos, se hace énfasis en la relación entre GP, MEL y la excitabilidad del SNC. En la segunda parte se plantean el problema en estudio, los objetivos perseguidos en el mismo y las hipótesis surgidas a partir de los antecedentes relevantes del problema. Se continúa con la descripción de la parte experimental y los resultados para terminar con la discusión y las conclusiones del trabajo.

II. MARCO TEORICO.

II.1. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA GLANDULA PINEAL.

II.1.1. Desarrollo Ontogenético y Filogenético de la Glándula Pineal.

La epiphisis cerebri o glándula pineal (GP) de los mamíferos se origina a partir de una evaginación del neuroepitelio del techo diencefálico situado entre las comisuras habenuar y posterior .

Estas células neuroepiteliales dan origen tanto a los pinealocitos o células parenquimatosas, como a las células gliales presentes en la glándula del adulto (56). El 90% de los derivados neuroectodérmicos de la GP formará las células parenquimatosas. La GP recibe su inervación durante la primera semana de vida postnatal. Los vasos sanguíneos que penetran a la glándula se forman a partir de constituyentes mesodérmicos.

La GP está presente en la mayoría de los vertebrados, desde los agnatos hasta los mamíferos superiores incluyendo al hombre. A lo largo de la evolución, muestra cambios en su estructura, función y patrón de inervación. En las lampreas, las células son fotorreceptoras y existen barras sinápticas, que son estructuras citoplasmáticas electrodensas situadas frente a otra célula, rodeadas por un conglomerado de vesículas parecidas a las observadas en los botones terminales de las sinápsis químicas.

En los peces y los anfibios el desarrollo y estructura del cuerpo pineal son muy similares a los de la retina. En el epitelio epifisario se distinguen células fotorreceptoras neurosensoriales de tipo ciliar, elementos de soporte y células nerviosas sensoriales. El proceso basal de las células fotorreceptoras está dirigido hacia la lámina propia del epitelio pineal y aunque no la alcanza, está en contacto con las dendritas o somas de las neuronas sensoriales del neuroepitelio, que son homólogas a las células de la capa interna de la retina. Al igual que en las lampreas hay barras sinápticas con organelos y vesículas (32).

Aunque se ha pensado que la GP de los anamniotas tiene únicamente un papel fotosensorial, por lo que algunos autores la llaman cuerpo pineal al no considerarla como una estructura endocrina, se incrementan las evidencias que apoyan una función secretora.

En los anfibios, se ha observado la existencia de vesículas que se originan en el aparato de Golgi de las células fotorreceptoras, estas vesículas se acumulan en los procesos basales y muestran una incorporación selectiva de precursores de la síntesis de MEL. Además contienen tanto a la enzima que participa en la última etapa de la síntesis de MEL, la hidroxindol-*o*-metiltransferasa (HIOMT) como a la propia MEL (8).

La GP de los anfibios se inerva por fibras no mielinizadas del Sistema Nervioso Autónomo que contienen vesículas distribuidas en el tracto pineal y en el espacio perivascular.

En los reptiles se observa una tendencia a la regresión de la función fotorreceptoral con el predominio de la función secretora y de una inervación simpática. En los lacértidos el número de células sensoriales decrece, así como el número de fibras sensoriales que corren por el tracto pineal. El segmento exterior de las células fotorreceptoras se ha modificado o desintegrado, sin embargo la función fotorreceptora no se ha perdido totalmente (31).

Los espacios pericapilares contienen fibras nerviosas mielinizadas probablemente sensoriales y haces no mielinizados con vesículas que contienen adrenalina (A) y noradrenalina (NA). En el citoplasma de las células fotorreceptoras se han encontrado serotonina (5HT), HIOMT y MEL. En miembros del orden Testudinata se ha demostrado una variación en la actividad secretora.

En las aves la GP varía ampliamente, los segmentos externos han sufrido regresión, en algunas especies existe la función fotorreceptoral aunque los polos fóticos prácticamente no existen. El proceso basal alcanza la lámina propia del epitelio, hay barreras sinápticas y la glándula está inervada por el ganglio cervical superior (GCS) (32).

En contraste con los mamíferos, ni la retina ni la inervación simpática son esenciales para la regulación fótica medioambiental sobre la producción de MEL. Se ha sugerido que el cráneo tan delgado de las aves permite la entrada de luz y que ésta estimula a la GP directamente. La GP de las aves es en sí un oscilador primario.

En el desarrollo ontogénico de los mamíferos se observa la transformación de las células fotorreceptoras en pinealocitos, que son las células secretoras de la GP. Los pinealocitos en estado adulto no muestran vestigios del polo fotorreceptor, aunque pueden estar presentes algunos remanentes del aparato ciliar. Se pierde la inervación que en otros vertebrados conduce el estímulo fótico transducido desde las células fotorreceptoras al cerebro. La GP está inervada por fibras del GCS que pertenece al

Sistema Nervioso Autónomo Periférico.

A pesar de que en los mamíferos los pinealocitos pierden su capacidad fotorreceptora, la GP se vuelve indirectamente fotosensible por un circuito vía la retina y otras estructuras neurales (32). Este circuito será detallado posteriormente en la sección II.2.3.

II.1.2. Aspectos Morfológicos de la Glándula Pineal.

La GP de los mamíferos es una estructura diencefálica situada fuera de la barrera hematoencefálica, cubierta por tejido leptomeningeo. En la rata adulta se localiza en la vecindad del cerebelo unida al techo del tercer ventrículo por medio de un tallo de 200 μ m de diámetro y 2700 a 3000 μ m de largo. La emergencia del tallo se produce entre las comisuras habonular y posterior (62). Se sitúa entre los colículos superiores y sus relaciones anatómicas son: en la parte dorsal con la confluencia de los senos venosos lateral y sagital posterior; en su parte posterior limita con el cerebelo y lateralmente con el giro cingulado de los lóbulos occipitales (62). (Fig.1).

En la rata, la GP tiene una forma esferoide y sus dimensiones son: 1500 a 1600, 1300 a 1500 y 750 a 800 μ m en sus ejes longitudinal (fronto-occipital), transversal (lateral) y vertical (dorso-ventral respectivamente) (12). Su peso varía entre 1.5 y 2 mg. Está inervada por los nervios conarios que se originan en el GCS del Sistema Nervioso Simpático y pasan por la superficie dorsal del cerebelo hasta llegar al diencefalo.

La GP está irrigada por una red capilar que proviene de las ramas de las arterias cerebrales posteriores. La anastomosis de talos capilares origina a las venas colectoras superficiales que desembocan en la gran vena cerebral y ésta a su vez en la confluencia de los senos venosos. La gran irrigación que recibe se relaciona con un flujo sanguíneo elevado de 4 ml/g de tejido (21). A lo largo de los primordios vasculares formados aparecen trabéculas (septa imperfecta) compuestas de tejido conjuntivo separan a las agrupaciones parenquimatosas. El tejido conjuntivo forma la cápsula de la GP que cubre al órgano completamente. Las células parenquimatosas se organizan en racimos, cordones, pseudoalveolos o lóbulos según la especie y edad del animal.

En los mamíferos, el pinealocito presenta un núcleo grande y lobulado con un nucleolo prominente. Se encuentran prolongaciones citoplasmáticas que terminan ya sea en el tejido conjuntivo perivascular cerca de los capilares o entre los mismos pinealocitos (62). Tanto en el soma como en las porciones terminales de las prolongaciones hay numerosas mitocondrias. La mayoría de los pinealocitos poseen vesículas granulares que junto con el material

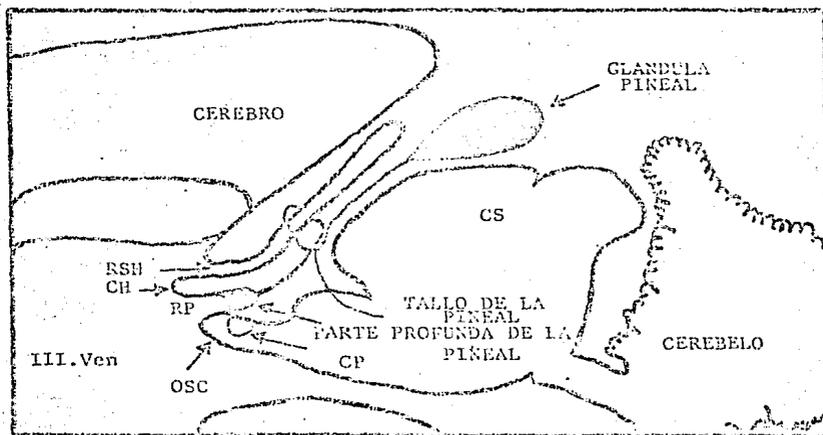


Fig. 1. REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL COMPLEJO PINEAL EN ROEDORES. CH, COMISURA HABENULAR; CP, COMISURA POSTERIOR; RP, RECESO PINEAL; CS, COLLICULUS SUPERIOR; OSC, ORGANO SUBCOMISURAL; RSH, RECESO SUPRAHABENULAR; III. VEN, TERCER VENTRICULO. (Tomado de Reiter, R.J. 62).

del retículo endoplásmico rugoso se han relacionado con los procesos secretores de los pinealocitos. Se han observado también las barras sinápticas.

A pesar de que en los mamíferos la GP sufre diversos grados de calcificación (corpura arenacea) al aumentar la edad del animal, la glándula continúa activa. En el humano la GP empieza a calcificarse durante la segunda década de la vida, ya entre los 50 y 60 años casi el 70% de las pineales estudiadas por rayos X, están al menos parcialmente calcificadas. No hay relación entre el grado de calcificación y la funcionalidad de la glándula, al menos en lo que respecta a la actividad de las enzimas participantes en el metabolismo de las indolaminas (86). Incluso en el humano anciano mayor de 90 años hay producción rítmica de MEL.

II.2. METABOLISMO DE LA MELATONINA.

II.2.1. Síntesis de Melatonina.

Los estudios bioquímicos de las indolaminas sintetizadas en la GP se iniciaron a finales de la década de 1950 cuando en 1959, Lerner y cols. (43) describieron la estructura química de la MEL, un metoxi-indol de naturaleza lipofílica y no ionizada que aclaraba la piel de los anfibios, propiedad descrita en 1917 por Mc Cord y Allen.

La MEL se sintetiza y secreta por la GP, la retina, la glándula Harderiana y las células enterocromafines del intestino. El 95% de la producción total de MEL corresponde a la GP y es la única estructura que la sintetiza de manera rítmica (13,52,58). En 1960 Axelrod y Weissbach (6) demostraron la presencia de las enzimas necesarias para la síntesis de MEL a partir de 5HT en la GP.

La MEL se sintetiza en el citoplasma de los pinealocitos a partir del triptofano. Este aminoácido es transformado en 5HT por medio de dos enzimas: la triptofano hidroxilasa, cuya actividad aumenta en el periodo de oscuridad y disminuye en el fotoperíodo (75) y la descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos que junto con su cofactor biotina, se encuentran en concentraciones elevadas, lo cual contribuye a que la GP presente los niveles cerebrales más altos de 5HT (0.5 mM). (44,75).

La 5HT a su vez es acetilada por la N-acetiltransferasa (NAT) para formar N-acetil serotonina (NAS), compuesto al que la HIOMT agrega un grupo metilo tomado de la N-adenosil metionina para

sintetizar 5-Metoxi-N-acetil triptamina (MEL) (Fig.2). La NAT parece regular la síntesis de MEL al limitar la disponibilidad de la NAG para la orto metilación.

En cultivos de pinealocitos, la noradrenalina (NA), adrenalina (A), dopamina (DO) y octopamina (OC) aumentan la actividad de la NAT. En la GP de la rata, esta actividad es 30 veces más alta durante el periodo de oscuridad que durante el fotoperiodo (38). Este ritmo de actividad persiste tanto en condiciones de oscuridad constante como en animales enucleados, y se suprime bajo luz continua. El aumento en la actividad de la NAT corresponde a una elevación en los niveles de MEL en suero y en la propia GP (85).

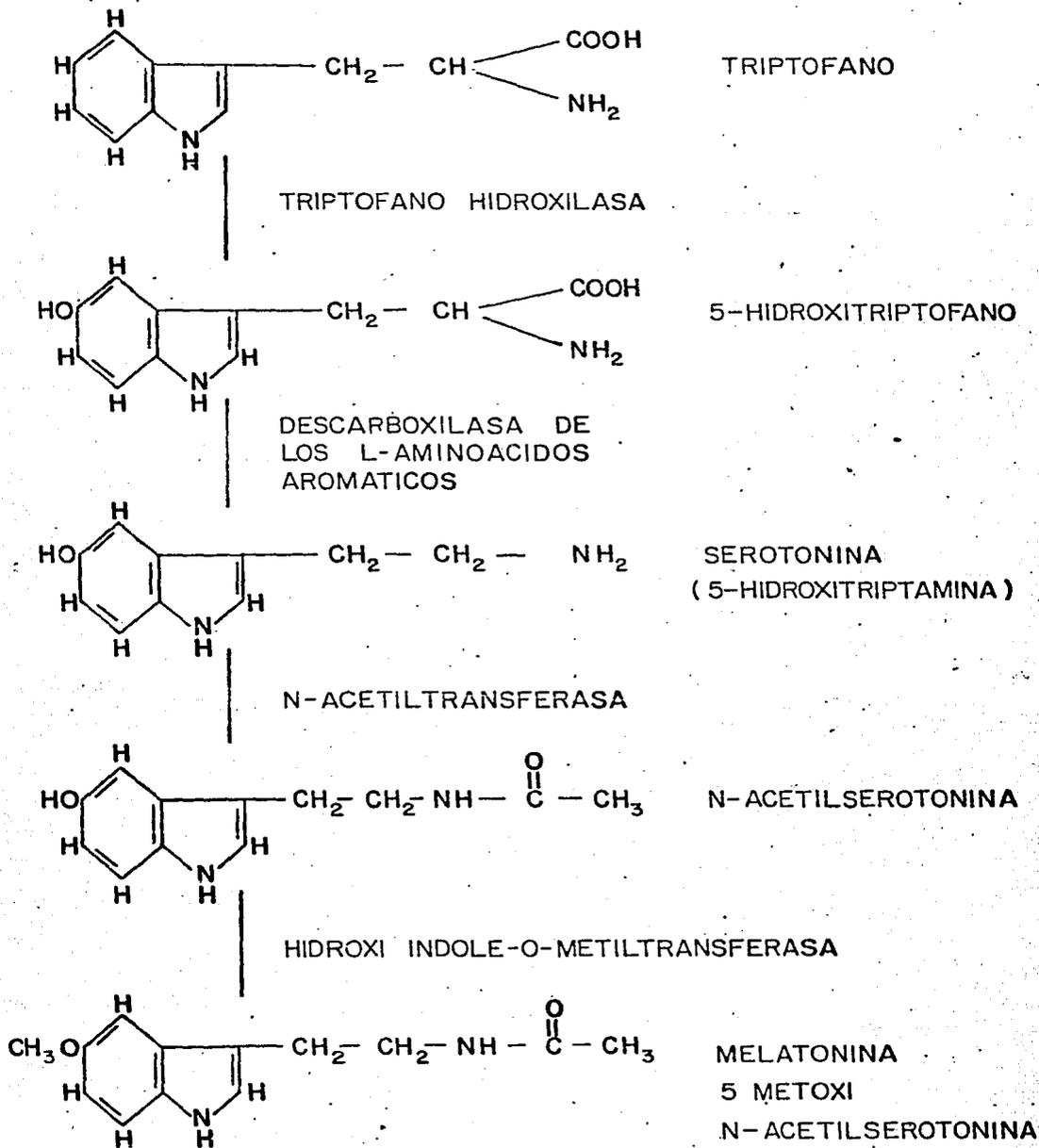
II.2.2. Secreción de Melatonina.

En los mamíferos existen dos rutas posibles para la secreción de MEL. El primer caso es la entrada directa de MEL a la circulación en los capilares vía la membrana basal del parénquima pineal, los espacios pericapilares y la pared endotelial.

La segunda vía alternativa es el paso al líquido cefalorraquídeo (LCR), probablemente hacia el espacio subaracnoideo que rodea a la glándula. En los primates se secreta directamente hacia el tercer ventrículo. Las concentraciones de MEL en el LCR varían de manera inter e intraespecífica.

Con el uso de un modelo matemático en ovejas, Rollag y cols. (66) estimaron que más del 70% de la MEL secretada por la GP pasa a la circulación antes de ir al LCR. Se ha demostrado una entrada rápida de la MEL proveniente de la circulación al LCR y viceversa; en ovejas y en el mono Rhesus existe una relación dinámica de las concentraciones entre ambos fluidos (63). Aunque en ovejas, mono Rhesus y el humano se han encontrado niveles de MEL más bajos en el LCR que en la sangre (63,82), es importante considerar las fuentes extrapineales de la hormona y su unión a proteínas plasmáticas como la albúmina en el torrente sanguíneo, por lo que sólo una parte es libre de cruzar la barrera hematoencefálica (14).

Fig.2 BIOSINTESIS DE LA MELATONINA



II.2.3. Regulación de la Producción Circadiana de Melatonina.

El primer indicio de un ritmo en la producción de MEL en la GP fue descrito por Quay (55) en 1963 con el uso de técnicas espectrofluorométricas. En el escotoperíodo hay un incremento en los niveles de MEL mientras que en el fotoperíodo hay una disminución. Este ritmo circadiano se ha descrito en la mayoría de los vertebrados estudiados hasta el momento, desde los peces hasta los mamíferos superiores que incluyen al hombre (23,64). El ritmo de secreción de MEL es independiente del período de actividad de los animales, el ciclo luz-oscuridad es el sincronizador externo que lo acopla.

La existencia de un ritmo de producción de MEL en la etapa embrionaria depende del desarrollo de los componentes necesarios para generarlo. En el feto y el neonato no se ha reportado síntesis de MEL, sin embargo esto no excluye la presencia de la misma ya que la madre proporciona MEL al feto y al neonato a través de la placenta y la contenida en la leche materna.

La transferencia placentaria de la hormona se ha observado en la rata, la oveja y el mono Rhesus (34). De esta manera, en las etapas tempranas del desarrollo, el feto contaría con una periodicidad química de 24 horas debida a la MEL proporcionada por la madre. Así se tendría un acoplamiento entre las funciones fetales y maternas con el medio ambiente y el ciclo luz-oscuridad.

La actividad de la NAT se detecta en la rata desde el cuarto día antes del nacimiento aunque no hay ritmicidad en su actividad, la cual se nota a partir del cuarto día después del nacimiento (27). Para ese día las fibras catecolaminérgicas se detectan en la superficie de la glándula. Entre el quinto y sexto día se encuentran unas cuantas fibras en el parénquima pineal. La innervación simpática de la glándula y la sensibilidad de la adenilato ciclasa a la NA se desarrollan al mismo tiempo que el ritmo de la NAT, el cual alcanza la magnitud propia de la etapa adulta al final de la tercera semana.

Al décimo día ya se produce NAS; la HIOMT se detecta hasta la segunda semana de vida en la rata y la capacidad para sintetizar MEL se desarrolla en las siguientes semanas.

La luz tiene varios efectos sobre la morfofisiología de la GP. En 1960, Fiske y cols. (18) observaron un decremento en el peso de la GP de ratas expuestas a luz constante durante 6 y 25 semanas. Los animales bajo un ciclo luz-oscuridad 12 : 12 presentan un aumento en el escotoperíodo y una disminución en el fotoperíodo, lo cual sugiere que la luz además de regular la síntesis de

indolaminas tiene otros efectos sobre la glándula a nivel de peso y morfología (7). La luz continua elimina la MEL de la circulación al inhibir la estimulación necesaria para que se produzca la síntesis y secreción de MEL, razón por la cual en condiciones de luz constante hay ausencia en el ritmo de MEL. (La estimulación mencionada será tratada posteriormente en esta sección).

Cuando las luces se apagan después de haber estado en condiciones de luz constante, la MEL no se incrementa de inmediato sino que el aumento se produce tiempo después, aunque hay discusión sobre el tiempo preciso en que se presenta tal aumento. Por otra parte, se ha visto una variación en la latencia que precede al incremento de MEL en el escotoperíodo dependiente de la especie. En la rata se produce 3 ó 4 horas después de que las luces se han apagado (95).

La exposición a un destello de luz por un tiempo que va de 0.25 a 10 minutos durante la fase de oscuridad produce un decremento inmediato en la actividad de la NAT que se produce 3 minutos después de haberse encendido las luces (39).

El ciclo luz-oscuridad coordina el ritmo diario de producción de MEL, sin embargo no lo maneja sino que éste es regulado por un oscilador endógeno.

En condiciones de oscuridad continua no se presenta un incremento ni en la actividad de la NAT ni en los niveles de MEL pero se conserva su ritmo (8). Diversos estudios realizados en ratas, hamsters, ovejas y monos mantenidos en oscuridad constante o enucleados quirúrgicamente, muestran que los ritmos de 5HT, NAT y MEL persisten en la GP con una duración cercana a 24 horas. Sin embargo, si estas condiciones se prolongan por varias semanas, el ritmo circadiano de MEL no se acopla al ciclo luz-oscuridad ambienta, por lo que entra en una fase denominada "oscilación libre" (64).

Los animales anósmicos no pierden el ritmo de actividad de la NAT y la HIOMT, por lo que al parecer el olfato no tiene un papel importante en la regulación de la síntesis de MEL (37).

En la regulación de la producción circadiana de MEL están implicadas varias estructuras neuronales. La vía que lleva la comunicación neuronal a la GP es poco común ya que las señales se originan en estructuras del SNC, pasan al Sistema Nervioso Autónomo Periférico y regresan a otra estructura cerebral como es la GP (49).

La retina media los efectos de la luz a través de la rodopsina, pigmento sobre el que incide el estímulo luminoso. La retina pasa la información al núcleo supraquiasmático (NSQ), estruc-

tura bilateral del hipotálamo antero-ventral situada sobre el quiasma óptico. La transmisión retina-NSQ se da vía un tracto retino-hipotalámico de la vía no visual diferente a los tractos óptico primario y accesorio, y puede implicar algún neurotransmisor colinérgico. Estas proyecciones se han identificado en varios mamíferos, incluyendo primates, aunque no se han establecido en el humano (48).

Se tienen evidencias de que el NSQ es determinante en la organización y generación del ritmo de MEL. Las lesiones electroli del NSQ ocasionan la pérdida del ritmo de actividad de la NAT y por lo tanto de la síntesis de MEL. En el mono se altera el ritmo de MEL en el LCR y la luz constante no la suprime (64).

Del NSQ las vías aferentes se proyectan caudalmente hacia el hipotálamo retroquiasmático. De esta región salen proyecciones que atraviesan el haz medio de la formación reticular mesencefálica, parten del encéfalo y se dirigen hacia los cuerpos celulares de la columna intermedio lateral a nivel torácico superior, las fibras emergentes de esta zona inervan al GCS; de las células postglionares de esta estructura parten axones hasta las proximidades de la GP (36). En el espacio perivascular de la GP las proyecciones forman un plexus denso caracterizado por procesos prominentes llamados varicositos que contienen a las sustancias neurotransmisoras como la NA que controlan las fluctuaciones circadianas del metabolismo de las indolaminas de la GP (36). (Fig.3.).

Las variaciones circadianas en la actividad de la NAT están acopladas a los cambios en la liberación de NA en las terminales simpáticas que llegan a la glándula (29). La NA interactúa con los receptores E-adrenérgicos situados en la membrana celular de los pinealocitos, estos receptores cambian en número como respuesta a los cambios en la liberación de NA. En el día hay un incremento en la sensibilidad de los receptores mientras que en el periodo de oscuridad hay un decremento cuando los receptores han sido ocupados (15,69).

La interacción de la NA con el adrenoceptor B produce un aumento en la actividad de la enzima adenilato ciclasa con el subcuente incremento en los niveles de AMP cíclico, el cual induce la síntesis del RNA mensajero necesario para el incremento en la actividad de la NAT (70).

El AMP cíclico puede también ocasionar cambios en el potencial de membrana o inducir la fosforilación de proteínas que podrían activar a la NAT. El decremento en las concentraciones de AMP cíclico provoca la disminución en la actividad de la NAT (T 1/2 = 3 min.) (35).

En el humano en contraste con la mayoría de los mamíferos el ritmo de la MEL parece ser independiente de las condiciones de luz. La luz constante no altera la producción de MEL, es necesaria una intensidad luminosa alta en el escotoperíodo para disminuir los niveles circulantes de esta indolamina. Tal independencia de las condiciones de luz medioambientales puede implicar diferencias en la vía de comunicación que llega a la GP, un ejemplo es el hecho de que en el humano no se ha detectado el tracto retino-hipotalámico.

II.2.4. Degradación de Melatonina.

La MEL tiene una vida media muy corta (15 min.) que está en función de su rápido catabolismo y de su grado de lipofilidad, que le permite almacenarse en tejido adiposo, por lo que desaparece rápidamente de la circulación (40). Los catabolitos de la MEL parecen no tener actividad biológica.

Se conocen 3 vías catabólicas de la MEL. En la primera que representa más del 50%, la MEL circulante es hidroxilada en el carbono 6 en la fracción microsomal del hígado y posteriormente es conjugada con un sulfato para formar el ácido glucorónico que es excretado en la orina (41). La segunda vía produce N-acetil S-metoxi kinurenamina, compuesto que se forma por el rompimiento del anillo indol, seguido de una remoción del carbono adyacente al nitrógeno.

En 1974, Hirata y cols. (24) encontraron que este metabolito es el único derivado de la MEL que se localiza en el cerebro después de la administración intracisternal de MEL radioactiva.

En 1979, Rogawski y cols. (65) al analizar el hígado *in vitro* describieron la última vía degradativa de la MEL que consiste en una desacilación producida por la enzima aril-acilililasa que lleva a la formación de S metoxitriptamina, una sustancia psicoactiva que no atraviesa la barrera hematoencefálica (Fig.4).

II.3. PARTICIPACION DE LA GLANDULA PINEAL Y LA MELATONINA EN EVENTOS FISIOLÓGICOS RÍTMICOS DE LOS MAMÍFEROS.

La GP es un órgano multifuncional que actúa como sincronizador, estabilizador y modulador de varios procesos fisiológicos entre los que se encuentran la reproducción, el sueño, la analgesia y la actividad eléctrica cerebral en general (71).

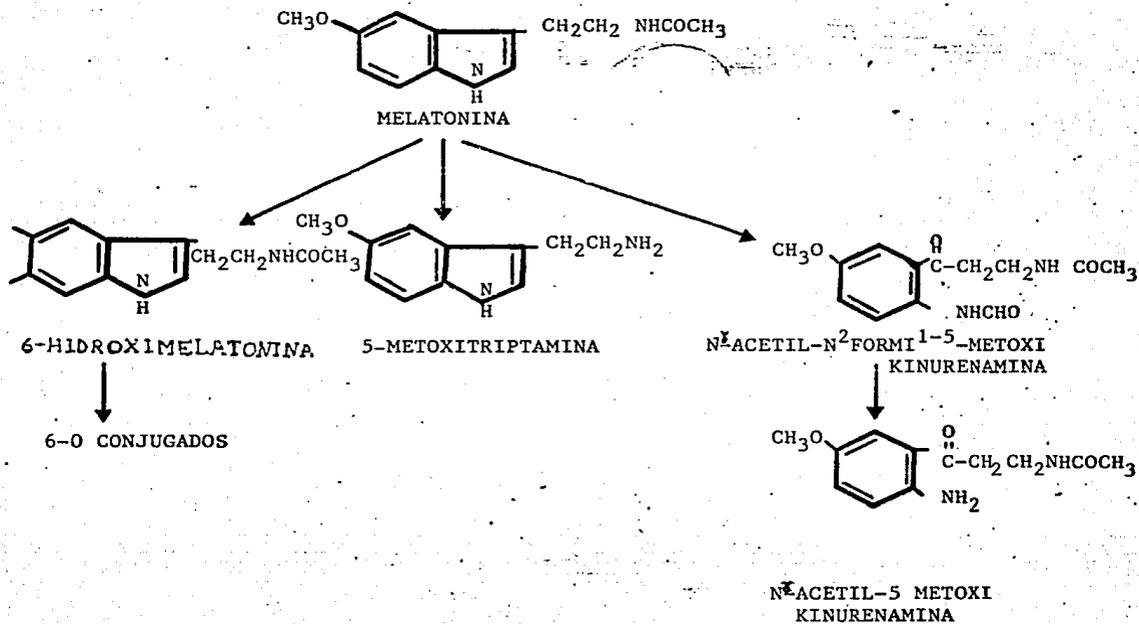


FIG. 4. CATABOLISMO DE LA MELATONINA.

(RECOPIADO DE LOS TRABAJOS DESCRITOS EN LAS REFERENCIAS : 24, 41, 43, 64 Y 65).

Ha sido considerada como un transductor endócrino que transforma la información fótica en una señal endócrina como es la secreción de MEL (80). Se le ha propuesto como un órgano tranquilizante que sincroniza los eventos fisiológicos de los mamíferos con los cambios en las condiciones medioambientales (71).

La actividad endócrina de la GP se refleja en los altos niveles de los metabolitos de las indolaminas secretadas por ella. La tasa mínima de flujo sanguíneo que llega a la GP sobrepasa a la mayoría de los órganos endócrinos, es igual a la de la neurohipófisis y solamente es superada por el riñón (21).

Aunque los estudios más extensos sobre el papel que tienen la GP y la MEL en la fisiología de los mamíferos se han realizado en las líneas de reproducción, sueño y actividad eléctrica del SNC, se ha sugerido su participación en otros eventos fisiológicos. Se ha reportado un efecto inhibitorio de la GP sobre la función tiroidea, la producción de aldosterona en la corteza adrenal así como un efecto de disminución en la presión arterial.

En vertebrados con reproducción estacional la GP media los cambios inducidos por el fotoperíodo (64). La asociación entre la GP y las funciones reproductoras se supuso desde 1876 cuando Heubner describió la relación entre la pubertad precoz y los tumores de la GP en humanos.

En 1951, Kitay (33) revisó varios casos de tumores en la GP y observó que los no parenquimatosos estaban frecuentemente asociados a la pubertad precoz, lo que llevó a pensar que la glándula secretaba una sustancia que inhibía la función reproductora, que se perdía al ser destruidos los pinealocitos por los tumores. En 1963, Wurtman y cols. (87) reportaron que la sustancia hipotética podría ser la MEL.

La iluminación continua o la pinealectomía inducen precocidad sexual o incremento en el tamaño gonadal en el hamster. En 1965, Hoffman y Reiter (25) demostraron que la presencia de la GP era necesaria para inducir la quiescencia gonadal en el hamster sirio. Los cambios hormonales que acompañan a este evento fisiológico como el decremento en las hormonas luteinizante, foliculo estimulante, prolactina y testosterona son mimetizados por la MEL.

Tamarkin y cols. (81) demostraron que en días largos, donde el período de luz es mayor al de oscuridad, las administraciones de MEL suprimen la función reproductiva en el hamster al producir regresión testicular en el macho y anovulación en la hembra.

Wetterberg y cols. (84) observaron cambios en los niveles sé_ rícos de MEL durante el ciclo menstrual. Los niveles pico se en_ contraron en los periodos premenstrual y menstrual, mientras que los valores más bajos se registraron en la etapa de ovulación.

Por otro lado, la relación entre la GP, la MEL y el sueño, se empezó a estudiar en la década de 1980. Hasta el momento se ha encontrado que la administración de MEL induce sueño en diferen_ tes especies incluyendo al hombre (5), mientras que su depleción, es decir eliminación, mediante la remoción de la GP produce un desacoplamiento en la ritmicidad del sueño de movimientos ocula_ res rápidos (SMOR) (45,50). Los diferentes trabajos en el área sugieren que la GP y/o la MEL tienen un doble efecto sobre el sueño, por una parte aumentan la eficiencia de sueño y por otra parecen modular la presentación del SMOR.

III. ANTECEDENTES RELEVANTES DEL PROBLEMA.

III.1. Crisis Convulsivas.

Entre los caracteres generales de la activación epiléptica se encuentran un aumento en la frecuencia de las descargas, generalmente en forma de trenes de duración variable y una tendencia a la sincronización de la actividad de un gran número de neuronas de distintas estructuras cerebrales con la presencia de una hipersincronía paroxística (?).

Durante la epilepsia las neuronas anormales presentan grandes potenciales. Hay un desequilibrio que facilita el proceso de excitación con un aumento de los potenciales postsinápticos excitadores y una disminución de los inhibidores.

En un ataque convulsivo aparece el complejo onda espiga que presenta una sincronización en los diferentes puntos del registro electroencefalográfico. El curso y duración de la crisis convulsiva depende de la condición funcional inicial de las estructuras que iniciaron el proceso patológico (22).

La postdescarga es un fenómeno primario de descargas de larga duración de tipo epiléptico y consiste en un proceso local que representa la descarga autosostenida de un grupo de neuronas (22).

Un área epiléptica muestra dos tendencias en el EEG: aumento en la amplitud y disminución progresiva de la frecuencia. El registro del EEG durante una crisis generalizada siempre muestra un periodo de silencio eléctrico de algunos segundos de duración, que se acompaña de una hiperpolarización de las neuronas que manifiesta la existencia de un proceso inhibitorio (72).

Durante la crisis se observa un decremento en la onda de hiperpolarización, un alargamiento progresivo en la onda de despolarización y una suma temporal de las ondas despolarizantes. Hacia el final del proceso la neurona se mantiene en un estado de despolarización sostenida que se manifiesta en la crisis. En la última etapa de la crisis se acentúa la fase de declive de las ondas de despolarización, hasta llegar al nivel de hiperpolarización, la cual vista en el corticograma coincide con el silencio eléctrico poscrítico (22).

La actividad epiléptica se propaga de una estructura hacia las diferentes regiones cerebrales. Esta generalización de la actividad convulsiva se debe al hecho de que el ataque perturba el

equilibrio entre los procesos de excitación y de inhibición.

La detención de la crisis se produce tanto por fatiga progresiva como por un mecanismo de inhibición. Es frecuente observar espigas epilépticas aisladas o trenes episódicos breves en el EEG durante 1 ó 2 minutos después del final del comportamiento convulsivo (30). Una vez que finalizó la crisis, la actividad eléctrica regresa progresivamente a la normalidad.

III.2. Modelos Experimentales de Epilepsia.

Los modelos experimentales de epilepsia han brindado muchos conocimientos no sólo acerca del trastorno mismo sino en general sobre el funcionamiento del SNC. Un buen modelo de epilepsia debe replicar en lo posible las condiciones que se presentan en la epilepsia clínica en el humano (79). Las espigas registradas en el corticograma de diferentes especies animales con el uso de diversos métodos de epilepsia experimental, resultan morfológicamente semejantes a las registradas en el EEG del humano durante una crisis convulsiva generalizada.

En la mayoría de los modelos animales, la epilepsia se produce por medio de diferentes tipos de estimulación. Así la estimulación eléctrica y localizada fue el primer método de investigación en epilepsia. En 1870, Fritsch y Hitzig provocaron crisis en perros por la estimulación eléctrica excesiva del cerebro. En 1882, Albertoni probó diversas sustancias como antiepilépticos en crisis inducidas eléctricamente en perros (78).

En 1937, Putnam y Merrit demostraron que los fármacos efectivos en el tratamiento de la epilepsia pueden ser distinguidos de otros compuestos por su capacidad para suprimir las convulsiones inducidas en animales de laboratorio (79).

El electroshock como método para producir epilepsia fue introducido por Battelli en 1903 y se basa en la producción de un ataque epiléptico por medio de estimulaciones percutáneas.

La aplicación sistémica o central de ciertos agentes químicos es otra de las maneras de producir convulsiones, así como la estimulación audiogénica producida por ondas de alta frecuencia. En 1967 se desarrolló un modelo de epilepsia en primates por la estimulación luminosa intermitente en el mandril senegalés *Papio papio* (78).

Uno de los últimos modelos desarrollados en la epilepsia experimental es la activación cerebral paroxística progresiva denominada "kindling" por Goddard y cols. en 1969 (20), aunque fue

descrita originalmente por Alonso de Florida y Delgado en 1958 (2).

El kindling es un modelo de plasticidad neuronal en el que pulsos subumbrales repetidos del mismo estímulo resultan a largo plazo en cambios epileptiformes generalizados en el EEG asociados con el incremento en la severidad del comportamiento convulsivo (20). En el transcurso del fenómeno se observa un avance gradual en el patrón convulsivo que conductualmente se puede distinguir por estadios convulsivos cada vez mayores hasta alcanzar la crisis convulsiva generalizada.

El kindling ha sido utilizado como modelo para el estudio de epileptogénesis, plasticidad neuronal, aprendizaje, crisis parciales y prueba de anticonvulsivantes. Muchos fármacos con actividad anticonvulsiva retardan o bloquean la adquisición del kindling (30). Entre las ventajas que ofrece el kindling están el poder controlar la intensidad de los estímulos, escoger la estructura por estimular y el no producir degeneraciones morfológicas (46).

El kindling inicialmente fue inducido por la estimulación eléctrica subumbral en la amígdala. Al implicar en el modelo la evolución progresiva de crisis más severas como respuesta a la administración periódica de un estímulo constante, el kindling puede ser inducido por una variedad de fármacos o incluso el electroshock (46). La respuesta a los estímulos depende del sitio de estimulación, fármaco utilizado, especie, cepa, sexo y edad del animal.

La respuesta final del kindling es la crisis convulsiva generalizada o "estado kindling". Una vez establecido el kindling, una futura estimulación provocará la respuesta máxima incluso después de un intervalo de meses o años sin estimulación (30).

Uno de los fármacos más utilizados tanto en la producción de crisis convulsivas como en el fenómeno kindling es el pentilona-tetrazol (PTZ), un ciclopentanemetileno-tetrazol mejor conocido como metrazol o cardiazol que fue sintetizado en 1924 y cuya acción convulsiva fue demostrada por Hildebrandt en 1926 (78).

El PTZ provoca descargas en diversas estructuras del SNC y produce un trazo electroencefalográfico semejante al de las crisis del Gran Mal en el hombre. En las convulsiones producidas por PTZ las ondas bioeléctricas se suceden de una manera ininterrumpida en el electrocorticograma (fase tónica). A medida que el ataque progresa las ondas se reúnen en grupos separados por pausas cada vez más largas (fase clónica) (22).

A nivel celular el PTZ tiene efectos sobre la membrana de las neuronas, reduce selectivamente la conductancia al cloro, anión utilizado en la comunicación celular de tipo inhibitor por neurotransmisores como el ácido γ -aminobutírico (GABA). De esta manera el PTZ incrementa la excitabilidad del SNC al reducir la inhibición (53).

El PTZ fue utilizado para inducir el fenómeno kindling por Ito y cols. en 1977 (28). El comportamiento descrito por estos investigadores en cada estadio del patrón convulsivo fue el siguiente:

1. Sin respuesta convulsiva.
2. Mioclonías faciales, del cuello y de los miembros anteriores.
3. Extensión tónico-clónica del animal con mioclonías bilaterales de los miembros anteriores.
4. Levantamiento del cuerpo apoyado en los miembros posteriores del animal con movimientos clónicos continuos durante el levantamiento.
5. Crisis convulsivas generalizadas con la conducta descrita en el estadio 4 más pérdida del equilibrio y caída del animal (28).

III.3. Relación entre la Glándula Pineal, la Melatonina y la Excitabilidad del Sistema Nervioso Central.

La participación de la GP y las indolaminas secretadas por ésta en la regulación y estabilización de la actividad eléctrica del SNC, se ha sugerido en varios estudios que datan desde inicios de la década de 1960.

En 1964, Roldán y cols. (67) administraron vía intravenosa (iv) 5 mg de un extracto acuoso de GP de bovinos a gatos en preparación "encéfalo aislado"; 5 segundos después de la administración, observaron desincronización progresiva del EEG que incluía la aparición de ondas de alto voltaje en los núcleos paraventricular y periventricular del hipotálamo, así como un aplanamiento en la actividad del núcleo habenular, la corteza motora y la formación reticular mesencefálica. Los cambios observados finalizaron 20 minutos después.

En 1965, Bindoni y Rizzo (10) registraron un patrón epileptiforme en el hipocampo de conejos pinealectomizados.

Tres años después Roldán y Antón Tay (68) provocaron crisis convulsivas en gatos mediante estimulaciones de tipo eléctrico, auditivo y químico, esta última con PTZ. Posteriormente administraron vía iv extractos de GP (2 a 5 mg); 20 segundos después

observaron una disminución en la amplitud de los potenciales evocados auditivos, así como una abolición en las crisis inducidas por la estimulación eléctrica entre 15 y 45 minutos después, con una duración del efecto entre 6 y 9 horas. No observaron cambios en las crisis inducidas por PTZ.

Nir y cols. (51) en 1969 pinealectomizaron ratas hembras. Tres semanas después, registraron la actividad eléctrica cerebral durante intervalos de 5 minutos. En un principio encontraron ondas monorrítmicas de alta frecuencia (8 a 10 c/seg) y baja amplitud (35 a 75 μ v); posterior a esta actividad basal se presentó una tendencia a la sincronización con descargas paroxísticas generalizadas que se presentaron esporádicamente. Estas descargas registradas en la corteza cerebral estaban compuestas de ondas lentas (2 a 4 c/seg), de gran amplitud y son semejantes a las registradas durante las convulsiones.

En 1971, Antón-Tay y cols. (5) encontraron una disminución en la actividad paroxística en pacientes epilépticos en las primeras 4 horas que siguieron a la administración de MEL (1.25 mg/kg) por vía iv.

Para 1973, Reiter y cols. (60) encontraron que la pinealectomía practicada en ratas paratiroidectomizadas una semana antes, produce crisis convulsivas repetidas durante las 48 horas siguientes a la remoción de la GP. La primera crisis se presentó 4 horas después de la manipulación quirúrgica y el pico de incidencia máxima de convulsiones se observó a las 8 horas. Estos hallazgos fueron corroborados 10 años después por Stockmeier y Blask (77).

En 1976, Fariello y Bubenik (17) produjeron una actividad epileptiforme mediante la aplicación de convulsivantes en diferentes regiones del cerebro de gatos. Administraron diferentes dosis de MEL (50 a 1000 μ g/kg) vías intraperitoneal (ip), intracisternal (ic) e (iv). A pesar de que no observaron cambios en la actividad epileptiforme, en áreas corticales y estructuras límbicas, cuando el foco epiléptico estaba localizado en áreas sensoriales primarias y éstas eran estimuladas 10 minutos después de la administración de MEL, observaron la reducción o la supresión de la actividad sensorial evocada por la actividad epileptiforme.

Ese mismo año, Brailowski (11) provocó convulsiones en el mandril senegalés *Papio papio* mediante la estimulación fónica intermitente, posteriormente administró MEL iv en dosis de 5, 10, 20 y 50 mg/kg. No se modificó la respuesta a la estimulación fónica ni hubo prevención de las crisis convulsivas generalizadas, pero se encontró un aumento en la latencia de aparición de las crisis con las dosis de 20 y 50 mg/kg.

En 1978, Philo y Reiter (54) pinealectomizaron a gerbos de la especie Meriones unguiculatus y 30 minutos después de la maniobra quirúrgica observaron los primeros signos de actividad convulsiva. Los animales fueron observados durante 3 horas y el 100% de ellos presentó crisis convulsivas.

En 1981, Albertson y cols. (1) trabajaron con dos esquemas de kindling en rata, durante un mes aplicaron cada tercer día estímulos subumbrales de tipo eléctrico (trenes de 60 c/seg durante un milisegundo con 400 uámperes de amplitud en la amígdala), y de tipo químico (PTZ 30 mg/kg vía ip), al llegar al estado kindling establecido, los animales se estimularon por 3 días consecutivos. Aquellos que respondieron con crisis convulsivas generalizadas y postdescargas estables fueron inyectados al día siguiente con MEL (50, 100, 150 y 200 mg/kg vía ip) y una hora después fueron estimulados eléctrica o químicamente para evaluar conductual y electroencefalográficamente el papel anticonvulsivo de la MEL. En este mismo estudio utilizaron anticonvulsivantes conocidos para comparar el efecto de MEL. En el kindling eléctrico las dosis de 100 a 200 mg/kg de MEL disminuyeron tanto la duración de las postdescargas como el rango promedio de crisis, sin embargo las dosis de 150 y 200 mg/kg provocaron ataxia y sedación. Tanto en este esquema como en la estimulación química, la dosis de 50 mg/kg de MEL no tuvo efecto. En el caso del kindling químico, las dosis más altas de MEL (150 y 200 mg/kg) provocaron un decremento en el rango promedio de crisis convulsivas aunque la dosis más alta ocasionó ataxia. El efecto anticonvulsivo de estas dosis fue similar al encontrado con antiepilépticos conocidos como el diazepam (2.5 mg/kg) y el fenobarbital (30 mg/kg). Con estos resultados los autores sugirieron que la MEL podría tener una posible propiedad anticonvulsiva.

SEGUNDA PARTE.

IV.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La mayoría de los estudios acerca de la relación entre la GP, la MEL y la actividad epiléptica se han llevado a cabo cuando las crisis están ya establecidas, sin embargo no se había estudiado la participación de la GP y la MEL en el desarrollo de las mismas.

Nuestro interés en este trabajo se dirigió hacia el estudio del papel que tienen la GP y la MEL en el desarrollo de crisis convulsivas inducidas por estimulaciones subumbrales tipo kindling, con el agente convulsivante PTZ.

Con este propósito se visualizó el problema desde tres perspectivas experimentales.

Con base en los antecedentes que destacan a la MEL como un posible anticonvulsivante, se decidió valorar el efecto del incremento en los niveles de MEL en la rata producido por la administración exógena de esta indolamina en tratamientos agudos y crónicos. En estos últimos se probó un esquema de administración de MEL utilizado en otros modelos experimentales que consiste en la aplicación de la hormona 3 veces al día durante el periodo luminoso con el objeto de proporcionar a los animales pulsos de MEL a lo largo del día.

Las dosis de MEL utilizadas tanto en los tratamientos agudos como en los crónicos han demostrado tener efectos tanto a nivel bioquímico como fisiológico en el SNC, y son mucho menores a las empleadas en otros trabajos donde se intenta relacionar a la MEL con la excitabilidad del SNC.

En el segundo enfoque experimental se evaluó la importancia que tienen tanto la integridad de la GP como la presencia de MEL endógena en el desarrollo de las crisis convulsivas. En el primer caso se removió quirúrgicamente la GP, con lo que además de eliminar la MEL circulante de los animales, se alteraron los procesos fisiológicos relacionados con la GP.

En el segundo caso se inhibió la síntesis de MEL al someter a los animales a condiciones de luz constante. De esta manera también se eliminó la MEL circulante pero sin dañar a la GP.

Finalmente con el objeto de tener un mejor correlato entre la actividad biológica de la MEL y la excitabilidad del SNC, se analizó el efecto convulsivante del PTZ en el momento que se produce, de manera fisiológica, la mayor secreción de MEL en la rata, es decir a la mitad del escotoperíodo.

Con las estrategias plantadas se pretendió contar con un panorama de la participación de la GP y la MEL en el desarrollo de las crisis convulsivas, lo cual está relacionado con la probable función que tienen la MEL u otras sustancias secretadas por la GP en la excitabilidad del SNC.

IV.2. OBJETIVOS.

- El objetivo central de este trabajo fue el conocer el papel que desempeñan la GP y la MEL en el desarrollo de crisis convulsivas producidas en la rata mediante la administración del agente convulsivante PTZ.
- Conocer el efecto de la administración exógena de MEL en el desarrollo de las crisis convulsivas.
- Comparar la efectividad de los tratamientos agudos de MEL con los tratamientos crónicos de esta indolamina en el desarrollo de crisis convulsivas en la rata.
- Evaluar el desarrollo de crisis convulsivas en ratas pinealectomizadas y en ratas mantenidas en condiciones de luz constante.
- Valorar el efecto convulsivante del PTZ a dos horas distintas del día, a la mitad del fotoperíodo, cuando no hay secreción de MEL y en el momento que se da la producción más alta de esta indolamina en la rata, es decir a la mitad del escotoperíodo.

IV.3. HIPOTESIS DE TRABAJO.

Con base en los antecedentes expuestos en la primera parte de esta tesis, en los que se destacan una posible función de tipo inhibidor de la GP sobre la actividad eléctrica del SNC y un cierto papel protector de la MEL ante las crisis convulsivas, se propone que:

1. Los animales tratados con MEL presenten un retardo en el desarrollo de las crisis convulsivas y/o alcancen un rango promedio de crisis menor a los grupos tratados con vehículo y los controles naturales.
2. La administración crónica de MEL disminuya más claramente el desarrollo de las crisis convulsivas que la administración aguda.
3. Los animales pinealectomizados tengan un desarrollo más rápido de las crisis convulsivas y/o alcancen un estadio convulsivo mayor en relación a los grupos de operación falsa e intacto.
4. Las condiciones de luz constante produzcan un desarrollo más rápido de las crisis convulsivas y/o un rango promedio de crisis mayor que las condiciones de luz-oscuridad 12 : 12.
5. Un mayor efecto convulsivante de la administración diurna de PTZ en comparación a la administración nocturna de este fármaco.

V. MATERIALES Y METODOS.

V.1. Condiciones Generales.

En este trabajo se utilizaron 140 ratas Wistar macho con un peso entre 250 y 300 g, mantenidas a 22 C y con un ciclo luz-oscuridad 12 : 12, el periodo luminoso se inició a las 6:00 h y terminó a las 18:00 h, a excepción de los animales que permanecieron en condiciones de luz constante. Los animales se agruparon en cajas transparentes de polipropileno (45 x 35 x 20 cm) con agua y comida ad libitum.

Las ratas fueron habituadas a las condiciones descritas, por lo menos 15 días antes de cualquier manipulación experimental. En este lapso de tiempo y durante el desarrollo del trabajo, las ratas se pesaron cada tercer día.

Los grupos utilizados en cada protocolo fueron distintos y en ningún caso se utilizó un grupo para dos pruebas.

Las manipulaciones experimentales y la distribución de los grupos fueron las siguientes:

GRUPO	TRATAMIENTO	n
1	CONTROL DEL TRATAMIENTO CON PTZ (20 mg/kg)	9
2	CONTROL DEL TRATAMIENTO CON PTZ (30 mg/kg)	8
3	CONTROL DEL TRATAMIENTO CON PTZ (40 mg/kg)	10
4	MEL. AGUDA 250 ug PTZ (30 mg/kg)	7
5	VEHICULO AGUDO PTZ (30 mg/kg)	8
6	MEL. AGUDA 250 ug PTZ (40 mg/kg)	6
7	VEHICULO AGUDO PTZ (40 mg/kg)	7
8	MEL. CRONICA 250 ug PTZ (30 mg/kg)	7
9	VEHICULO CRONICO PTZ (30 mg/kg)	8
10	MEL. CRONICA 25 ug 3 VECES AL DIA PTZ (30 mg/kg)	6
11	VEHICULO CRONICO 3 VECES AL DIA PTZ (30 mg/kg)	6
12	MEL. CRONICA 25 ug 3 VECES AL DIA PTZ (40 mg/kg)	17
13	VEHICULO CRONICO 3 VECES AL DIA PTZ (40 mg/kg)	14
14	PINEALECTOMIA PTZ (30 mg/kg)	9
15	OPERACION FALSA PTZ (30 mg/kg)	4
16	LUZ CONTINUA PTZ (30 mg/kg)	6
17	ADMINISTRACION NOCTURNA PTZ (20 mg/kg)	4
18	ADMINISTRACION NOCTURNA PTZ (30 mg/kg)	4

V.2. Administración Exógena de Melatonina.

i. Tratamientos Agudos.

En este esquema experimental la MEL se administró a los grupos 4 y 6 en dosis de 250 ug* por vía subcutánea (sc) a las 11:00 h, y una hora después se inyectó el PTZ por vía ip en dosis de 30 y 40 mg/kg de peso.

Paralelamente al tratamiento con MEL y para descartar algún efecto del medio en el que se disuelve esta indolamina, los grupos 5 y 7 se trataron con 0.5 ml del vehículo por vía sc una hora antes de la administración del PTZ.

A los grupos 2 y 3 que se tomaron como controles naturales, se les administró únicamente el PTZ, 30 y 40 mg/kg respectivamente a las 12:00.

Una vez administrado el PTZ, los animales tratados con MEL, Vehículo o Controles se colocaron individualmente en cajas transparentes de polipropileno (45 x 35 x 20 cm) y se evaluó la conducta de las ratas por 30 minutos.

Los estadios convulsivos de los animales se evaluaron de acuerdo a la clasificación de Ito y cols (28). El comportamiento observado en cada estadio es el siguiente:

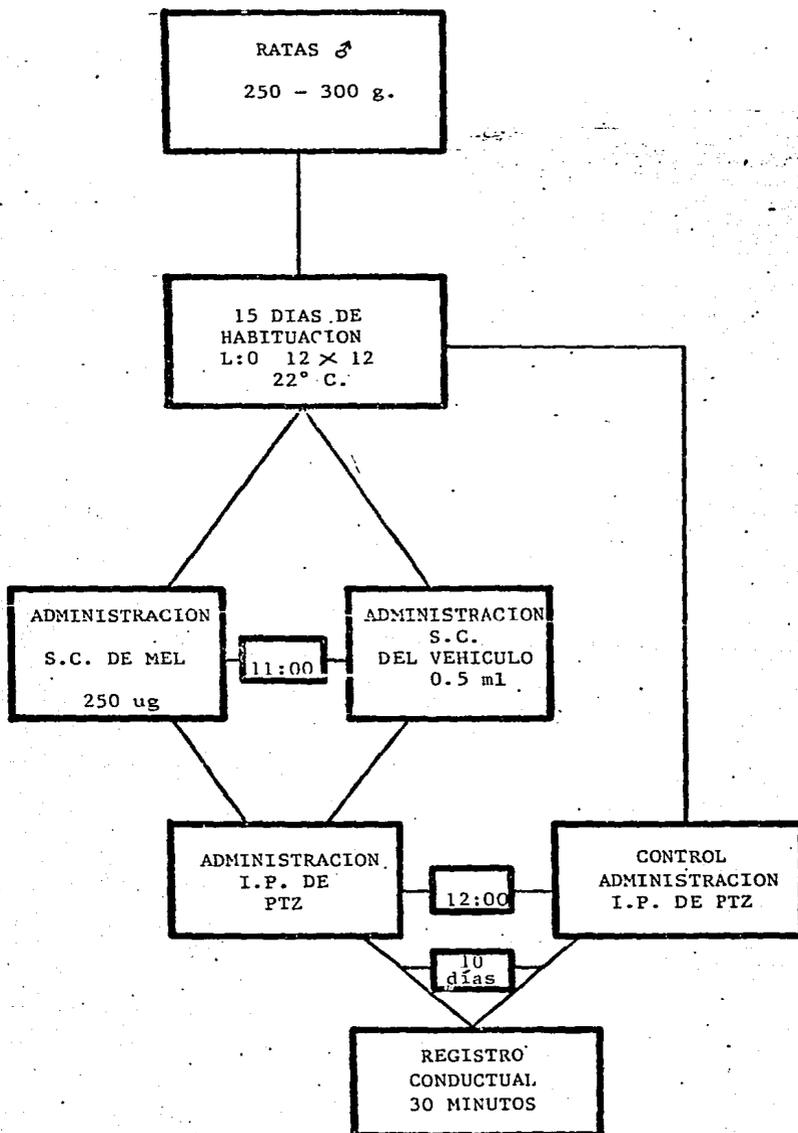
1. Sin respuesta convulsiva.
2. Mioclonias faciales, del cuello y de los miembros anteriores.
3. Extensión tónico-clónica del animal con mioclonias bilaterales de los miembros anteriores.
4. Levantamiento del cuerpo apoyado en los miembros posteriores con movimientos clónicos continuos durante el levantamiento.
5. Crisis convulsivas generalizadas con la conducta descrita en el estadio 4 más pérdida del equilibrio y caída del animal.

Después del registro conductual los animales se regresaron a las cajas en las que estaban agrupados.

El esquema de tratamiento antes mencionado se llevó a cabo por 10 días consecutivos (Fig.5).

* PREPARACION DE SOLUCIONES EN EL APENDICE "A".

FIG. 5. ESQUEMA DE LA METODOLOGIA UTILIZADA EN LOS TRATAMIENTOS AGUDOS



11. Tratamientos Crónicos.

Los animales se pretrataron diariamente con MEL (25 y 250 ug) administrada 15 días antes de la aplicación del PTZ. La dosis de 250 ug de MEL se administró al grupo 8, una vez al día a las 11:00 h. A partir del día 16 el procedimiento utilizado fue el mismo que el de los tratamientos agudos. La MEL en dosis de 25 ug se administró 3 veces al día a los grupos 10 y 12, en el inicio (8:00 h); a la mitad (11:00 h); y al final del fotoperíodo (17:00 h). Después del pretratamiento, el esquema experimental seguido fue el mencionado para la administración aguda.

Al igual que en los tratamientos agudos, en el esquema de administración crónica, se contó con grupos de ratas controles 2 y 3 y tratadas con vehículo 9, 11 y 13, en los que se empleó la metodología usada en los animales tratados con MEL (Fig.6).

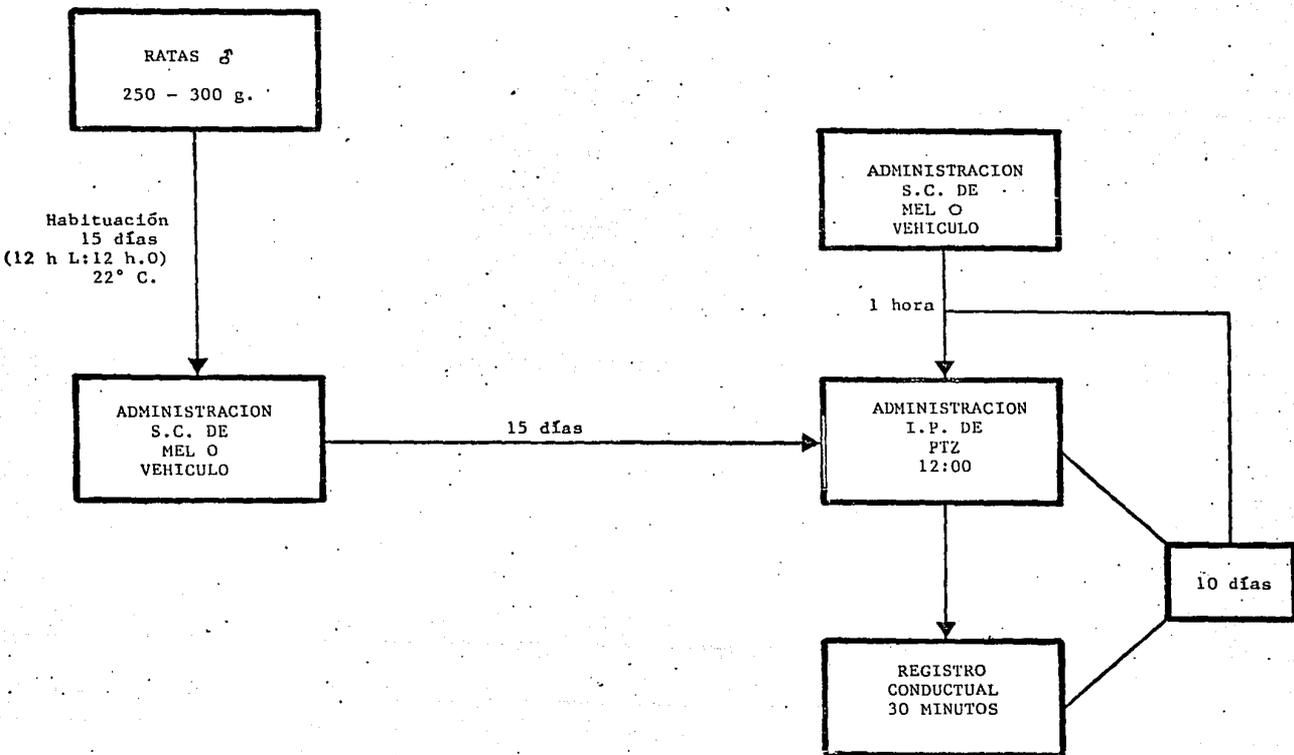
V.3. Manipulación Quirúrgica y Depleción de los Niveles de Melatonina.

i. Pinealectomía.

Esta maniobra experimental se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Hoffman y Reiter en 1965 (26).

1. Las ratas del grupo 14 fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (40 mg/kg) administrado ip.
2. Tres minutos después se retiró el pelo de la parte superior de la cabeza.
3. Los animales se montaron en un aparato estereotáxico; con un bisturí se efectuó una incisión anteroposterior en el cuero cabelludo a lo largo de la línea media. Cuidadosamente se hizo a un lado el tejido conjuntivo hasta llegar a la base del cráneo. Las suturas y los senos venosos son ya visibles a través de éste.
4. Al estar el cráneo despejado de membranas, se realizó un trepano con una fresa dental sujeta a un taladro, 1 mm posterior a la sutura.
5. Por ser una zona fuertemente irrigada, debido a la confluencia de los senos longitudinales y transversales, los animales sangran de inmediato por lo que fue necesario aspirar la sangre con un equipo de vacío para tener un mejor panorama de la zona.
6. En el orificio se introdujeron unas pinzas oftalmológicas abiertas para la remoción de la GP. Al estar adentro las pinzas se cerraron, se tomó el tallo de la glándula para jalar hacia afuera y así extraerla. Por su color, forma y posición

FIG. 6. ESQUEMA DE LA METODOLOGÍA UTILIZADA EN LOS TRATAMIENTOS CRONICOS.



puede ser removida facilmente y sin peligro de confusión con otras estructuras.

7. Inmediatamente después de la obtención de la glándula se puso gelatina purificada en el lugar del trepano para detener el sangrado.
8. Una vez efectuada la hemostasia, se untó una pomada con neomicina para prevenir infecciones.
9. Posteriormente se unió la piel y se hizo una sutura con una aguja curva y seda quirúrgica de "00".
10. Los animales se colocaron por 4 horas en una caja de polipropileno en un lugar caliente ya que el anestésico utilizado produce hipotermia.
11. Finalmente los animales se regresaron a las cajas en las que estaban agrupados en el cuarto del bioterio, bajo las condiciones ambientales antes descritas.

ii. Operación Falsa.

Esta maniobra experimental se efectuó en el grupo 15. En ella se desarrollaron las actividades señaladas en los puntos: 1,2,3,4,9,10 y 11 de la sección anterior, sólo que en este caso no se obtuvo la GP y por otro lado se evitó el sangrado del animal ya que se tienen evidencias de que el simple sangrado en esa zona puede deaferentar a la GP (26).

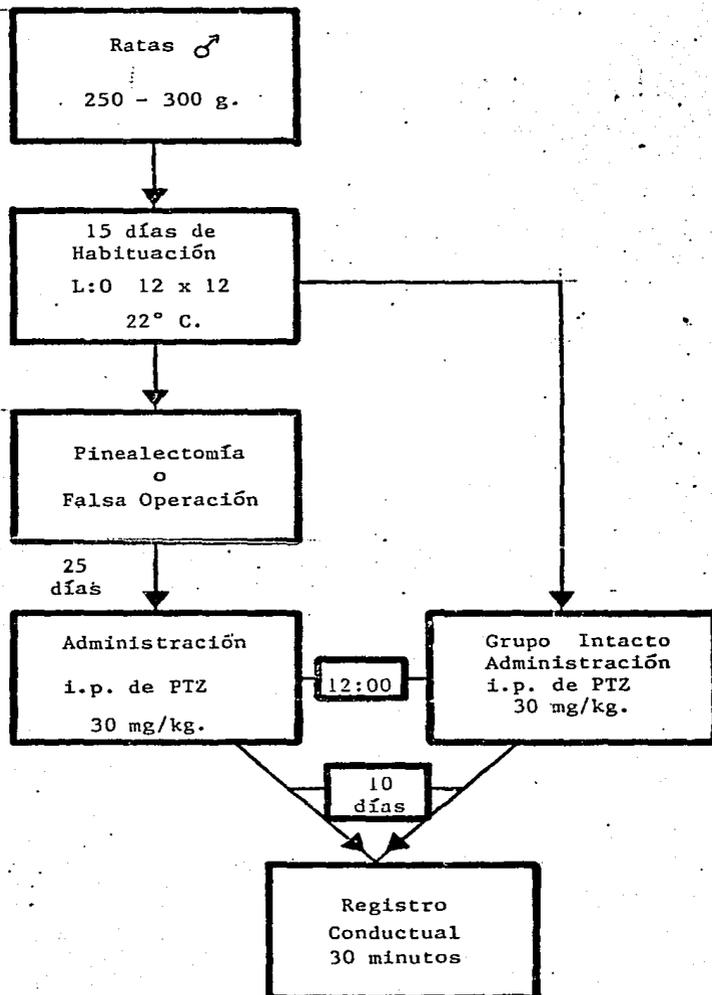
iii. Inducción de las Crisis Convulsivas en los grupos con Manipulación Quirúrgica.

Tanto el grupo pinealectomizado como el grupo de operación falsa se mantuvieron en recuperación de la cirugía durante 25 días, después de los cuales se administró por vía ip el PTZ (30 mg/kg) a las 12:00 h. El otro control en este caso fue un grupo intacto sin operación, (grupo 2) al que solamente se le aplicó el PTZ.

Después de la administración del PTZ, los animales se dispusieron individualmente en cajas transparentes de polipropileno (45 x 35 x 20 cm) y se efectuó el registro conductual correspondiente por 30 minutos durante 10 días consecutivos (Fig.7).

Al concluirse el trabajo experimental los animales se decapitaron bajo anestesia para verificar la ausencia o presencia de la GP en los grupos pinealectomizado y falsamente operado. La comprobación se llevó a cabo mediante la observación macroscópica del cerebro.

Fig. 7. ESQUEMA DE LA METODOLOGIA UTILIZADA EN LA
MANIPULACION QUIRURGICA



iv. Inducción de las Crisis Convulsivas en Ratas Mantenido en Luz Constante.

En este esquema experimental los animales del grupo 16 se mantuvieron en condiciones de luz constante durante 15 días, después de los cuales se administró el PTZ (30 mg/kg) por vía ip a las 12:00 h durante 10 días consecutivos. Diariamente se evaluó la conducta de las ratas durante 30 minutos. Durante todo el estudio los animales permanecieron en condiciones de luz constante.

V.4. Estimulaciones Diurna y Nocturna con Pentileno-tetrazol.

La metodología utilizada en esta fase experimental fue la siguiente: se administró ip el PTZ (20 y 30 mg/kg) a los grupos 1 y 2 respectivamente a la mitad del fotoperíodo 12:00 h y a los grupos 17 y 18 a la mitad del escotoperíodo 24:00 h. Después de la inyección del PTZ, las ratas se colocaron individualmente en cajas transparentes de polipropileno de las medidas ya señaladas y se registró la conducta de los animales por 30 minutos con la evaluación respectiva del comportamiento convulsivo durante 10 días seguidos (Fig.8).

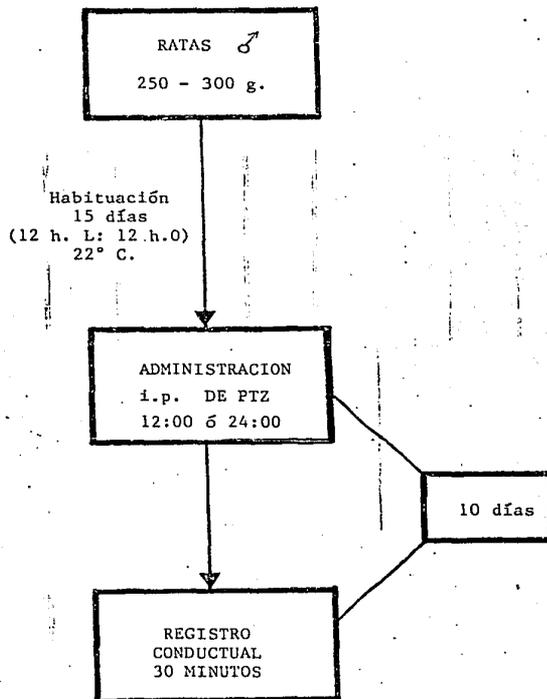
En el trabajo nocturno se utilizó luz roja como fuente de iluminación para evitar la inhibición de la síntesis de MEL con el uso de luz blanca.

V.5. Análisis de los Datos.

El criterio para la evaluación de los estadios convulsivos fue el descrito por Ito y cols. (26) por ser claro, fácil de aplicar y ampliamente usado por numerosos grupos de trabajo.

Para el análisis estadístico se utilizaron pruebas no paramétricas ya que solamente se conocen algunas características de la función de distribución de la población y los datos obtenidos pertenecen a una escala ordinal, por lo que existe un orden lógico de intensidad en su manifestación, pero no se puede precisar el lugar exacto de cada modalidad ni los puntajes son verdaderamente numéricos (47).

FIG.8. ESQUEMA DE LA ESTIMULACION DIURNA Y NOCTURNA CON PENTILENETETRAZOL.



Las pruebas utilizadas fueron las siguientes:

- Prueba de Kolmogorov-Smirnov; con el fin de conocer la forma de distribución de los datos.
- Prueba de Correlación de Spearman; para detectar el avance en el desarrollo de los estadios convulsivos en el transcurso del tiempo.
- Prueba de Análisis de Varianza por Rangos de Kruskal-Wallis; para comparar los estadios convulsivos de 3 grupos. Por ejemplo: Pinelectomizado, Operado Falsamente e Intacto.
- Prueba de U de Mann-Whitney; para analizar los estadios del patrón convulsivo en dos grupos experimentales. Por ejemplo: Administración Diurna de PTZ vs Administración Nocturna.
- Prueba Exacta de Fisher; para conocer las diferencias existentes en el porcentaje de ratas que presentaron crisis convulsivas generalizadas en dos grupos experimentales. Se consideró como crisis convulsiva generalizada la conducta representada en los estadios 4 y 5 de la escala de Ito y cols (28).

La significancia de las pruebas estadísticas se obtuvo de las Tablas de Probabilidad recopiladas por Siegel en 1980 (76).

Para los fines específicos del trabajo los resultados obtenidos se agruparon en dos periodos de tiempo para su análisis, del primero al quinto día y del sexto al décimo día de estimulación con PTZ.

Este agrupamiento se basó tanto en la homogeneidad de las conductas observadas en esos periodos de tiempo como en los resultados obtenidos en la prueba de correlación de Spearman que muestran un avance en el desarrollo de los estadios convulsivos conforme transcurre el tiempo de estimulación.

VI. RESULTADOS.

Generalidades.

Los resultados del presente estudio se basan en el trabajo experimental realizado con 140 ratas macho de la cepa Wistar.

En términos generales, todos los grupos presentaron los estadios convulsivos descritos por Ito y cols. (28) para la administración subumbral repetida con PTZ.

El avance progresivo en la severidad de las crisis en el transcurso del tiempo se observó en la mayoría de los grupos. Tal avance que se muestra en las diferentes tablas y figuras, se ve reflejado tanto en el rango promedio de crisis (estadio convulsivo promedio) como en el porcentaje de ratas que presentaron crisis convulsivas generalizadas (estadios 4 y 5) en la escala de Ito y cols (28). Solamente en los tratamientos con la dosis de PTZ (20 mg/kg) no se observó un avance significativo en el desarrollo de las crisis.

i. Administración Exógena de Melatonina.

a) Tratamientos Agudos.

Los grupos tratados con MEL 250 ug de manera aguda no presentaron diferencias significativas respecto a los grupos Control y Vehículo ni en el rango promedio de crisis (RPC) ni en el porcentaje de animales que presentaron las crisis convulsivas generalizadas (PACG).

En los ensayos con PTZ 30 mg/kg, el grupo tratado con MEL tuvo el mismo RPC que el grupo tratado con Vehículo durante los primeros 5 días de estimulación (Tabla I). El valor obtenido (2.1) fue ligeramente mayor al del grupo Control (1.975), sin que tal diferencia fuera significativa. Para el segundo período de tiempo, los grupos MEL y Vehículo presentaron nuevamente estadios superiores al grupo Control aunque las diferencias tampoco fueron significativas. En este caso el grupo Vehículo alcanzó un estadio convulsivo promedio (2.725) mayor que el grupo MEL (2.485).

En lo que respecta al PACG los datos son similares en los tres grupos (Tabla II). Se observa que para el segundo período de tiempo aumenta al doble el PACG.

TABLA I. ESTADIOS DE LAS RATAS TRATADAS CON PTZ 30 mg/kg. (\bar{X} +D.S.).

DIAS	CONTROL n=8	VEHICULO AGUDO n=8	MELATONINA AGUDA 250 ug n=7
1 - 5 *	1.975 \pm 0.357	2.1 \pm 0.462	2.142 \pm 0.285
6 - 10*	2.350 \pm 0.162	2.725 \pm 0.389	2.485 \pm 0.588

* En ningún caso hubo diferencias significativas. Prueba de Kruskal-Wallis.

Tabla I. El rango promedio de crisis (RPC) del grupo tratado con MEL de manera aguda fue muy similar al alcanzado por los otros dos grupos durante los primeros cinco días de estimulación con PTZ (30 mg/kg). En el segundo período de tiempo el RPC del grupo MEL fue mayor al del grupo Control.

TABLA II. PORCENTAJE DE RATAS QUE PRESENTARON CRISIS (ESTADIOS 4 Y 5)
DURANTE EL TRATAMIENTO CON PTZ (30 mg/kg).

DIAS	CONTROL n=8	VEHICULO AGUDO n=8	MELATONINA AGUDA 250 ug n=7
1 - 5	7.5	10.0	8.5
6 - 10	12.5	20.0	14.2

Tabla II. En los tres grupos analizados, el porcentaje de animales con crisis convulsivas generalizadas (PACG) aumentó casi al doble en el segundo período de tiempo. Las diferencias intergrupo no fueron significativas. Prueba Exacta de Fisher.

En los primeros 5 días de estimulación con PTZ 40 mg/kg, el grupo MEL tuvo un RPC (2.75) menor a los grupos Control y Vehículo, aunque las diferencias no fueron significativas (Tabla III). Como en el caso de la estimulación con PTZ 30 mg/kg, el grupo Vehículo presentó un estadio convulsivo promedio mayor que los otros dos grupos.

Del sexto al décimo día, los grupos MEL y Vehículo alcanzaron el mismo RPC (4) que fue mayor al del grupo Control (3.12) sin que la diferencia fuera significativa.

El PACG para esta dosis de PTZ aumentó considerablemente en los grupos MEL y Vehículo (Tabla IV); el grupo control mostró un aumento muy ligero. Entre los grupos no hubo diferencias significativas.

b) Tratamientos Crónicos.

La administración crónica de MEL tuvo diferentes efectos. La dosis de Mel 250 ug no produjo ningún cambio significativo en el desarrollo de las crisis convulsivas (Tabla V). En los primeros 5 días el RPC fue similar al del grupo Control, sin embargo el grupo Vehículo alcanzó un RPC mayor que los otros dos grupos, siendo significativa esta diferencia ($p < .049$).

En el segundo lapso de tiempo, el RPC más alto fue el alcanzado por el grupo MEL (2.685); no hubo un incremento en el RPC del grupo Vehículo. El PACG aumentó en el segundo período de tiempo en los grupos Control y MEL, más no en el grupo Vehículo, lo cual coincide con el avance nulo en el RPC de este grupo (Tabla VI).

El grupo tratado con 25 ug de MEL administrada 3 veces al día en el caso de la estimulación con PTZ 30 mg/kg alcanzó un RPC menor al de los otros dos grupos (Tabla VII, Fig 9.). Las diferencias significativas se encontraron únicamente entre el grupo MEL y el Control ($p < .009$) en el segundo período de tiempo.

El PACG fue menor en el grupo MEL, en el que ningún animal presentó estadios 4 ó 5 (Tabla VIII). En el grupo Control hubo un incremento del 83% mientras que el grupo Vehículo no mostró aumento en el PACG.

TABLA III. PORCENTAJE DE RATAS QUE PRESENTARON CRISIS (ESTADIOS 4 Y 5)
DURANTE EL TRATAMIENTO CON PTZ (30 mg/kg)

DIAS	CONTROL n=8	VEHICULO AGUDO n=8	MELATONINA AGUDA 250 ug n=7
1 - 5	7.5	10	8.5
6 - 10	12.5	20.	14.2

Tabla III. El grupo MEL presentó el RPC más bajo durante los primeros cinco días de estimulación con PTZ 40 mg/kg. En el segundo lapso de tiempo el RPC tanto del grupo MEL como del grupo Vehículo fue idéntico, lo mismo que la desviación estándar que fue igual a cero. Lo anterior se debió a que en el sexto día los animales alcanzaron el "estado kindling" establecido por lo que ya no se estimularon.

TABLA. IV. PORCENTAJE DE RATAS QUE PRESENTARON CRISIS (ESTADIOS 4 Y 5)
DURANTE EL TRATAMIENTO CON PTZ 40 mg/kg

<u>D I A S</u>	<u>CONTROL</u> n=10	<u>VEHICULO</u> <u>AGUDO</u> n=7	<u>MELATONINA</u> <u>AGUDA 250 ug</u> n=6
1 - 5	36.0	54.7	30.3
6 - 10	42.0	100.0	100.0

Tabla IV. El PACG aumentó considerablemente en los grupos MEL y Vehículo más no así en el grupo Control que tuvo un incremento ligero. En los grupos MEL y Vehículo el PACG fue de 100 debido a que los animales llegaron el "estado kind ling". No hubo diferencias significativas. Prueba Exacta de Fisher.

TABLA.V. ESTADIOS DE LAS RATAS TRATADAS CON PTZ 30 mg/kg. ($\bar{X} \pm D.S.$)

DIAS	CONTROL n=8 a	VEHICULO CRONICO n=8 b	MELATONINA CRONICA 250 ug n = 7 c	TRATAMIENTO ESTADISTICO. PRUEBA DE KRUSKALL-WALLIS
1 - 5 (')	1.975 \pm 0.357	* 2.55 \pm 0.189	1.942 \pm 0.411	a' vs b' p < .049 a'' vs b'' n s a' vs c' ns a'' vs c'' n s b' vs c' p < .049 b'' vs c'' n s
6 - 10 (")	2.350 \pm 0.162	2.5 \pm 0.088	2.685 \pm 0.274	

Tabla V. En los primeros cinco días de estimulación, el grupo MEL presentó el menor RPC, mientras que en el segundo período de tiempo tuvo el mayor. El grupo Vehículo presentó el RPC más alto en el primer lapso de tiempo.

TABLA. VI. PORCENTAJE DE RATAS QUE PRESENTARON CRISIS (ESTADIOS 4 Y 5) DURANTE EL TRATAMIENTO CON PTZ 30 mg/kg

D I A S	CONTROL n=8	VEHICULO CRONICO n=8	MELATONINA CRONICA 250 ug n=7
1 - 5	7.5	22.5	8.5
6 - 10	12.5	15	22.8

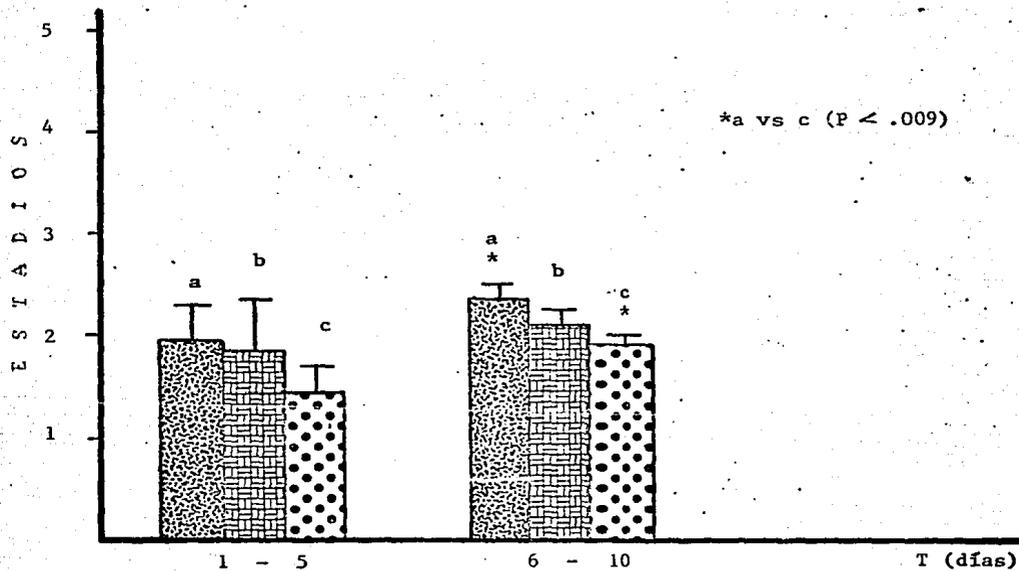
Tabla VI. El aumento encontrado en los grupos MEL y Control no se manifestó en el grupo Vehículo que incluso mostró un decremento en el PACG. Las diferencias intergrupo en los dos periodos de tiempo no fueron significativas. Prueba Exacta de Fisher.

TABLA. VII. ESTADIOS DE LAS RATAS TRATADAS CON PTZ 30 mg/kg . ($\bar{X} \pm$ D. S.)

DIAS	CONTROL	VEHICULO	MELATONINA	TRATAMIENTO ESTADISTICO. PRUEBA			
	n=8 a	CRONICO X 3 n=6 b	CRONICA 25 ug X 3 n=6 c	DE KRUSKALL-WALLIS			
1 - 5 (')	1.975 \pm 0.357	1.866 \pm 0.51	1.466 \pm 0.247	a' vs b'	ns	a'' vs b''	ns
				a' vs c'	ns	a'' vs c''	p < .009
6 - 10 (")	2.35 \pm 0.162	2.08 \pm 0.17	*1.933 \pm 0.091	b' vs c'	ns	b'' vs c''	ns

Tabla VI. El grupo tratado con MEL 25 ug, administrada tres veces al día, tuvo el menor RPC en ambos periodos de tiempo. Sin embargo sólo hubo diferencias significativas respecto al grupo Control en el segundo periodo.

FIG. 9. RANGO PROMEDIO DE CRISIS EN LAS RATAS
DURANTE LA ESTIMULACION CON PTZ (30 mg/kg)
 $\bar{X} \pm D.S.$



Control n=8



Vehículo n=6



Melatonina n=6
 Crónica
 25 ug. X 3

TABLA VIII. PORCENTAJE DE RATAS QUE PRESENTARON CRISIS (ESTADIOS 4 Y 5)
DURANTE EL TRATAMIENTO CON PTZ 30 mg/kg

DIAS	CONTROL n=8	VEHICULO CRONICO X 3 n=6	MELATONINA CRONICA 25 ug X 3 n=6
1 - 5	7.5	6.66	0
6 - 10	12.5	3.33	0

Tabla VIII. Ningún animal del grupo MEL presentó crisis generalizadas en los 10 días de estimulación con PTZ 30 mg/kg. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas. Prueba Exacta de Fisher.

En el estudio con MEL 25 ug administrada 3 veces al día y estimulación con FTZ 40 mg/kg, los animales tratados con MEL tuvieron un RPC significativamente menor ($p < .009$) que los grupos Control y Vehículo durante los primeros 5 días de estimulación (Tabla IX, Fig. 10). Del sexto al décimo día de estimulación el RPC del grupo MEL (2.08) fue menor que el de los grupos Vehículo (3.35) y Control (3.12), aunque las diferencias no fueron significativas.

El menor PACG se registró en el grupo MEL durante los 10 días de estimulación, sin haberse encontrado diferencias significativas (Tabla X).

ii. Manipulación Quirúrgica y Depleción de los Niveles de Melatonina.

a) Pinealectomía.

Durante los 10 días de estimulación con FTZ (30 mg/kg) los animales pinealectomizados alcanzaron un RPC más alto que los grupos Intacto y de Operación Falsa (Tabla XI, Fig. 11.). Las diferencias fueron significativas durante todo el estudio ($p < .045$).

El PACG fue 3 veces mayor en el grupo pinealectomizado que en los otros dos grupos, aunque no se encontraron diferencias significativas (Tabla XII).

Ningún animal se eliminó por errores en la cirugía. Los animales pinealectomizados no presentaron GP, mientras que en el grupo de Operación Falsa, la glándula se encontró en la cubierta dural del cráneo o en una depresión cefálica anterior a los colículos superiores.

b) Luz Constante.

Las condiciones de luz constante no tuvieron efecto en el desarrollo de las crisis convulsivas (Tablas XIII y XIV). Los valores del RPC como los del PACG fueron muy similares tanto en el grupo bajo luz constante como el mantenido en las condiciones normales de luz-oscuridad 12 : 12.

TABLA. IX. ESTADIOS DE LAS RATAS TRATADAS CON PTZ 40 mg/kg. ($\bar{X} \pm$ D.S.)

DIAS	CONTROL n=10 a	VEHICULO CRONICO X 3 n=14 b	MELATONINA CRONINA 25 ug X 3 n=17 c	TRATAMIENTO ESTADISTICO. PRUEBA DE KRUSKALL-WALLIS
1 - 5 (')	3.14 \pm 0.296	2.414 \pm 0.36	*1.952 \pm 0.434	a' vs b' ns a'' vs b'' ns a' vs c' p < .009 a'' vs c'' ns
6 - 10 (")	3.12 \pm 0.228	3.364 \pm 0.362	2.883 \pm 0.544	b' vs c' p < .009 b'' vs c'' ns

Tabla IX. En los 10 de estimulación el grupo MEL presentó el RPC más bajo de los tres grupos. Las diferencias fueron significativas en los primeros cinco días de estimulación con PTZ 40 mg/kg.

FIG. 10. RANGO PROMEDIO DE CRISIS EN LAS RATAS DURANTE LA ESTIMULACION CON PTZ (40 mg/kg.) $\bar{X} \pm D.S.$

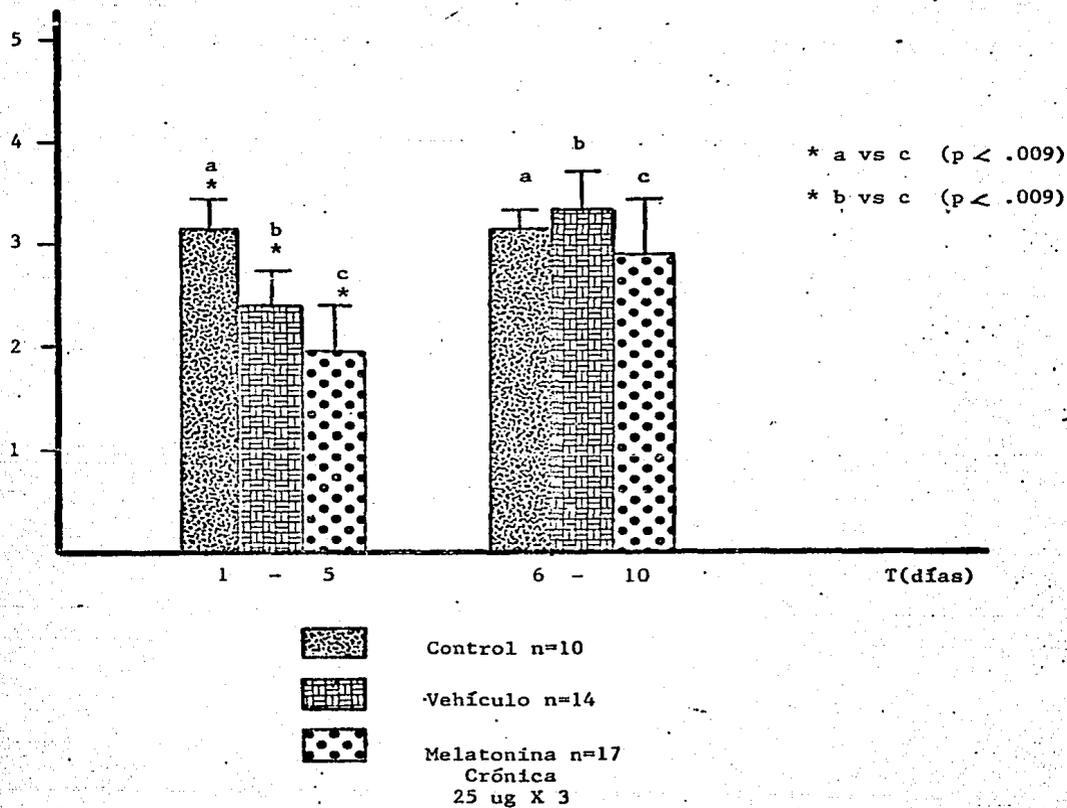


TABLA. X. PORCENTAJE DE RATAS QUE PRESENTARON CRISIS (ESTADIOS 4 Y 5)
DURANTE EL TRATAMIENTO CON PTZ 40 mg/kg.

DIAS	CONTROL n=10	VEHICULO CRONICO X 3 n=14	MELATONINA CRONICA 25 ug X 3 n=17
1 - 5	36	14.3	3.5
6 - 10	42	54	37.5

Tabla X. El menor PACG en ambos periodos de tiempo lo presentó el grupo MEL. No se encontraron diferencias significativas. Prueba Exacta de Fisher.

TABLA. XI. ESTADIOS DE LAS RATAS TRATADAS CON PTZ 30 mg/kg. ($\bar{X} \pm D.S.$)

DIAS	CONTROL INTACTO n=8 a	OPERACION FALSA n=4 b	PINEALECTOMIA n=9 c	TRATAMIENTO ESTADISTICO PRUEBA DE KRUSKALL-WALLIS
1 - 0 (')	1.975 \pm 0.357	2.15 \pm 0.223	*2.75 \pm 0.492	a' vs b' ns a'' vs b'' ns a' vs c' p < .049 a'' vs c'' p < .049
6 - 10 (")	2.350 \pm 0.162	2.55 \pm 0.37	*2.95 \pm 0.209	b' vs c' p < .049 b'' vs c'' p < .049

Tabla XI. La remoción de la GP provocó que los animales alcanzaran un RPC mas alto que los grupos Intacto y de Operación Falsa. Las diferencias fueron sig_ nificativas en los dos periodos de tiempo. El tratamiento estadistico indica que los grupos Intacto y de Operacion Falsa no son significativa_ mente distintos.

FIG. 11. RANGO PROMEDIO DE CRISIS EN LAS RATAS DURANTE LA
ESTIMULACION CON PTZ (30 mg/kg) - $\bar{X} \pm D.S.$

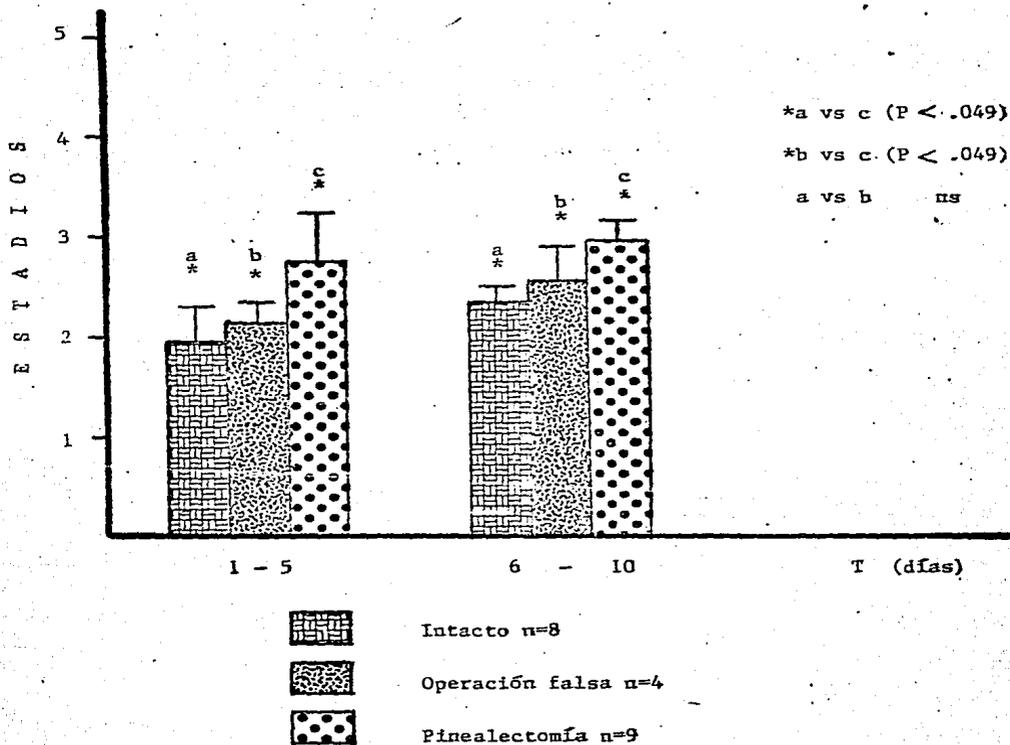


TABLA. XII. PORCENTAJE DE RATAS QUE PRESENTARON CRISIS (ESTADIOS 4 Y 5)
DURANTE EL TRATAMIENTO CON PTZ 30 mg/kg.

D I A S	CONTROL INTACTO n=8	OPERACION FALSA n=4	PINEALECTOMIA n=9
1 - 5	7.5	10	28.9
6 - 10	12.5	15	45.0

Tabla XIII. En ambos periodos de tiempo el grupo pinealectomizado presentó el mayor PACG y aunque éste fue tres veces mayor que el de los otros grupos, las diferencias no resultaron significativas. Prueba Exacta de Fisher.

TABLA. XIII. ESTADIOS DE LAS RATAS TRATADAS CON PTZ 30 mg/kg EN LAS
CONDICIONES DE MANIPULACION DEL FOTOPERIODO. ($\bar{X} \pm D.S.$)

DIAS	CONTROL RATAS EN CICLO L:O 12 X 12 n=8	LUZ CONTINUA n=6	TRATAMIENTO ESTADISTICO PRUEBA DE U. DE Mann-Whitney
1 - 5	1.975 \pm 0.357	1.799 \pm 0.439	En ningún caso hubo diferencias significativas
6 - 10	2.350 \pm 0.162	2.5 00 \pm 0	

Tabla XIII. La inhibición de la síntesis de MEL producida por las condiciones de luz constante no alteró el desarrollo de las crisis convulsivas.

TABLA. XIV. PORCENTAJE DE RATAS QUE PRESENTARON CRISIS (ESTADIOS 4 Y 5)
DURANTE EL TRATAMIENTO CON PTZ. 30 mg/kg.

DIAS	CONTROL RATAS EN CICLO L:0 12 X 12 n=8	LUZ CONTINUA n=6
1 - 5	7.5	13.33
6 - 10	12.5	16.66

Tabla XIV. La luz continua no produjo un cambio significativo respecto al grupo mantenido en condiciones de luz-oscuridad 12:12. Prueba Exacta de Fisher.

iii. Estimulaciones Diurna y Nocturna con Pentilenetrazol.

El tratamiento diurno con PTZ (20 y 30 mg/kg) fue más efectivo que el nocturno. En el caso de la estimulación con PTZ 20 mg/kg el RPC fue menor en el tratamiento nocturno (Tabla XV). La diferencia significativa ($p < .028$) se registró del sexto al décimo día de estimulación.

En ambos casos el PACB fue similar y muy pequeño (Tabla XVI). La administración nocturna no indujo crisis convulsivas generalizadas.

Como en el caso de la dosis pequeña, el PTZ (30 mg/kg) administrado a la mitad del escotoperíodo produjo un RPC menor que la administración diurna (Tabla XVII, Figs. 12 y 13.). Las diferencias fueron significativas durante todo el estudio ($p < .016$) en los primeros 5 días y ($p < .028$) en el segundo período de tiempo.

El PACB también fue menor durante la administración nocturna, sin haber diferencias significativas (Tabla XVIII).

TABLA XV. ESTADIOS DE LAS RATAS TRATADAS CON PTZ 20mg/kg. ($\bar{X} \pm D.S.$)

DIAS	ADMINISTRACION DIURNA (12:00) n=9 a	ADMINISTRACION NOCTURNA (24:00) n=4 b	TRATAMIENTO ESTADISTICO PRUEBA DE U DE Mann-Whitney
1 - 5 (')	1.244 \pm 0.253	1.1 \pm 0.136	a' vs b' ns
6 - 10 (")	1.660 \pm 0.392	*1.183 \pm 0.29	a'' vs b'' p < .028

Tabla XV. El tratamiento diurno con PTZ 20 mg/kg fue más efectivo que el nocturno. Las diferencias significativas se encontraron en el segundo lapso de tiempo.

TABLA XVI. PORCENTAJE DE RATAS QUE PRESENTARON CRISIS (ESTADIOS 4 Y 5)
DURANTE EL TRATAMIENTO CON PTZ 20 mg/kg.

DIAS	ADMINISTRACION DIURNA (12:00) n = 9	ADMINISTRACION NOCTURNA (24:00) n = 4
1 - 5	0	0
6 - 10	2.2	0

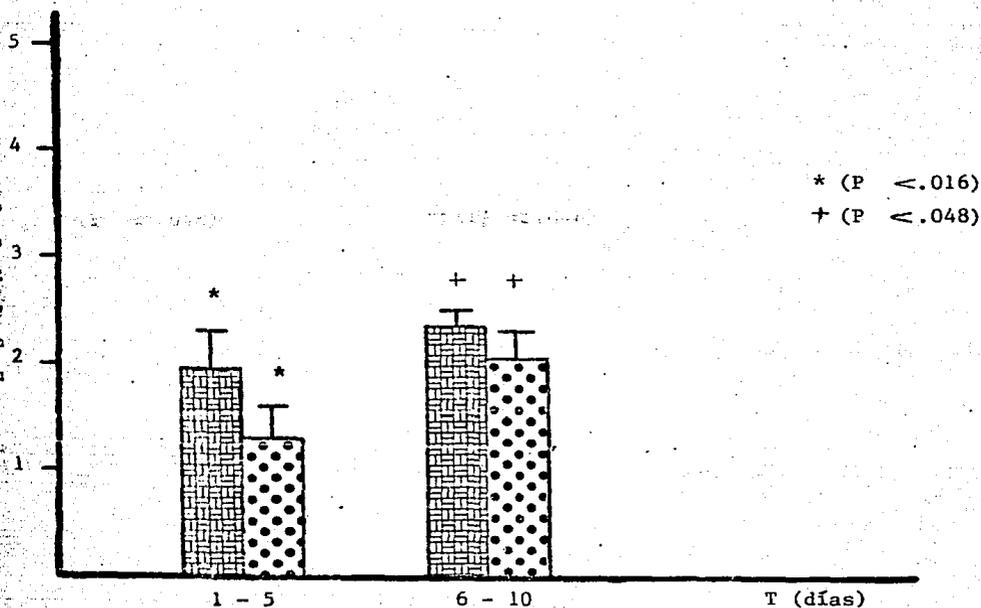
Tabla XVI. Durante la administración nocturna de PTZ 20mg/kg ningún animal presentó crisis generalizadas. La administración diurna de esta dosis en los primeros cinco días tampoco provocó crisis, mientras que en el segundo lapso de tiempo sólo una mínima parte de los animales presentó estadios 4 o 5.

TABLA.XVII. ESTADIOS DE LAS RATAS TRATADAS CON PTZ 30mg/kg. ($\bar{X} \pm$ D.S.)

DIAS	ADMINISTRACION DIURNA (12:00) n=8 a	ADMINISTRACION NOCTURNA (24:00) n=4 b	TRATAMIENTO ESTADISTICO PRUEBA DE U DE Mann-Whitney
1 - 5 (')	1.975 \pm 0.357	*1.3 \pm 0.325	a' vs b' p < .016
6 - 10 (")	2.350 \pm 0.162	*2.05 \pm 0.273	a'' vs b'' p < .028

Tabla XVII. La dosis de PTZ 30 mg/kg administrada al momento de la secreción fisiológica de MEL produjo un RPC sig_ nificativamente menor al encontrado en la adminis_ tración diurna.

FIG. 12. RANGO PROMEDIO DE CRISIS EN LAS RATAS DURANTE LA ESTIMULACION CON PTZ (30 mg/kg). $\bar{X} \pm$ D.S.



Dosis Administrada a mitad del fotoperíodo (12 hrs.) n=8



Dosis Administrada a mitad del escotoperíodo (24 hrs.) n=4

FIG. 13. CAMBIOS EN EL PATRON CONVULSIVO EN RATAS TRATADAS
 CON PTZ (30 mg/kg) $\bar{X} \pm$ E.S.

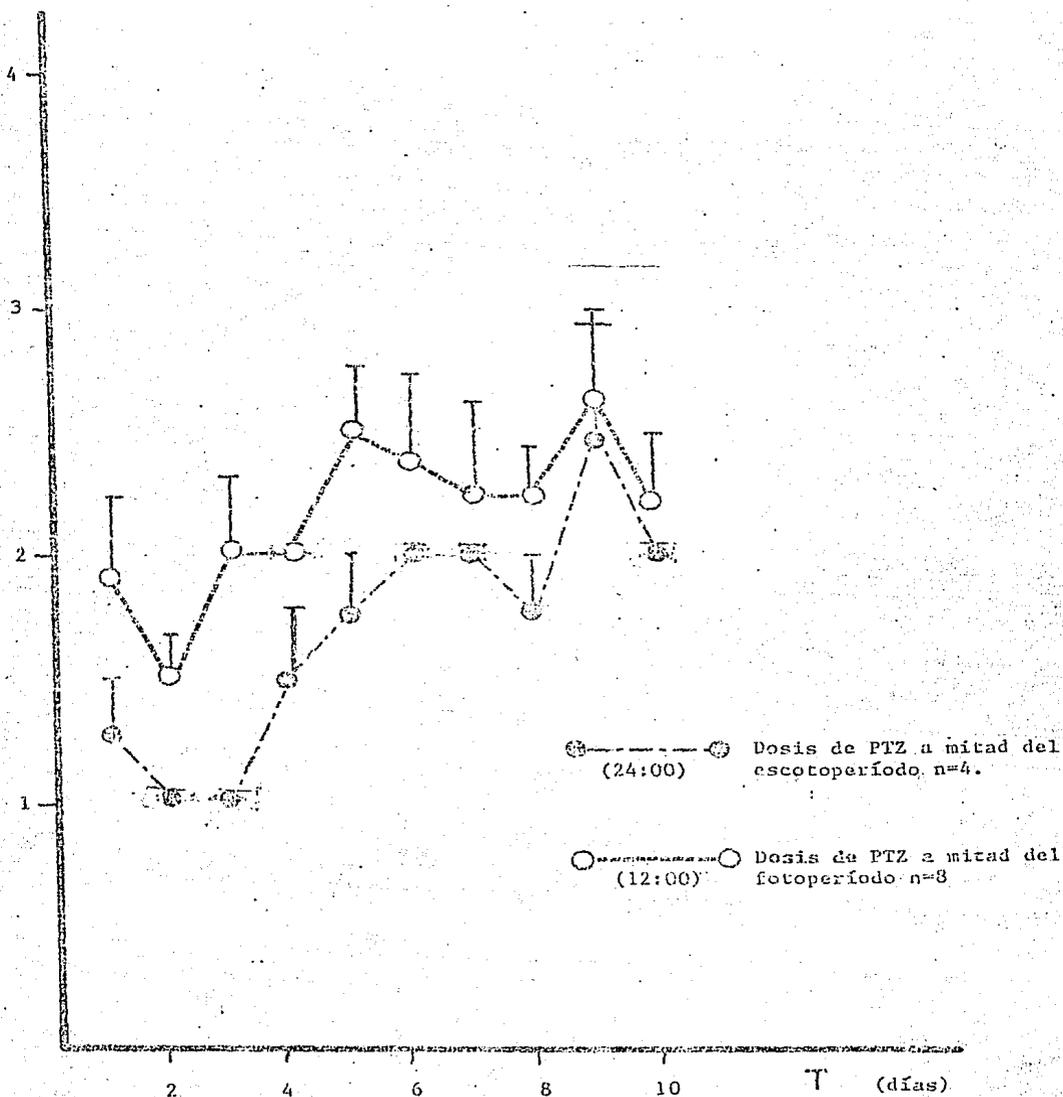


TABLA. XVIII. PORCENTAJE DE RATAS QUE PRESENTARON CRISIS (ESTADIOS 4 Y 5) DURANTE EL TRATAMIENTO CON PTZ 30 mg/kg.

DIAS	ADMINISTRACION DIURNA (12:00) n=8	ADMINISTRACION NOCTURNA (24:00) n=4
1 - 5	7.5	0
6 - 10	12.5	5

Tabla XVIII. La administración nocturna de PTZ 30 mg/kg provocó que un menor número de animales presentara estadios 4 ó 5. Las diferencias no resultaron significativas. Prueba Exacta de Fisher.

VII. DISCUSION.

i. Administración Exógena de Melatonina.

En lo que se refiere a los resultados obtenidos con la primera estrategia experimental, se observó que la administración de MEL tuvo efectos diferentes en el desarrollo de las crisis convulsivas que dependieron del esquema de tratamiento.

En el esquema agudo tanto para la dosis de PTZ 30 mg/kg como para la de 40 mg/kg no se encontró ningún cambio en el desarrollo de las crisis convulsivas (Tablas I y III).

Esta ausencia de efecto pudiera deberse al rápido catabolismo de la MEL (40), la latencia entre su administración y la estimulación con el agente convulsivante (1 hora) es suficiente para que hubiera ocurrido más del 75% de la degradación de la MEL, por lo que al momento de la estimulación con PTZ, ya no habría MEL en el SNC, aunque Albertson y cols. (1) observaron el efecto anticonvulsivo de la MEL en ese lapso de tiempo y algunos efectos de esta hormona sobre las concentraciones de GABA y monoaminas cerebrales se han reportado también 1 hora después de su administración (3,4). En estudios posteriores sería adecuado producir la estimulación con PTZ a intervalos de tiempo más cortos.

Por otro lado, si el efecto de MEL en la excitabilidad del SNC no fuera directo sino a través de la modificación en los niveles de neurotransmisores asociados con los mecanismos de epileptogénesis, como sería la elevación en las concentraciones de 5HT y GABA que causa en el mesencéfalo (3,4), este último considerado como un neurotransmisor inhibidor general dentro del SNC, llevaría a cambios más finos en la excitabilidad del SNC y no produciría un cambio tan generalizado y brusco que pudiera evitar las crisis convulsivas con un tratamiento agudo. Cabe señalar que la gran mayoría de los efectos fisiológicos reportados para la MEL no se han reproducido en tratamientos agudos.

La discrepancia entre los resultados del esquema de administración aguda encontrados en este trabajo y los reportados por Albertson y cols. en 1981 (1) donde se propone a la MEL como un agente anticonvulsivante, pudiera deberse por un lado a que en dicho trabajo las crisis estaban ya establecidas cuando se administró la MEL, y por otro lado a la diferencia en las dosis utilizadas, ya que mientras Albertson y cols. emplearon dosis farmacológicas muy altas, que incluso produjeron ataxia y sedación en las ratas, en el presente estudio las dosis de MEL son 3 ordenes de magnitud menores a las usadas por ellos, debido a que nuestro interés era utilizar dosis que tuvieran efectos bioquímicos y fisiológicos sobre el SNC y que se acercaran en lo posible a las concentraciones fisiológicas de MEL encontradas en la rata.

Por otra parte en el tratamiento agudo con la estimulación de PTZ (40 mg/kg) a diferencia del resto de los tratamientos, las estimulaciones sólo se llevaron a cabo durante 6 días, ya que a esa altura del estudio tanto los animales tratados con MEL como con Vehículo alcanzaron el "estado kindling" establecido, esta fue una de las causas que originaron la utilización de la dosis de PTZ (30 mg/kg).

En el esquema de administración crónica, el probable efecto anticonvulsivo de la MEL fue bastante moderado. Los resultados muestran un cierto retardo en el desarrollo de las crisis convulsivas ya que los grupos tratados con MEL presentaron un RPC menor comparado con sus respectivos grupos Control y Vehículo durante los primeros 5 días de tratamiento con PTZ, las diferencias fueron significativas en el caso del grupo tratado con 25 ug de MEL, 3 veces al día y PTZ en dosis de 40 mg/kg de peso (Tabla IX).

En los otros dos casos aunque no se encontraron diferencias significativas, los estadios convulsivos fueron menores en los grupos tratados con MEL (tablas V y VI).

En los ensayos con MEL 25 ug 3 veces al día y PTZ (30 mg/kg) hubo diferencias significativas entre el grupo tratado con MEL y el Control durante el segundo periodo de tiempo, más no hubo diferencias significativas con respecto al Vehículo (Tabla VII). Sin embargo, en términos generales para el segundo periodo, que abarcó del sexto al décimo día de estimulación con PTZ, la MEL no alteró el desarrollo de las crisis convulsivas.

El efecto de la administración crónica de MEL observado únicamente en los primeros 5 días de tratamiento con PTZ, pudiera indicar que esta indolamina actúa a un nivel fino de la excitabilidad del SMC, quizá modulando la actividad de las estructuras participantes en el mantenimiento de tal excitabilidad y no a través de un cambio generalizado en la excitabilidad del SNC que pudiera llegar a proteger al organismo de una crisis convulsiva generalizada en la que se ve alterada la comunicación no tan sólo en el SNC sino también en el Sistema Nervioso Autónomo por la acción en este caso del PTZ, que entre los efectos que tiene en la comunicación neural está el reducir la respuesta de los neurotransmisores que actúan a través del canal de cloro como el GABA (53).

El efecto del pretratamiento crónico con MEL pudiera implicar cambios en la plasticidad neuronal en los que probablemente se elevarían las actividades gabaérgica, serotoninérgica, de péptidos opiáceos o se disminuirían los niveles de neurotransmisores excitadores como la acetilcolina y el glutamato. Los mecanismos que mediarían estos procesos no se conocen, el cambio puede presentarse a nivel de síntesis, almacenamiento, conductancias

iónicas, liberación, captura, degradación o sensibilización de receptores pre y postsinápticos.

Los estudios con los receptores para MEL recientemente descritos podrían ser una herramienta importante en la elucidación de los mecanismos de acción de esta sustancia (42).

En lo que respecta a la efectividad de los tratamientos crónicos, se observa que la dosis de 25 ug administrada 3 veces al día en comparación con la dosis de 250 ug administrada 1 vez al día (Tablas V, VII y IX) fue más potente al disminuir significativamente el RPC en los primeros 5 días en la estimulación con PTZ (40 mg/kg) y disminuirlo también del sexto al décimo día en el caso del tratamiento con PTZ (30 mg/kg).

Estos resultados son congruentes con los observados por Antón-Tay y cols (3), y por Tamarkin y cols. (81) en otros modelos. En el primer caso las dosis más pequeñas de MEL provocaron un incremento en los niveles de SHT en mesencéfalo e hipotálamo mientras que en el segundo caso la administración de MEL (25 ug, 3 veces al día) inhibió de manera efectiva la función reproductora en hamsters de ambos sexos, sin tener efecto la administración crónica 1 vez al día, aplicada 3 horas después de haberse encendido las luces. Estos autores sugirieron la existencia de un ritmo diurno en la sensibilidad a MEL.

Por otra parte, es necesario hacer notar que el vehículo utilizado (alcohol etílico al 1%) produjo resultados heterogeneos en los distintos grupos.

En ocasiones las ratas tratadas con vehículo presentaron un RPC más alto que los grupos Control y MEL, incluso se observaron diferencias significativas, como en el ensayo donde MEL se administró de manera crónica en dosis de 250 ug (Tabla V). En otras ocasiones, los grupos tratados con el vehículo tuvieron estadios convulsivos menores que los Controles pero mayores que los presentados por los grupos tratados con MEL (Fig.9). Estos efectos contrarios del vehículo pueden oscurecer los verdaderos efectos de MEL, por lo que sería recomendable utilizar otro disolvente como vehículo en estudios posteriores.

ii. Manipulación Quirúrgica y Depleción de los Niveles de MEL.

La comparación entre los grupos Intacto, Operación Falsa y Pinealectomía permite observar una disminución en el umbral convulsivo en las ratas pinealectomizadas, al presentarse en este grupo el RPC más alto del patrón convulsivo (Tabla XI, Fig.11) así como el mayor PACS durante el tiempo de estimulación con PTZ,

aunque en este sentido no se encontraron diferencias significativas (Tabla XII).

El efecto nulo de la operación falsa indica que la conducta observada se debe a la ausencia de la GP y no al trauma quirúrgico.

Los resultados encontrados coinciden con los reportados por otros grupos de trabajo como son los estudios de Nir y cols (51), Reiter y cols (60), y Philo y Reiter (54). En el primer trabajo la pinealectomía produjo un patrón en el EEG de tipo epileptiforme en ratas. En el segundo estudio, la ablación de la GP posterior a la paratiroidectomía ocasionó convulsiones en ratas, mientras que en el estudio de Philo, los gerbos sufrieron crisis convulsivas después de la extirpación de la GP.

La disminución en el umbral convulsivo producida por la pinealectomía sugiere que la integridad de la glándula es necesaria en la estabilización de la actividad eléctrica del SNC (57) la cual podría ser modulada por la GP a través de la secreción de diversas sustancias neuroactivas.

También es probable que en el SNC se haya dado un proceso de adaptación al haberse modificado ritmos circadianos tanto en el caso de la pinealectomía como en el caso de la administración crónica de MEL.

Mientras que en los animales pinealectomizados se encontró la disminución esperada en el umbral convulsivo, en los animales tratados con MEL no se obtuvo el efecto esperado si es que en realidad esta sustancia desempeña algún papel protector ante las crisis convulsivas.

Esta falta de correspondencia de efectos, ya reportada por Philo y Reiter (54) en 1978 donde la administración de MEL (30 ug) posterior a la pinealectomía no provocó una disminución en la actividad convulsiva de los gerbos, puede deberse a que el papel "tranquilizante" de la GP se deba a otras sustancias secretadas por ella y no a la propia MEL.

Entre las posibles sustancias neuroactivas secretadas por la GP están la 5HT y la taurina, que además de presentarse en concentraciones elevadas en esta estructura, se les ha relacionado con la excitabilidad del SNC.

En los últimos años se han acumulado evidencias que tratan sobre péptidos y proteínas secretadas por la GP como responsables de los efectos que tiene la glándula en la fisiología de los mamíferos. Se ha pensado incluso que las indolaminas secretadas por la GP tienen un efecto puramente local dentro de la glándula, al modular la formación o liberación de sustancias neuroactivas que realmente intervendrían en la comunicación con otros órganos.

Se ha observado que la liberación nocturna de NA sobre la GP estimula simultáneamente la síntesis y liberación de granulos secretados por el aparato de Golgi que contienen principalmente sustancias proteicas (71).

Se ha propuesto que las indolaminas y proteínas sintetizadas en los pinealocitos se almacenan en los mismos granulos secretados, de manera tal que pasarían a la circulación juntas. Una o más de las indolaminas liberadas podría actuar como modulador o reforzador de las posibles sustancias neuroactivas secretadas por la GP (71).

La hipótesis que propone a otras sustancias como las responsables del papel fisiológico de la GP se vio reforzada con los datos obtenidos en los animales que permanecieron en condiciones de luz constante donde hay inhibición de la síntesis de MEL y sin embargo no se encontró un aumento en los estadios convulsivos (Tabla XIII).

Este último resultado no coincide con los datos reportados por Schreiber y Schlesinger en 1972 (74), donde encontraron un aumento en la susceptibilidad de las crisis inducidas por estimulación auditiva, en ratones mantenidos en condiciones de luz constante, aunque tal aumento lo encontraron también en ratones mantenidos en oscuridad constante.

iii. Estimulaciones Diurna y Nocturna con Pentilene-tetrazol.

En lo que respecta a la comparación entre los grupos estimulados con PTZ (20 y 30 mg/kg) a mitad del fotoperíodo y del escotoperíodo, se registró para ambas dosis que los animales estimulados durante el período luminoso presentaron un RPC más alto que los animales estimulados a la mitad del escotoperíodo (Tablas XV y XVII).

Estos resultados eran los esperados y concuerdan con la hipótesis de que la GP tiene cierto efecto estabilizador de la excitabilidad del SNC ya que en el momento de mayor actividad de la glándula se observó un aumento en el umbral convulsivo.

Sin embargo estos resultados no concuerdan con los reportados por Wada y Asakura (83) en 1970, Schreiber y Schlesinger (73) en 1971, ni con los encontrados por Freeman (19) en 1980. Los dos primeros grupos de trabajo encontraron una mayor susceptibilidad de ratas y ratones respectivamente a las crisis convulsivas provocadas por estimulación auditiva en el período de oscuridad, mientras que Freeman (19) encontró una facilitación en la presentación de las crisis producidas por estimulación eléctrica durante el escotoperíodo en ratas de la cepa Long Evans.

Las diferencias encontradas pudieran deberse tanto a la cepa utilizada como a la fuente de estimulación que en nuestro estudio fue química con PTZ que tiene un efecto más generalizado sobre la excitabilidad del SNC.

Es necesario señalar que en nuestro caso para todos los estudios, la estimulación con PTZ tuvo el problema de producir un efecto muy irregular sobre el comportamiento convulsivo, ya que por ejemplo un día los animales presentaban estadio 3, pero al día siguiente presentaban estadio 1 ó 2 y así sucesivamente, por lo que la conducta osciló bastante con el subsecuente incremento en la variación intragrupo, de esta manera se sugiere una fuente de estimulación más precisa como serían la eléctrica, auditiva o fónica en estudios posteriores.

Los resultados indican que la GP tiene algún papel en la regulación de la excitabilidad del SNC. Esta función puede atribuirse a la secreción de MEL o de otras sustancias, o incluso a algún otro cambio en el SNC provocado por la ausencia de la GP.

El aumento en el umbral convulsivo en el escotoperíodo pudiera asociarse a la fisiología de la GP, ya que es la fase en la que la glándula presenta su mayor actividad. Aunque no se debe descartar la influencia de otros factores asociados al escotoperíodo, lo cual puede valorarse en estudios futuros que contrasten los efectos de las estimulaciones diurna y nocturna con PTZ en ratas pinealectomizadas.

VIII. CONCLUSIONES.

Con base en los resultados y en la discusión presentados en las secciones anteriores se desprenden las siguientes conclusiones:

- La administración exógena de MEL presenta diferentes efectos en el desarrollo de las crisis convulsivas que dependen del esquema de tratamiento.
- La administración aguda de MEL no produce ningún cambio en el desarrollo de las convulsiones.
- El tratamiento crónico con MEL tuvo un efecto moderado en el desarrollo de las crisis convulsivas, la disminución se notó únicamente durante los primeros 5 días de estimulación con PTZ, siendo más efectiva la administración de MEL (25 ug, 3 veces al día).
- El vehículo utilizado (alcohol etílico al 1%) tuvo efectos muy diferentes que podrían oscurecer el verdadero papel de MEL en el desarrollo de las crisis convulsivas.
- La pinealectomía produce una disminución en el umbral convulsivo.
- Las condiciones de luz constante no alteran el desarrollo de las crisis convulsivas producidas por PTZ.
- La estimulación diurna con PTZ fue más efectiva que la nocturna. El aumento en el umbral convulsivo en el escotoperíodo se relaciona con el pico de actividad de la GP.
- La participación de la GP en la excitabilidad del SNC puede deberse a la actividad de otras sustancias y no a la propia MEL.
- Es necesario contar con un modelo más fino para la valoración del papel fisiológico que tienen la GP y la MEL en la actividad eléctrica del SNC.

IX. REFERENCIAS.

1. Albertson, T.E., Peterson, S.L., Stark, L., Lakin, M.L., y Winters, W.D. 1981. The anticonvulsant properties of Melatonin on kindled seizures in rats. Neuropharmacology. 20:61-66.
2. Alonso de Florida, F., y Delgado, J.M.R. 1958. Lasting behavioral and EEG changes in cats induced by prolonged stimulation of amygdala. Amer.J.Physiol. 193:223-229.
3. Antón-Tay, F., Chuan, C., Antón, S. y Wurtman, R.J. 1968. Brain Serotonin Concentration: Elevation Following Intraperitoneal Administration of Melatonin. Science. 162:277-278.
4. Antón-Tay, F. 1971. Pineal-Brain Relationships. In: Wolstenholme, G.E.W., y Knight, J. (eds). The Pineal Gland. Churchill Livingstone. London. 213-220.
5. Antón-Tay, F., Díaz, J.L., y Fernández-Guardiola, A. 1971. On the effect of Melatonin upon human brain. Its possible therapeutic implications. Life.Sci. 10:841-850.
6. Axelrod, J., y Weissbach, H. 1960. Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. Science. 131:1312-1313.
7. Axelrod, J., Wurtman, R.J., y Snyder, S. 1965. Control of hydroxyindol-O-methyltransferase activity in the rat pineal gland by environmental lighting. J.Biol.Chem. 240:949-954.
8. Axelrod, J., Guay, W.B., y Baker, P.C. 1965. Enzymatic synthesis of the skin-lightening agent Melatonin in Amphibians. Nature. 208:386.
9. Baumgartner, G. 1954. Microelectrode recordings from single cortical neurons in the normal state and during epileptic discharges. Electroenceph.Clin.Neurophysiol. 6:520-521.
10. Bindoni, M., y Rizzo, R. 1965. Hippocampal evoked potentials and convulsive activity after electrolytic lesions in rabbits. Archs.Sci.Biol. 49:223-233.
11. Brailowsky, S. 1976. Effects of Melatonin on the photosensitive epilepsy of the baboon Papio papio. Electroenceph.Clin.Neurophysiol. 41:314-319.
12. Calvo, J., y Boya, J. 1984. Postnatal evolution of the rat pineal gland: light microscopy. J.Anat. 138:45-53.

13. Cardinali, D.P., Larin, F., y Wurtman, R.J. 1972. Action spectra for effects of light on hydroxyindole-O-methyltransferases in rat pineal, retina and harderian gland. Endocrinology. 91:877-886.
14. Cardinali, D.P., Lynch, H.J., y Wurtman, R.J. 1972. Binding of Melatonin to human and rat plasma proteins. Endocrinology. 91:1213-1218.
15. Deguchi, T., y Axelrod, J. 1972. Induction and superinduction of serotonin N-acetyltransferase by adrenergic drugs and denervation in the rat pineal gland. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69:2547-2550.
16. Ellisson, N., Weller, J.L., y Klein, D.C. 1972. Development of a circadian rhythm in pineal N-acetyltransferase. J. Neurochem 19:1335-1341.
17. Fariello, R.G., y Eubank, G.A. 1976. Melatonin induced changes in the sensory activation of acute epileptic foci. Neurosci. Lett. 3:151-155.
18. Fiske, V.M., y Putman, J. 1960. Effects of light on the weight of the pineal in rats. Endocrinology. 66:489-491.
19. Freeman, F.G. 1980. Development of kindled seizures and circadian rhythms. Behavioral and Neural Biology. 30:231-235.
20. Goddard, G.V., Mc Intyre, D.C., y Leech, C.K. 1969. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. Exp. Neurol. 25:295-330.
21. Goldman, H., y Wurtman, R.J. 1964. Flow of blood to the pineal body of the rat. Nature. 203:87-88.
22. González Estrada, M.T. 1977. Estudio del patrón de descargas del Núcleo Rojo durante la actividad convulsiva. Tesis. Universidad Iberoamericana. México. 205 pp.
23. Hedlund, L., Lischke, M., y Niswender, G.D. 1977. Melatonin: daily cycle in plasma and cerebrospinal fluid of calves. Science. 195:686-687.
24. Hirata, F., Hayaishi, O., Tokuyama, T., y Serich, S. 1974. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. J. Biol. Chem. 249:1311-1313.
25. Hoffman, R.A., y Reiter, R.J. 1965. Pineal gland: Influence on gonads of male hamsters. Science. 148:1609-1611.
26. Hoffman, R.A., y Reiter, R.J. 1965. Rapid pinealectomy in hamsters and other small rodents. Anat. Rec. 153:19-22.

27. Illnerova, H., y Skopov, A.J. 1976. Regulation of the diurnal rhythm in rat pineal serotonin N-acetyltransferase activity and serotonin content during ontogenesis. J. Neurochem. 26:1051-1052.
28. Ito, T., Yoshida, K., y Shimizu, M. 1977. Effect of anticonvulsants on seizures developing in the course of daily administration of pentetrazol to rats. Eur. J. Pharmacol. 45:165-172.
29. Jain-Etcheverry, G., y Zieher, L.M. 1975. Octopamine probably coexists with noradrenaline and serotonin in vesicles of pineal adrenergic nerves. J. Neurochem. 25:915-918.
30. Joy, R.M. 1965. The effects of neurotoxicants on kindling and kindled seizures. Fundamental and Applied Toxicology. 5:41-65.
31. Kappers, J.A. 1965. Survey of innervation of the epiphysis cerebri and the accessory pineal organs in vertebrates. In: Kappers, J.A., y Schadé, J.P. (eds). Prog. Brain Res. Elsevier. Amsterdam. 10:87-153.
32. Kappers, J.A. 1971. The Pineal Organ. An Introduction. In: Wolstenholme, G.E.W., y Knight, J. (eds). The Pineal Gland. Churchill Livingstone. London. 3-25.
33. Kitay, I. 1954. Pineal lesions and precocious puberty. J. Clin. Endocrinol. Metab. 14:622-625.
34. Klein, D.C. 1972. Evidence for the placental transfer of H acetyl melatonin. Nature. 237:118-119.
35. Klein, D.C., Buda, M., Kappor, C.L., y Krishna, G. 1978. Pineal serotonin N-acetyltransferase activity: An abrupt decrease in cyclic AMP may be the signal for "turn off". Science. 199:309-311.
36. Klein, D.C., y Moore, R.Y. 1979. Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: Control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. Brain Res. 174:245-262.
37. Klein, D.C., Reiter, R.J., y Weller, J.L. 1971. Pineal N-acetyltransferase activity in blinded and anosmic rats. Endocrinology. 89:1021-1023.
38. Klein, D.C., y Weller, J.L. 1970. Indole metabolism in the pineal gland: A circadian rhythm in N-acetyltransferase. Science. 169:1073-1075.

39. Klein, D.C., y Weller, J.L. 1972. A rapid light-induced decrease in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. Science, 177:532-533.
40. Kopin, J.I., Fare, C.M.B., Axelrod, J. y Weissbach, H. 1961. The fate of melatonin in animals. J. Biol. Chem. 236:3072-3075.
41. Kveder, S., y Molsaad, W.M. 1961. The metabolism of melatonin and 5-methoxytryptamine. J. Biol. Chem. 236:3214-3220.
42. Laudon, M., y Zisapel, N. 1986. Characterization of central melatonin receptors using I melatonin. FEBS Lett. 197 (1):9-12.
43. Lerner, A.B., Case, J.D., y Takahashi, Y. 1960. Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3 acetic acid from bovine pineal glands. J. Biol. Chem. 235(7):1992-1997.
44. Lovenberg, W., Weissbach, H., y Udenfriend, S. 1962. Aromatic L-aminoacid decarboxylase. J. Biol. Chem. 237:81-92.
45. Martin, J.V., Salin-Pascual, R.J., Tamarkin, L., y Mendelson, W.B. 1985. Pinealectomy increases REM sleep during the early light phase of the diurnal cycle of the rats. In: Society for Neuroscience Abstracts, Texas. 11:1282.
46. Mc Namara, J.O., Byrne, M.C., Dasheiff, R.M., y Fitz, J.G. 1980. The kindling model of epilepsy: a review. Prog. Neurobiol. 15:139-159.
47. Méndez, I. 1975. Estadística y Método Científico. UNAM. México. 16 pp.
48. Moore, R.Y. 1973. Retinohypothalamic projection in mammals: A comparative study. Brain Res. 49:403-409.
49. Moore, R.Y., y Klein, D.C. 1974. Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. Brain Res. 71:17-23.
50. Mouret, J., Coindet, J., y Chouvet, G. 1974. Effet de la Pinealectomie sur les états et rythmes de sommeil du rat male. Brain Res. 67:97-105.
51. Nir, I., Behrooz, K., Assael, M., Ivriani, I., y Sulman, F. 1969. Changes in the electrical activity of the brain following pinealectomy. Neuroendocrinology. 4(2):122-127.
52. Pang, S.F., Brown, G.M., Grotta, L.J., Chambers, J.W., y Rodman, R.L. 1977. Determination of N-acetyl serotonin and melatonin

activities in the pineal gland, retina, harderian gland, brain and serum of rats and chickens. Neuroendocrinology, 23:1-13.

53. Fellmar, T.C. y Wilson, W.A. 1977. Synaptic mechanism of penty-
lentetrazole: selectivity for chloride conductance. Science,
197:912-913.
54. Philo, T., y Reiter, R.J. 1978. Characterization of pineslecto-
my induced convulsions in the mongolian gerbil. Epilepsia,
19:485-492.
55. Quay, W.B. 1963. Differential extractions for the spectrophoto-
fluorometric measurement of diverse 5-hydroxy and 5-methoxy
indoles. Anal. Biochem. 5:51-59.
56. Quay, W.B. 1965. Histological structure and cytology of the
pineal organ in birds and mammals. Prog. Brain Res. 10:49-86.
57. Quay, W.B. 1965. Experimental evidence for pineal participa-
tion in homeostasis of brain composition. Prog. Brain Res. 19:
644-653.
58. Raikhlin, N.T., Kvetnoy, I.M., y Tolkachev, V.N. 1975. Melatonin
may be synthesized in enterochromaffin cells. Nature,
255:344-345.
59. Ralph, C.L., Hull, D., Lynch, H.J., y Hedlun, L. 1971. A melato-
nin rhythm persists in rat pineal in darkness. Endocrinology,
89:1361-1366.
60. Reiter, R., Blask, D., Taibot, J., y Barnett, M. 1973. Nature and
the time course of seizures associated with surgical removal
of the pineal gland of parathyroidectomized rats. Exp. Neurol.
38:386-387.
61. Reiter, R.J., y Vaughan, M.K. 1977. Pineal antigonadotrophic
substances: Polypeptides and indoles. Life Sci. 21:159-
172.
62. Reiter, R.J. 1981. The mammalian pineal: structure and func-
tion. Amer. J. Anat. 162:287-313.
63. Reppert, S.M., Perlow, M.J., Tamarin, L., y Klein, D.C. 1979.
A diurnal rhythm in primate cerebrospinal fluid. Endocrine
logy, 104:295-301.
64. Reppert, S.M., y Klein, D.C. 1980. Mammalian Pineal Gland:
Basic and clinical aspects. In: Motta, M. (ed). The endocrine
functions of the brain. 327-371.

65. Rogawsky, M.A., Roth, R.H., y Aghajanian, G.K. 1979. Melatonin: Deacetylation to 5-methoxytryptamine by liver but not brain arylacylamidase. J. Neurochem. 32:1219-1226.
66. Rollag, M.D., Morgan, R.J. y Niswender, G.D. 1978. Route of melatonin secretion in sheep. Endocrinology. 102:1-8.
67. Roldán, E., Antón-Tay, F., y Escobar, A. 1964. Studies on the pineal gland: IV. The effect of pineal extract on the electroencephalogram. Bol. Inst. Estud. Méd. Biol. UNAM. 22:145-156.
68. Roldán, E., y Antón-Tay, F. 1968. EEG and convulsive threshold changes produced by pineal extract administration. Brain. Res. 11:238-245.
69. Romero, J.A., y Axelrod, J. 1974. Pineal B-adrenergic receptor: diurnal variation in sensitivity. Science. 184:1091-1092.
70. Romero, J.A., Zals, M., y Axelrod, J. 1975. Beta-adrenergic stimulation of pineal N-acetyltransferase: Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate stimulates both RNA and protein synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72:2107-2111.
71. Romijn, H.J. 1978. The Pineal, a tranquilizing organ? Life. Sci. 23:2257-2274.
72. Sawa, M., Neruyama, M., y Kaj, S. 1963. Intracellular potential during electrically induced seizures. Electroenceph. Clin. Neurophysiol. 13:207-220.
73. Schreiber, R.A., y Schlesinger, K. 1971. Circadian rhythms and seizure susceptibility relation to 5HT and NE in brain. Physiol. Behav. 6:635-640.
74. Schreiber, R.A., y Schlesinger, K. 1972. Circadian rhythms and seizure susceptibility: effects of manipulations of light cycles on susceptibility to audiogenic seizures and levels of 5HT and NE in brain. Physiol. Behav. 8:699-703.
75. Shibuya, H., Toru, M., y Watanabe, S. 1976. A circadian rhythm of tryptophan hydroxylase in rats pineals. Brain. Res. 138:364-368.
76. Siegel, S. 1980. Estadística no Paramétrica aplicada a las Ciencias de la Conducta. Trillas. México. 346 pp.
77. Stockmeier, C.A., y Blask, D.E. 1983. Effects of grouping and isolation on pinealectomy-induced seizures in rats. Physiol. Behav. 30:651-652.

78. Swinyard, E.A. 1982. Introduction. In: Woodbury, D.M., Penry, J. K., y Pippenger, C.E. (eds). Antiepileptic Drugs. Raven Press. New York. 1-9.
79. Swinyard, E.A., y Woodhead, J.H. 1982. Experimental detection, quantification and evaluation of anticonvulsants. In: Woodbury, D.M., Penry, J.K., y Pippenger, C.E. (eds). Antiepileptic Drugs. Raven Press. New York. 111-126.
80. Tamarkin, L., Reppert, S.M., y Klein, D.C. 1979. Regulation of pineal melatonin in the Syrian hamster. Endocrinology. 104: 335-339.
81. Tamarkin, L., Westrom, W.K., Hamill, A.I., y Goldman, G.C. 1976. Effect of melatonin on the reproductive systems of male and female Syrian hamsters: A diurnal rhythm in sensitivity to melatonin. Endocrinology. 99:1534-1541.
82. Vaughan, G.M., Mc Donald, S.A., Jordon, R.N., Allen, J.P., Bohm-falk, G.L., Abou-Samra, M., y Story, J.L. 1978. Melatonin concentration in human blood and cerebrospinal fluid: Relationship to stress. J.Clin.Endocrinol.Metab. 47:220-223.
83. Wada, J.A., y Asakura, T. 1970. Circadian alteration of audiogenic seizures susceptibility in rats. Exp.Neurol. 29:211-214.
84. Wetterberg, L., Arendt, J., Faugier, L., Sizonenko, P.C., van Douselaar, W., y Heyden, T. 1976. Human serum melatonin changes during the menstrual cycle. J.Clin.Endocrinol.Metab. 42:185-188.
85. Wilkinson, M., Arendt, J., y Ziegler, D. 1977. Determination of a dark-induced increase in pineal N-acetyltransferase activity and simultaneous radioimmunoassay of melatonin in pineal, serum and pituitary tissue of the male rat. J.Endocrinol. 72: 243-244.
86. Wurtman, R.J., Axelrod, J., y Barchas, J.D. 1964. Age and enzyme activity in the human pineal. J.Clin.Endocrinol.Metab. 24:299-301.
87. Wurtman, R.J., Axelrod, J., y Chou, E.W. 1963. Melatonin a pineal substance. Effect on the rat ovary. Science. 141:277-278.

X. APENDICE "A".

Preparación de Soluciones.

i. Melatonina: 25 y 250 ug.

Para la preparación de la dosis pequeña, se pesó 1 mg de MEL (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo.) en una balanza analítica, se agregaron 200 ul de alcohol etílico absoluto (Baker, S. A. Mex.); la solución se agitó en un vortex por un minuto. Una vez disuelta la MEL, se aforó a 20 ml con solución salina 0.9% (Mc. Gaw. Mex.). De la solución final se inyectaron 0.5 ml a cada animal.

La solución de 250 ug se preparó de la siguiente manera: 4 mg de MEL fueron disueltos en 80 ul de alcohol etílico absoluto, la solución se agitó en un vortex por un minuto, posteriormente se aforó a 8 ml con solución salina al 0.9%. Inyectándose 0.5 ml de la solución final.

ii. Vehículo: alcohol etílico al 1%.

Una alícuota de 200 ul de alcohol etílico absoluto se aforó a 20 ml con solución salina. De aquí se tomaron 0.5 ml que fueron inyectados a cada animal.

Tanto las soluciones de MEL como las del Vehículo se mantuvieron en refrigeración en frascos color ambar y fueron renovadas cada tercer día.

iii. Pentilenoetrazol: 20, 30 y 40 mg.

En la preparación de la dosis menor, 500 mg de PTZ (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo.) se disolvieron en 20 ml de solución salina al 0.9%. Esta mezcla se mantuvo en un agitador magnético durante 5 minutos, tiempo en el que el PTZ se disuelve totalmente.

Para las dosis de 30 y 40 mg, también se pesaron 500 mg de PTZ, variando solamente el volumen de solución salina. En la dosis de 30 mg se ocuparon 16.66 ml, mientras que para la preparación de la dosis más alta se utilizó un volumen de 12.5 ml.

En las tres soluciones preparadas se obtuvieron concentraciones de 20, 30 y 40 mg/ml de solución de PTZ. El volumen inyectado a cada animal varío de acuerdo a su peso. Todas las soluciones se mantuvieron en refrigeración en frascos color ambar y se renovaron cada tres días.