

77
2 g

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

MODIFICACION DE PARAMETROS CONVULSIVOS DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE
LA HORMONA MELATONINA

TESIS PROFESIONAL

Para obtener el titulo de

BIOLOGO

Presenta

DANIEL GRANADOS FUENTES

MEXICO, D.F.

1990

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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	1
II. MARCO TEORICO.	
II.1. ORIGEN Y ANATOMIA DE LA GLANDULA PINEAL.....	2
II.2. REGULACION NERVIOSA DE LA SECRECION DE LA GLANDULA PINEAL.....	4
II.3. CONTENIDO SECRETOR DE LA GLANDULA PINEAL.....	4
II.4. METABOLISMO DE LA MELATONINA.....	5
II.4.a. Sintesis de la Melatonina.....	5
II.4.b. Catabolismo de la Melatonina.....	6
II.5. LUGAR DE SECRECION DE LA MELATONINA.....	6
II.6. RITMO SECRETOR DE LA GLANDULA PINEAL.....	7
II.7. REGULACION FOTICA DE LA GLANDULA PINEAL VIA TRACTO RETINO-HIPOTALAMICO.....	9
II.8. EFECTOS INDUCIDOS POR LA MELATONINA.....	10
III. ANTECEDENTES RELEVANTES DEL PROBLEMA.....	11

SEGUNDA PARTE.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
IV.1. OBJETIVOS.....	14
IV.2. HIPOTESIS DE TRABAJO.....	15
V. MATERIALES Y METODOS.....	15

VI. RESULTADOS.	
VI.1. CURVA DOSIS-RESPUESTA A PENTILENTETRAZOL.....	18
VI.2. ADMINISTRACION DE MELATONINA DURANTE EL FOTOPERIODO (CICLO NORMAL).	
VI.2.a. Administración aguda.....	18
VI.2.b. Administración crónica.....	19
VI.3. ADMINISTRACION DE MELATONINA DURANTE EL ESCOTOPERIODO (CICLO INVERTIDO).	
VI.3.a. Administración aguda.....	20
VI.3.b. Administración crónica.....	21
VI.4. COMPARACION ENTRE LOS DOS CICLOS DE ILUMINACION.	
VI.4.a. Administración aguda.....	21
VI.4.b. Administración crónica.....	22
VII. DISCUSION	23
VIII. CONCLUSIONES	30
IX. BIBLIOGRAFIA.....	31

1. INTRODUCCION

En algunos trabajos se le ha atribuido a la glándula pineal (GP) un papel de órgano "tranquilizante" (1,2,3,4,5,6); característica que parece estar ligada a la Melatonina (MEL), la cual es una de las hormonas producidas en dicha glándula, es por esto que se ha probado el efecto "anticonvulsivo" de esta hormona en algunos modelos experimentales de convulsiones (7,8,9).

Por otro lado, la epilepsia es un transtorno que ha sido ampliamente estudiado ya que es de suma importancia conocer las causas que lo producen. Para ello, se han utilizado diversos modelos experimentales los cuales han ayudado a la síntesis tanto de compuestos convulsivantes para ser utilizados en estos modelos, como de compuestos anticonvulsivantes para el tratamiento de la enfermedad (4).

Los estudios referentes a la actividad convulsiva han proporcionado información muy importante acerca de la organización morfológica y fisiológica del Sistema Nervioso Central (SCN). El hecho de que la hormona MEL se haya relacionado con la regulación de la excitabilidad neuronal en mamíferos nos ha motivado a realizar este trabajo con el cual se pretende evaluar el posible efecto anticonvulsivo de la MEL cuando es administrada en dosis farmacológicas que no son capaces de producir cambios conductuales como sedación o ataxia.

Además de esto, la GP es una estructura que está involucrada en diversas funciones, en particular con aquellas que describen un

patrón rítmico en su presentación, tales como la reproducción (10,11), la actividad locomotora (12,13) y el ciclo sueño-vigilia (14,15,16), entre otras.

La primera parte de esta tesis consta de una revisión de las características generales de la GP; la segunda enmarca el problema de estudio, los objetivos que se pretendieron alcanzar, las hipótesis de trabajo, la descripción del diseño experimental, los resultados obtenidos y las conclusiones surgidas del estudio.

II. MARCO TEORICO

II.1. ORIGEN Y ANATOMIA DE LA GLANDULA PINEAL

La GP en el hombre y en otros vertebrados se origina de la modificación de células ependimales de la región epitalámica del tercer ventrículo (17). En anfibios y ciertos peces, las células de la GP tienen características morfológicas y fisiológicas de fotorreceptores (18,19); estas características de fotosensibilidad de la GP son perdidas para dar lugar a las funciones glandulares secretoras que presentan los pinealocitos en aves y mamíferos. En el humano la GP mide aproximadamente 7 mm en el eje longitudinal, 5 en el eje transversal y 4 en el eje anteroposterior y está unida al diencéfalo por el pedúnculo pineal. En la pared posterior del pedúnculo se encuentra la comisura habenular, la cual incluye fibras de la estria medullaris thalami que terminan en los núcleos habenulares opuestos (20).

La pineal está inervada por fibras simpáticas originadas en los

ganglios cervicales superiores y también por una vía central directa. Se tienen evidencias de que el pedúnculo pineal en ratas, contiene gran cantidad de fibras, pero que no todas forman sinapsis con la GP. Las fibras que sí se comunican con la pineal terminan en las láminas intercalares y los núcleos habenuares mediales (21). Esta descripción forma parte de la vía no visual (se denomina de esta manera, ya que el trayecto que sigue dicha vía no llega a la corteza cerebral, en particular la corteza visual, por lo tanto no existe una integración de imágenes) que comunica la retina con la GP y que se origina a nivel de las células ganglionares de la retina. Los axones que parten de las células ganglionares se cruzan en el quiasma óptico y hacen sinápsis en el núcleo supraóptico, de donde, las fibras de relevo descienden por el fascículo longitudinal medial hasta niveles cervicales. Ahí hacen relevo con neuronas simpáticas localizadas en las astas laterales de la médula espinal de donde las fibras preganglionares las conectan con el ganglio cervical superior, de esta manera a través del nervio conarii se forma la conexión final que asciende por el foramen magno, pasando por la tienda del cerebelo, para llegar a las estructuras epitalámicas (22).

Fisiológicamente la GP satisface muchos de los criterios para ser un órgano endócrino. Existen evidencias anatómicas que sugieren que la vascularización de la pineal en la rata y el ratón es menor que en otros órganos endócrinos. Esta disminución en la vascularización se ve compensada, ya que la razón mínima de flujo sanguíneo por gramo (ml/min/gr) excede la de otros órganos endócrinos (23).

El tipo celular predominante, el pinealocito, tiene una o más proyecciones de longitud variable y una configuración adaptada para la función secretora. Sus terminaciones llegan al espacio perivascular

rodeando los capilares ; en ésta zona de contacto los procesos presentan las típicas fenestraciones celulares de las glándulas endócrinas. El otro tipo de células presente en la GP, son las células gliales, que recuerdan morfológicamente a los astrocitos (17); además se pueden encontrar también linfocitos T (24).

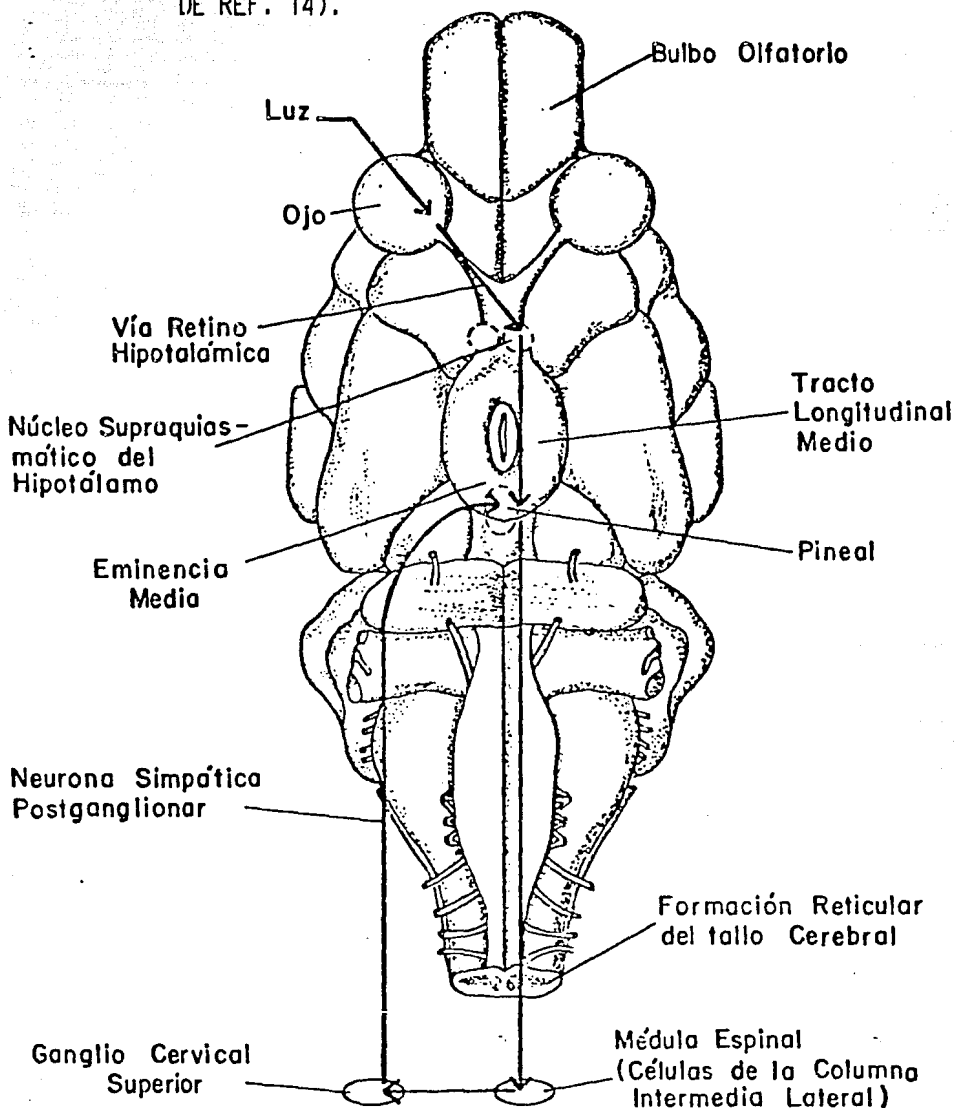
11.2. REGULACION NERVIOSA DE LA SECRECION DE LA GLANDULA PINEAL

Como se mencionó anteriormente la vía no visual a la GP comienza en la retina , pasa por el núcleo supraquiasmático (NSQ) y el haz del hipotálamo para terminar en los núcleos del tracto accesorio inferior, el cual está localizado ventralmente respecto al núcleo geniculado medial. El NSQ, es una pequeña estructura par, situada en el hipotálamo anterior que ha sido propuesta como un oscilador o reloj biológico (11) , el cual, juega un papel muy importante en la generación y organización de los ritmos , por lo tanto, está íntimamente relacionado con la actividad circádica de la GP (11) (fig. 1) ya que los impulsos conducidos por los nervios simpáticos a la GP pueden ser modificados por cambios en la luz y oscuridad del medio ambiente externo a través del NSQ (11).

11.3. CONTENIDO SECRETOR DE LA GLANDULA PINEAL

Las secreciones más conocidas de la pineal son la MEL, los metoxindoles y algunos péptidos. En algunos trabajos, se han determinado concentraciones significativas de los péptidos hipotálamicos TRH, LHRH y somatostatina, además de fracciones

FIG. 1 VIA NO VISUAL RETINA-HIPOTALAMO-PINEAL EN RATA (TOMADA DE REF. 14).



peptídicas de naturaleza no bien conocida, varios de ellos con actividad biológica (17).

En la GP se encuentran serotonina (5-HT), norepinefrina (NE) y octopamina aunque no forman parte de los productos de secreción. La 5-HT interviene como sustrato para la síntesis de MEL, la NE es el neurotransmisor que media la comunicación sináptica entre las terminales del ganglio cervical superior y la GP.

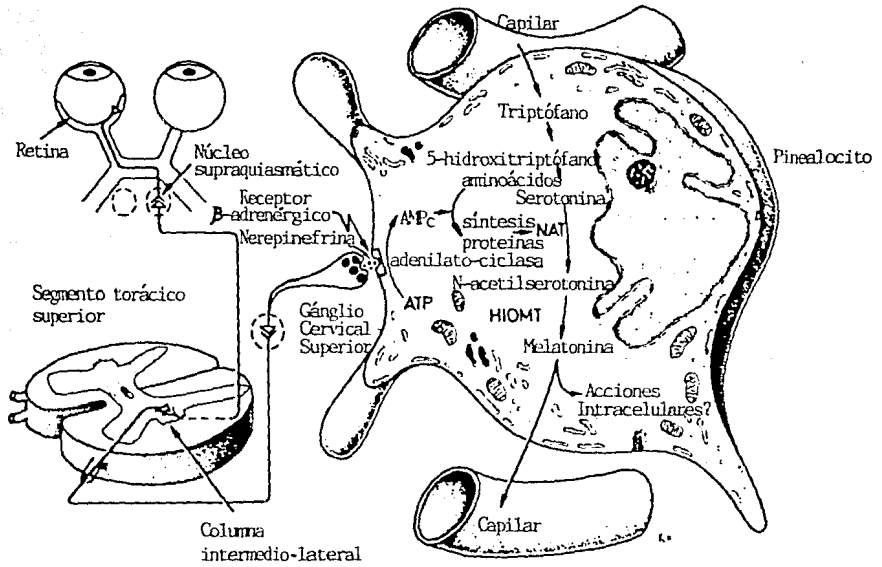
11.4. METABOLISMO DE LA MELATONINA

11.4.a. SÍNTESIS DE LA MELATONINA

La biosíntesis de la MEL durante el período de oscuridad se lleva a cabo a partir del L-triptófano que es tomado de la circulación y puede ser dividida en dos partes. La primera de ellas, la síntesis de 5-HT, es dependiente de la disponibilidad del aminoácido triptófano. La captura de L-triptófano circulante dentro de los pinealocitos es seguida por la conversión a 5-HT por dos enzimas; la triptófano hidroxilasa y la 5-hidroxitriptófano descarboxilasa. Los niveles altos de la enzima formadora y de su cofactor, la biotina, son los responsables de los altos niveles de 5-HT dentro de la glándula, más altos que en cualquier tejido en el cuerpo (11).

La segunda parte, que es la conversión de 5-HT a MEL, comienza con la transformación de 5-HT a N-acetilserotonina por la N-acetiltransferasa; posteriormente la hidroxindol-O-metiltransferasa transfiere el grupo metilo de la S-adenosilmetionina a el grupo hidroxilo de la N-acetilserotonina para formar la hormona MEL (25) (fig.

FIG.2 SINTESIS DE MELATONINA



2).

11.4.b. CATABOLISMO DE LA MELATONINA

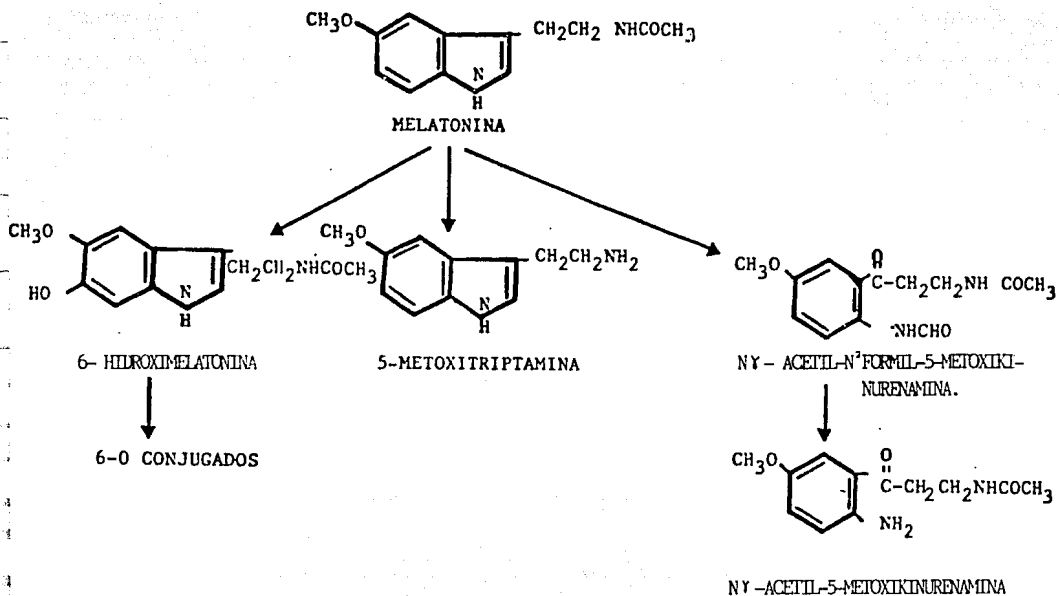
El 80 % de la Mel circulante (se ha calculado que despues de la administración intravenosa de MEL, ésta tarda aprox. 5.6 min en absorverse del torrente sanguíneo y 43.6 min en eliminarse. Cuando es administrada oralmente, tarda aprox. 24.4 min en absorverse y tarda el mismo tiempo en eliminarse que cuando es administrada por vía intravenosa (26)) , sufre una 6-hidroxilación en los microsomas, seguida por una conjugación de sulfato y ácido glucurónico.

Se ha identificado un metabolito de la MEL, la N-acetil-5-metoxikinurenamina, que es formada in vitro en tejido cerebral por dos pasos enzimáticos, el primero es la ruptura del anillo indólico y el segundo es la remoción del carbono adyacente al nitrógeno unido al anillo (11) (fig. 3).

11.5. LUGAR DE SECRECION DE LA MELATONINA

Hay evidencias (27) que sugieren que la MEL es secretada principalmente en el sistema vascular y en menor grado, directamente al líquido cefalorraquídeo (LCR). Se ha demostrado en monos rhesus que las cantidades de MEL en el LCR y el plasma, obtenidos al mismo tiempo presentan patrones parecidos; en el día los niveles de MEL en el LCR son un cuarto de los correspondientes a los niveles plasmáticos y en la noche los niveles son muy similares entre si (27). En otros trabajos se ha reportado que en ovejas, la Melatonina es secretada principalmente en la sangre y una pequeña cantidad en el tercer

FIG. 3 CATABOLISMO DE LA MELATONINA (TOMADA DE REF. 8).



ventrículo, de donde la MEL es incorporada rápidamente a la circulación (28).

Utilizando el método de unión a MEL en plasma de rata y humano se ha comprobado que dicha hormona está unida a una proteína y que probablemente ésta sea la albúmina, mientras que en el LCR se encuentra en forma libre (29).

11.6. RITMO SECRETOR DE LA GLANDULA PINEAL

El contenido de 5-HT, MEL y las actividades de las enzimas que intervienen en la síntesis de MEL en la pineal, como la hidroxindol-o-metiltransferasa y la serotonín-N-acetiltransferasa en la pineal muestran cambios circádicos mediados por nervios simpáticos (30-39).

Durante el día la concentración de 5-HT en la GP es de 0.5 mM, al iniciar el período de oscuridad su concentración desciende gradualmente hasta alcanzar los valores equivalentes a la mitad de los observados durante el día (11,39); durante la noche, la concentración de serotonín-N-acetiltransferasa aumenta de 15 a 70 veces con respecto al período de iluminación (32,33,40) mientras que la concentración de la hidroxindol-o-metiltransferasa aumenta también de 1.6 a 3 veces, durante la noche en comparación con el día (35).

De gran interés es el hecho que también la MEL eleva su concentración durante la noche de 7 a 10 veces (40) (en humanos se ha determinado que la concentración de MEL durante el día varía desde niveles indetectables, hasta 12 pg/ml y en la noche los niveles promedian 49.6 ± 10.6 pg/ml (26)), debido a la variación que también

sufre la N-acetiltransferasa. Existen varias hipótesis que tratan de explicar los posibles mecanismos responsables de la disminución de la actividad de la enzima N-acetiltransferasa durante el día, las cuales son:

- a) Disminución en la liberación de neurotransmisor endógeno (NE).
- b) Inicio de una señal inhibitoria o moduladora.
- c) Disminución del precursor esencial para la síntesis o activación de la enzima.

De la misma manera, se ha reportado que el aumento en la actividad enzimática después del inicio de la oscuridad puede responder a un pequeño incremento en la concentración de neurotransmisor en los sitios receptores en el momento que estos presentan mayor sensibilidad, y que la caída de la actividad enzimática durante la última parte del período de oscuridad puede resultar en un decremento en la sensibilidad de los receptores acoplada a una disminución temprana en el recambio de NA (32). También se menciona, que la disminución en la actividad de la N-acetiltransferasa durante el día está acompañada por un decremento en la concentración de AMPc intracelular (34). Estos puntos dan evidencia para creer que la señal para "apagado" de la actividad de la N-acetiltransferasa puede ser el rápido decremento en el AMPc a un nivel crítico como producto de una disminución en la sensibilidad de los receptores. Los cambios en la actividad de la N-acetiltransferasa durante el día y la noche traen como consecuencia un cambio en los niveles de MEL, siendo mayor durante el período de oscuridad y menor durante el período de luz (fig. 4).

11.7. REGULACION FOTICA DE LA GLANDULA PINEAL VIA TRACTO RETINO-HIPOTALAMICO

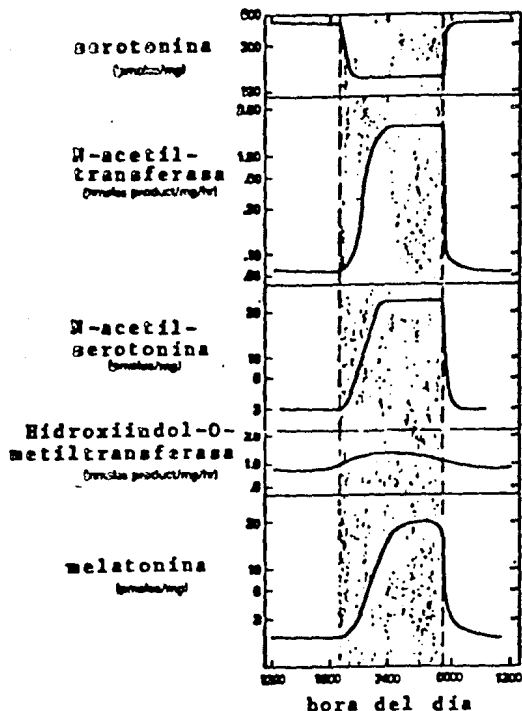
La luz actúa en el NSQ via el tracto retinohipotalámico que es una proyección monosináptica de la retina por medio de la cual el NSQ recibe información sobre los cambios de luz en el medio ambiente, permitiéndole acoplar los ciclos biológicos internos a dichos cambios. La luz tiene algunos efectos en el sistema generador del ritmo de la MEL (síntesis y secreción). Primero, en un ciclo natural 12-12 luz/obscuridad, la luz reacopla cada día los ritmos metabólicos, al ciclo de luz.

Un segundo efecto de la luz es ajustar la duración del período presentado por el NSQ el cual a su vez estimula a la GP. Finalmente, un tercer efecto es disparar la transmisión de señales del NSQ a la GP por la noche. A través de este mecanismo de disparo, la luz puede bloquear el incremento nocturno de N-acetiltransferasa y MEL.

Las ratas que son mantenidas experimentalmente en un ciclo L-D 14-10 después de permanecer 3 hr en oscuridad y que son trasladadas a un cuarto en donde se les expone a la luz por un tiempo de entre 0.25 a 10 min presentan una disminución en la actividad de la N-acetiltransferasa de cerca de 5000 unidades, después de la exposición por 10 min a la luz, la actividad de enzima cae a 400 unidades (36). De manera similar la actividad de la hidroxíndol-o-metiltransferasa disminuye cuando las ratas son sometidas a luz constante (35). Se ha reportado también que los animales cegados por enucleación no tienen ningún cambio en la actividad de la N-acetiltransferasa (36). Por otra parte, también se ha reportado un aumento en la actividad enzimática en los

FIG. 4 RITMO DEL METABOLISMO INDOLICO EN LA GP.

(tomada de la ref. 66)



El esquema muestra las variaciones en las concentraciones de metabolitos y actividades de las enzimas que intervienen. La porción oscura indica el período de oscuridad del ciclo de iluminación.

animales cegados, la cual es aún mayor que la de los animales controles durante el periodo de oscuridad (40), esto no nos permite tener una idea clara de lo que sucede en los animales cegados, ya que los datos son contradictorios.

Además del efecto de la luz sobre la actividad enzimática se ha visto que la exposición de ratas a luz constante produce una disminución en el tamaño de las pineales comparándolas con las de animales mantenidos en oscuridad constante o en un ciclo L-D normal (36).

11.8. EFFECTOS INDUCIDOS POR LA MELATONINA

Se han establecido algunos efectos de los productos de secreción de la GP principalmente en el control estacional de la reproducción (10); ya que la inyección diaria de MEL disminuye la incidencia del estro y reduce el peso de los ovarios (41). Por otro lado, en hamsters machos mantenidos en periodos de oscuridad por periodos prolongados (30 días) se presenta atrofia testicular y pérdida de la actividad espermatogénica (42). No obstante estos resultados, se menciona que la MEL no se puede considerar como pro o antigonadal por sí misma, más bien, esta hormona estaría encargada de regular la información temporal que va al eje hipotálamo-hipófisis y éste a su vez es el responsable de coordinar las actividades reproductivas (10). De esta manera, se ha encontrado que la MEL bloquea o promueve la liberación de hormona LH de acuerdo al estadio reproductivo en que se encuentren las hembras (43), por otra parte, se han encontrado cambios en el patrón circádico de liberación de MEL durante diferentes estadios del ciclo

menstrual en las mujeres, así como un incremento en la concentración de MEL en la fase luteal, comparada con la fase folicular (44).

La administración crónica de MEL deprime la función gonadal en hamsters, principalmente cuando es inyectada durante la última parte de la fase luminosa (45). La "MEL tiene un efecto diurno" in vivo, inhibe la liberación de FSH y LH a nivel de la pituitaria anterior (45). Además de tener efecto sobre el eje hipotálamo-hipófisis, la pineal a, través de la MEL tiene una acción inhibitoria sobre el eje hipófisis-tiroideo (46,47).

Existen otros efectos asociados con la MEL como la participación de ésta en los cambios circádicos de analgesia endógena (48) o actuar como promotor de sueño en la rata y el hombre (15).

La mayoría de los trabajos realizados con esta hormona han mostrado que es un acoplador de ciclos circádicos tales como la actividad locomotora e ingesta de agua (12,13), además de tener influencias en el comportamiento pupilar, termoregulación, metabolismo de carbohidratos y lípidos, así como en el catabolismo de proteínas, (49). Se ha descrito asimismo su participación en la homeostasis de la composición electrolítica cerebral (50).

111. ANTECEDENTES RELEVANTES DEL PROBLEMA

Para este trabajo resulta de gran importancia el hecho de que a la MEL también se le ha relacionado con la regulación de la actividad eléctrica cerebral. Por ejemplo, se ha probado que la pinealectomía en ratas, propicia la aparición de ondas paroxísticas en el EEG (1). En ratas a las que se les practicó una pinealectomía y después una

paratiroidectomía se les produjo la aparición de convulsiones que en algunos casos condujeron a la muerte de los animales (2). En el gerbo, asimismo se ha observado que la pinealectomía produce convulsiones (3). Otros datos han mostrado que el extracto de pineal tiene un efecto supresor en las convulsiones inducidas eléctricamente y produce además una activación del EEG (7,51); en los gerbos también la MEL disminuye el número promedio de convulsiones y reduce también el número de animales que exhiben actividad convulsiva después de la pinealectomía (52).

Otra evidencia que pone de manifiesto la importancia que tiene la MEL para regular la actividad eléctrica cerebral proviene de los estudios hechos por Fariello y cols. (53) quienes utilizaron un anticuerpo contra la MEL en la rata, para inactivar la acción de la hormona y mostraron el desarrollo de anomalías epileptiformes transitorias y crisis convulsivas ocasionales.

La actividad anticonvulsiva de la MEL cuando es administrada en forma aguda sobre la aplicación tópica, cortical y subcortical de diferentes agentes epileptogénicos, únicamente ha mostrado una pequeña modificación en la actividad focal epileptiforme, pero una reducción significativa e incluso una supresión en los potenciales sensoriales evocados (54).

Albertson y cols. (9) han reportado la actividad anticonvulsiva de la MEL en dos modelos de epilepsia, el "Kindling" eléctrico amigdalino y el provocado por la administración repetida de Pentilentetrazol (PTZ) o "Kindling" químico. Estos autores encontraron una disminución significativa en el estadio convulsivo promedio cuando se administraron dosis de 150 mg/kg comparable al provocado por 2.5

mg/kg de diazepam y 30 mg/kg de fenobarbital (9). Como ya se mencionó el "Kindling" químico es producido por la administración repetida de dosis subconvulsivas de PTZ, sin embargo no se conoce con certeza los mecanismos fisiológicos ni celulares del "Kindling".

SEGUNDA PARTE

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la mayoría de trabajos en los que se han querido probar los efectos anticonvulsivos de la MEL se han utilizado dosis muy altas (mayores de los 50 mg/kg), como en el caso del trabajo de Albertson (9), se ha llegado a inducir ataxia o sedación en los animales. Estos efectos podrían estar enmascarando un efecto directo de la MEL sobre la hiperexcitabilidad neuronal.

Tomando en cuenta los antecedentes mencionados, el presente trabajo pretende evaluar el posible efecto anticonvulsivo de la MEL administrada a dosis que no son capaces de producir otros cambios conductuales que pudieran estar enmascarando tales efectos.

IV.1. OBJETIVOS

- El primer objetivo de este trabajo es probar que la administración de MEL tanto aguda (en dosis que van de 0.1 a 10 mg/kg) como crónica (en una dosis única de 0.25 mg/kg) las cuales no son capaces de producir ningún cambio conductual (ataxia o sedación), son efectivas para modificar los parámetros convulsivos producidos por la administración aguda del agente convulsivante PTZ.

- Un segundo objetivo es comprobar cuál esquema de administración de MEL (administración aguda o crónica) es el más efectivo para la modificación de parámetros convulsivos.

- Un tercer objetivo es comparar la efectividad de la hormona cuando

se administra bajo dos esquemas de iluminación: inyección de la hormona durante el fotoperíodo o el escotoperíodo.

IV.2. HIPOTESIS DE TRABAJO

De acuerdo a estos últimos antecedentes sobre el papel de la pineal como regulador de la actividad eléctrica a través de la hormona MEL se tienen las siguientes hipótesis:

a) Los animales que reciban MEL deberán presentar un retardo en la aparición de parámetros convulsivos, una disminución en el porcentaje de animales con actividad convulsiva, así como una disminución del estadio convulsivo.

b) El efecto anticonvulsivo será más pronunciado en animales que reciban la administración crónica de la hormona que los que reciban la administración aguda.

c) El efecto anticonvulsivo tanto en la administración crónica como en la aguda de MEL será más fuerte cuando la hormona sea inyectada en la fase de oscuridad que cuando sea inyectada en la fase de luz.

V. MATERIALES Y METODOS

En una primera fase del estudio se utilizaron ratones machos Balb-C de 30-35 gr de peso habituados por 15 días a un ciclo luz-oscuridad (L-D) 12:12 con inicio del fotoperíodo a las 06:00 hr y con agua y comida ad libitum, mantenidos a una temperatura de 21 °C. Con estos animales se construyó una curva dosis-respuesta del efecto convulsivo inducido por el PTZ a partir de la cual se seleccionó una

dosis que provocara el mayor número de parámetros convulsivos que pudieran sufrir modificaciones con la administración de MEL; ésta dosis fue de 31.62 mg/kg intraperitoneal (i.p.) (fig 1A).

Por otra parte el efecto de la MEL sobre la acción convulsiva del PTZ fue probado bajo dos esquemas de administración de la hormona; uno de administración aguda (i.p) y otro de administración crónica (i.p.). En ambos esquemas, los ratones se habituaron por 15 días a un ciclo L-O 12:12 con inicio de fotoperiodo a las 06:00 hrs.

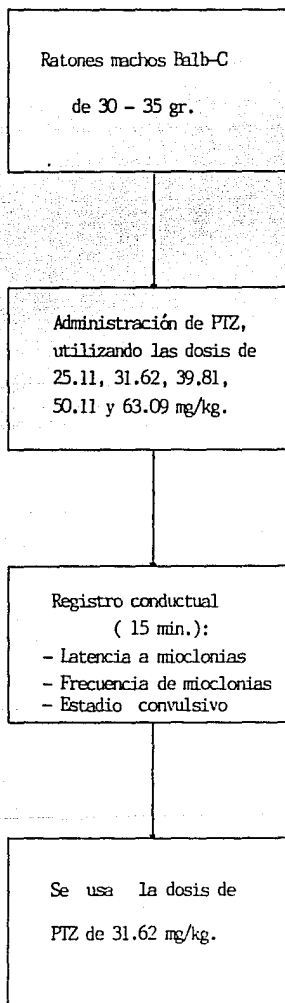
Para la administración aguda se formaron 6 grupos (n=5-11) que recibieron 0.1, 0.31, 1.0, 3.16, 10.0 mg/kg respectivamente de MEL o vehículo, este último como grupo control (en las gráficas aparecen éstas dosis con el valor de su log.) 30 min antes de la inyección de PTZ a la dosis de 31.62 mg/kg. Inmediatamente después de la administración de PTZ se midió la latencia a la aparición de la primera mioclónica, la frecuencia de éstas y la severidad del estadio convulsivo producido de acuerdo a la escala de Ito y cols. (1977) (54) por un periodo de 30 min.

Los estadios convulsivos se definieron de la siguiente manera:

- Estadio 1. Sin respuesta convulsiva.
- Estadio 2. Mioclonias faciales, del cuello y los miembros anteriores.
- Estadio 3. Extensión tónico-clónica del animal con mioclonias bilaterales de los miembros anteriores (crisis parciales).
- Estadio 4. Levantamiento del cuerpo apoyado en los miembros posteriores del animal con movimientos clónicos continuos durante el levantamiento.
- Estadio 5. Crisis convulsivas generalizadas con la conducta

FIG. 1 A.

ESQUEMA DE LA ELABORACION DE LA CURVA DOSIS-RESPUESTA DEL EFECTO CONVULSIVO INDUCIDO POR PTZ.



descrita en el estadio 4, más pérdida del equilibrio y caída del animal.

La administración crónica de MEL se realizó inyectando a un grupo (n=10) 0.25 mg/kg de MEL o vehículo (n=14) por 15 días siempre entre las 10:00 y las 10:30 hr. Al día 15 después de la inyección de MEL se dejaron transcurrir 30 min. y posteriormente se aplicó el PTZ registrándose inmediatamente los parámetros antes mencionados por un periodo de 30 min. (fig. 2A).

En una segunda fase experimental se habituaron los animales a un ciclo L-D 12:12 pero con inicio de fotoperíodo a las 18:00 hr y la inyección de MEL o vehículo se realizó también de 10:00-10:30; en este caso la administración de MEL o vehículo y el registro de los parámetros se efectuó bajo luz roja todo esto siguiendo el mismo esquema antes descrito. La administración aguda de MEL o vehículo se efectuó en grupos de n=10-32 y para la administración crónica con grupos de n=11 y 19 respectivamente (fig 3A).

El análisis estadístico se realizó con una prueba t-Student para muestras no pareadas para la latencia y frecuencia de mioclonías, con una corrección al nivel alfa de significancia de 0.01 (corrección de Bonferroni), debido a la desigualdad de los grupos, y con la prueba exacta de Fisher (55) para el estadio convulsivo y porcentaje de animales que presentaron algún estadio convulsivo específico.

FIG. 2 A.

ESQUEMA DE LA METODOLOGIA UTILIZADA PARA PROBAR EL EFECTO ANTICONVULSIVO DE LA MEL DURANTE SU ADMINISTRACION EN EL FOTOPERIODO.

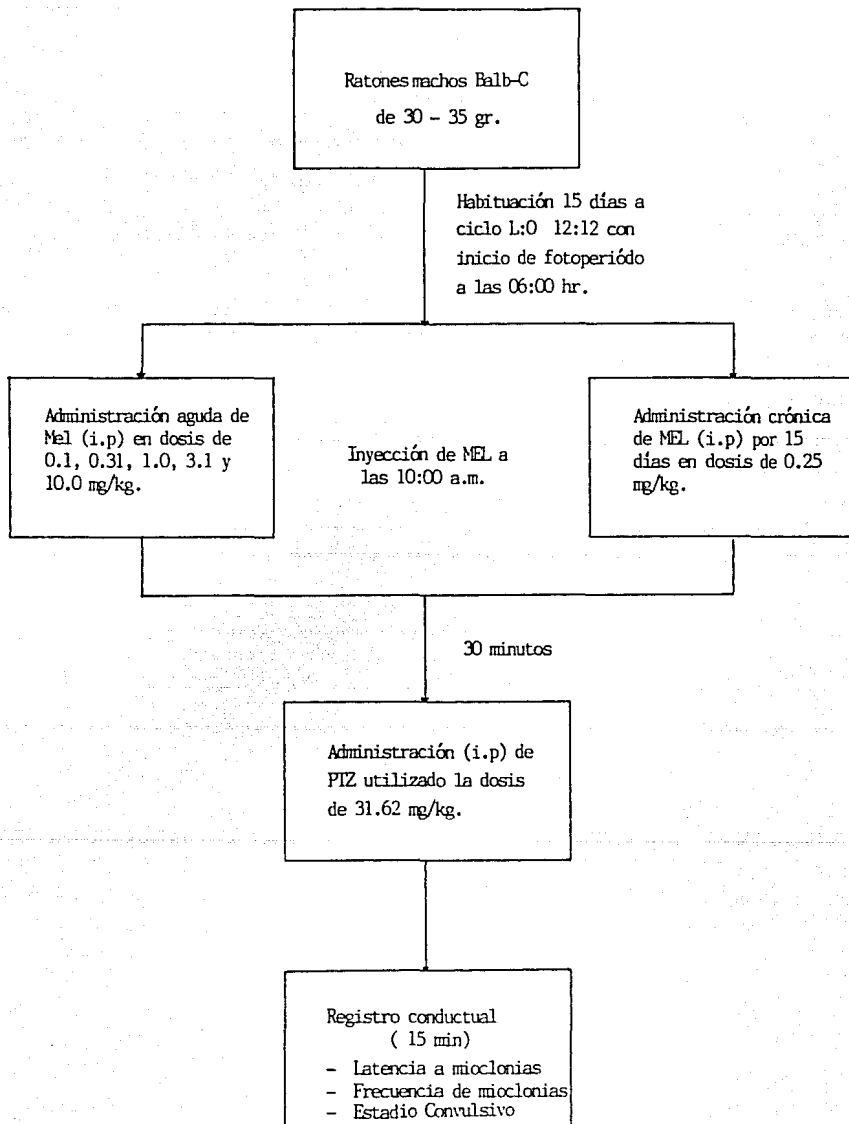
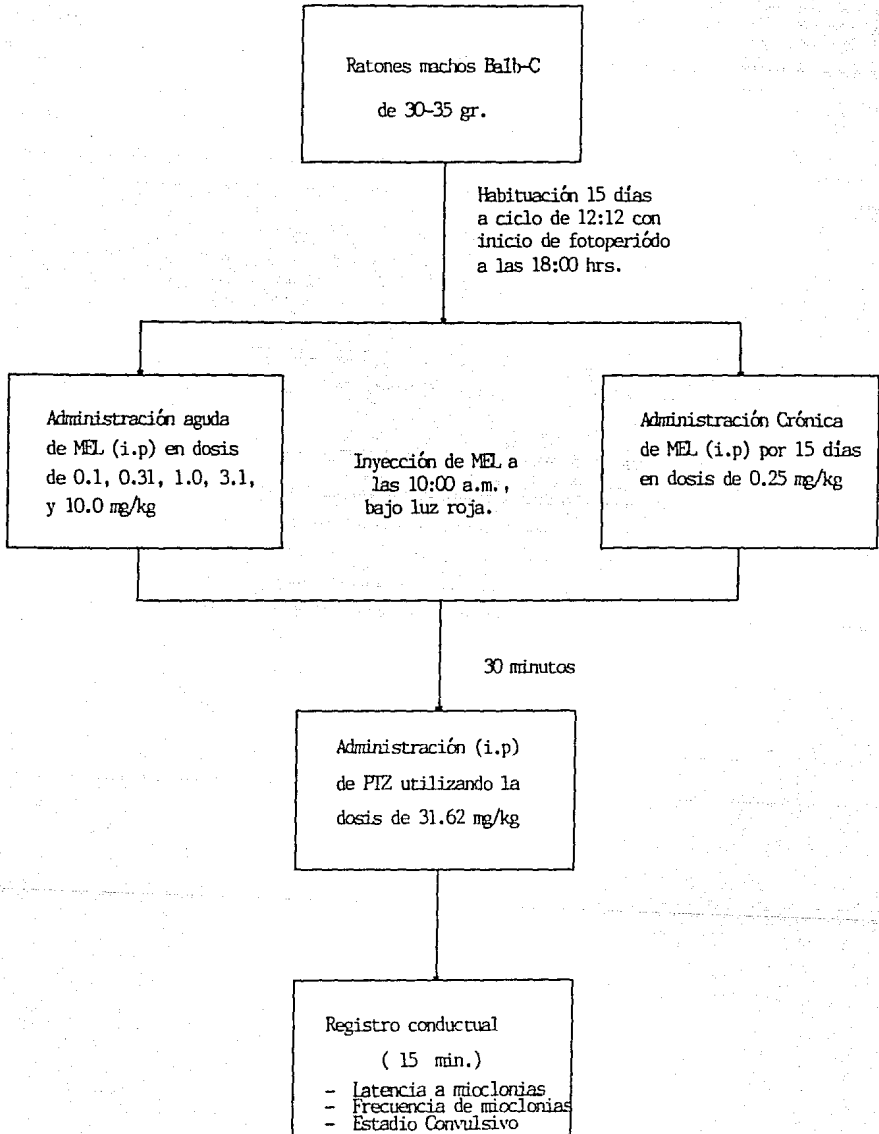


FIG. 3 A.

ESQUEMA DE LA METODOLOGIA UTILIZADA PARA PROBAR EL EFECTO ANTICONVULSIVO DE LA MEL DURANTE SU ADMINISTRACION EN EL ESCOTOPERIODO.



VI. RESULTADOS

VI.1. CURVA DOSIS-RESPUESTA A PTZ

La tabla 1 y la fig. 4 muestran la curva dosis-respuesta del efecto convulsivo del PTZ en donde se puede observar que a dosis bajas del fármaco (25.11 mg/kg) no se presentó ninguna conducta convulsiva (estadio convulsivo 1), a dosis intermedias (31.62 y 39.81 mg/kg) se presentaron mioclonías y crisis parciales (estadios convulsivos 2 y 3) y a dosis altas (50.11 y 63.09 mg/kg) los animales presentaron tanto crisis parciales como crisis generalizadas. Con estas últimas dosis la mayoría de animales llegaron a morir (estadio convulsivo 4 y 5).

La dosis de 31.62 mg/kg de PTZ fue con la que se produjeron mioclonías (estadio convulsivo 2) y en algunos casos también crisis parciales (estadio convulsivo 3), por lo tanto, fue seleccionada para probar el posible efecto anticonvulsivo de la MEL pues nos permitió tener más parámetros que medir y que nos pudieran mostrar algún cambio producido por la hormona.

VI.2. ADMINISTRACION DE MELATONINA DURANTE EL FOTOPERIODO (CICLO NORMAL)

VI.2.a. ADMINISTRACION AGUDA:

El grupo control presentó una latencia a la aparición de la primer mioclonía de 2.5 ± 0.64 min $n=11$ ($X \pm EE$), la cual se incrementó por la administración de MEL, sin embargo, este cambio fue

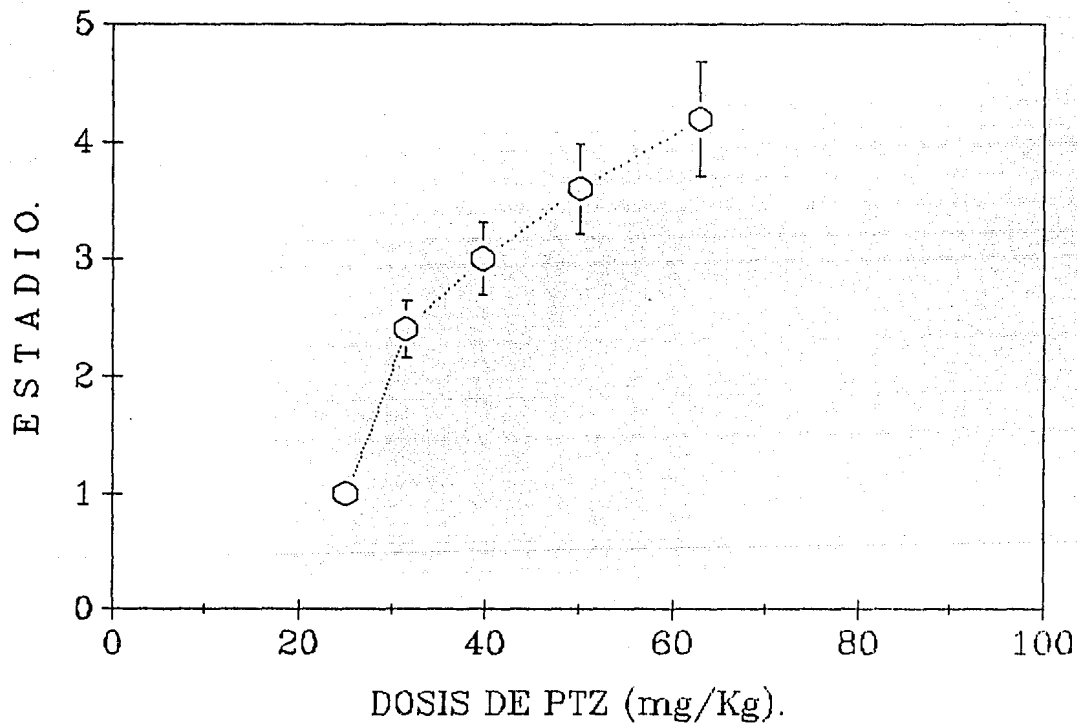
Tabla 1.

Estadios convulsivos inducidos por la administración de PIZ.

Dosis PIZ en mg/kg.	Estadio ($\bar{x} \pm E E$)
25.11	1 \pm 0
31.62	2.4 \pm 0.24
39.81	3.0 \pm 0.31
50.11	3.6 \pm 0.39
63.09	4.2 \pm 0.48

En cada dosis de PIZ se utilizó una n=5.

Fig. 4A CURVA DOSIS-RESPUESTA DEL
ESTADIO CONVULSIVO INDUCIDO POR PTZ.



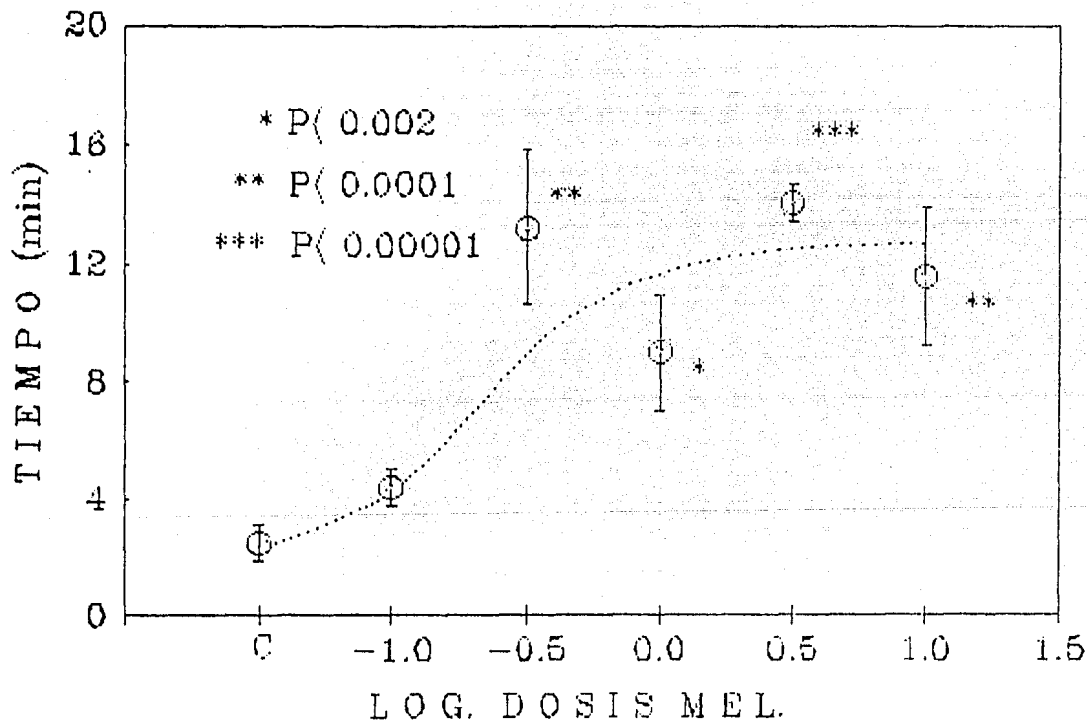
Se grafica el $\bar{x} \pm EE$ del estadio convulsivo producido por las dosis de pentilen tetrazol utilizadas.

Tabla 2.

Latencia a mioclonias durante la administración de MEL en el fotoperíodo.

MEL en mg/kg.	Latencia a mioclonias en min. ($\bar{x} \pm E E$)	T student para muestras no pareadas
C (n=11)	2.5 \pm 0.64	—
0.1 (n=5)	4.37 \pm 0.59	ns
0.31 (n=5)	13.25 \pm 2.60	p < 0.0001
1.0 (n=7)	9.0 \pm 2.0	p < 0.002
3.1 (n=8)	14.08 \pm 0.61	p < 0.0001
10.0 (n=5)	11.6 \pm 2.3	p < 0.0001

Fig. 5A LATENCIA A MIOCLONIAS DURANTE LA ADMINISTRACION AGUDA DE MEL EN EL FOTOPERIODO.



Los valores de latencia son $\bar{X} \pm EE$ graficados contra el logaritmo de las dosis de MEL utilizadas. Las comparaciones se realizaron entre el control (C) vs. cada dosis de MEL con una prueba de t-student.

significativo sólo a partir de las dosis de 0.31 mg/kg (13.25 ± 2.6 min n=5) y siguió una curva dosis dependiente (fig. 5A y tabla 2),

En cuanto a la frecuencia de mioclonias se observó una disminución en el número de éstas desde la dosis de 0.1 mg/kg de MEL (fig 6A) la cual fué estadísticamente significativa. Este efecto se ve acentuado conforme fue aumentando la dosis de MEL (tabla 3).

El estadio convulsivo promedio inducido por el PTZ en los ratones control (2.23 ± 0.12 n=11) fué reducido por la administración de MEL (fig 7A) y al igual que ocurre con la frecuencia de mioclonias el estadio convulsivo fue disminuyendo conforme fué aumentando la dosis de MEL desde la dosis de 0.31 mg/kg (1.8 ± 0.12 n=5) (tabla 4).

Por otra parte, el análisis del porcentaje de animales que presentaron algun estadio específico nos muestra que tomando en cuenta el total de animales con actividad convulsiva (estadio 2 y 3) y que fue del 100 % (n=11), disminuyó a partir de los 0.31 mg/kg al 20 % (n=5), el porcentaje de animales que presentaron sólo estadio 2 (81.81 % n=11) disminuyó únicamente con la dosis de 3.1 mg/kg (12.5 % n=5) , no siendo significativa esta reducción para las otras dosis a pesar de su cambio. Para el estadio 3 se registró una disminución a cero desde la dosis de 0.1 mg/kg (n=5) que sin embargo no es significativa (fig. 8A y tabla 5).

VI.2.b. ADMINISTRACION CRONICA:

En la latencia a mioclonias no se registró un cambio significativo en el grupo de tratamiento. La latencia para el grupo control fue de 2.31 ± 0.29 min. (n=14) y para el grupo de MEL de 2.56 ± 0.36 min (n=10) (tabla 6).

La frecuencia de mioclonias no mostró ningún cambio

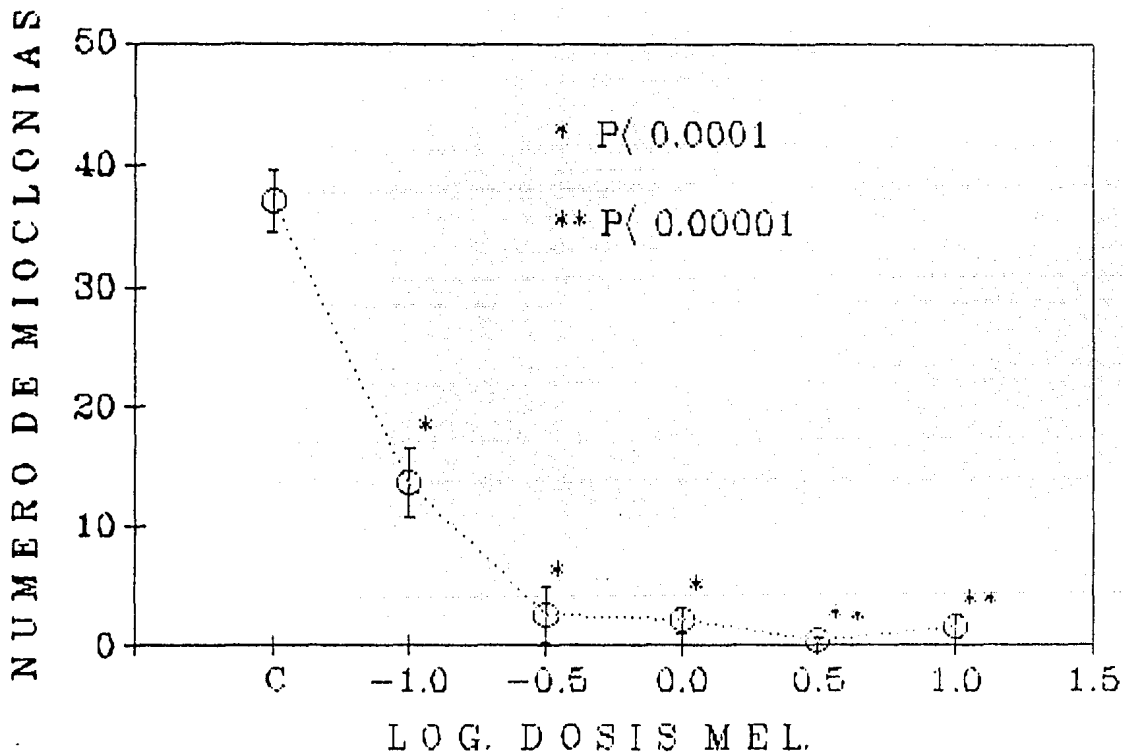
Tabla 3.

Frecuencia de mioclonias durante la administración de MEL en el fotoperíodo.

MEL en mg/kg.	Frecuencia de mioclonias ($\bar{x} \pm E E$)	T student para mues- tras no pareadas.
C	37,09 \pm 2.55	—
0.1	13,63 \pm 2.89	p < 0,001
0.31	2.6 \pm 2.36	p < 0,0001
1.0	2,14 \pm 1.01	p < 0,0001
3.1	0,37 \pm 0.26	p < 0,0001
10.0	1,63 \pm 0.95	p < 0,0001

Los valores de n son iguales a los de la tabla 2.

Fig. 8A FRECUENCIA DE MIOCLONIAS DURANTE LA ADMINISTRACION AGUDA DE MEL EN EL FOTOPERIODO.



Al igual que en la fig. 5A se utiliza el $\bar{X} \pm EE$ de la frecuencia de mioclonias contra el logaritmo de las dosis de MEL. Las comparaciones son similares a la fig. anterior.

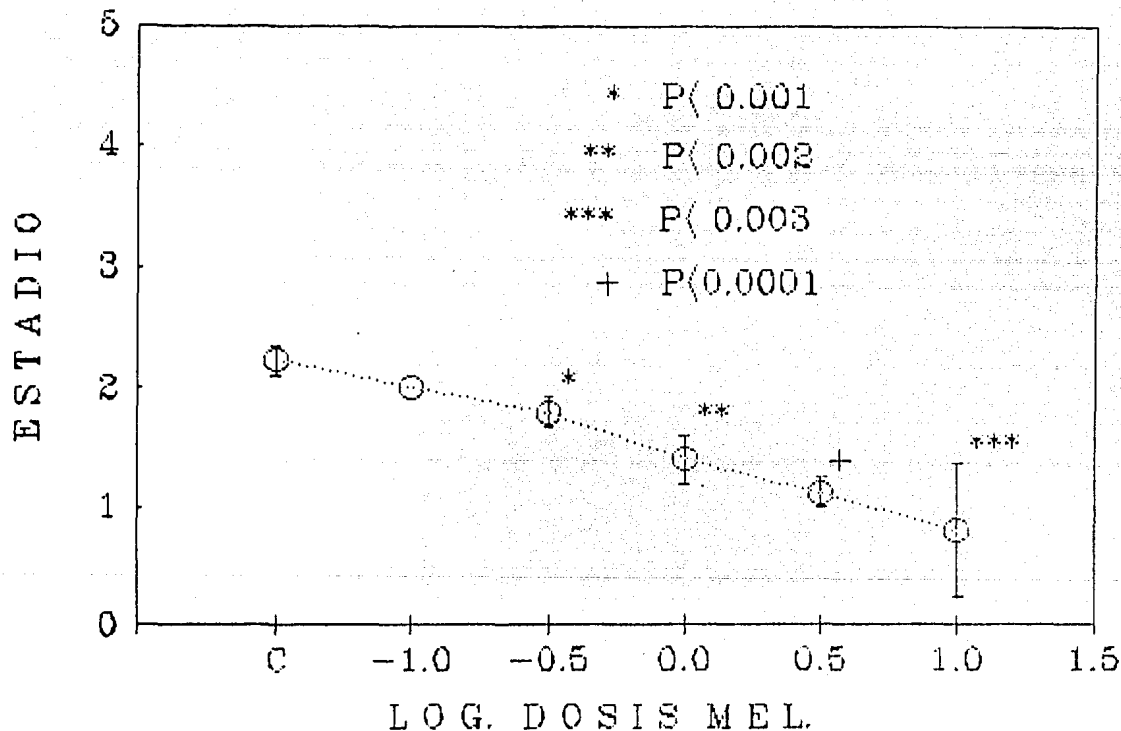
Tabla 4.

Estadio convulsivo durante la administración de MEL en el fotoperíodo.

MEL en mg/kg.	Estadio convulsivo ($\bar{x} \pm E E$)	T student para muestras no pareadas
C	2.23 \pm 0.12	—
0.1	2.0 \pm 0	ns
0.31	1.8 \pm 0.12	p < 0.0001
1.0	1.42 \pm 0.2	p < 0.002
3.1	1.12 \pm 0.12	p < 0.0001
10.0	0.8 \pm 0.56	p < 0.003

Los valores de n son iguales a los de la tabla 2.

Fig. 7A ESTADIO CONVULSIVO DURANTE LA ADMINISTRACION AGUDA DE MEL. EN EL FOTOPERIODO.



Se grafica el $\bar{x} \pm EE$ del estadio convulsivo inducido por PTZ contra el logaritmo de las dosis de MEL. En este caso se utilizó el test exacto de Fisher como prueba estadística, para comparar el control vs. dosis de MEL.

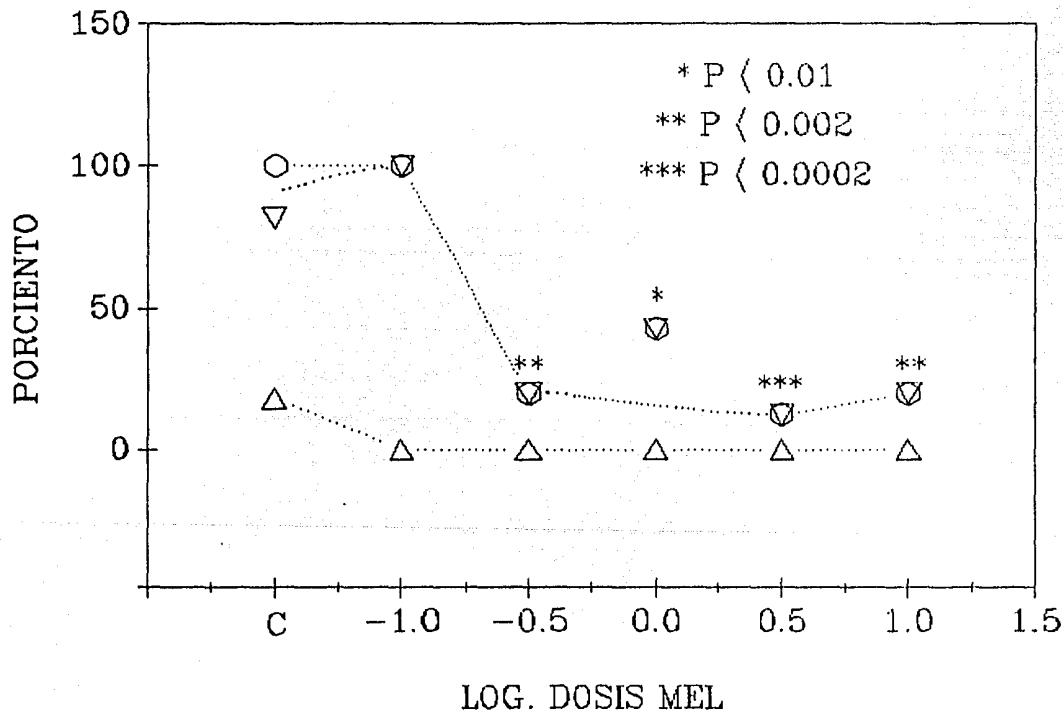
Tabla 5.

Porcentaje de animales con actividad convulsiva durante la administración de MEL en el fotoperíodo.

MEL mg/kg.	% animales con Estadio 2 y 3	prueba exacta de Fisher (PEF)	% de animales con Estadio 2	P.E.F.	% animales con Estadio 3	P.E.F.
C	100	—	81.81	—	18.18	—
0.1	100	n s	100	n s	0	n s
0.31	20	$p < 0.002$	20	n s	0	n s
1.0	42.85	$p < 0.01$	42.85	n s	0	n s
3.1	12.5	$p < 0.0002$	12.5	$p < 0.005$	0	n s
10.0	20	$p < 0.002$	20	n s	0	n s

Los valores de n son iguales a los de la tabla 2.

Fig. 8A PORCENTAJE DE ANIMALES CON ACTIVIDAD CONVULSIVA DURANTE LA ADMINISTRACION AGUDA DE MEL. EN EL FOTOPERIODO.



En esta gráfica muestra el porcentaje de animales por grupo que presentaron un estadio convulsivo determinado. Se compara el control vs. dosis de MEL con la prueba exacta de Fisher. ○—○ Estadio 2 y 3, ▼—▼ Estadio 2, ▲—▲ Estadio 3. Los valores de significancia se refieren al estadio 2 y 3 juntos y al estadio 2.

significativo. No obstante se observó una tendencia a la disminución en el número de mioclonias: de 23.57 ± 5.37 (n=14) en el control a 11.4 ± 2.24 (n=10) mioclonias en el tratado con MEL (tabla 7).

Así como los parámetros antes mencionados, el estadio convulsivo no sufrió ningún cambio significativo. Su valor para el grupo control fue de 2.21 ± 0.11 (n=14) y 2 ± 0 (n=10) para el grupo de MEL (tabla 8).

El total de animales que presentaron estadio 2 y 3 no cambió su porcentaje entre el grupo control (100 % n=14) y el grupo tratado (100 % n=10), el porcentaje de animales que sólo presentaron estadio 2 (78.57 % n=14) aumentó con la administración de MEL (100 % n=10) ocurriendo lo contrario con animales que presentaron estadio 3 (cambio del 21.42 % para el control n=14 a 0 % para MEL n=10), sin embargo, ningún cambio es significativo (tabla 9).

VI.3. ADMINISTRACION DE MELATONINA DURANTE EL ESCOTOPERIODO (CICLO INVERTIDO)

VI.3.a. ADMINISTRACION AGUDA:

En la fig. 9A y tabla 10 se puede observar que la administración de MEL durante el escotoperíodo también produjo un aumento en la latencia a mioclonias (1.89 ± 0.55 min. n=32 grupo control) que es significativa a partir de la dosis de 1.0 mg/kg (2.68 ± 1.41 min n=9).

Existe además una disminución significativa en el número de mioclonias (24.31 ± 2.22 n=32 grupo control) sólo para las dosis de 0.1 mg/kg (12.27 ± 1.61 n=11) y 10 mg/kg (11.3 ± 2.13 n=10) aunque con las otras dosis también hubo disminución pero ésta no fue

Tabla 6.

Latencia de mioclonías durante la administración crónica de MEL en el fotoperíodo.

Control (n=14)	MEL (n=10)
2.31 ± 0.29 min.	2.56 ± 0.36 min

Tabla 7.

Frecuencia de mioclonías durante la administración crónica de MEL.

Control	MEL
23.57 ± 5.37	11.4 ± 2.24

Los valores de n son iguales a los de la tabla 6.

Tabla 8.

Estado convulsivo durante la administración crónica de MEL.

Control	MEL
2.21 ± 0.11	2 ± 0

Los valores de n son iguales a los de la tabla 6.

Tabla 9.

Porcentaje de animales con actividad convulsiva en la administración crónica de MEL.

	Control	MEL
% Estadio 2 y 3	100	100
% Estadio 2	78.57	100
% Estadio 3	21.42	0

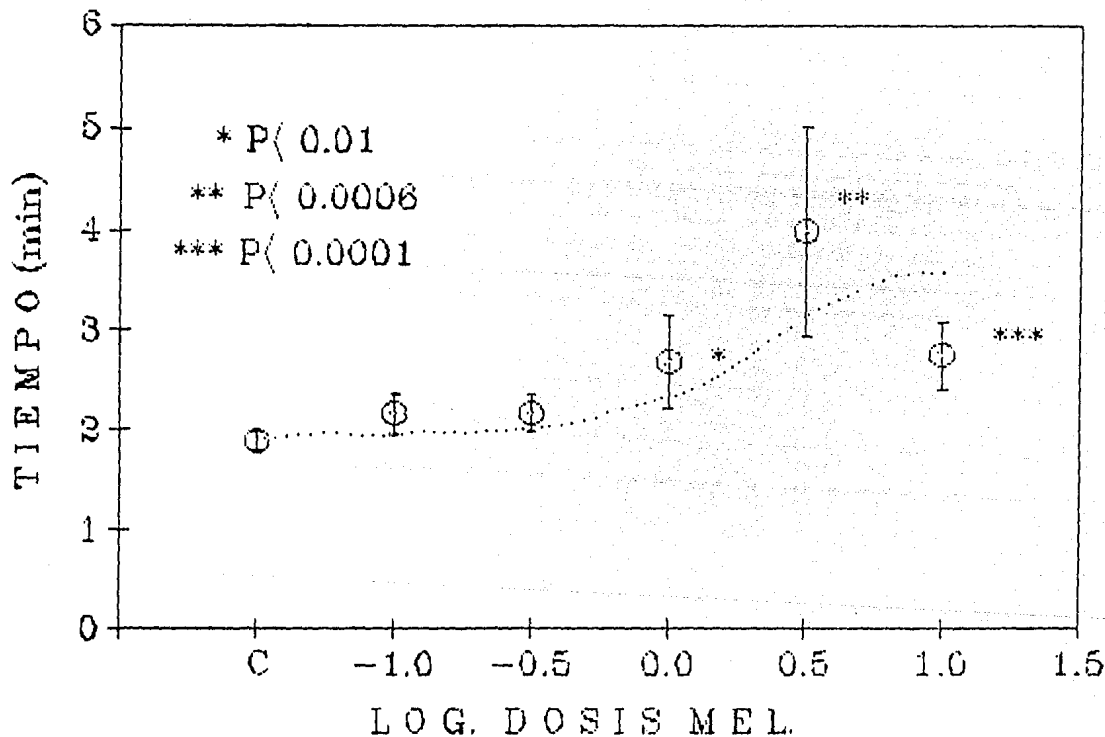
Los valores de n son iguales a los de la tabla 6.

Tabla 10.

Latencia a mioclonias durante la administración de MEL en el escotoperíodo.

MEL en mg/kg.	Latencia a mioclonias en min. ($\bar{x} \pm E E$).	T student para muestras no pareadas.
C (n=32)	1.89 \pm 0.55	———
0.1 (n=11)	2.17 \pm 1.1	n s
0.31 (n=10)	2.17 \pm 1.1	n s
1.0 (n=9)	2.68 \pm 1.41	p < 0.01
3.1 (n=9)	3.98 \pm 3.1	p < 0.0006
10.0 (n=10)	2.75 \pm 1.09	p < 0.0001

Fig. 9A LATENCIA A MIOCLONIAS DURANTE
LA ADMINISTRACION AGUDA DE MEL EN EL ESCOTOPERIODO.



Se tiene lo mismo que en la fig. 5A, solo que en esta fig. representa los valores de latencia en el escotoperiód.

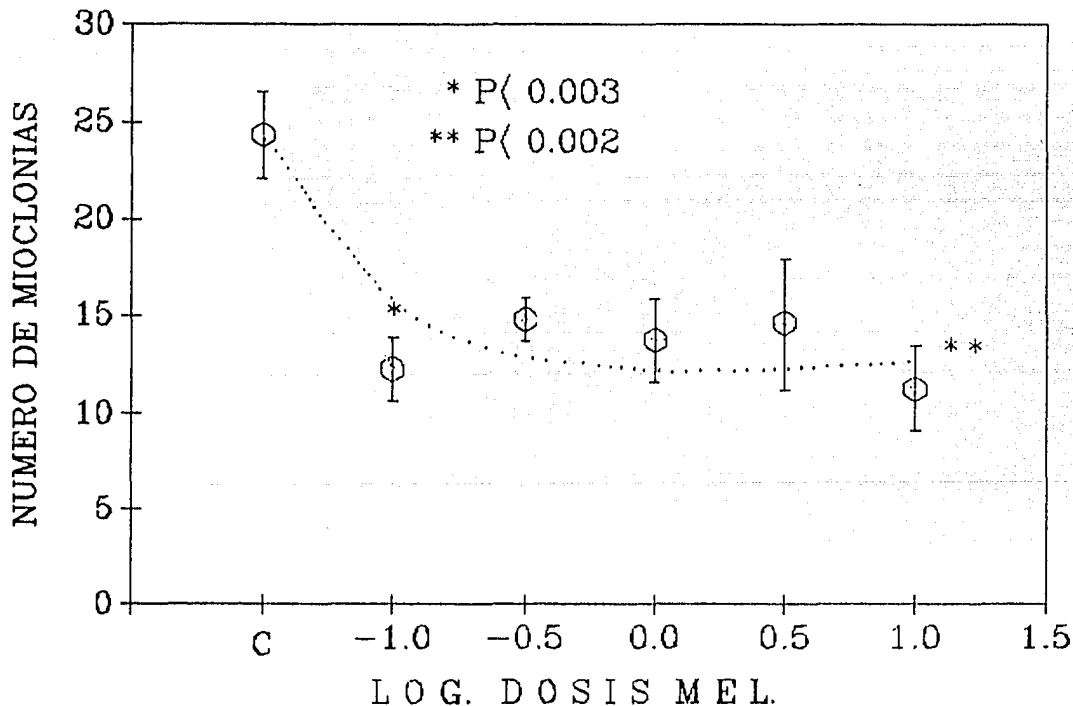
Tabla 11.

Frecuencia de mioclonías durante la administración de MEL en el escotoperiódó.

MEL en mg/kg.	Frecuencia de mioclonías ($\bar{x} \pm E E$)	T student para muestras no pareadas.
C	24.31 \pm 2.22	—
0.1	12.27 \pm 1.61	p < 0.003
0.31	14.8 \pm 1.13	n s
1.0	13.7 \pm 2.1	n s
3.1	14.6 \pm 3.35	n s
10.0	11.3 \pm 2.13	p < 0.002

Los valores de n son iguales a los de la tabla 1

Fig. 10A FRECUENCIA DE MIOCLONIAS DURANTE LA ADMINISTRACION AGUDA DE MEL EN EL ESCOTOPERIODO.



Se tiene lo mismo que en la fig. 6A utilizando los valores de frecuencia obtenidos en el escotoperiód.

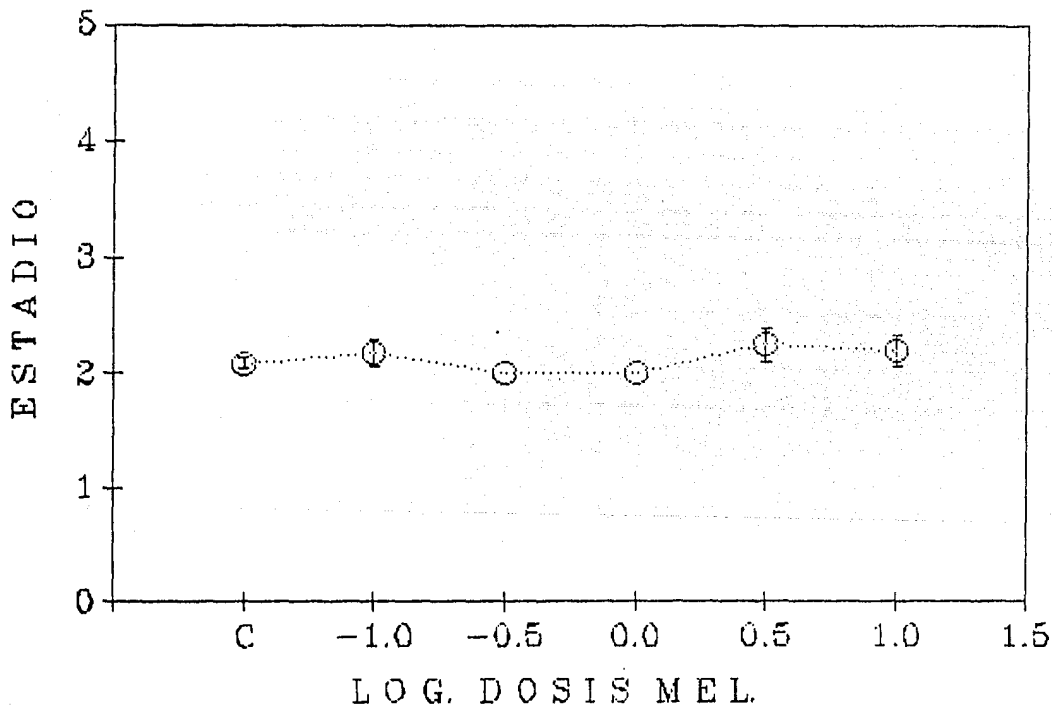
Tabla 12.

Estado convulsivo durante la administración de MEL en el escotoperíodo.

MEL en mg/kg.	Estado convulsivo ($\bar{x} \pm E E$).	T student para muestras no pareadas.
C	2.09 \pm 0.29	—
0.1	2.18 \pm 0.4	n s
0.31	2.0 \pm 0	n s
1.0	2.0 \pm 0	n s
3.1	2.25 \pm 0.46	n s
10.0	2.2 \pm 0.42	n s

Los valores de n son iguales a los de la tabla 10.

Fig. 11A ESTADIO CONVULSIVO DURANTE LA ADMINISTRACION AGUDA DE MEL. EN EL ESCOTOPERIODO.



Se tiene lo mismo que en la fig. 7A utilizando los valores de estadio convulsivo obtenidos en el escotoperiódó.

significativa (fig. 10A y tabla 11).

Para el estadio convulsivo se pudo observar que la MEL no produjo ningún cambio con cualquiera de las dosis de la hormona (fig. 11A y tabla 12).

El porcentaje de animales que presentaron algún estadio convulsivo no sufrió ningún cambio (fig. 12A y tabla 13).

VI.3.b. ADMINISTRACION CRONICA:

La tabla 14 nos muestra que la MEL no produjo cambios significativos en ninguno de los parámetros, pero existe una tendencia al aumento de la latencia, disminución de la frecuencia y el estadio convulsivo que no alcanzan significancia debido a la gran dispersión de los datos obtenidos (Tabla 14-16).

Tampoco para el porcentaje de animales con actividad convulsiva hay cambio, pero al igual que los que estuvieron en el ciclo normal hay una tendencia al aumento del porcentaje de animales con estadio 2 y una disminución en el porcentaje de animales con estadio 3 (Tabla 17).

VI.4. COMPARACION ENTRE LOS DOS CICLOS

VI.4.a. ADMINISTRACION AGUDA.

Cuando se compara la administración de MEL entre los dos ciclos encontramos que para la latencia a mioclonias hubo un aumento más evidente cuando se inyectó la hormona durante el fotoperiodo (fig. 13A). En la frecuencia de mioclonias se ve una disminución

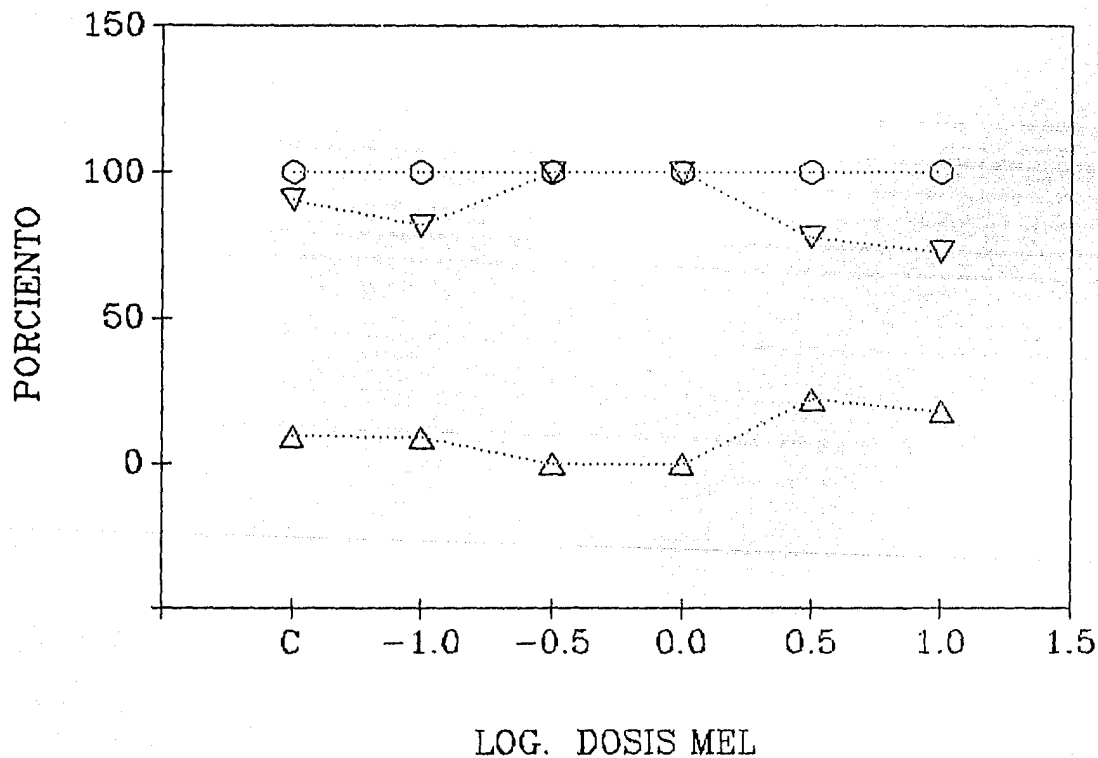
Tabla 13.

Porcentaje de animales con actividad convulsiva durante la administración de MEL en el escotoperíodo.

MEL en mg/kg.	% de animales con Estadio 2 y 3	Prueba exacta de Fisher (P.E.F.)	% de animales con estadio 2	P.E.F.	% de animales con estadio 3	P.E.F.
C	100	—	90,62	—	9,37	—
0.1	100	n s	81,81	n s	9,09	n s
0.31	100	n s	100	n s	0	n s
1.0	100	n s	100	n s	0	n s
3.1	100	n s	77,72	n s	22,2	n s
10.0	100	n s	72,72	n s	18,18	n s

Los valores de n son iguales a los de la tabla 10.

Fig. 12A PORCENTAJE DE ANIMALES CON ACTIVIDAD CONVULSIVA DURANTE LA ADMINISTRACION AGUDA DE MEL. EN EL ESCOTOPERIODO.



Se tiene la misma nomenclatura utilizada en la fig. 8A, utilizando los valores del porcentaje del escotoperíodo.

Tabla 14.

Latencia de mioclonias durante la administración crónica de MEL en el escotoperíodo.

Control (n=11)	MEL (n=19)
2.14 ± 0.47	2.15 ± 0.6

Tabla 15.

Frecuencia de mioclonias durante la administración crónica de MEL en el escotoperíodo.

Control	MEL
17.27 ± 1.93	13.47 ± 1.87

Los valores de n son iguales a los de la tabla 14.

Tabla 16.

Estadio convulsivo durante la administración crónica de MEL en el escotoperíodo.

Control	MEL
2.27 ± 0.13	2 ± 0.05

los valores de n son iguales a los de la tabla 14.

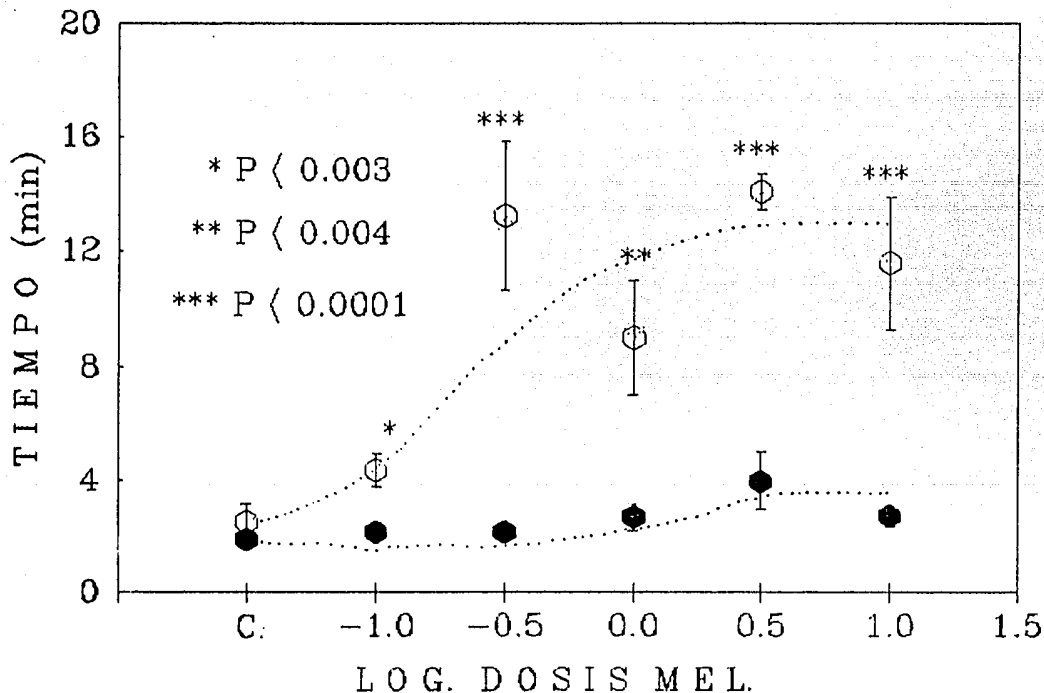
Tabla 17.

Porcentaje de animales con actividad convulsiva en la administración crónica de MEL.

	Control	MEL
% Estadio 2 y 3	100	100
% Estadio 2	72.72	100
% Estadio 3	27.27	0

Los valores de n son iguales a los de la tabla 14.

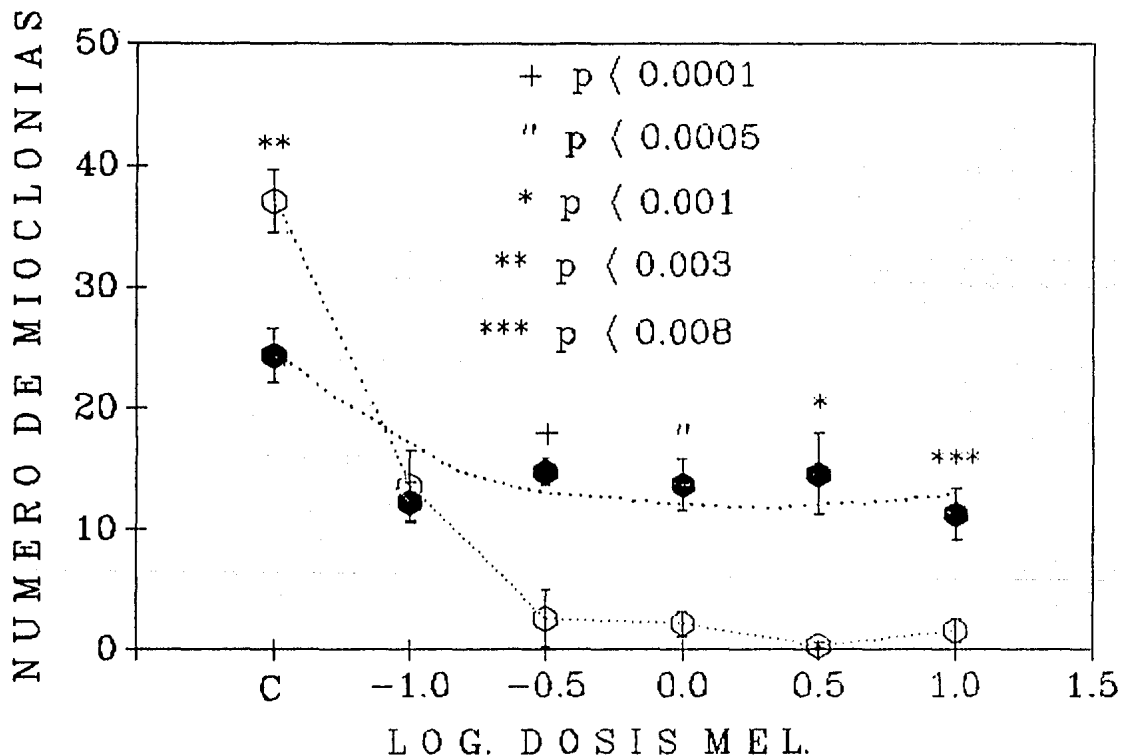
Fig. 13A LATENCIA A MIOCLONIAS.
COMPARACION ENTRE LOS DOS CICLOS DE ILUMINACION.



La fig. muestra la comparación ($\bar{x} \pm EE$) de la latencia a mioclonias entre los dos ciclos de iluminación, ésta se realizó comparando el control de una dosis de MEL de un ciclo de iluminación contra su grupo similar en el otro ciclo de iluminación.

Se utilizó la prueba t-student. ○—○ administración de MEL en el fotoperíodo,
●—● administración de MEL en el escotoperíodo.

Fig. 14A FRECUENCIA DE MIOCLONIAS.
COMPARACION ENTRE LOS DOS CICLOS DE ILUMINACION.



La nomenclatura utilizada es similar a la de la fig. 13A, utilizando los valores ($\bar{x} \pm EE$) de la frecuencia.

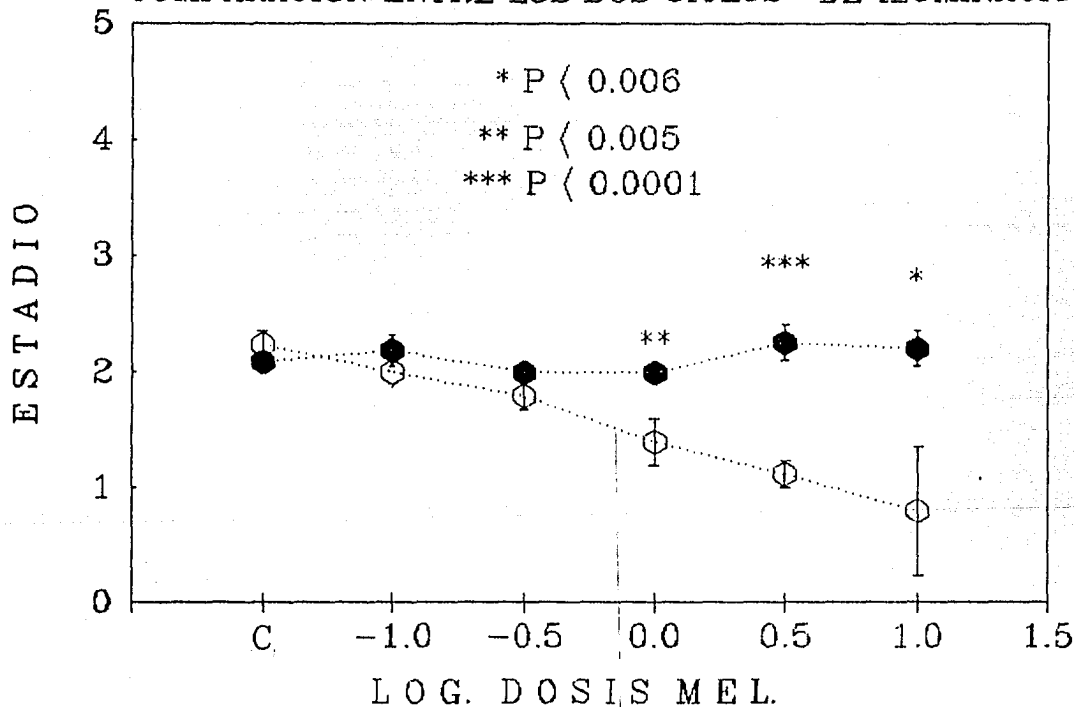
significativa en el grupo control cuando la inyección se realizó durante el escotoperiodo en comparación del control del fotoperiodo (este punto se discutirá más tarde), sin embargo, para los puntos en donde se administra MEL la disminución fue mayor para los grupos del fotoperiodo (fig. 14A). El estadio convulsivo no sufrió cambios en el grupo control y las dos primeras dosis de MEL, pero a partir de 1 mg/kg de MEL el estadio convulsivo disminuyó más en los grupos del ciclo del fotoperiodo (fig. 15A).

El porcentaje de animales con actividad convulsiva nos muestra que el total de animales con estadio 2 y 3 presentó una disminución marcada a partir de las dosis de 0.31 mg/kg en animales con ciclo normal mientras que los de ciclo invertido no. Tomando el porcentaje de animales que presentó estadio 2 también se observó una disminución significativa a partir de la dosis de 0.31 mg/kg solo para el fotoperiodo y sin diferencia para el porcentaje con estadio 3 para ninguno de los ciclos (tabla 18).

VI.4.b. ADMINISTRACION CRONICA:

No existió ninguna diferencia significativa entre los dos ciclos de iluminación en las variables registradas cuando la administración de MEL fue crónica.

Fig. 15A ESTADIO CONVULSIVO
COMPARACION ENTRE LOS DOS CICLOS DE ILUMINACION.



La nomenclatura utilizada es similar a la de la fig. 13A utilizando los valores ($\bar{x} \pm EE$) del estadio convulsivo. En este caso la prueba estadística fué el test exacto de Fisher.

VII. DISCUSION

Analizando los resultados obtenidos se puede decir que efectivamente la MEL tiene un efecto regulador en la actividad neuronal del SNC y que en el trabajo realizado se manifiesta como lo que nosotros hemos llamado propiedades anticonvulsivas. En general estas propiedades se mostraron produciendo un aumento en la latencia a la aparición de las mioclonias, una disminución en la frecuencia de las mismas, una disminución en algunos signos que caracterizan a un estadio convulsivo producido por el PTZ y una disminución en el porcentaje de animales con actividad convulsiva.

El PTZ ha sido ampliamente utilizado en modelos de epilepsia y se ha visto que su administración produce convulsiones tónico-clónicas en varias especies animales, sin embargo, su mecanismo de acción no esta bien dilucidado. Se ha reportado que el PTZ bloquea la acción del GABA, ya sea por una disminución en las corrientes de membrana (Cl⁻) en respuesta al GABA, o en parte, a través de la reducción del tiempo que se mantienen abiertos los canales iónicos activados por GABA (56,57). Otros trabajos sugieren que la actividad convulsiva del PTZ al menos en gran parte resulta de su interacción con algún tipo de receptor a benzodiazepinas (58,59).

Se desconoce el mecanismo por el cual la MEL pueda estar ejerciendo su acción, algunos autores apoyan la idea de la existencia de receptores a MEL por medio de los cuales la hormona estuviera llevando a cabo una función directa a través de receptores membranales, sobre todo en la región medial del hipotálamo, puente y médula oblongada (60-63), no obstante esto, otros investigadores mencionan que

la MEL actúa sólo modulando (inhibiendo o estimulando) la respuesta a algunos neurotransmisores, es decir, su mecanismo de acción es indirecto a través de la alteración de la respuesta mediada por segundos mensajeros como Ca^{2+} (64). Se ha encontrado que la administración de MEL produce un aumento en la unión de $[^3H]$ muscimol semejante al producido por el diazepam, también produce un aumento en la unión a $[^3H]$ GABA y $[^3H]$ diazepam (65,66). Esto sugeriría que la MEL podría interactuar en el sitio benzodiazepínico para modular la unión a GABA, además se menciona que esto no excluye que la hormona pueda interactuar con otros sitios del complejo receptor de GABA (67). En otros trabajos se ha mostrado que la MEL no sólo aumenta la unión a diazepam sino que también puede competir con este por su sitio de unión, su potencia aunque es pequeña es comparable con la de la inosina o la hipoxantina. Otro punto que se sugiere es que la MEL puede ser metabolizada a un potente inhibidor de la unión al diazepam y que estos metabolitos podrían ser las β -carbolicinas, de este modo la hormona MEL podría tener un efecto anticonvulsivo (67).

Además de las evidencias que se tienen respecto al GABA se puede mencionar que la administración i.p. de MEL produce un aumento de 5-HT en el mesencéfalo sin producir cambios en la concentración de NE. Los cambios en 5-HT se pueden detectar a los 20 min. (68) en el cortex cerebral. También se menciona que inhibe la liberación de dopamina en el hipocampo ventral, hipotálamo medio y posterior, puente y área preóptica (26). Tomando en cuenta todos los datos mencionados se pueden explicar algunos de los efectos encontrados en el trabajo. Para empezar, se pudo observar un mayor efecto anticonvulsivo cuando la administración de MEL se llevó a cabo en forma aguda y durante el periodo de luz. Al comparar los efectos en los dos ciclos de

iluminación, con sus respectivas dosis, se pudo notar que el mayor efecto anticonvulsivo se da durante el fotoperiodo.

Esta respuesta coincide con los resultados de otros trabajos (69,70) en los que se menciona que la susceptibilidad a la inducción de convulsiones por estímulos auditivos es mayor cuando dichos estímulos se presentan durante el periodo de oscuridad. Se discute que dicha respuesta está dada en base a los niveles cerebrales de 5-HT, NE, y GABA entre otros neurotransmisores. También se ha visto que el decremento en niveles de aminas y GABA en el cerebro, aumenta la susceptibilidad a convulsiones producidas por estímulos auditivos, inducidas eléctricamente y por agentes químicos. Esto aunado a que se ha mostrado una periodicidad en las concentraciones de algunas aminas, siendo mayor la concentración durante el día que durante la noche (26,70) y teniendo en cuenta que la MEL produce cambios en la concentración de algunas aminas y en otros sistemas de neurotransmisión, nos lleva a pensar que la mayor producción de cambios en los sistemas de neurotransmisión por la administración de MEL se dan durante el día y que esto podría estar contribuyendo a tener un mayor efecto anticonvulsivo con este esquema de administración.

Ahora bien, de igual importancia es el hecho de que el efecto diferencial producido por la MEL se deba a que exista una diferencia circadiana en cuanto a la sensibilidad del mecanismo de acción de la MEL en lo que refiere a su efecto "protector" frente al FTZ, cualquiera que sea éste. También se puede hablar de una saturación del sistema de MEL durante el escotoperiodo que no permite una mayor respuesta. Este resultado de mayor efecto anticonvulsivo durante el

periodo de luz no coincide con la hipótesis que planteaba una mayor respuesta anticonvulsiva de la MEL cuando ésta fuera administrada durante el periodo de oscuridad, debido a que en la hipótesis se tenía pensado que debido a que la MEL es secretada durante el periodo de oscuridad, su efecto anticonvulsivo sería mayor.

Además de los puntos antes mencionados, existe el hecho de que el efecto anticonvulsivo se empieza a dar después de 30 min de la inyección de la hormona. En el inicio de éste trabajo durante una prueba piloto se probó también la administración de PTZ después de 15 min de la inyección de MEL, sin embargo, no se encontró el mismo efecto anticonvulsivo; el tiempo que tiene que transcurrir para obtener dicha respuesta podría apoyar la idea de que la acción de la hormona pueden ser atribuido a mecanismos indirectos (aumento en la concentración de algunos neurotransmisores) y no a la acción de la MEL sobre receptores a MEL.

En cuanto a la administración crónica de MEL no se observó ningún cambio significativo, aunque Niles (66) reporta un aumento en la unión de 3H -GABA después de la administración crónica muy parecido al producido por la administración aguda. Los resultados que se obtuvieron concuerdan con otros datos obtenidos en el laboratorio en donde tampoco se observó un cambio significativo en el desarrollo de crisis convulsivas en el modelo de "Kindling" químico (4). Pareciera ser que la administración crónica no tiene un efecto anticonvulsivo muy marcado para expresarse de manera conductual, pues la respuesta encontrada en los animales es muy dispareja, sin embargo, si se puede ver una tendencia al aumento de la latencia, una disminución en la frecuencia y estadio convulsivo, que no son significativos debido a la gran desviación que presentan los datos. Es posible que la

administración crónica de MEL esté produciendo cambios diferentes a los obtenidos por la administración aguda que no son capaces de producir la misma respuesta, sin embargo, es importante notar el efecto que tuvo la administración crónica en lo que se refiere al porcentaje de animales con actividad convulsiva ya que fue diferente a la producida por la administración aguda. Se pudo ver que en la crónica hubo un aumento en el porcentaje de animales que presentaron estadio 2 pero a expensas de una completa desaparición de animales que presentaron estadio 3 (esta diferencia no fue significativa debido a que la prueba utilizada da significancia sólo si hay más de un 40% de diferencia entre los grupos comparados), este efecto fue diferente al de la administración aguda pues en este caso sólo hay una disminución en el porcentaje de animales con estadio 2 sin cambios en el porcentaje de estadio 3. Este resultado no coincide también con la hipótesis en la cual se mencionaba obtener un mayor efecto anticonvulsivo cuando la administración de la MEL fuera crónica debido a que se pensaba que la estimulación diaria producida por la MEL exógena, reforzaría fuertemente el efecto anticonvulsivo.

Otro punto que se tiene que mencionar es la diferencia en la frecuencia de mioclonias entre los controles de los dos ciclos de iluminación cuando la administración de MEL es aguda; ésta se podría atribuir a que durante el escotoperíodo ya existe MEL basalmente que de hecho pudiera estar interviniendo en ésta reducción del número de mioclonias y aunque como se ha venido mencionando la administración de MEL durante el período de oscuridad no es muy efectiva parece ser que la secreción basal de MEL es suficiente para producir ésta diferencia entre los controles. Este resultado es el que podría apoyar la idea de

considerar a la MEL como regulador de la actividad neuronal, ya que el grupo control que no presentó ninguna manipulación farmacológica con MEL tendría solamente la MEL que se secreta basalmente en los ratones.

Hasta aquí se puede manejar la idea de que la MEL podría estar ejerciendo su efecto anticonvulsivo a través de un aumento en la sensibilidad del sistema GABAérgico debido a que en este trabajo la hormona se probó frente a un agente convulsivante que afecta principalmente la transmisión GABAérgica, además de que existen evidencias que sugieren que la epilepsia es el resultado de una disfunción de la inhibición mediada por el GABA (71), sin embargo, los efectos "anticonvulsivos" obtenidos no se pueden atribuir solamente a la interacción de la MEL con el sistema GABAérgico, ya que, en los modelos de epilepsia están involucrados otros neurotransmisores, entre éstos se ha encontrado que las catecolaminas ejercen una acción inhibitoria a ciertos niveles del SNC. En algunos modelos se ha visto que la disminución de la transmisión noradrenérgica provoca un aumento en la frecuencia y severidad de las crisis epilépticas, en el "Kindling" la noradrenalina muestra efectos inhibitorios. Aparte de estos neurotransmisores se ha involucrado a la Glicina, al Glutamato y a algunos neuropéptidos que son capaces de modificar la excitabilidad neuronal (71), todo esto formando una compleja red que es importante en la generación de las crisis convulsivas y que podrían estar afectados también por la administración de MEL y que pudieran estar contribuyendo de una forma muy importante a la inhibición de la expresión conductual de los parámetros utilizados en este trabajo.

Los datos obtenidos apoyan los resultados de algunos autores (1,2,3,7,8,9) y los de nuestro laboratorio (4,6,72) en los que se propone a la MEL como una hormona reguladora de la excitabilidad

cerebral y que puede tener efectos anticonvulsivos en modelos de epilepsia in vivo, entre algunas de sus multiples funciones.

ESTA TESIS NO DEBE
SER REPRODUCIDA SIN EL CONSENTIMIENTO DEL AUTOR

-La MEL tiene efectos anticonvulsivos aún en dosis que no son capaces de provocar otros cambios conductuales como ataxia o sedación, los cuales podrían estar enmascarando dicho efecto, en el modelo de inducción de convulsiones por administración aguda de PTZ (31.62 mg/kg).

- El efecto anticonvulsivo se mostró como un aumento en la latencia y disminución de frecuencia de mioclonias, así como, una disminución de algunos signos de los estadios convulsivos y en el porcentaje de animales con actividad convulsiva.

- El efecto anticonvulsivo muestra una respuesta diferencial que obedece al período de inyección de MEL (fotoperíodo o escotoperíodo) y al tipo de administración (aguda o crónica).

- La administración aguda resultó la más efectiva en la modificación de los parámetros convulsivos, en especial la que se realizó durante el fotoperíodo.

- La administración crónica no es efectiva para modificar los parámetros convulsivos no importa el período de inyección de la hormona.

- Debido a que no se encontró una mayor respuesta anticonvulsiva en la inyección de MEL durante el escotoperíodo y el tiempo que se tarda en obtener dicha respuesta, se propone que cuando menos éste efecto de hormona "anticonvulsiva", pudiera estar mediado por la modificación de sistemas de neurotransmisión.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Nir, I., Behroozi, K., Assael, M., Ivriani, I. and Sulman, F.G. Changes in the electrical activity of the brain following pinealectomy. *Neuroendo.* 4:122-127, 1969.
2. Reiter, R.J., Blask, D.E., Talbot, J.A. and Barnett, M.P. Nature and the time course of seizures associated with surgical removal of the pineal gland from parathyroidectomized rats. *Exp. Neurol.* 38:386-397, 1973.
3. Philo, R. and Reiter, R.J. Characterization of pinealectomy induced convulsions in the mongolian gerbil (Meriones unguiculatus). *Epilepsia.* 19:485-492, 1978.
4. Camacho, A.I. Papel de la glándula pineal y la Melatonina en el desarrollo de crisis convulsivas provocadas en la rata. Tesis de Licenciatura para obtener el grado de Biologo, Fac. Ciencias, UNAM, 1986.
5. Coloma, F.M. and Niles, L.P. Melatonin enhancement of [3H]-aminobutyric acid and [3H] muscimol binding in rat brain. *Biochem. Pharmacol.* 37:1271-1274, 1988.
6. Roldán, R.G. Efecto protector de la glándula pineal en la presentación de crisis convulsivas durante la abstinencia etílica en la rata. Tesis de Licenciatura para obtener el grado de Biologo. Fac. Ciencias, UNAM, 1987.
7. Roldán, E. and Anton-Tay, F. EEG and convulsive threshold changes produced by pineal extract administration. *Brain Res.* 11:238-245, 1968.
8. Anton-Tay, F., Díaz J.L. and Fernández-Guardiola A. On the effect of Melatonin upon human brain. Its possible therapeutic implications. *Life Sci.* 10:841-850, 1971.

9. Albertson, T.E., Peterson, S.L., Stark, L.G., Lakin, M.L. and Winters, W.D. The anticonvulsant properties of Melatonin on kindled seizures in rats. *Neuropharma.* 20:61-66, 1981.
10. Tamarkin, L., Baird, C.J. and Almeida, D.F.X. Melatonin: A coordinating signal for mammalian reproduction?. *Science.* 227:714-720, 1985.
11. Reppert, S.M. and Klein, D.C. Mammalian pineal gland: Basic and clinical aspects. In: *The endocrine function of the brain*, Marcella Mota Ed. New York: Raven Press, 1980, pp. 327-371.
12. Reiss, M., Davis, R.H., Sideman, M.B. and Plichta, E.S. Pineal gland and spontaneous activity of rats. *J. Endocrin.* 28:127-128, 1963.
13. Oshima, I., Yamada, H., Sato, K. and Ebihara, S. The phase relationship between the circadian rhythms of locomotor activity and circulating Melatonin in the pigeon (*Columba livia*). *Gen. Comp. Endocrin.* 67:409-414, 1987.
14. Cramer, H., Rudolph, J., Cunsbroch, N. and Kendel, K. On the effects of Melatonin on sleep and behavior in man. *Adv. Biochem. Psychopharmac.* 11:187-191, 1974.
15. Holmes, S.W. and Sugden, D. Effects of Melatonin on sleep and neurochemistry in the rat. *Br. J. Pharmac.* 76:95-101, 1982.
16. James, S.F., Mendelson, W.B., Sack, D.A., Rosenthal, N.E. and Wehr, T.A. The effect of Melatonin on normal sleep. *Neuropsychopharmac.* 1: 41-44, 1988.
17. Martin, J.B., Reichlin, S. and Brown, G.M. The pineal gland and periventricular organs. In: *Contemporary neurology series*, F.A. Davis company Ed. Philadelphia, 1978, pp. 229-246.
18. Ostholm, Th., Brannas, E. and Van Veen, Th. The pineal organ is the

- first differentiated light receptor in the embryonic salmon, Salmo salar L. *Cell Tissue Res.* 249:641-646, 1987.
19. Ekstrom, P., Foster, R.G., Korf, H. and Schalken, J.J. Antibodies against retinal photoreceptor-specific proteins reveal axonal projections from the photosensory pineal organ in teleosts. *J. Comp. Neurol.* 265:25-33, 1987.
 20. Barr, M.L. Diencephalon. In: *the human nervous system*, edited by Harper and Row. Virginia, 1979, pp. 141-163.
 21. Patrickson, J.W. and Smith, Th.J. Innervation of the pineal gland in the rat: An HRP study. *Exp. Neurol.* 96:207-215, 1987.
 22. Salin-Pascual, R.J. Aspectos neurobiológicos de la glándula pineal. *Salud Ment.* 7:29-36, 1984.
 23. Goldman, H. and Wurtman, R.J. Flow of blood to the pineal body of the rat. *Nature.* 203:87-88, 1964.
 24. Calvo, J. and Boya, J. Postnatal evolution of the rat pineal gland: light microscopy. *J. Anat.* 138:45-53, 1984.
 25. Axelrod, J. and Weisebach, H. Enzymatic o-methylation of N-acetylserotonin to Melatonin. *Science.* 131: 1312, 1959.
 26. Reiter, J.R. *The Pineal Gland*. Edited by Luciano Martini. Raven Press, 1984, p. 500.
 27. Reppert, S.M., Perlow, M.J., Tamarkin, L. and Klein, D.C. A diurnal Melatonin rhythm in primate cerebrospinal fluid. *Endocrinol.* 104:295-301, 1979.
 28. Rollag, M.D., Morgan, R.J. and Niswender, G.D. Route of Melatonin secretion in sheep. *Endocrinol.* 102:1-8, 1978.
 29. Cardinali, D.P., Lynch, H.J. and Wurtman R.J. Binding of Melatonin to human and rat plasma proteins. *Endocrinol.* 91:1213-1218, 1972.
 30. Deguchi, T. and Axelrod, J. Control of circadian change of serotonin

N-acetyltransferase activity in the pineal organ by the β -adrenergic receptor. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 69:2547-2550, 1972.

31. Ralph, Ch.L., Mull, D., Lynch, H.J. and Hedlund, L. A Melatonin rhythm persists in rat pineals in darkness. Endocrinol. 89:1361-1366, 1971.

32. Romero, J.A. and Axelrod, J. Pineal β -adrenergic receptor: Diurnal variation in sensitivity. Science. 184:1091-1092, 1974.

33. Klein, D.C. and Weller, J.L. Indole metabolism in the pineal gland: A circadian rhythm in N-acetyltransferase. Science. 169:1093-1095, 1970.

34. Klein, D.C., Buda, D.J., Kapoor, C.L. and Krishna, G. Pineal serotonin N-acetyltransferase activity: Abrupt decrease in adenosine 3',5'-monophosphate may be signal for "turnoff". Science. 199:309-311, 1978.

35. Axelrod, J., Wurtman, R.J. and Snyder, S.H. Control of hydroxyindole o-methyltransferase activity in the rat pineal gland by environmental lighting. J. Biol. Chem. 240:949-954, 1965.

36. Klein, D.C. and Weller, J.L. Rapid light-induced decrease in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. Science. 177:532-533, 1972.

37. Cardinali, D.P., Larin, F. and Wurtman R.J. Action spectra for effects of light on hydroxyindole-o-methyltransferases in rat pineal, retina and harderian gland. Endocrinol. 91:877-886, 1972.

38. Shibuya, H., Toru, M. and Watanabe, Sh. A circadian rhythm of tryptophan hydroxylase in rat pineals. Brain Res. 138:364-368, 1978.

39. Antón-Tay, F. y Claps, C.F. La actividad rítmica en la glándula pineal. Bol. Estud. Méd. Biol. 29:29-38, 1976.

40. Klein, D.C., Reiter, R.J. and Weller, J.L. Pineal N-

- acetyltransferase activity in blinded and anosmic male rats. *Endocrinol.* 89:1020-1023, 1971.
41. Wurtman, R.J., Axelrod, J., Chu, W.E. Melatonin, a pineal substance: Effect on the rat ovary. *Science.* 141:277-278, 1963.
42. Hoffman, R.A., and Reiter, R.J. Pineal gland: Influence on gonads of male hamsters. *Science.* 148:1609-1611, 1965.
43. Walker, R.F., McCamant, S. and Timiras, P.S. Melatonin and the influence of the pineal gland on timing of the LH surge in rats. *Neuroendocrinol.* 35:37-42, 1982.
44. Webley, G.E., and Leidenberg, F. The circadian pattern of Melatonin and its positive relationship with progesterone in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 63:323-328, 1986.
45. Wun, W.A., Berkowitz, A.S. and Preslock, J.P. Melatonin's differential inhibition of FSH and LH release from hamster pituitary glands. *Mol. Cell. Endocrinol.* 46:215-225, 1986.
46. Vriend, J. The pineal and Melatonin in the regulation of pituitary-thyroid axis. *Life Sci.* 29:1929-1936, 1981.
47. Vriend, J. Evidence for pineal gland modulation of the neuroendocrine-thyroid axis. *Neuroendocrinol.* 36:68-78, 1983.
48. Lakin, M.L., Miller, C.H., Stott, M.L. and Winters, W.D. Involvement of the pineal gland and Melatonin in murine analgesia. *Life Sci.* 29:2543-2551, 1981.
49. Kachi, T. Pineal actions on the autonomic system. *Pineal Res. Rev.* 5:217-263, 1987.
50. Quay, W.B. Experimental evidence for pineal participation in homeostasis of brain composition. *Prog. Brain Res.* 19:646-653, 1965.
51. Roldán, E., Antón-Tay, F. and Escobar, A. Studies on the pineal gland. IV. The effect of pineal extract on the electroencephalogram.

- Bol. Inst. Estud. Méd. Biol. 22:145-156, 1964.
52. Rudeen, P.K., Philo, R.C. and Symmes, S.K. Antiepileptic effects of Melatonin in the pinealectomized mongolian gerbil. *Epilepsia*. 21:149-154, 1980.
53. Fariello, R.G., Bubenik, G.A., Brown, G.H. and Grota, L.J. Epileptogenic action of intraventricularly injected anti-Melatonin antibody. *Neurol.* 27:567-570, 1977.
54. Ito, T., Hori, M., Yoshida, K., and Shimizu, M. Effect of anticonvulsants on seizures developing in the course of daily administration of pentylenetetrazol to rats. *Eur. J. Pharmacol.* 45:165-172, 1977.
55. Siegel, S. Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta. Editorial Trillas. México, D.F. 1976. pp. 120-130.
56. Olsen, R.W. The GABA postsynaptic membrane receptor-complex: Site of action of convulsant and anticonvulsant drugs. *Moll Cell. Biochem.* 39:261-279, 1981.
57. Faingold, C.L. Seizures induced by convulsant drugs. In: *Neurotransmitters and epilepsy*. Edited by Phillip C. Jobe and Hugh E. Laird. The Human Press, 1987, pp. 215-276.
58. Grecksch, G., Prado de Carvalho, L., Venault, F., Chapouthier, G. and Rossier, J. Convulsions induced by submaximal dose of pentylenetetrazol in mice are antagonized by the benzodiazepine antagonist Ro 15-1788. *Life Sci.* 32:2579-2584, 1983.
59. Chweh, A.Y., Swinyard, E.A. and Wolf, H.H. Pentylenetetrazol may discriminate between different types of benzodiazepine receptors. *J. Neurochem.* 41:830-833, 1983.
60. Cardinali, D.P., Vacas, M.I. and Boyer, E.E. Specific binding of

- Melatonin in bovine brain. *Endocrinol.* 105:437-441, 1979.
61. Laudon, M. and Zisapel, N. Characterization of central Melatonin receptors using ¹²⁵I-Melatonin. *FEBS J.* 197:9-12, 1986.
 62. Zisapel, N. Melatonin receptors revisited. *J. Neural Transm.* 73:1-5, 1988.
 63. Dubocovich, M.L. Pharmacology and function of Melatonin receptors. *FASEB J.* 2:2765-2773, 1988.
 64. Zisapel, N. and Laudon, M. Inhibition by Melatonin of dopamine release from rat hypothalamus: regulation of calcium entry. *Brain Res.* 272:378-381, 1983.
 65. Coloma, F.M. and Niles, L.P. *In vitro* effects of Melatonin on [³H] Muscimol binding in rat brain. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.* 8:669-672, 1984.
 66. Niles, L.P., Pickering, D.S. and Arciszewski, M.A. Effects of chronic Melatonin administration on GABA and diazepam binding in rat brain. *J. Neural Transm.* 70:117-124, 1987.
 67. Marangos, F.J., Patel, J., Hirata, F., Sondhein, D., Paul, S.M., Skolnick, P. and Goodwin, F.K. Inhibition of diazepam binding by tryptophan derivatives including Melatonin and its brain metabolite N-acetyl-5-methoxy kynurenamine. *Life Sci.* 29:259-267, 1981.
 68. Anton-Tay, F., Chou, C., Antón, S., and Wurtman, R. Brain serotonin concentration: Elevation following intraperitoneal administration of Melatonin. *Science.* 162:277-278, 1968.
 69. Reiter, J.R. *The Pineal Gland.* Edited by Luciano Martini. Raven Press, 1984, pp. 1-37.
 70. Schreiber, R. and Schlesinger, K. Circadian rhythms and seizure susceptibility: Relation to brain serotonin and norepinephrine in mice. *Physiol. Behav.* 6:635-640, 1971.

71. Schreiber, R. and Schlesinger, K. Circadian rhythms and seizure susceptibility: Effects of manipulations of light cycles on susceptibility to audiogenic seizures and on levels of 5-hydroxytryptamine and norepinephrine in brain. *Physiol. Behav.* 8:699-703, 1972.
72. Brailowsky, S., Silva-Barrat, C. y Naquet, R. Elementos fisiopatológicos de las epilepsias: Aportaciones recientes de la investigación experimental. *Salud Men.* 12:53-62, 1989.
73. Granados, F.D., Salin, R.J., Roldán, R.G., y Huerto, D.L. Evidencia de actividad anticonvulsiva de la Melatonina administrada en dosis fisiológicas en ratones. *Memorias del XXX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas.* Jalapa, Ver. 1987.