

11281

3

2y.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

" ANALISIS CONDUCTUAL Y ELECTROFISIOLÓGICO DE LAS INTERACCIONES  
ENTRE LA MELATONINA Y LOS SISTEMAS GABAÉRGICOS CEREBRALES "

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

AREA F I S I O L O G Í A

PRESENTA: M en C. ELIA BROSLA NARANJO-RODRÍGUEZ

ASESOR ACADÉMICO: Dr. en C. CRUZ REYES-VÁZQUEZ.

1991

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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.

# C O N T E N I D O

	Página
PROLOGO .....	4
RESUMEN .....	6
ABSTRACT .....	7
INTRODUCCION .....	8
I. Experimentos In Vivo .....	23
a) Efectos ansiolíticos de la melatonina en una situación de conflicto .....	24
b) Pruebas dolorimétricas .....	33
c) Actividad locomotriz .....	37
d) Aprendizaje .....	42
e) Ingesta de Agua .....	45
II. Experimentos In Vitro .....	47
a) Acciones de la melatonina sobre tejido aislado .....	47
III. Experimentos In Situ .....	55
a) Microiontoforésis y micropresión .....	55
b) Experimentos Electrofisiológicos en rebenadas de cerebro de cobayo .....	64
DISCUSION .....	68
BIBLIOGRAFIA .....	77

Agradezco sinceramente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), todo el apoyo que me brindó para el desarrollo de mi trabajo, tanto experimental como el manuscrito de esta Tesis.

A T E N T A M E N T E

ELIA BROSLA NARANJO RODRIGUEZ  
BECARIA DE DOCTORADO No. 54488  
(1o. Nov. 1987-1o. Nov. 1990)

## P R O L O G O

A pesar de que la glándula pineal o Epiphysis cerebri ha sido objeto de múltiples estudios, ni sus funciones ni los mecanismos de acción utilizados por sus hormonas están del todo esclarecidos. En la antigüedad muchos conceptos filosóficos fueron emitidos en torno a esta estructura. Así, para los Griegos se hablaba de una válvula reguladora de el flujo humoral entre el cerebro y los ventrículos; para los Hindús, la pineal es el órgano de la clarividencia; mientras que para el filósofo Francés Descartes en este órgano residía el alma.

Desde la primera descripción de la glándula pineal realizada por Herófilo aproximadamente 300 años A.C., hasta la actualidad tanto científicos como filósofos han intentado esclarecer la naturaleza de las funciones en las diferentes especies de animales; pero no fué sino hasta principios de este siglo cuando se inició la investigación sistematizada de esta glándula. Sin embargo, son las investigaciones de los últimos 20 años, las que han aportado el 90 % de la información que actualmente poseemos sobre la pineal.

Esta glándula es indispensable en el proceso de sincronía de la reproducción de muchas especies de animales con una estación determinada del año. También, la pineal interviene en los cambios de color de la piel, de pelaje de muchos animales, en el metabolismo, en la fisiología tiroidea, la conducta, etc., funciones cuya característica común es su variación circadiana y estacional.

Por esta razón, la pineal forma parte de un conjunto de

estructuras indispensables para establecer los nexos adecuados entre el medio ambiente y los individuos, o dicho de otra forma, es parte de un sistema adaptativo; gracias al cual los sujetos son capaces de realizar una conducta adecuada ante los cambios del medio ambiente, con lo que se permite la sobrevivencia de la especie.

Quizá debido a esta sutileza de los efectos sincronizantes de la pineal, ha sido muy difícil el determinar y comprender en su totalidad, sus acciones y la de sus productos hormonales. Tales hormonas, las cuales además ejercen efectos más pronunciados en unas especies que en otras, incrementando con ello la dificultad de describir los mecanismos bioquímicos y fisiológicos que ocurren en todos estos procesos.

Es posible entonces, que a pesar de toda la información que actualmente poseemos sobre esta estructura, la glándula pineal continúe siendo lo que ha sido desde su primera descripción realizada por Herófilo : La estructura más incomprendida de toda la economía.

## R E S U M E N

Algunos de los efectos provocados por la melatonina (MEL) como la hipnosis, sedación y sus efectos anticonvulsivos son similares a los provocados por sustancias de tipo GABAérgico. Además, varios estudios electrofisiológicos muestran que la MEL reduce la actividad eléctrica cerebral de manera similar a como lo hacen las sustancias GABAérgicas. Tales datos sugieren la existencia de una interacción entre la MEL y los mecanismos GABAérgicos cerebrales. Si tal relación existe, entonces es probable que la MEL posea otros efectos característicos de las sustancias GABAérgicas, tal como la ansiólisis. Con el propósito de analizar esta interacción se diseñaron y realizaron una serie de experimentos: In Vivo (Conductuales, Analgesia, Actividad Locomotriz, Aprendizaje e Ingesta de Agua), In Vitro (Tejido aislado) e In Situ (Electrofisiológicos, Microiontoforesis y Micropresión). Se estudió el posible efecto ansiolítico de la MEL en sujetos sometidos a una situación de conflicto. Para este experimento se utilizó el modelo de Vogel y los efectos encontrados fueron similares a los provocados por sustancias ansiolíticas clásicas. También se realizaron estudios analgésicos, utilizando modelos de Inmersión de la cola y de placa caliente, en los cuales la MEL no ejerció efectos analgésicos. En el registro de la actividad locomotriz, con un modelo de campo abierto, la MEL produjo un efecto depresor de la misma. En estudios de prevención pasiva y de prevención activa se mostró que la melatonina tampoco influye de forma importante en el aprendizaje. En pruebas de ingesta de agua la melatonina no modifica tal actividad fisiológica. Estos últimos resultados sugieren efectos ansiolíticos reales de la MEL. Se realizaron estudios en músculo liso intestinal, donde la MEL y el GABA provocan un efecto depresor sobre la contracción de estos tejidos, ni el efecto de la MEL ni el de GABA fueron bloqueados por la bicuculina. Debido a que las contracciones de estos músculos dependen de un sistema colinérgico-adrenérgico-purinérgico, es difícil el sugerir un mecanismo de acción de la MEL en el intestino. Los estudios electrofisiológicos con administración local por microiontoforesis y micropresión de MEL, agonistas y antagonistas GABAérgicos también mostraron una acción directa celular similar entre MEL y GABA, aunque los antagonistas GABAérgicos no bloquearon los efectos de la MEL, lo que indica que a pesar de las similitudes el mecanismo de acción a nivel de la membrana celular es diferente entre ambas sustancias. Por último se realizaron estudios electrofisiológicos en rebanadas de cerebro en la región CA<sub>1</sub> del hipocampo, donde la interacción entre la MEL y el GABA fueron evidentes. Los datos obtenidos muestran que la MEL puede ejercer sus efectos a través de mecanismos GABAérgicos.

## A B S T R A C T

Several of the effects elicited by melatonin (MEL) such as hypnosis, sedation, and its anticonvulsant actions, are very similar to those provoked by GABAergic-like drugs. Additionally, some electrophysiological studies /shown that MEL reduces the cerebral electric activity in a similar fashion to GABAergic drugs. These data suggest an interaction between MEL and the brain GABA systems. If such relation exists, then it is possible that MEL could exert another characteristic GABAergic activities such as anxiolysis. With the aim to analyze such relationship several experimental designs, using behavioral and electrophysiological procedures, were realized. Initially, the anxiolytic properties of MEL were studied in a conflict procedure using Vogel's experimental model. In this situation MEL produced effects very similar to those provoked by classical anxiolytic such as diazepam, chlorodiazepoxide, and buspirone. Furthermore, several experiments showed that MEL no exert analgesic actions and did not modify learning and water intake in rats. Besides, it decreases the spontaneous locomotor activity, suggesting that MEL actions on the conflict procedure, seems to be indeed anxiolytics. MEL addition to tissue bath in longitudinal rings of visceral smooth muscle, elicited a constant and reversible depression of the contractile activity of both, spontaneous and electrically provoked. This effect was also induced by the addition of GABA to the bath tissue. However, neither MEL effects nor GABA action on this tissue, was blocked or reversed by the preincubation with bicuculline. Since the contractions of this muscle are modulated by a cholinergic-adrenergic-purinergetic system, it is difficult suggest the mechanism of action of MEL in order to produce such effects. MEL and GABA microtophoresis in anterior hypothalamic units reduced the electrical activity of these neurons. In this situation, bicuculline blocked the inhibitory action of GABA, but was unable to modify MEL the effects, suggesting a different membrane site of action. Finally our electrophysiological studies on hippocampal slice preparation showed that MEL enhances the GABAergic mechanisms in pyramidal CA<sub>3</sub> cells. These data indicate that MEL could exert its hypnotic, sedative, anticonvulsant and anxiolytic actions through the brain GABAergic systems.



## I N T R O D U C C I O N

Cada vez existen evidencias más firmes, las cuales muestran que la glándula pineal (GP), ejerce un papel importante en la regulación de un gran número de órganos y sistemas de todas las especies de animales hasta ahora estudiadas, incluyendo al hombre. Esta glándula, la cual se encuentra presente en casi todos los vertebrados, a excepción del armadillo y el cocodrilo (90), constituye una prolongación diencefálica de forma conoidea. Su vértice está suspendido sobre los colículos superiores y la lámina del techo mesencefálico mediante un corto pedúnculo; mientras que su porción basal se une a la región posterior del III ventrículo cerebral (FIG. 1).

En el caso de animales filogenéticamente inferiores, la pineal es de tipo sacular con paredes internas perfundidas continuamente por el líquido cefalorraquídeo (LCR); el sáculo se abre directamente al III ventrículo. En este tipo de animales, también existe un órgano parapineal, con células receptoras similares a los fotorreceptores retinianos (82) (FIG. 1). El órgano parapineal ha sido motivo de múltiples teorías filosóficas y religiosas y se le ha denominado el "Tercer ojo" (32).

Filogenéticamente la GP sufre amplias transformaciones de ser sacular y con elementos nerviosos en anfibios, se transforma en una glándula secretora en mamíferos, perdiendo además, su característica sacular y el contacto directo con el LCR. También en vertebrados inferiores se mostró la existencia de una inervación desde la comisura y núcleos habenulares hasta la pineal, (117) (FIG. 1).

En la rata, la GP (117) es una estructura epitalámica de forma esferoidal, con diámetro no mayor a 2 mm y un peso de hasta 1 mg. La glándula reside en la parte más posterior del cerebro y en la línea media, por debajo de la confluencia del seno venoso sagital con los senos venosos laterales, descansando sobre los colículos superiores y oponiéndose a la tienda del cerebelo (FIG. 1). En el hombre la GP ocupa la depresión localizada entre los colículos superiores y el mesencéfalo. Mientras que su peso oscila entre los 50 y 150 mg.

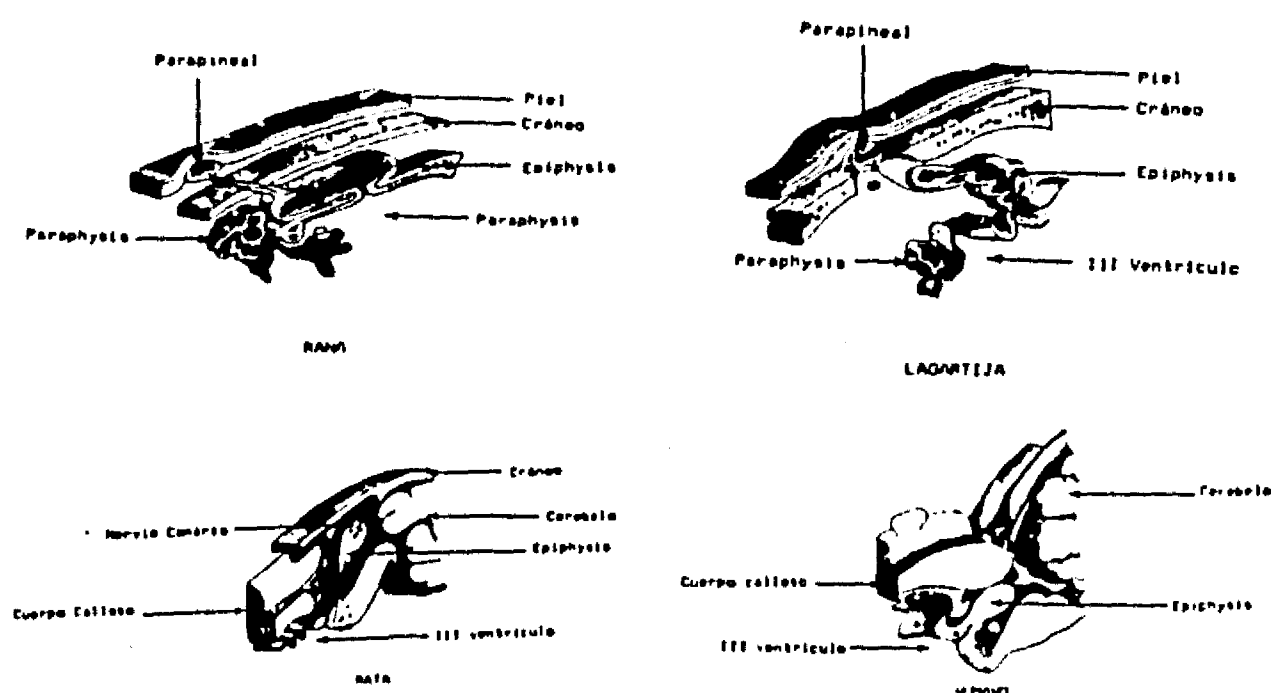


FIG. 1. Representación esquemática de un corte sagital de la glándula pineal (GP) tanto en animales superiores como en inferiores, en el que se muestra sus relaciones con otras estructuras (89).

En los equinos, el elefante y el hombre, la GP tiende a calcificarse formando depósitos calcáreos, con una base orgánica

sobre la que se fijan compuestos inorgánicos del tipo de los carbonatos y fosfatos de calcio y de magnesio (20).

La GP de los mamíferos carece de elementos fotosensibles por lo que la información fótica le llega a la pineal a través de un sistema inespecífico cerebral (27,28) y de un circuito neuronal específico (44,72) (FIG. 2); el cual se origina en la retina, en su capa ganglionar, de donde surge un conjunto de fibras amielínicas que forman el tracto retinohipotalámico. Este se dirige inicialmente hacia el núcleo supraquiasmático, tanto ipsi como contralateral (49,70); y posteriormente al hipotálamo lateral donde se agrega al haz prosencefálico medial.

Después de atravesar la formación reticular, alcanza las astas laterales de los segmentos espinales torácicos de la médula, sitio de origen de las fibras preganglionares simpáticas, las cuales se dirigen hacia el ganglio cervical superior. Algunas de las fibras de este ganglio, constituyen los nervios conarii cuyos axones terminan dentro de la GP (52,55,71) (FIG. 2). Estas fibras son de origen simpático y utilizan noradrenalina (NA) como neurotransmisor. En algunas especies se han identificado fibras parasimpáticas (53,93).

Existen cambios morfológicos y funcionales de la GP relacionadas con las oscilaciones del fotoperiodo ambiental; (condiciones ambientales de luz/oscuridad). Tal sincronía sugiere que la pineal pertenece a un sistema de regulación fotoneuroendócrino (57), cuya acción modula aquellas funciones, tanto cerebrales como endócrinas, que se asocian al fotoperiodo. Así, en algunos mamíferos la GP regula el metabolismo en general

(108), la temperatura (9), la actividad locomotoriz (34) y la pigmentación cutánea (75). Además, la aplicación de sus extractos en concentraciones farmacológicas provoca cambios de conducta de los estados emotivos (119), del electroencefalograma (87) y de la actividad sexual (16,88); la cual incidentalmente es la más extensamente estudiada. Estas acciones de la GP requieren de una inervación simpática íntegra (17).

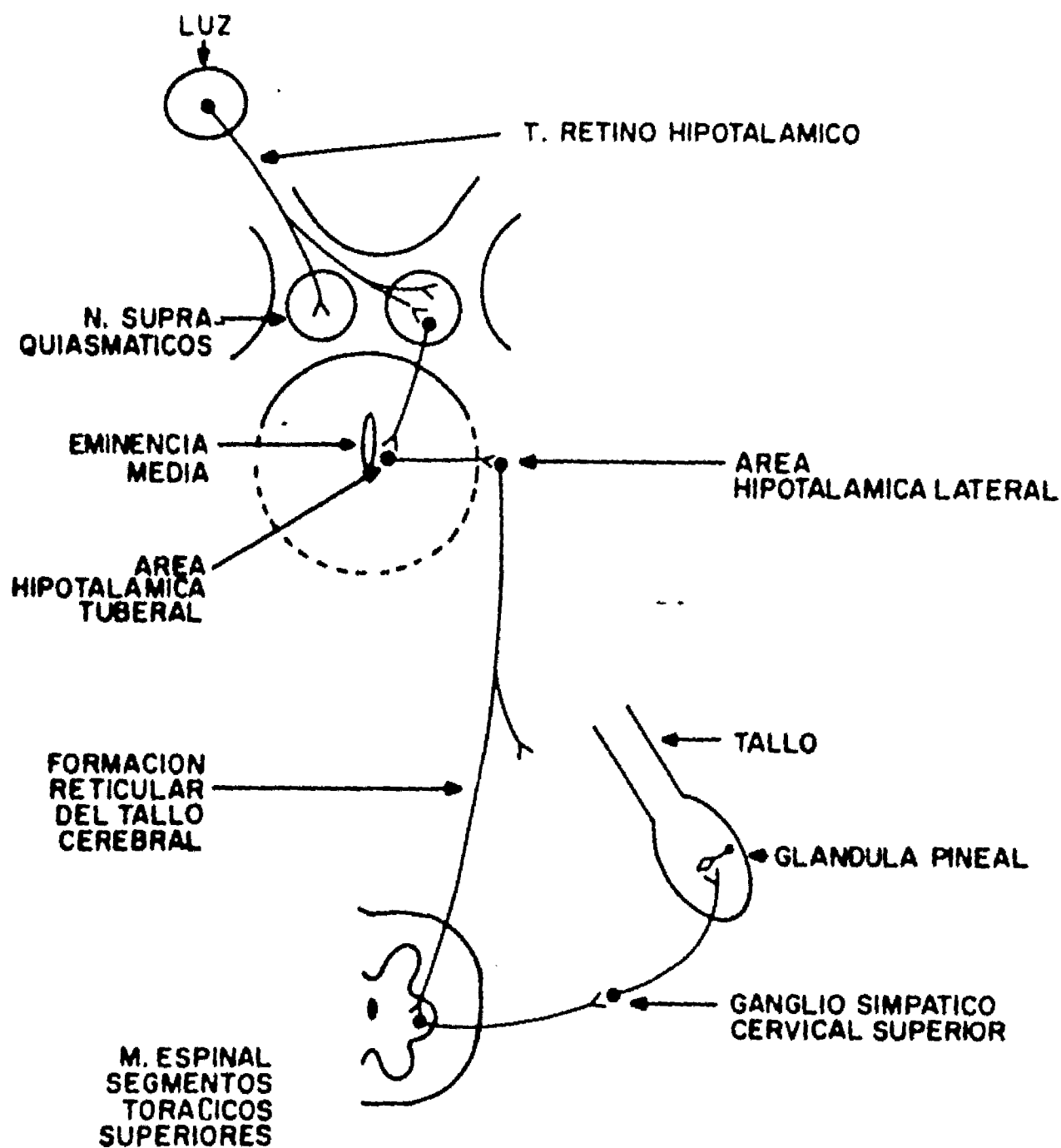


FIG. 2. Representación esquemática del circuito neuronal, por medio del cual la GP recibe información fótica.

La pineal ejerce sus acciones a través de hormonas; cuyos efectos son dependientes de la especie, la dosis, la vía de administración e incluso de las condiciones ambientales (89). Estructuralmente estas sustancias son indóles o péptidos. Péptidos como la somatoestatina, la arginina-vasotocina y la treonil-seril-lisina (10) han sido caracterizados en el parénquima pineal. Mientras que el grupo de los indoles incluye a varios compuestos derivados del triptofano (FIG. 3), muchos de ellos con múltiples efectos biológicos. Aunque, algunos estudios refieren a la melatonina (MEL) (5-Metoxi-N-Acetiltriptamina) como la hormona pineal más importante, no hay duda de que la pineal produce también otros principios activos (39).

El término MEL surgió de Lerner y Case (64) quienes observaron que en ranas y renacuajos se provocaba un aclaramiento de la piel por efecto de los extractos de la pineal, tal acción es consecuencia de una agregación de gránulos de melanina alrededor de los núcleos celulares.

La estructura química de la MEL fué caracterizada en 1958 por Lerner y cols. (63).

La síntesis de MEL se inicia con la captura del aminoácido plasmático triptofano, el cual a través de una hidroxilación se transforma en 5-hidroxitriptofano. Una posterior descarboxilación forma la 5-hidroxitriptamina o serotonina (5-HT) (8). A su vez, su acetilación por la enzima N-acetiltransferasa (NAT) la transforma en N-acetilserotonina (56,58). Este compuesto puede ser oxidado a 5-hidroxiindol-3-ácido acético (64) o transformado a 5-hidroxitriptofol. En este punto de la vía metabólica se forman los 5-metoxi-indoles por la acción de la enzima hidroxindol-O-

metiltransferasa (HIOMT) (FIGS. 2 y 3). De estos compuestos, la MEL (8,64,117) y el 5-metoxitriptofol (5-MTF) consideran las sustancias más activas.

La síntesis de MEL no es exclusiva de la pineal, ésta también se presenta en sitios como la retina (77), la glándula Harderiana (118,77) y el intestino (84).

Muchos estudios muestran que el contenido de serotonina, y de los 5-metoxi-indoles (48) así como la actividad de la enzima NAT (56) muestran variaciones sincronizadas con el fotoperiodo ambiental. Además también existen factores ambientales, diferentes al fotoperiodo, (108), neuronales (25) y hormonales (16) que a su vez regulan la función de la GP.

Los productos indólicos de la pineal alcanzan su concentración más alta durante la escotofase, y sus niveles son mínimos durante la fotofase (58) (FIG. 4). En otras palabras, la luz ejerce una influencia inhibidora sobre la síntesis y secreción de tales hormonas. En la GP de la rata, las concentraciones más altas de MEL oscilan entre 2.5 y 30 pmoles/mg, los valores últimos se alcanzan al final de la fase de oscuridad o escotofase (4:00 h), mientras que las concentraciones mínimas se detectan al inicio del periodo de luz o fotofase (7:00 h).

En humanos y roedores las hormonas de la pineal se catabolizan en el hígado con una 6-hidroxilación o con una conjugación con ácido glucurónico o con sulfato para formar 6-sulfatoxi-indol (aMT6s). Sin embargo, el mayor metabolito urinario es la 6-hidroximelatonina (36,50,60,62). La detección de este compuesto en la orina muestra una relación directa y exacta con la

producción de MEL (6), una cantidad pequeña de MEL es excretada sin cambio. La vida media biológica de la MEL es aproximadamente de 20 min en el suero de rata.

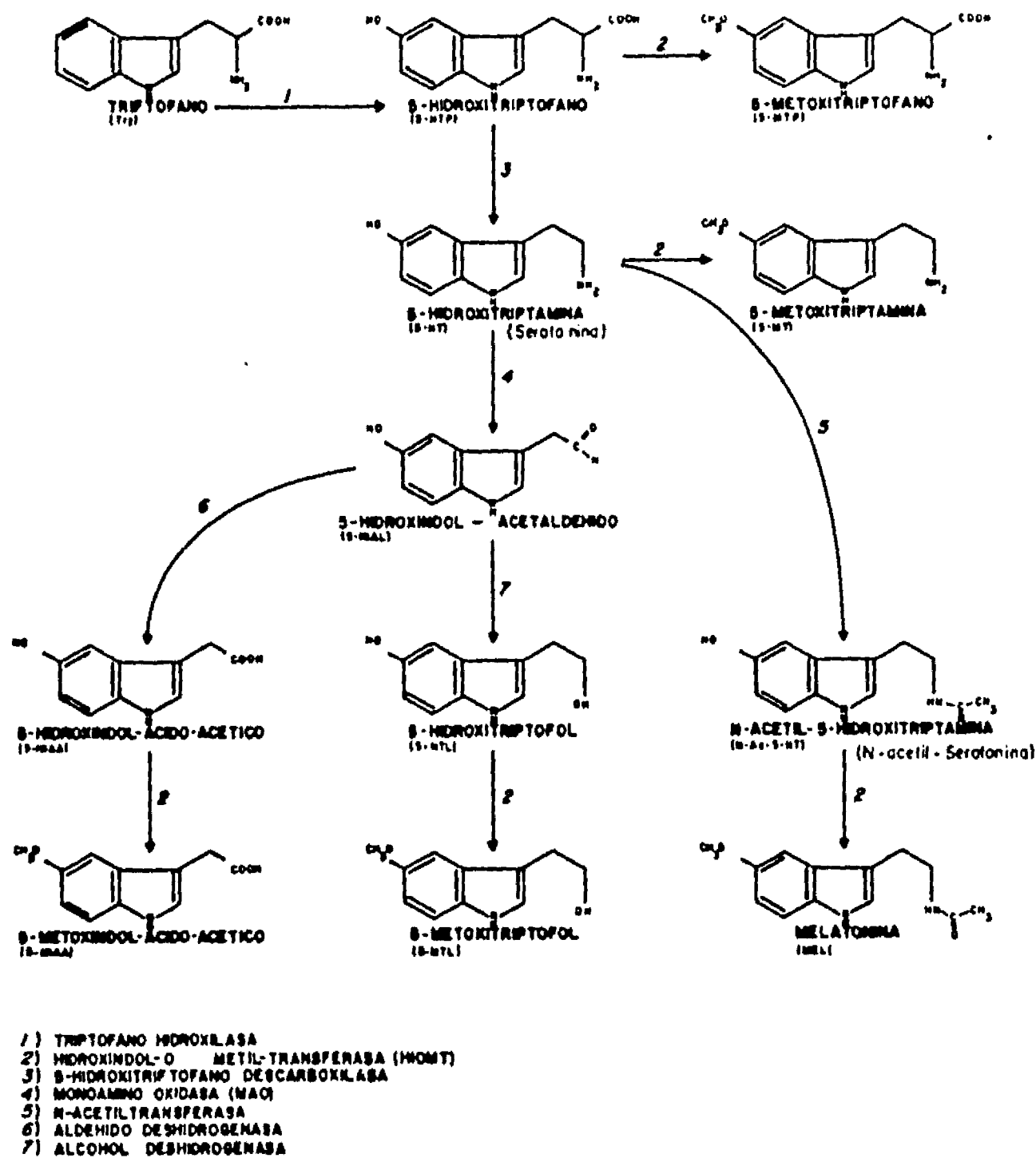


FIG. 3. Vía metabólica de los indoles de la glándula pineal (GP). Esta vía se inicia con el aminoácido triptófano, el cual gracias a la acción de diferentes enzimas forma 3 grupos de 5-metoxi-indoles.

Una vez descritos los efectos de la pineal sobre la piel de renacuajos, se generó un verdadero interés en el estudio de las

funciones de la pineal y se investigó la influencia de esta hormona sobre diversos órganos (47). De todas las funciones atribuidas a la pineal, probablemente ninguna ha sido tan estudiada como su acción sobre la reproducción.

Así, la pinealectomía incrementa tanto el crecimiento como la función gonadal (87). Por ejemplo, la pinealectomía en ratas hembras de 1 a 5 días de edad provoca una apertura vaginal prematura y un subsecuente alargamiento del útero con crecimiento ovárico; mientras que en ratas macho, induce un crecimiento testicular, de las vesículas seminales y de la próstata ventral (103). De hecho existe una relación inversa entre el tamaño celular de la pineal y la masa de células intersticiales testiculares (102). Estos resultados sugieren un efecto antigonadotrópico pineal.

El papel de la MEL en la reproducción humana es menos clara, aunque la modulación que las hormonas del eje pituitaria-gónadas ejercen sobre la pineal en el hombre son muy prominentes. Wetterberg y cols, en 1976 (111), mostraron que las concentraciones de MEL sérica se elevan previamente a la menstruación y se reducen durante la ovulación. También durante los primeros meses del embarazo la MEL se incrementa; mientras que en la etapa final los niveles son mínimos (78).

Los efectos provocados por la GP se ejercen en diferentes estructuras y órganos. Probablemente, el principal sitio de acción de la MEL es el sistema nervioso central. Después de administrar MEL radiactiva por vía sistémica, ésta se acumula principalmente en el cerebro; las estructuras cerebrales que captan y acumulan altas concentraciones de MEL; son el hipotálamo, el tallo cerebral, algunas estructuras epitalámicas, la pineal y la pituitaria (3).



También órganos periféricos como las gónadas y en general todo el sistema reproductor, captan y acumulan MEL (88).

Dentro de los efectos no reproductores provocados por la administración de MEL, esta su acción hipnogénica (25). Los implantes hipotalámicos de MEL en gatos, producen signos conductuales y electroencefalográficos (EEG) de sueño (67). También en pollos la administración sistémica de MEL induce un estado de sueño, el cual electroencefalográficamente corresponde al sueño de ondas lentas (46).

Los efectos hipnogénicos de la MEL también se producen en humanos. Así, Antón-Tay y cols., (2), observaron que la administración de MEL reduce la latencia de sueño e incrementa la fase de sueño paradójico en voluntarios sanos. Aunque, Cramer y cols (25), mostraron que una dosis de 50 mg de MEL en sujetos voluntarios sanos, es un potente inductor de sueño, pero no modifica ni el patrón ni la frecuencia de aparición de algunas de las fases de sueño. De acuerdo a estos autores, la MEL induce un sueño que tanto conductualmente como poligráficamente es muy similar al sueño fisiológico (4,25).

La MEL también influye en muchos aspectos de la conducta humana. Por ejemplo, dosis farmacológicas de MEL (20-50 mg) producen sedación y sensación de bienestar y tranquilidad en sujetos jóvenes sanos.(25). Contradictoriamente, Arendt en 1984 (5) encontró que la aplicación de MEL por 4 semanas produjo una fatiga crónica muy importante.

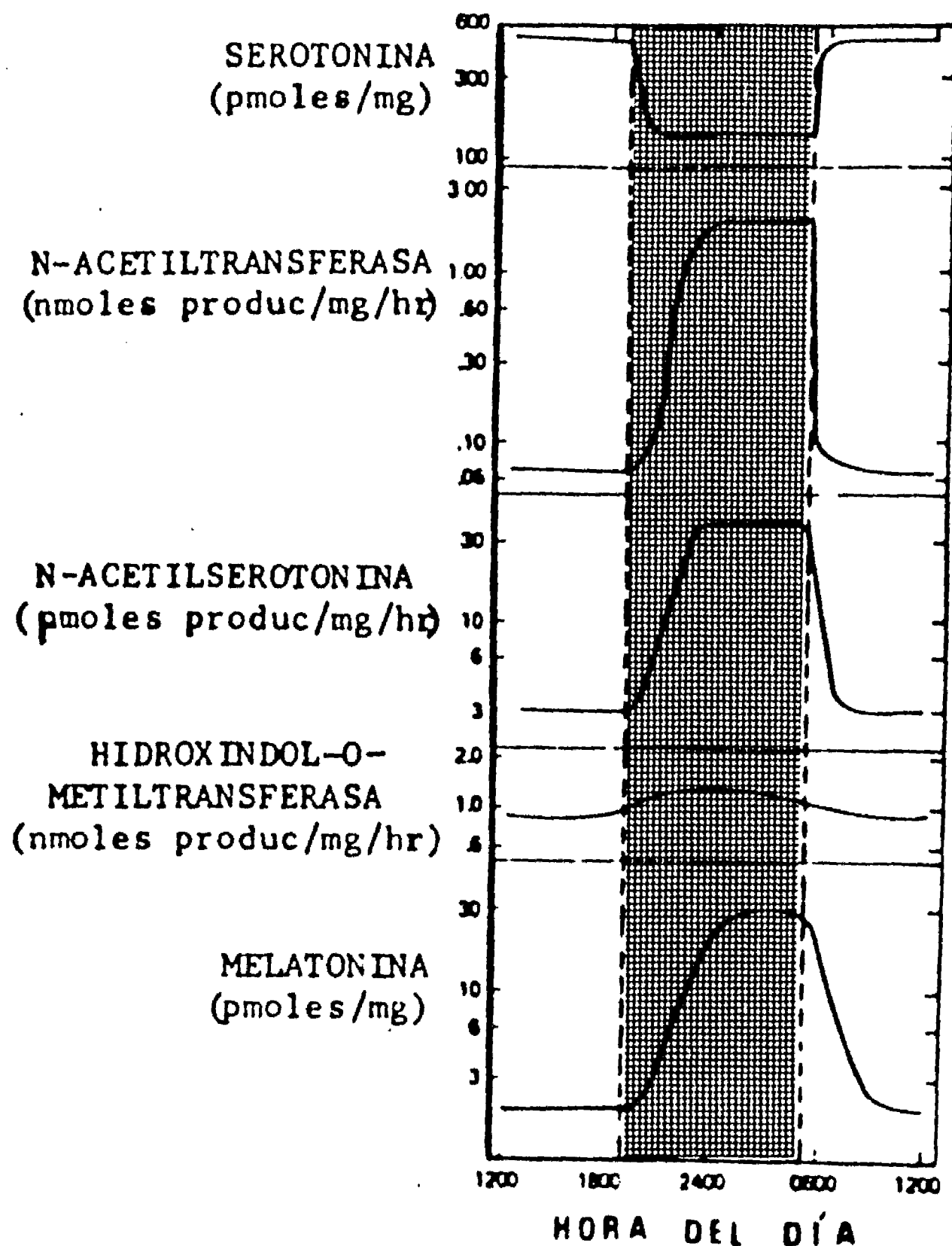


FIG. 4 Esquema del ritmo luz/oscuridad de triptofano, serotonina, N-acetiltransferasa, HIOMT y MEL. Los niveles de MEL en la fotofase son aproximadamente 10 veces menores que los observados durante la escotofase.

El efecto sedante que posee la MEL se manifiesta cuando se administra en sujetos enfermos. Por ejemplo, la administración de

MEL en sujetos epilépticos reduce significativamente tanto la frecuencia como la intensidad de las crisis convulsivas, provocando además una tendencia hacia la normalización de los patrones EEG de estos pacientes (2). También durante situaciones estresantes, como las provocadas por exposición al frío, por inmovilización, por hipoglucemia, etc., se incrementa importantemente la MEL sérica en ratas (105), lo que supone una acción tranquilizadora de la misma que revertirá los efectos del estrés.

Otro aspecto interesante de la MEL, es su reciente asociación con algunas patologías mentales. Debido a la presencia de un ritmo circadiano y estacional en la producción y liberación de MEL en humanos (112); y de acuerdo con la idea de que algunos desórdenes psiquiátricos dependen de alteraciones de los ritmos circadianos, se sugirieron relaciones entre la MEL y este tipo de alteraciones. Con esta idea en mente Cramer y cols (25), mostraron que la aplicación de MEL en pacientes con depresión bipolar empeora el cuadro psiquiátrico. Además estos pacientes, presentan concentraciones reducidas de MEL, indicando un tono adrenérgico disminuido (15).

Algunas investigaciones mostraron que los pacientes que padecen de depresión acompañada de melancolía, muestran patrones de secreción de MEL muy diferentes a los sujetos sanos (113). En general la pendiente del pico nocturno es menor y está desfasada con respecto a los controles.

Recientemente se caracterizó un cuadro clínico denominado depresión afectiva estacional (99). La cual únicamente se manifiesta en las estaciones de otoño e invierno y desaparece en la primavera y en el verano. Este cuadro tiende a desaparecer con fototerapia o

cuando el paciente viaja a una altitud cercana a Ecuador.

Se desconoce el mecanismo de acción a nivel cerebral de la MEL, los estudios que intentan localizar y caracterizar a receptores específicos a la MEL dentro del SNC, son controversiales. Así, mientras Cohen y cols, en 1978 (20), y Niles y cols, en 1979 (74), describieron la presencia de receptores específicos a la MEL en casi todas las estructuras cerebrales de la rata, con mayor densidad en hipotálamo, hipocampo, cuerpo estriado y mesencéfalo; estudios más reciente describen la existencia de receptores únicamente en hipotálamo (120).

Estudios electrofisiológicos, muestran que la MEL es capaz de modificar la actividad eléctrica cerebral. Por ejemplo, los trabajos sobre sueño realizados por Antón-Tay (2), indican que la administración sistémica de MEL modifican los patrones electroencefalográficos.

Otros estudios (80) describen un efecto bifásico depresor, excitador, inducido por la aplicación sistémica de MEL sobre la frecuencia de descarga unitaria de neuronas, tanto hipotalámicas como extrahipotalámicas, en ratas con movimiento libre (73). De igual manera, los estudios que utilizan microiontoforésis de MEL, muestran un efecto depresor de la misma, sobre la frecuencia de descarga de los pinealocitos (96) y de estructuras hipotalámicas.

El mecanismo de acción de la MEL a nivel celular, en el cual intervienen posibles receptores específicos, parece involucrar, la intervención directa o indirecta de segundos mensajeros. Dentro de este último grupo se incluyen a los nucleótidos cíclicos, al ión calcio ( $Ca^{+2}$ ) y a las prostaglandinas en células neuronales y

gliales (120).

También en la síntesis y secreción de MEL, interviene el AMPc, activado por la NA, que a su vez es liberada por las terminaciones simpáticas (91,92). Existen también otras sustancias dentro de la GP, que modulan la producción y liberación de melatonina, estas son el glutamato y el ácido gama-amino-butírico (GABA) y péptidos como el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (7).

La similitud entre los efectos inducidos por la MEL con aquellos provocados por fármacos GABAérgicos; por ejemplo, hipnosis, sedación y propiedades anticonvulsivas, entre otras; sugiere un nexo entre la glándula pineal, a través de los indoles, y los sistemas gabaérgicos. Esta relación fue postulada inicialmente por Romjin (94) quien sugirió que la pineal es un órgano tranquilizante; algunas otras evidencias neuroquímicas apoyan esta sugerencia (21,22). Una evidencia muy importante en esta relación fue aportada por los estudios de Marangos y Cols., (66) quienes mostraron que la MEL reduce la unión de [<sup>3</sup>H]-diazepan de sitios de unión específicos en las membranas de cerebro de rata. Para estos autores se trata de una interacción de la MEL con el complejo benzodiazepina-ionóforo-receptor-GABA (66).

Estos autores señalan parte del hecho de que las benzodiazepinas (BZP) y los barbitúricos son capaces de mejorar la neurotransmisión GABA-érgica, debido a que uno de los componentes del complejo receptor supramolecular del GABA, reconoce sitios con los que interactúan varias sustancias entre las que se encuentran como las propias BZP y los barbitúricos (30) esto sugiere que los efectos sedativos y anticonvulsivos de estos fármacos, son el resultado de una modulación de la actividad del receptor GABAérgico

(66). La actividad de este tipo de receptor se ve incrementada por sustancias como los ansiolíticos, los anticonvulsivos, los relajantes musculares, los sedantes hipnóticos, pero se disminuye por algunas  $\beta$ -carbolinas ansiogénicas (100).

En un estudio reciente Coloma y Niles en 1988 (22) estudiaron el efecto de la MEL sobre la unión del GABA a membranas cerebrales In Vitro. Estos autores observaron que la melatonina a una concentración de  $10^{-7}$  incrementó en un 24 % la unión específica a [ $^3$ H]-muscimol en la corteza frontal de la rata. Si la preparación era pre-tratada con TRITON X-100, sustancia tensoactiva, el efecto de la MEL desaparecía. El tiempo de preincubación con MEL fue un factor decisivo de este efecto, así, cuando la preparación se preincubaba durante 30 min, con  $10^{-4}$  M de MEL, existió un incremento del 30 % de la unión al [ $^3$ H]-GABA; mientras, que a 60 min se produjo un incremento del 60 % con la misma concentración de MEL. La concentración media de melatonina que causó a el 50 % de incremento de la unión al [ $^3$ H]-GABA fue de  $1.5 \times 10^{-8}$  M. Cuando los autores compararon este efecto provocado por el Diazepam, encontraron que este fármaco es 4 veces más potente que la MEL. La melatonina casi no produjo efecto en el receptor GABA<sub>B</sub>, pero fueron muy evidentes los de baja afinidad, es decir en el receptor GABA<sub>A</sub>. Por el contrario el diazepam ejerce efectos en ambos tipos de receptores GABAérgicos.

Aunque estos trabajos muestran una evidencia neuroquímica de la relación GABA-Melatonina no existen evidencias farmacológicas ni conductuales directas de tal interacción, ni mucho menos una descripción del posible mecanismo de acción "GABAérgico" de la MEL.

Por lo tanto y con el objetivo de analizar esta posibilidad, se diseñó una serie de experimentos:

- a) In Vivo (con la finalidad de estudiar los efectos ansiolíticos de la, MEL, de la actividad analgésica, la actividad locomotriz, del aprendizaje y además, la ingesta de agua).
- b) In Vitro (En músculo liso intestinal).
- c) In Situ (electrofisiológicos en hipotálamo anterior e hipocampo de rata).

Los cuales se resumen en la presente tesis.

## I. EXPERIMENTOS In Vivo

Una característica de las sustancias GABAérgicas del tipo de las benzodiazepinas (BZP) son sus propiedades ansiolíticas (23, 37). Estos fármacos deprimen el sistema nervioso central en varios grados dependiendo de las dosis. Una vez alcanzado el efecto ansiolítico se presenta una ligera depresión, la cual puede o no acompañarse de algún grado de alteración en algunas funciones psicológicas (42). Dosis grandes pueden causar sueño y dosis tóxicas producen coma. Muchas de estas drogas tienen efectos anticonvulsivos por virtud de deprimir centros nerviosos cerebrales. El bloqueo de neuronas internunciales, así como algunos efectos sedantes contribuyen a varios grados de acción relajante muscular. Estos efectos son ejercidos a través de mejorar la neurotransmisión que utiliza GABA, razón por la cual estos fármacos son considerados como GABAérgicos (12).

Las propiedades ansiolíticas de estos compuestos se han puesto de manifiesto en varios modelos experimentales, siendo los más utilizados aquellos que poseen una situación de conflicto. Las similitudes entre estos efectos provocados por las BZP con aquellos reportados para la MEL son muy similares, por lo que es posible que los indoles de la pineal ejerzan también estos efectos ansiolíticos; los cuales han sido sugeridos por algunos autores como Kóvacs (61), pero no han sido realmente analizados.

Nuestro primer intento de asociar los efectos de la MEL con las sustancias GABAérgicas cerebrales fué un estudio de ansiólisis utilizando el modelo experimental diseñado por Vogel (107). Realizamos un estudio competitivo entre la MEL, diazepam (DZP),



clorodiazepóxido (CDP) y buspirona (BUS)

Ia) Efectos ansiolíticos de la melatonina en una situación de conflicto.

Se utilizaron 400 ratas (*Ratus norvegicus*) Wistar macho (180-230 g), las cuales se dividieron en varios grupos (n=20) y se sometieron a la prueba de conflicto en dos horarios (n=10 a las 9:00 h; n=10 a las 16:00 h). Las ratas se almacenaron en cajas individuales (acrílico transparente 40 X 30 X 20 cm) y se mantuvieron con acceso libre a comida (Purina Rat Chow) y agua. Durante el tiempo que duraron los experimentos las ratas permanecieron bajo ciclos de luz/oscuridad 12/12 (9:00-21:00 h) y con temperatura controlada (20-23°C).

El modelo de Vogel (107) utiliza una caja de acrílico transparente (38 X 38 cm), en cuya pared posterior y a través de un orificio se introduce un bebedero constituido por un tubo metálico y en una botella de plástico con una capacidad de 250 ml. El bebedero se localiza a 6 cm de distancia del piso de la caja, el cual está formado por una rejilla que contiene 15 varillas de aluminio de 5 mm de diámetro separadas un cm de distancia entre ellas. Un circuito de corriente directa el cual utiliza una fuente de poder de 6 V, se conecta entre las varillas que componen la rejilla del piso de la caja y el tubo del bebedero. El circuito se completa o se cierra cada vez que el sujeto, parado en las rejillas del piso, lame el bebedero (FOTO 1).

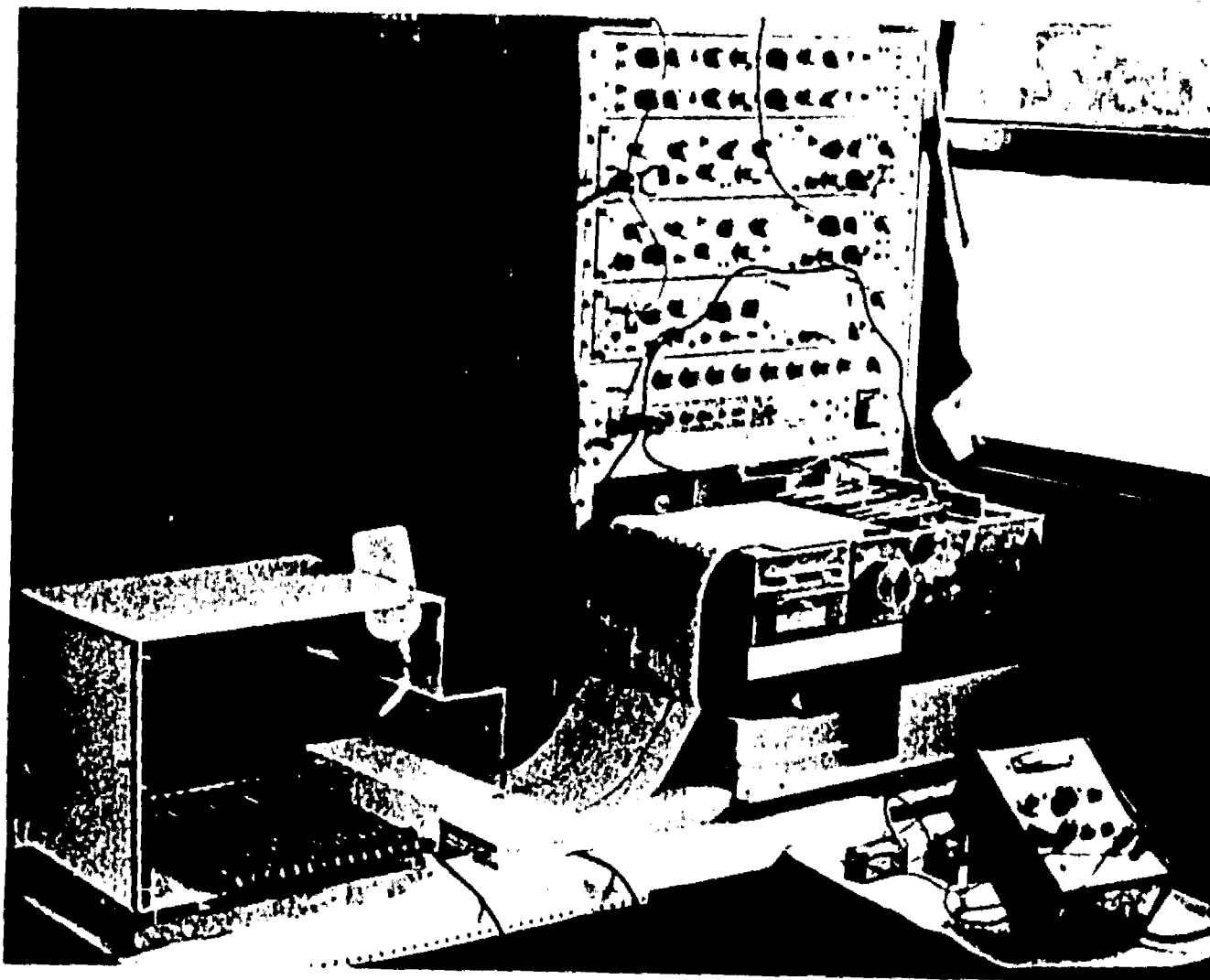


FOTO 1. Dispositivo utilizado para realizar las pruebas de conflicto.

Cuando el circuito se cierra, es decir con cada lengüetazo, se genera un pulso ( $200 \mu\text{V}$ ), el cual alimenta a un preamplificador de un polígrafo (Grass 7D). Estos pulsos son integrados con la ayuda de un integrador (Grass 7F B1) calibrado de tal manera que cada "rampa" o "escalón" corresponda a 20 lengüetazos que el animal realiza o a  $400 \mu\text{V}$  (FIG. 5) Cuando se produce este "escalón", se dispara un estimulador el cual genera una corriente de  $0.6 \text{ mA}$  que el sujeto recibe durante el lengüetazo No. 21. Después el sistema nuevamente inicia en un valor de voltaje cero, hasta que el animal vuelve a completar los 20 lengüetazos. El número de lengüetazos y el número de choques recibidos por el animal se registraron

automáticamente en un polígrafo, durante un periodo de 3 min, tiempo que duraba el registro experimental (FIG. 5).

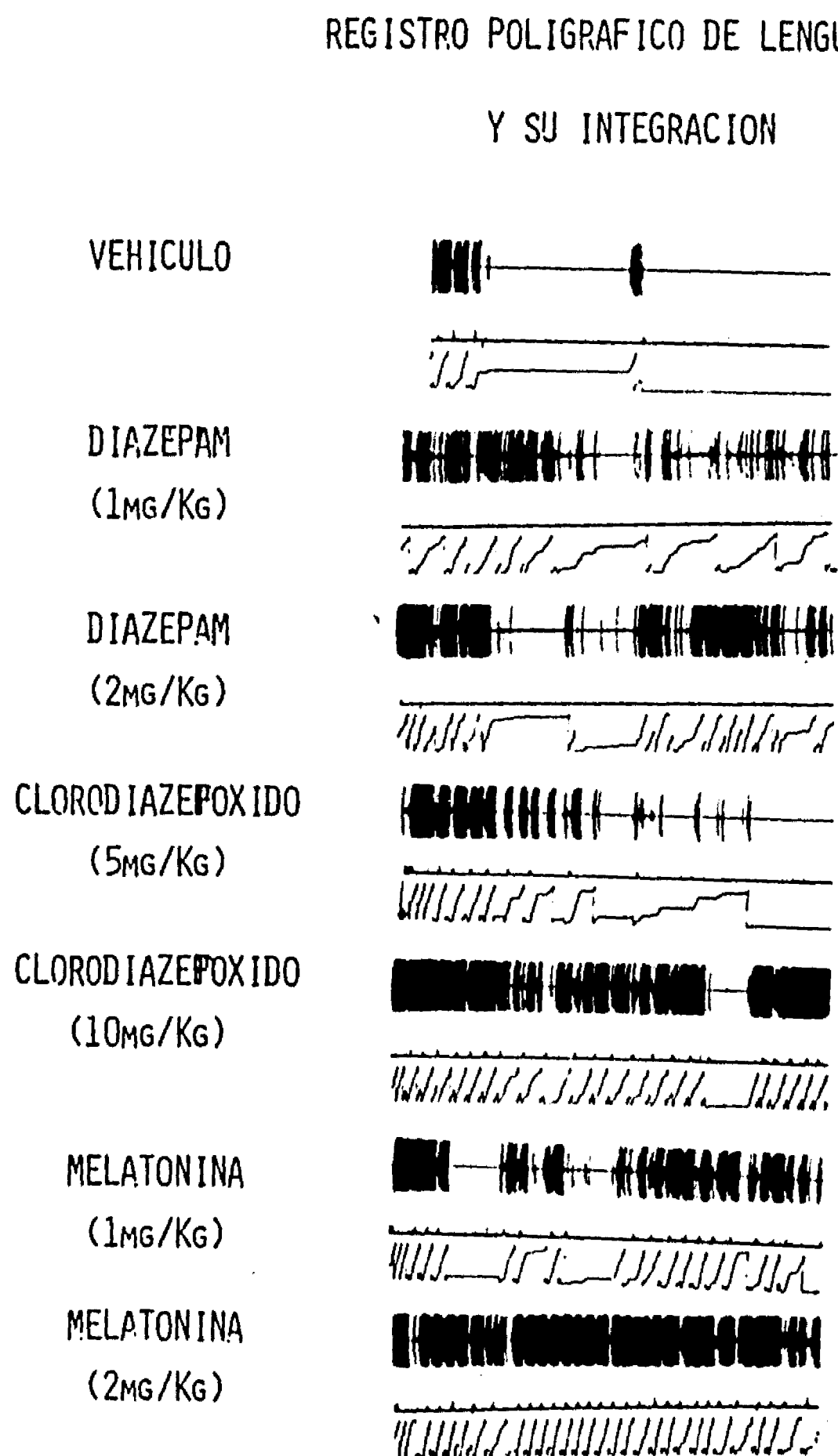


FIG. 5. Series de registros gráficos realizados por el polígrafo los cuales muestran los pulsos generados cuando el sujeto cierra el circuito. Las "rampas" de abajo representan la misma señal integrada. Cada uno de estos trazos corresponde al registro obtenido durante 3 min después de la administración de los diferentes fármacos.

Los animales se privaron de agua y alimento por 48 h antes de cada sesión experimental, 30 min antes de introducir al sujeto en la caja de prueba, éstos recibieron la administración intraperitoneal de alguno de los fármacos empleados.

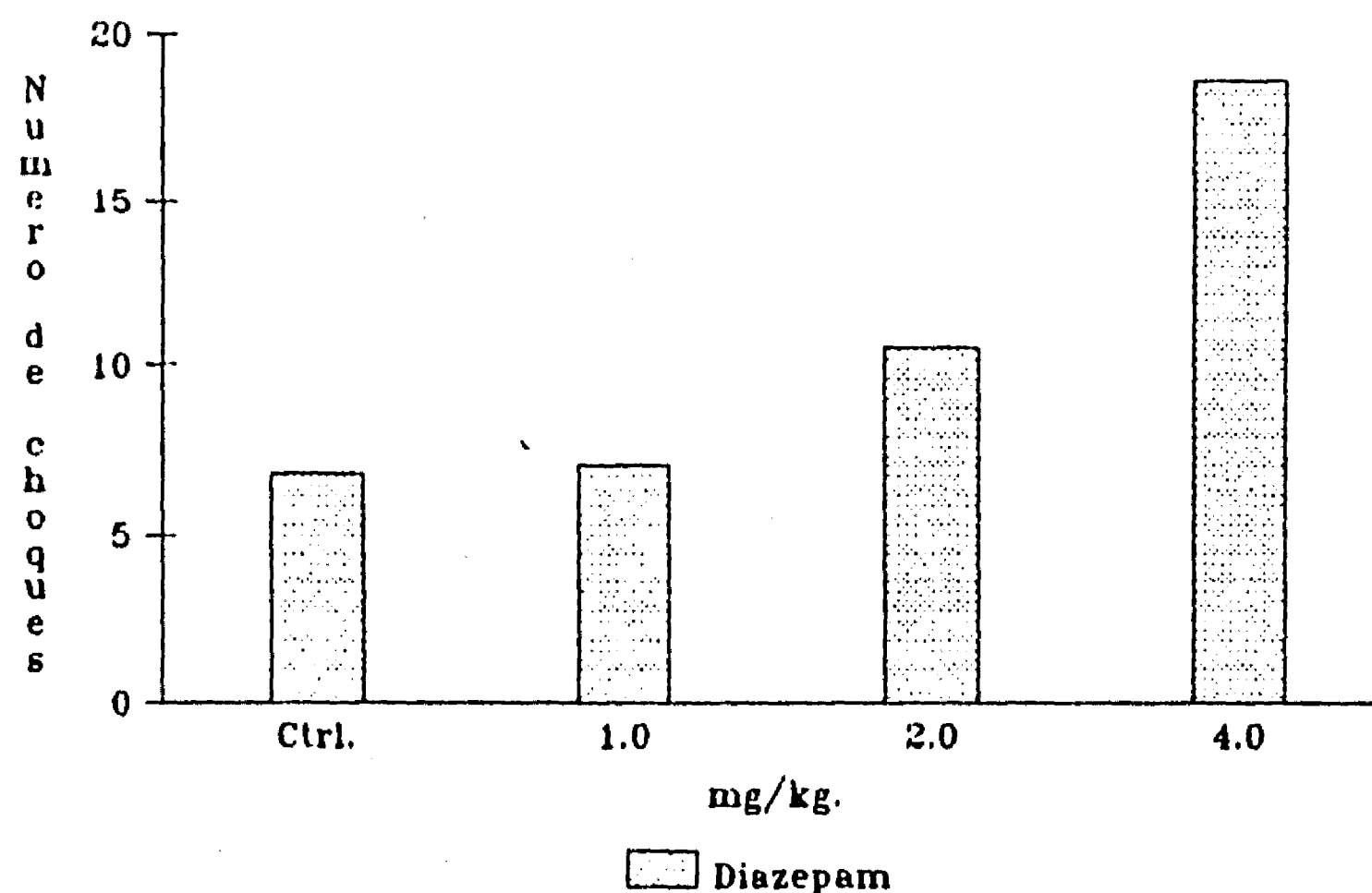


FIG. 6. La administración de DZP 1.0 mg/Kg (n=20); 2.0 mg/Kg (n=20) y 4.0 mg/Kg (n=20), provocó un incremento significativo en el número de choques que los animales recibieron comparados con el grupo control (buffer-fosfato, n=20). Este efecto fue dosis-dependiente y se inició desde la dosis menor.

Tanto los sujetos experimentales como los controles fueron sometidos a esta prueba una sola vez. Los fármacos y las dosis empleadas fueron las siguientes: diazepam (DZP; Valium-Roche; 1.0, 2.0 y 4.0 mg/Kg); clordiazepóxido (CDP; Sigma; 5.0 y 10.0 mg/kg) y buspirona (BUS; Sigma; 5.0 y 10.0 mg/Kg). Los efectos provocados por

estas sustancias se compararon con los producidos por la melatonina (MEL; Sigma; 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 y 2.0 mg/Kg).

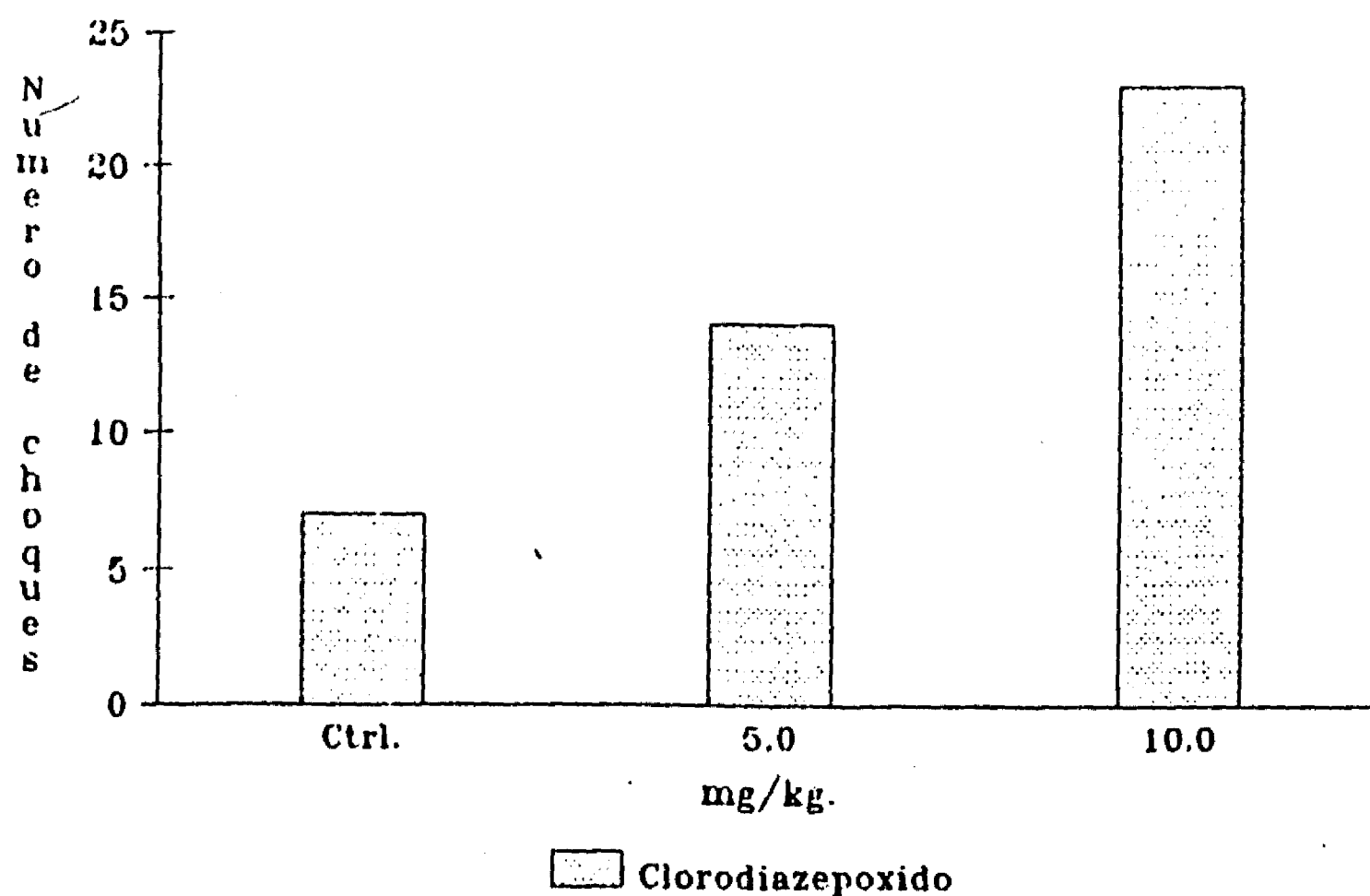


FIG. 7. Los grupos tratados con CDP 5.0 mg/Kg (n=20) y 10.0 mg/Kg (n=20), recibieron un mayor número de choques, comparado con el grupo control (agua destilada) (n=20). También estos efectos mostraron una relación dosis-efecto.

Los sujetos recibían la aplicación de solución vehículo (propilenglicol-polietilenglicol; Merck; 10%, buffer fosfato o agua destilada). Una vez finalizado el registro, recibían una sobredosis de pentobarbital sódico. Los datos obtenidos se analizaron mediante la prueba estadística "t" de Student.

Los resultados obtenidos con los registros, de este trabajo

se interpretaron, por el número de "rampas" que se obtuvieron en cada una de las sesiones. Este análisis nos permitió determinar la frecuencia de choques que cada animal recibía en un intervalo de 3 minutos y en cada administración. Se calcularon las frecuencias promedio de las muestras.

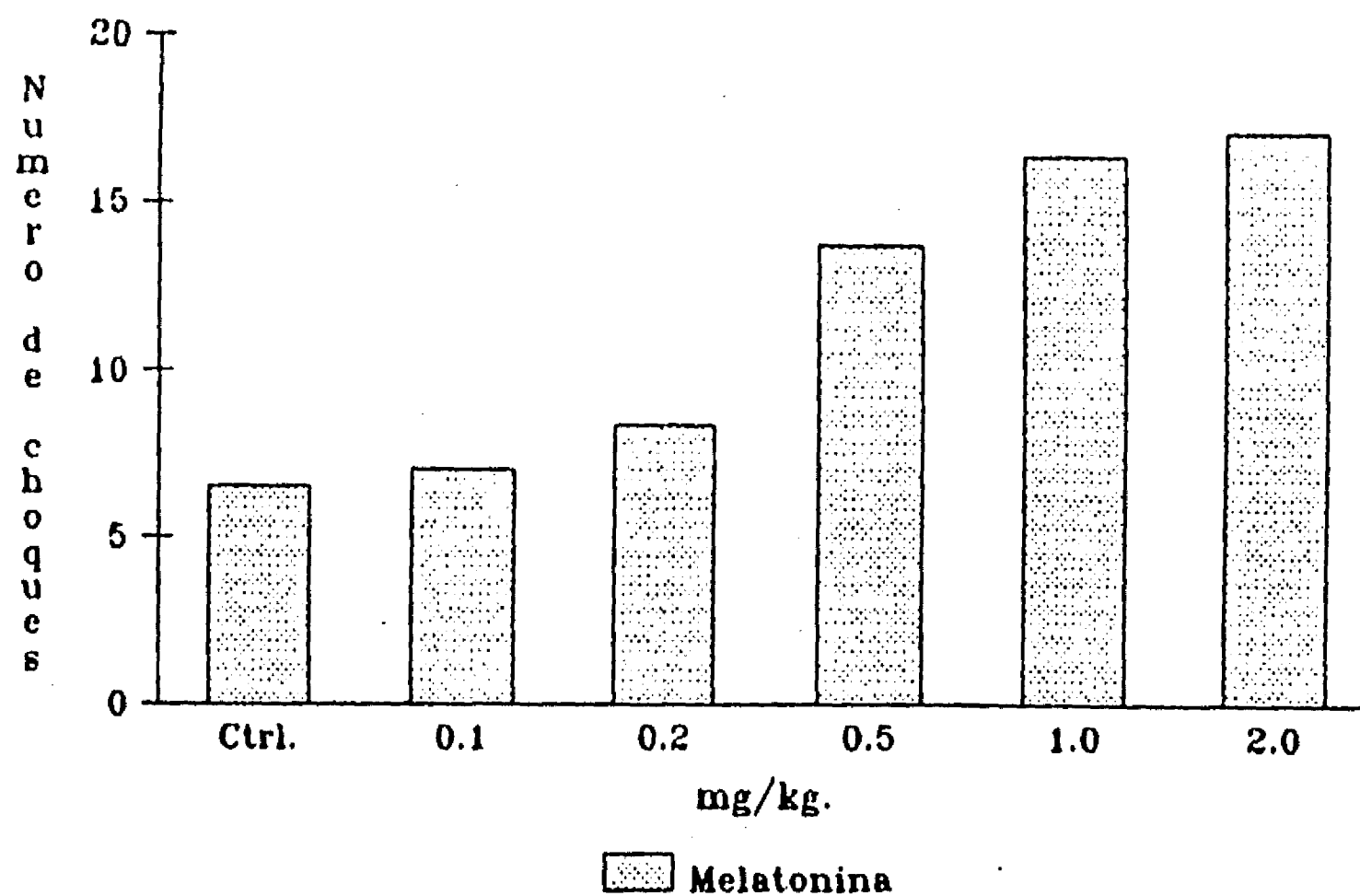


FIG. 8. La administración de MEL provocó efectos similares a todos estos ansiolíticos. Los grupos de animales que recibieron las diferentes dosis de melatonina 0.1 mg/Kg (n=20); 0.2 mg/Kg (n=20); 0.5 mg/Kg (n=20); 1.0 mg/Kg (n=20) y 2.0 mg/Kg (n=20), respectivamente mostraron un incremento significativo en el número de choques recibidos con respecto a los sujetos del grupo control (polietilenglicol 10%, n=20). Este efecto también depende de las dosis administrada.

Los resultados obtenidos en estos experimentos mostraron que la administración de DZP a 1.0 mg/Kg,  $\bar{X}=7.0$  (n=20/dosis); 2.0 mg/Kg,  $\bar{X}=10.5$  (n=20) y 4.0 mg/Kg,  $\bar{X}=18.6$  (n=20), incrementó significativamente el número de choques eléctricos ( $p<0.05$ ) comparados con los animales control,  $\bar{X}=6.8$  (n=20), FIG. 6.

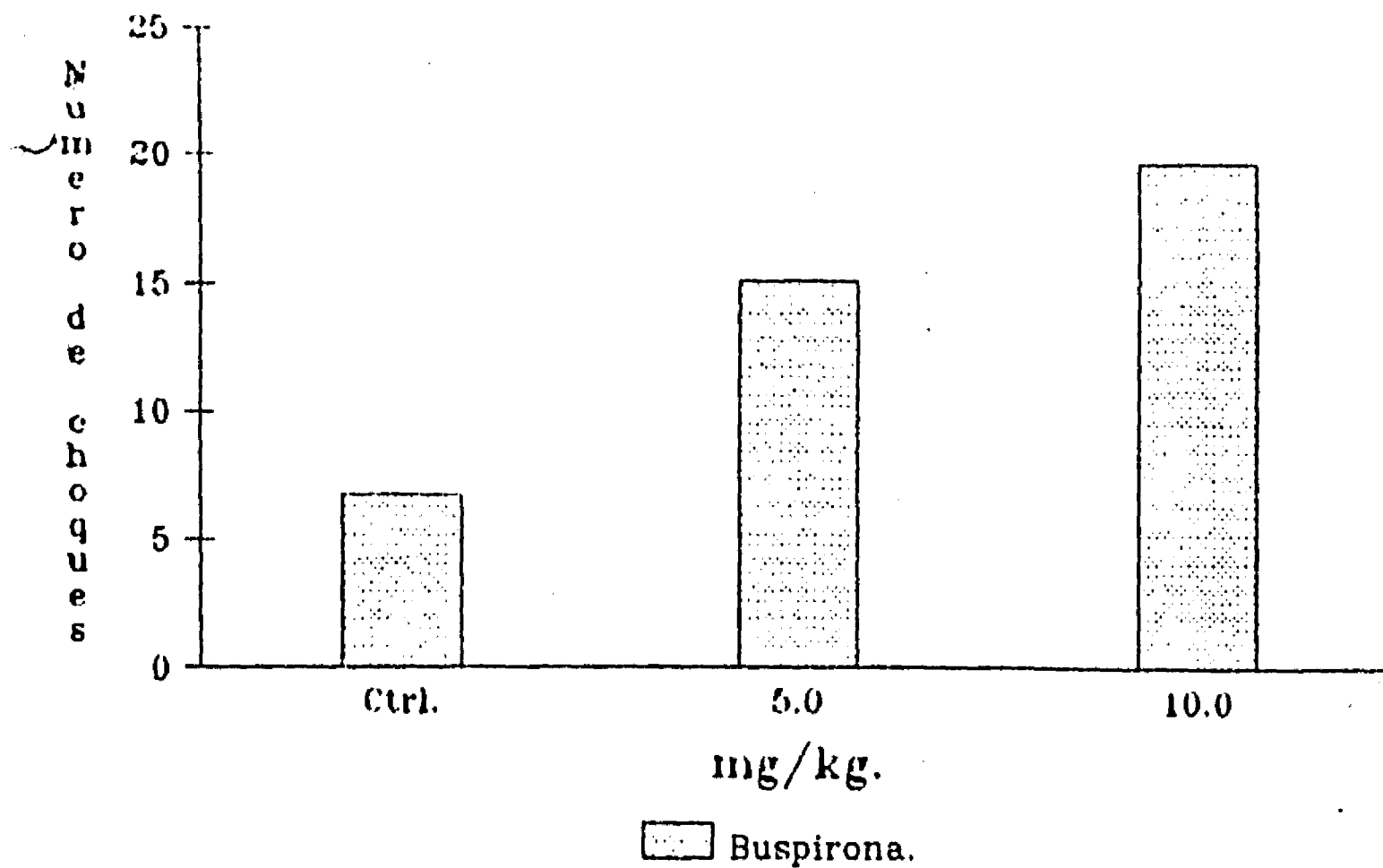


FIG. 9. La BUS en dosis de 5.0 mg/Kg (n=20) y 10.0 mg/Kg (n=20) indujo también un incremento dosis-dependiente en el número de choques eléctricos comparados con el grupo control (agua destilada, n=20).  $.1s2$

La administración de CDP provocó a 5.0 mg/Kg un  $\bar{X}=14.0$  (n=20) y de 10.0 mg/Kg un  $\bar{X}=23.0$ ; incrementó al igual que DZP el número de choques eléctricos ( $p<0.05$ ) en relación a los animales del grupo control, el cual tuvo un  $\bar{X}=7.0$  (n=20), FIG. 7.

La administración de BUS, por su parte también indujo acciones ansiolíticas así, de un valor promedio del grupo control (n=20) de 6.14 choques el grupo (n=10) tratado con 5.0 mg/Kg pasó a 15.8 choques eléctricos (p<0.05). Finalmente el grupo (n=20) que recibió una dosis de 10 mg/Kg alcanzó un promedio de 19.6 choques eléctricos (p<0.01) FIG. 9.

En este modelo de ansiedad los fármacos ansiolíticos clásicos, como lo son el DZP, CDP y la BUS indujeron efectos significativos en el número de choques con respecto a los animales del grupo control. Tal efecto se interpreta como una acción ansiolítica puesto que termina con el conflicto y como consecuencia se reduce la ansiedad. La administración de MEL también indujo un efecto ansiolítico en este modelo. Este efecto el cual fué dosis dependiente mostró que la dosis efectiva mínima de la MEL fué de 0.5, la cual comparada con las dosis efectivas mínimas de los otros fármacos fué de 2.0 mg/Kg para DZP y 5.0 mg/Kg para CDP y BUS, respectivamente, estos resultados se resumen en la tabla I.

T A B L A I  
ACTIVIDAD ANTICONFLICTO DE LOS FARMACOS UTILIZADOS

FARMACO	DOSIS MINIMA EFECTIVA (mg/Kg - IP.)
Diazepam (n=20)	2.0
Clordiazepóxido (n=20)	5.0
Buspirona (n=20)	5.0
Melatonina (n=20)	0.5



Existen varias situaciones que pueden ser consecuencia de este supuesto, efecto ansiolítico de la MEL. Por ejemplo si este fármaco induce analgesia, modifica el aprendizaje, altera la actividad locomotriz o interfiere con la conducta de ingesta de agua, es posible que este efecto de incremento en el número de choques observado en los animales tratados con MEL, puede ser explicado por un efecto en cualquiera de estas variables. Por lo tanto es necesario analizar el efecto de MEL sobre cada uno de estos parámetros antes de establecer una acción ansiolítica real.

## III PRUEBAS DOLORIMÉTRICAS

Utilizamos dos de los modelos experimentales que fueron empleados en la descripción de los mecanismos de analgesia provocada por la estimulación de algunas regiones del tallo cerebral (38). Estos modelos son los de retiramiento de la cola (tail flick) en rata y el de placa caliente (hot plate) en ratón. Los posibles efectos provocados por la MEL fueron comparados por aquellos provocados por un fármaco analgésico característico como es el caso de la morfina (MOR).

Los experimentos se realizaron en 40 ratas Wistar machos de 180 a 230 g, y 52 ratones, CDI machos de 30 a 35 g de peso. Estos animales se mantuvieron en el laboratorio desde 3 días antes de iniciarse la fase experimental hasta el término de la misma, con ciclos de luz-obscuridad de 12/12 h (9:00-21:00 h) y temperatura controlada (27 °C). Los animales se colocaron en cajas individuales de acrílico transparente de 30 X 20 X 15 cm. Todos los animales tuvieron acceso libre al alimento (Purina Rat Chow) y al agua. Cada sujeto fue numerado al azar en la cola, utilizando una numeración binaria. En todos los experimentos se emplearon grupos de 4 y 6 sujetos.

Las sustancias empleadas fueron MEL (Sigma), la cual se disolvió en polietilenglicol (Merck) al 10 %, sulfato de morfina (Endo) disuelta en solución salina al 0.9 %, ésta última para establecer un análisis comparativo.

Las dosis administradas de MEL por vía intraperitoneal (en ambos grupos de animales) fueron de 2.0 y 4.0 mg/kg; de MOR 5.0 mg/kg. Un grupo recibió la solución de vehículo (polietilenglicol

al 10 % y/c solución salina) y fue considerado como control.

#### 1) PRUEBA DE LA PLACA CALIENTE A 55° C EN RATON

La MEL o la solución control (polietilenglicol al 10 %) se administraron 30 min antes de la prueba experimental, mientras que la aplicación de morfina se hizo sólo 10 min antes. Los animales fueron levantados por la cola, y colocados sobre la superficie de un aparato de placa caliente (hot-plate) (Ho-71915B type Sybron/Thermolyne), de 16 x 16 cm, mantenida a una temperatura de  $55 \pm 1^\circ\text{C}$ . En el momento en que el animal era colocado en la placa caliente, se accionaba automáticamente un cronómetro el cual se detenía cuando el animal se lamía las patas delanteras o cuando mostraba una conducta de salto. En ese momento, los animales fueron retirados inmediatamente de la placa, o bien, si durante los primeros 30 seg el ratón no mostraba tales conductas, el sujeto era retirado evitando con ello, algún daño en las patas. Puesto que los sujetos se sometieron a una sola prueba y formaron grupos independientes entre sí, las latencias observadas entre los diversos grupos fueron analizadas utilizando la prueba de "t" de Student.

La administración de MEL en dosis de 2.0 mg/Kg (n=13) y 4.0 mg/Kg (n=13), produjeron latencias de  $\bar{X}=4.96$  y  $\bar{X}=4.1$  seg respectivamente, en esta prueba dolorimétrica. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los tiempos de latencia comparados con los del grupo control ( $\bar{X}=3.35$  seg, n=13), pero sí se presentó una diferencia importante de los tiempos de latencia cuando se compararon con el grupo tratado con morfina a la dosis de 5.0 mg/Kg ( $\bar{X}=37.4$  seg, n=13) y el grupo control ( $p<0.005$ ).

FIG. 10.

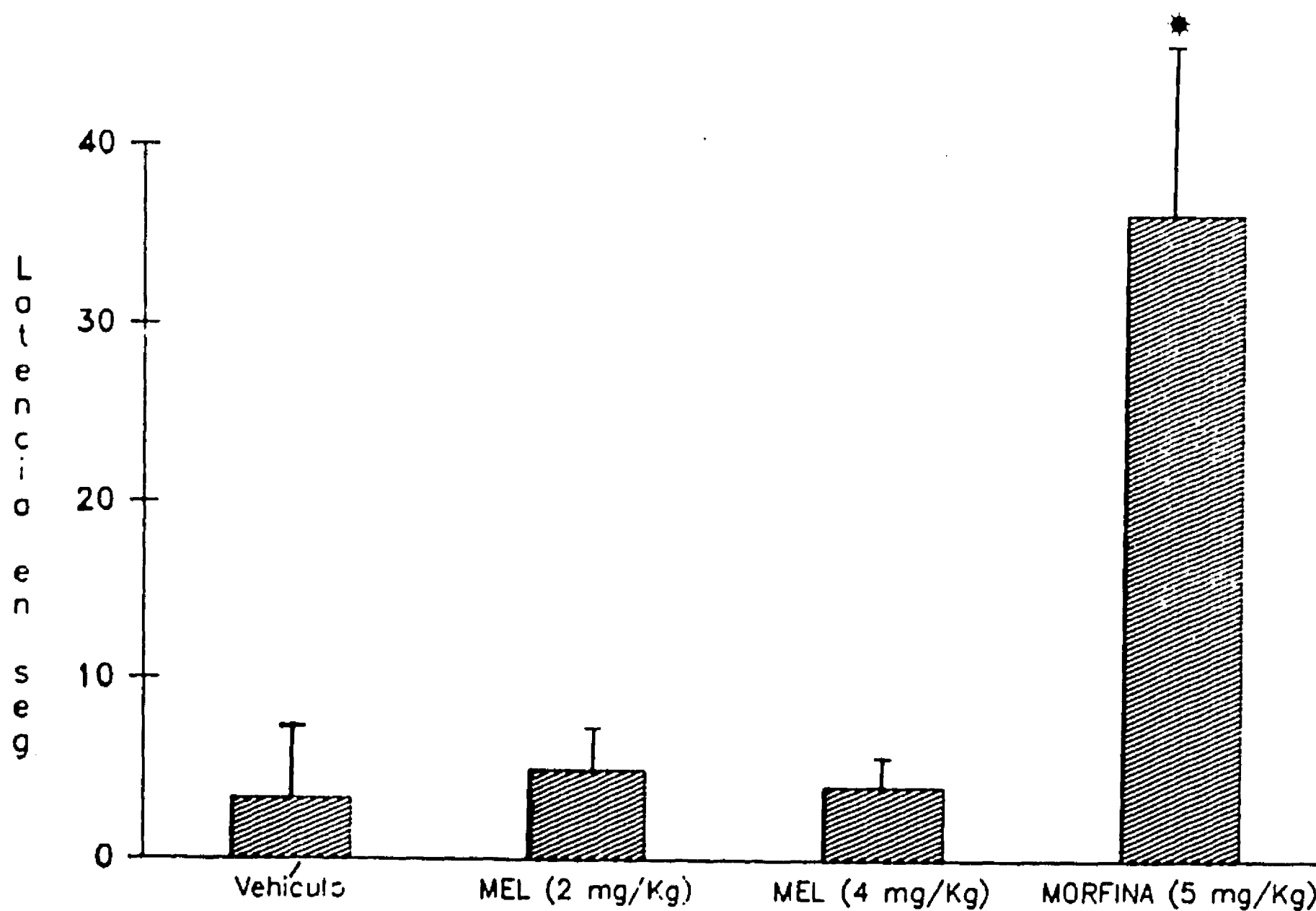


FIG. 10. Histogramas de latencias promedio en segundos que muestran los grupos tratados con MEL, MOR y el grupo control (n=13/grupo).

## 2) INMERSION DE LA COLA DE RATA EN AGUA CALIENTE A 50° C

Retiramiento de la cola ante un estímulo nociceptivo.

Cada rata se colocó en un inmovilizador cilíndrico de plástico con 19 cm de longitud, 5 cm de altura y 5.7 cm de diámetro, del cual solo quedaba fuera la cola de la rata. Antes de iniciar cualquier procedimiento experimental, el animal permaneció por 30 min en el inmovilizador con el objeto de habituarlo, y reducir al máximo el estrés. Posteriormente, se procedió a introducir los últimos 5 cm de la cola de la rata en un vaso de precipitado de 100

ml que contenía agua caliente a  $50^{\circ} \pm 1^{\circ}$  C. Tal procedimiento provoca que la rata retire bruscamente la cola del vaso que contenía el agua. Se determinó la latencia de respuesta, la cual se consideró como el tiempo transcurrido desde la inmersión de la cola en el agua hasta el retiramiento de la misma. Tal parámetro fue registrado, empleando un cronómetro electrónico (modelo grabb-lab 3000) capaz de determinar hasta centésimas de segundo.

En la fase control, antes de administrar cualquier dosis de la sustancia, se realizaron 3 mediciones del tiempo de retiramiento de la cola cada 5 min. Después, invirtiendo el inmovilizador donde se localiza la parte ventral de la rata ésta se inyectó intraperitonealmente con alguna de las dosis de MEL o de la solución control (polietilenglicol al 10 %). La prueba dclorimétrica se realizó entonces 5, 10, 15, 30 y 60 min posterior a la administración del fármaco. Si el animal no retiraba la cola del agua en los primeros 60 seg, la prueba finalizaba.

Para el análisis estadístico de las latencias de respuesta obtenidas en los diferentes grupos se empleó una prueba de análisis de varianza (ANOVA).

En los resultados se observó que en los animales del grupo control (n=10), la introducción de los últimos 5 cm de la cola en agua caliente a  $50^{\circ} \pm 1^{\circ}$ C, provocó una reacción de retiramiento brusco de la cola con una latencia que osciló entre 7 y 13 seg a los 5, 10 y 15 min, preadministración. Estos valores comparados con los obtenidos a los 5, 10, 15, 30 y 60 min postadministración, en los cuales se encontró una latencia promedio que osciló de 14 a 12 seg no mostraron diferencias significativas importantes. De igual forma los datos obtenidos para MEL 2.0 y 4.0 mg/Kg fueron muy similares a

los encontrados con el grupo control. Sin embargo, una vez que se compararon estos datos con la administración de MOR a la dosis de 5.0 mg/Kg, se observó un incremento de la latencia desde los 5 min postadministración, siendo el incremento significativamente importante ( $p < 0.001$ ) al minuto 30 con un promedio de 60.0 seg, FIG. 11.

### INMERSION DE LA COLA EN AGUA CALIENTE

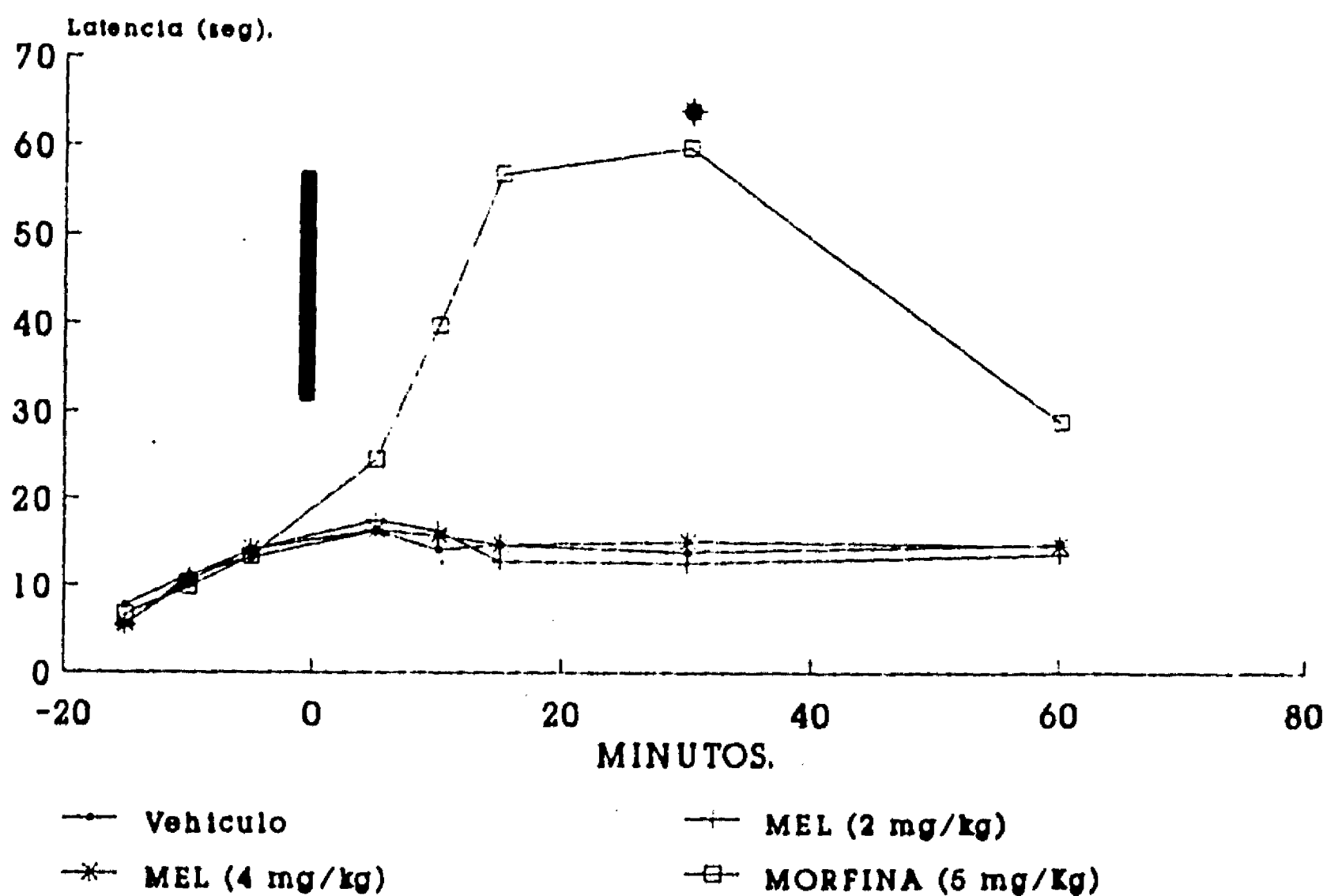


FIG. 11. Grafica que representa el efecto de la MEL (2.0 y 4.0 mg/Kg, n=10) y la MOR (5.0 mg/Kg, n=10), comparadas con el grupo control (n=10). Sobre la latencia de retiramiento de la cola.

#### 1.c) ACTIVIDAD LOCOMOTRIZ

La hiperactividad locomotriz constituye una acción que

puede aumentar el número de choques recibidos por el animal, sin que por ello exista una acción ansiolítica. Por lo tanto resulta indispensable el analizar el efecto de la MEL sobre este parámetro conductual, el cual es también modificado por las benzodiazepinas (26).

Los experimentos se realizaron en 30 ratas macho Wistar (180-230 g), almacenadas en jaulas individuales (cajas de acrílico 40X30X20 cm), con acceso libre a comida (Purina Rat Chow) y agua, con ciclos de luz-obscuridad de 12/12 (9:00-21:00 h) y temperatura controlada (21 °C).

Para registrar la actividad locomotriz se utilizó el Sistema Electrónico de Cuantificación de Actividad Locomotriz (SECAL). El principio de este aparato de registro se basa en colocar al rata en un área limitada por paredes con haces de luz y celdas fotosensibles, de tal manera que las interrupciones de los haces de luz efectuadas por la rata en movimiento, se toman como un índice de la actividad locomotriz del animal. Cabe señalar que este sistema de registro para medir la actividad locomotriz de los ratas es uno de los que menos retroalimentación induce como es el caso del tambor rotatorio o de la tabla estabilimétrica (106).

Este aparato consta de una caja de lámina y un tablero de controles con carátula donde aparecen los contadores. En estas se encuentran los resultados de la sesión en números digitales.

La caja de lámina tiene las siguientes dimensiones exteriores: 82.5 cm de altura, 62.5 cm de ancho y 72.5 cm de fondo. Sus paredes son sismoamortiguadas. Las cajas cuentan con 8 orificios de 1 cm de diámetro a 2.5 cm del piso, distribuidos equidistantemente en la misma. En estos orificios se sitúan 4

fuentes de luz roja y 4 sensores fotoeléctricos, en forma alternada (FIG. 12). A cada sensor fotoeléctrico le corresponde una fuente emisora de luz roja. Los rayos luminosos de la cámara están dispuestos perpendicularmente, cruzándose en 9 puntos diferentes del área de registro. Las cajas están cubiertas con una tapa de triplay con orificios para ventilación. La actividad locomotriz espontánea se cuantificó determinando el número de veces que la rata cruzaba el rayo de luz en periodos de 15 min durante 60 min, FIG. 12.

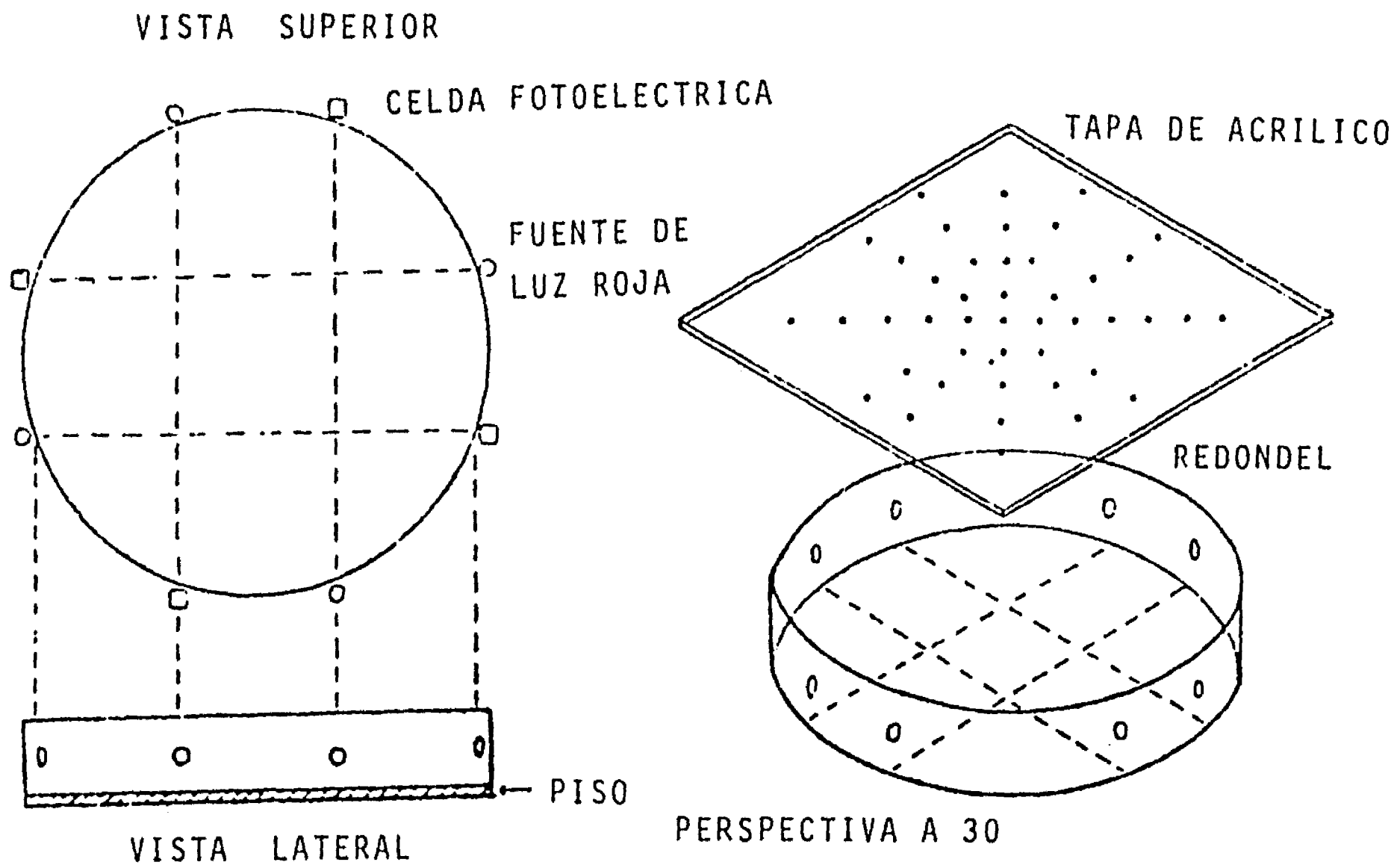


FIG. 12. Esquema de un dispositivo utilizado para medir la actividad espontánea de las ratas. El área total de registro es de 707 cm<sup>2</sup>. La cuadrícula corresponde a la intersección que realizan los haces luminosos.



Cuando una rata cruza un rayo de luz roja, el sensor fotoeléctrico lo detecta y aumenta un número de la cuenta total. Los sensores son independientes entre sí, cuando uno de ellos queda bloqueado, los demás continúan funcionando independientemente de los otros.

Los contadores digitales se encargan de contar el número de veces que ocurren las interrupciones de cualquiera de los 4 haces luminosos percibidos por las celdillas fotoeléctricas.

Mediante la acción de los interruptores del tablero se obtienen los 15 resultados parciales y el número total de cuentas por sesión.

El registro de la actividad locomotriz en todos los experimentos se realizó entre las 10:00 y las 13:00 h. Se utilizaron tres grupos de animales (n=10/por grupo) los cuales correspondían a un grupo control íntegro, control vehículo y al grupo experimental el cual recibió la administración de 2.0 mg/Kg de MEL intraperitonealmente, 15 min antes de iniciar la sesión. Después de que los animales participaban en alguno de los experimentos, éstos fueron sacrificados.

La tendencia común de esta prueba es una gran actividad locomotriz inicial, producto de colocar al animal en un ambiente "nuevo", con una reducción significativa posterior, resultado del proceso de habituación. Los 3 grupos de animales mostraron tal patrón de actividad locomotriz. Sin embargo el grupo tratado con MEL siempre mostró una menor actividad locomotriz que los otros 2 grupos. Tal hallazgo se observa en la FIG. 13. Durante los primeros 15 minutos tanto los animales íntegros como los controles mostraron una actividad cercana a las 1200 cuentas, mientras que el grupo

tratado con MEL mostró aproximadamente 450 cuentas. Esta importante diferencia disminuyó a los 30, 45 y 60 min, básicamente por el descenso de la actividad locomotriz en los animales íntegros y controles.

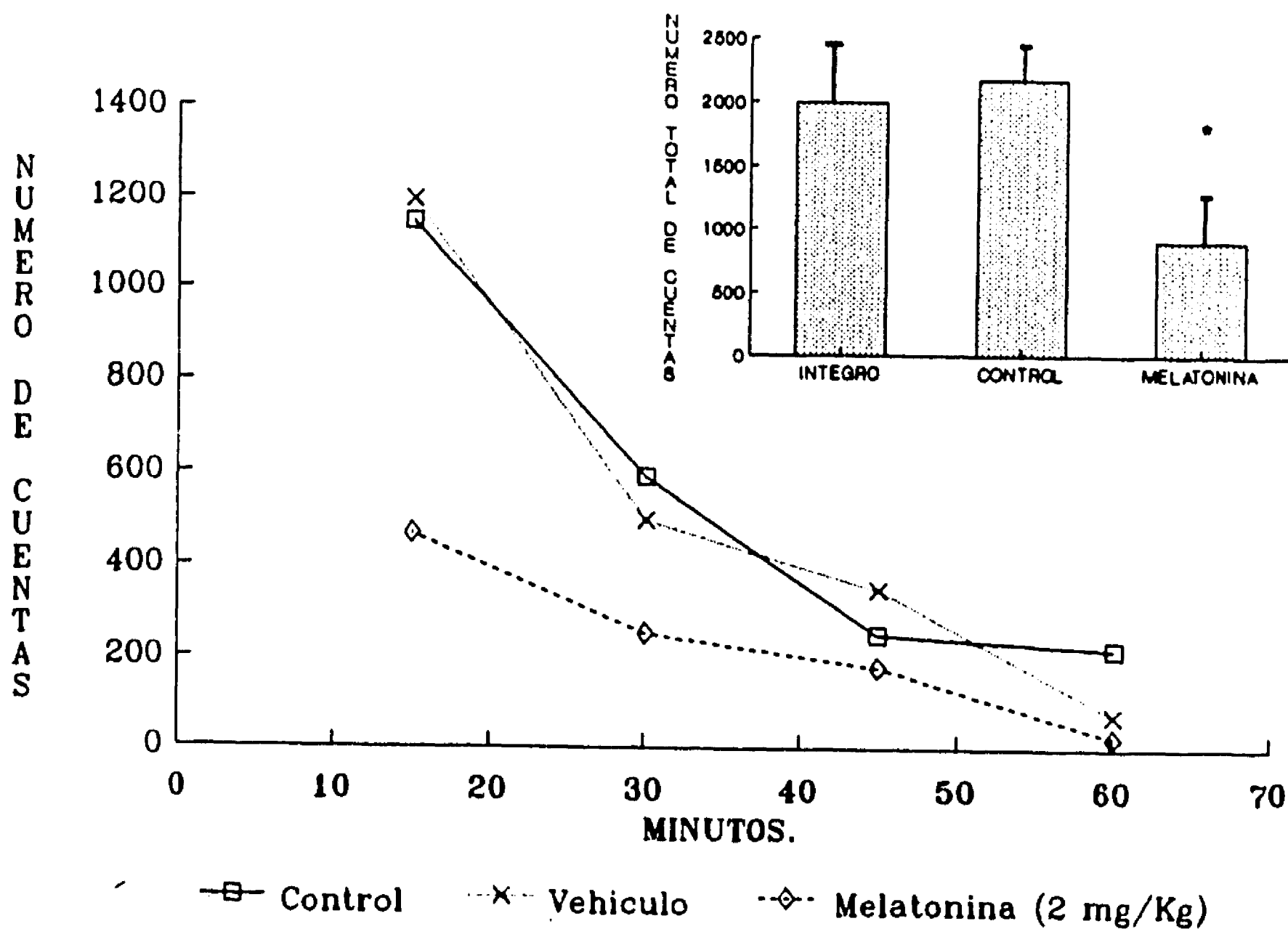


FIG. 13. Se muestra el número de cuentas obtenido a los 15, 30, 45 y 60 min. de los animales íntegros, de aquellos que recibieron vehículo, y de los tratados con MEL (2.0 mg/Kg). El histograma de la parte superior derecha, muestra el número de cuentas acumulado durante los 60 min. el asterisco representa una diferencia estadística ( $p < 0.024$ ) del grupo tratado con MEL, con respecto a los grupos control e íntegro.

En el recuadro de la misma FIG. 13, se observa el histograma del número acumulativo de cuentas en los 60 min, para los

3 grupos. Así, los animales íntegros acumularon 1995 puntos en 60 min, mientras que los animales que recibieron únicamente el vehículo acumularon 2112 puntos y los sujetos tratados con MEL sólo alcanzaron 902 cuentas. Al comparar estos 3 valores por medio de la prueba de "t" de Student encontramos una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.034$ ).

#### 1.d) APRENDIZAJE

Existe también la posibilidad de que la MEL modifique en forma importante procesos de habituación o adquisición de nuevos conocimientos, con lo cual modificaría el aprendizaje. Tal efecto provocaría cambios conductuales que podrán llevar a un incremento en el número de choques recibido, por ejemplo al mejorar la habituación hacia este tipo de estímulo, sin que por ello, esta sustancia provoque efectos ansiolíticos. En un intento de discriminar tal situación diseñamos un experimento de prevención activa para analizar el efecto de la MEL sobre este tipo de respuesta. Tres grupos de ratas ( $n=16$ , cada uno) fueron entrenadas en un procedimiento de prevención activa de dos vías en una caja de doble compartimento. Los compartimentos divididos por una separación de madera muy visible, eran idénticos (30 X 30 X 45 cm), su pared anterior era transparente y el piso estaba formado por barras electrificables de 0.5 cm de diámetro y separadas 0.8 cm entre sí. Estas barras se conectaban a un reostato alimentado por corriente alterna de 60 Hz y 120 Volts. En el techo de ambos compartimentos una fuente luminosa de 100 Watts era activada a través de un interruptor externo.

Los animales se mantenían en cajas individuales, con ciclos

de 12:12 (8:00 a 20:00 h) y comida (Furina Rat Chow) y agua ad libitum. Las sesiones de entrenamiento se realizaban diario de 10 a 14 h. En estas sesiones se introducía el sujeto en alguno de los compartimentos y después de 10 min de habituación se le presentaba al individuo 5 destellos luminosos en el compartimento en el que se encontraban. Si para el quinto destello, el animal no pasaba al otro compartimento entonces pulsos eléctricos de 60 Hz y 1 seg de duración con intensidad necesaria, administrada a través de las barras electrificables se aplicaba hasta que el sujeto pasaba al otro compartimento. Cada dos min se repitió el mismo procedimiento hasta completar 10 asociaciones luz-choques eléctricos por sesión.

Si el animal cruzaba antes o durante el 5o. destello se consideraba un acierto. En cambio al pasar de un compartimento a otro por efecto del choque eléctrico se consideró como un error. En cada sesión se determinaba, el número de aciertos y errores, el número de destello luminoso en el que el sujeto realizaba un acierto, así como el número de pulsos utilizados para obligar al sujeto a pasar de un compartimento a otro. Utilizamos una prueba de ANOVA con repetición en un factor para realizar el análisis estadístico comparativo de estos parámetros. Los 3 diferentes grupos de ratas recibieron la aplicación intraperitoneal del vehículo (polietilenglicol 10 %), CDP (5.0 mg/Kg) o MEL (2.0 mg/Kg) respectivamente 10 min antes de iniciada la sesión experimental.

En las primeras sesiones de entrenamiento, los sujetos mostraron entre 2 y 5 aciertos por sesión (FIG. 14), mientras que para la 4a. y 5a. sesión la tasa de aciertos se incrementó entre 6 y 8 aciertos. Para la sesión no. 8 los sujetos tratados con CDP

alcanzaron el 100 % de respuestas, mientras que para el grupo tratado con MEL, esto ocurrió hasta el día 11 y hasta el 13 para los sujetos controles. Aunque los animales controles siempre mostraron tasas de ejecución menor a la que presentaron los sujetos tratados ya sea con CDP o con MEL (FIG. 14), al aplicar la prueba de ANOVA no apareció ninguna diferencia estadística entre estos datos. De forma similar, al analizar el promedio, del número de destellos o de pulsos eléctricos requeridos para que el sujeto pase de un compartimento a otro no se encontró diferencia significativa estadística alguna utilizando la prueba de ANOVA.

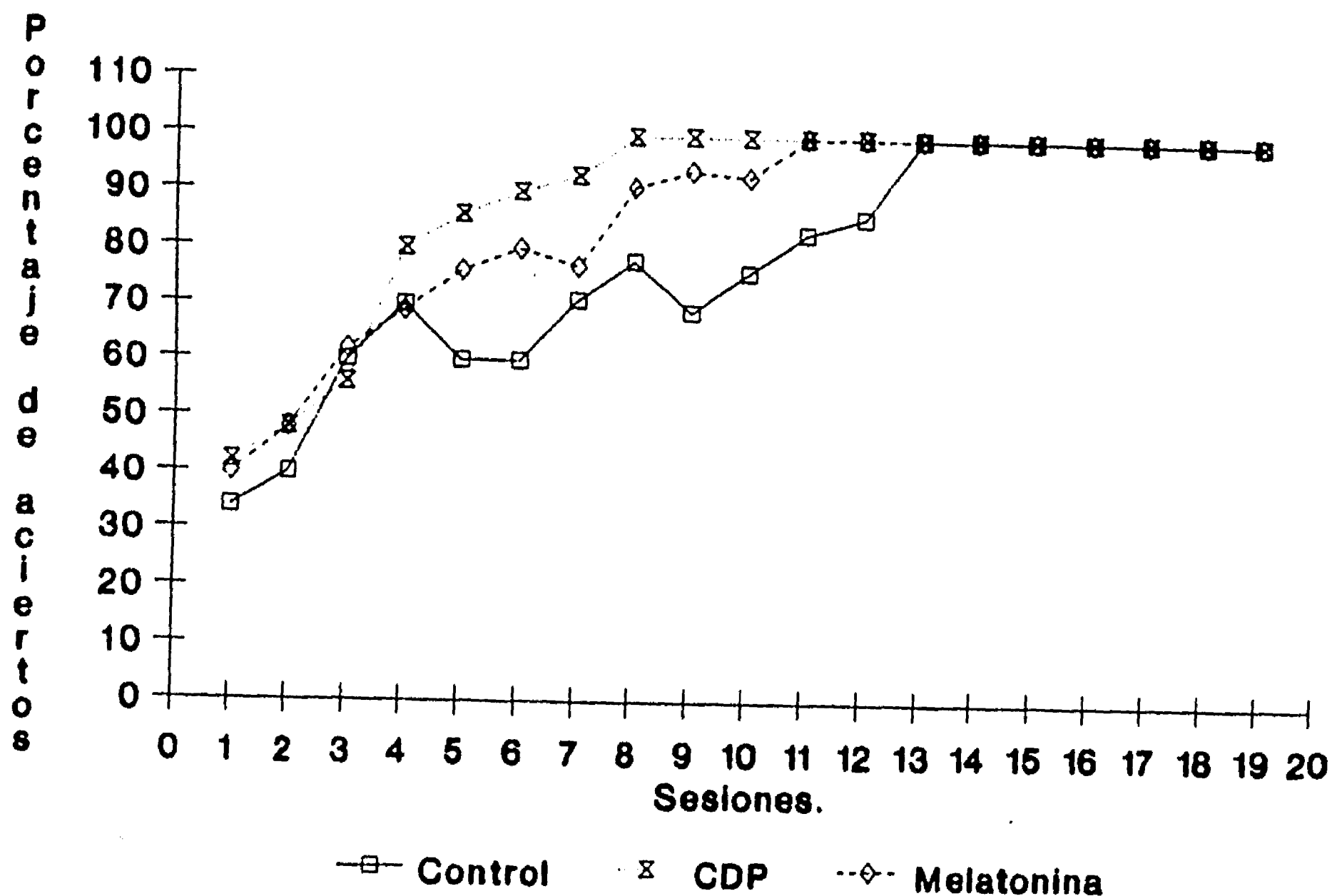


FIG. 14. Se muestran el porcentaje de aciertos que realizaron los sujetos del grupo control y de los grupos tratados con MEL (2.0 mg/Kg), CDP (5.0 mg/kg), no se encontró diferencia estadística

alguna.

#### I.e). INGESTA DE AGUA

Algunos de los fármacos o maniobras experimentales que modifiquen a los sistemas responsables de la ingesta de agua ya sea en algún aspecto motor fisicoquímico o motivacional, provocarían una modificación en el número de lengüetazos o en la cantidad de agua ingerida durante los 3 minutos que dura la sesión experimental, sin que por ello esté de alguna manera involucrado en el mecanismo cerebral de la ansiedad. Por lo tanto, si la MEL ejerce verdaderos efectos ansiolíticos, su acción de incrementar el número de lengüetazos en esta prueba de conflicto no debe de ser consecuencia de una acción sobre la ingesta de agua.

Para determinar una acción de este indol sobre este parámetro, privamos a 4 grupos (n=8/por grupo) de ratas macho, h=32 Wistar (180-220 g) de agua y alimento durante 48 h. Treinta min antes de cumplirse este plazo se aplicó ya sea solución vehículo (polietilenglicol al 10 %) o bien una dosis de 0.5, 1.0 y 2.0 mg/Kg de MEL a los 3 grupos restantes.

Estos animales se introdujeron en la misma caja de acrílico donde se llevó a cabo el experimento de conflicto y se les permitió beber "ad libitum" durante 3 min. En el transcurso de este tiempo, se registraron el número de lengüetazos que realizó el animal y al final de este tiempo se calculó la cantidad de agua que bebieron en este lapso.

Los resultados de este experimento se presentan en la FIG. 15. Los animales control realizaron aproximadamente 520 lengüetazos, mientras que los tratados con MEL oscilaron entre 450 y 550

lengüetazos. La comparación estadística empleando la prueba de t de Student no arrojó diferencia significativa alguna. Durante los 3 min de la prueba, los sujetos controles bebieron en promedio 2.5 ml de agua. También en este caso no encontramos diferencia estadística alguna.

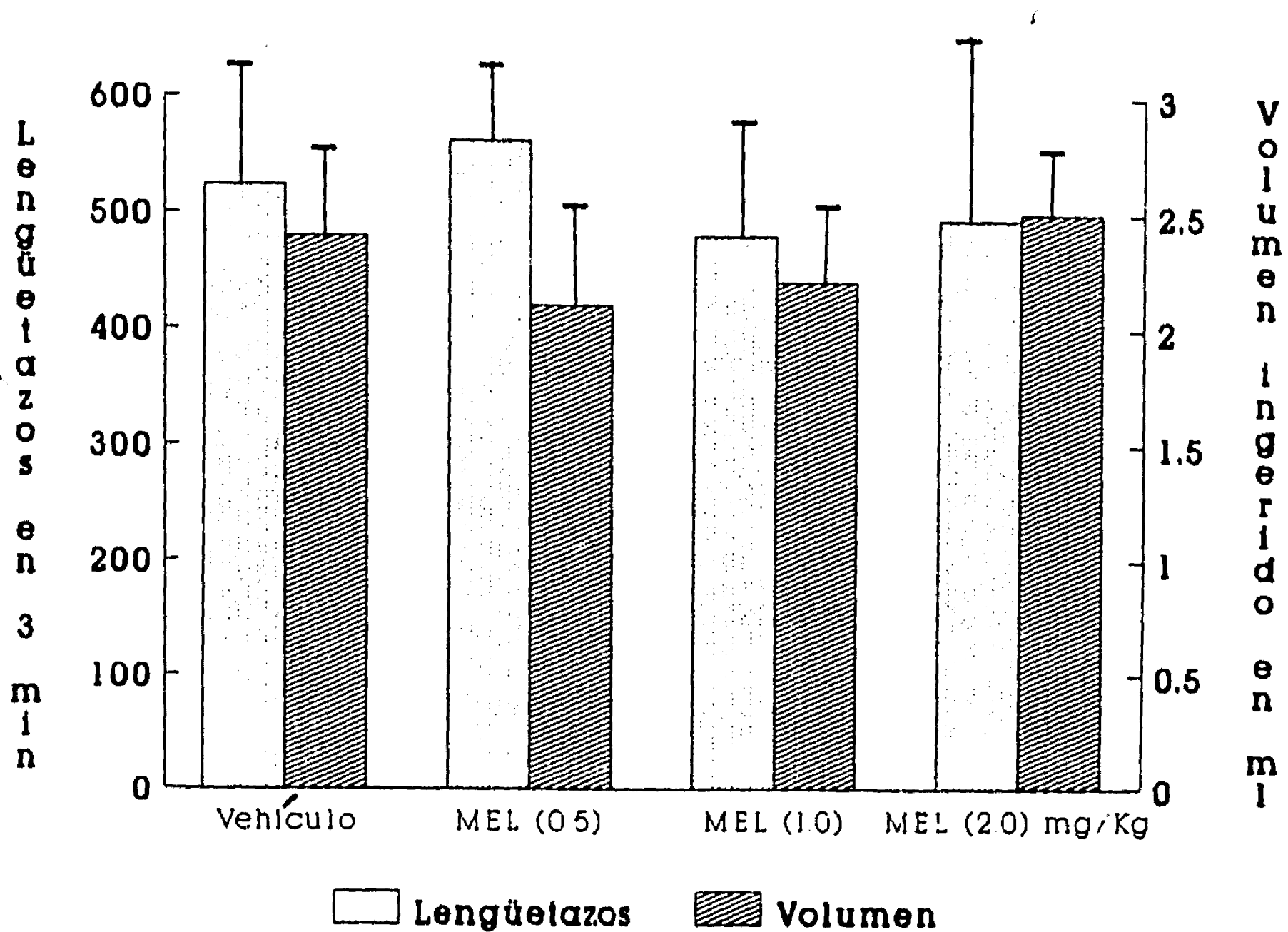


FIG. 15. Histogramas descriptivos del número de lengüetazos que realizaron los animales tratados con MEL o con vehículo, así como el volumen de agua ingerido durante una sesión de 3 min de registro.

### III) EXPERIMENTOS IN VITRO

#### IIIa) Acciones de la MEL y el GABA sobre tejido aislado.

Los experimentos conductuales indican una posible relación funcional entre los sistemas GABAérgicos y la melatonina. Sin embargo, debido a la complejidad de un organismo íntegro, es extremadamente difícil el conjeturar o siquiera postular el mecanismo de acción de tal correlación. Para ello es útil recurrir a sistemas más simples, donde es posible, controlar una gran cantidad de variables en el estudio. Con el objetivo de realizar un análisis farmacológico de estos compuestos en un sistema celular menos complejo, decidimos analizar el efecto de la MEL y del GABA sobre la actividad contráctil del músculo liso visceral.

Los experimentos se realizaron utilizando duodeno aislado de ratas macho de la cepa Wistar, con pesos comprendidos entre 180 a 250 g.

#### a) Selección de la muestra

Estos animales se almacenaron en jaulas individuales de acrílico transparente de 40 X 30 X 20 cm, tuvieron acceso libre a comida (Purina Rat Chow) y agua. Las ratas se colocaron en estas jaulas una semana antes del registro de la actividad contractil del músculo liso. Durante este periodo permanecieron con ciclos de luz-oscuridad de 10/14 (8:00 - 18:00 h) y con temperatura ambiente controlada (20 - 23°C)

Después de un periodo de habituación de una semana, se privó de alimento a la rata durante 18 horas y se sacrificó mediante un golpe en la nuca. Inmediatamente después se realizó una incisión



en el abdomen de aproximadamente 5 cm de longitud, se extrajo el estómago y el duodeno, e identificando la unión estómago-intestino (píloro), se extirparon los 5 cm del intestino más próximo al estómago. El procedimiento de extracción se realizó con sumo cuidado y en un tiempo menor a 2 minutos, con el fin de no dañar al músculo (116).

El duodeno se colocó en una placa Petri que contenía una solución Ringer-Krebs-Bicarbonato con la siguiente composición en mM: 118 de NaCl, 4.7 de KCl, 2.5 de CaCl<sub>2</sub>, 1.2 de MgSO<sub>4</sub>, 1.2 de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 de NaHCO<sub>3</sub> y 11 de glucosa, a un pH 7.4 y una temperatura de 37°C, la solución fue burbujeada con una mezcla de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>. El mesenterio se removió y se cortaron segmentos de intestino de 1 cm de longitud, los cuales se ataron en forma lateral alterna de ambos extremos con hilo de seda (ANACAP Davis-Geck), procurando dejar libre la luz del segmento (116).

Un extremo de la preparación se sujetó al piso de una cámara de vidrio para tejido aislado con capacidad de 10 ml. El otro extremo de la preparación se sujetó a un transductor de fuerza isométrica (Grass FT 03C). Este transductor a su vez está conectado a un preamplificador de corriente directa monofásico (Grass 7P1F) el cual se localizó como parte integral de un polígrafo (Grass FPS 708) donde se registró en papel la contracción intestinal (FOTO 2).

Se analizó el efecto de la Melatonina (MEL) (Sigma, PM 232.7, GABA (PM 103.1 Cal Biochem), sobre la contracción espontánea del duodeno. Para ello la MEL se disolvió en Etanol (Merck) al 10%, mientras que el GABA se disolvió en agua bidestilada, ambos fármacos se preparan inmediatamente antes de su administración. Las

aplicaciones de ambos fármacos se realizaron en volúmenes de 10  $\mu$ l medidas a través de una micropipeta (Pfeiffer); la concentración final del Etanol en el baño fue de 0.06%.

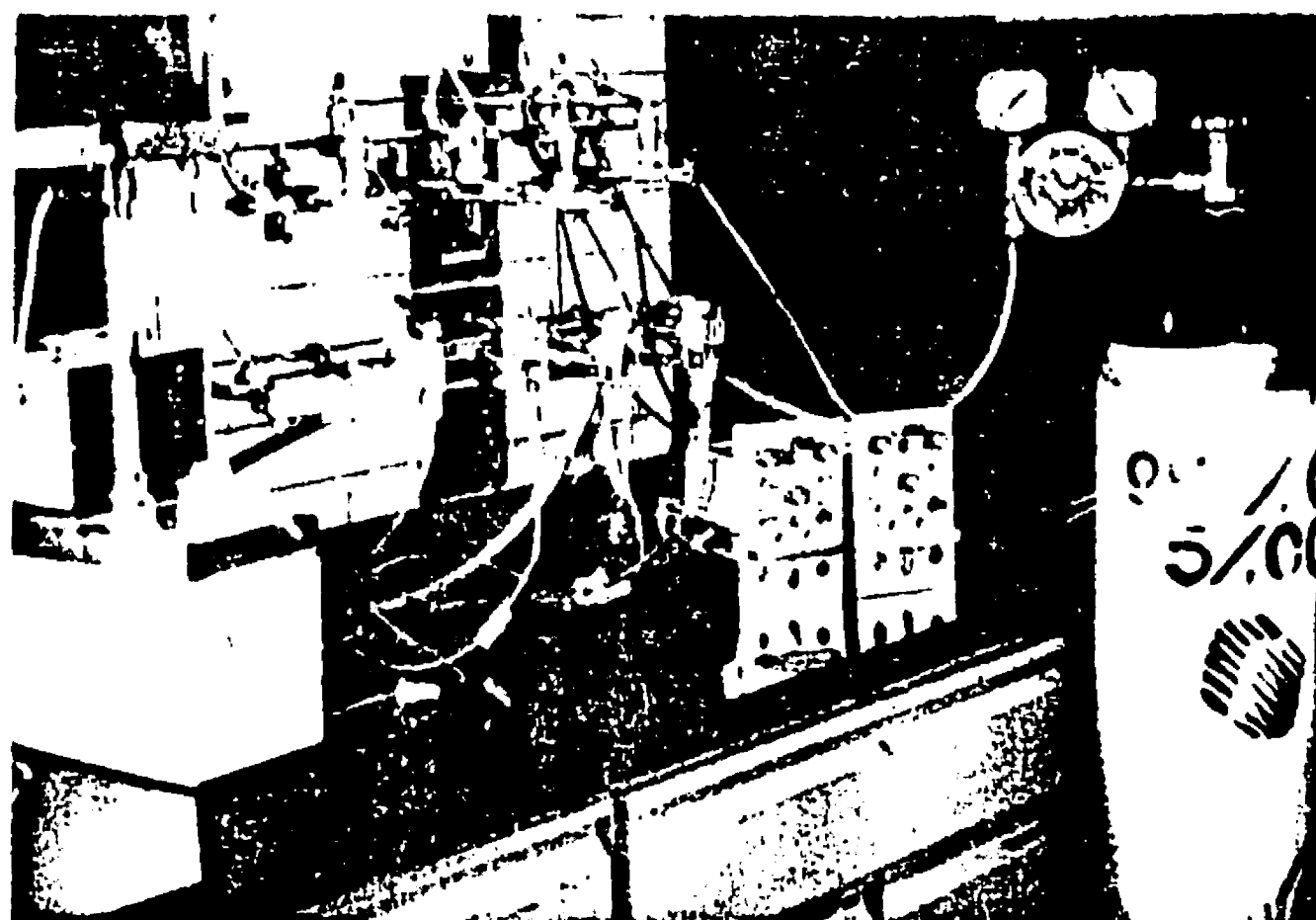


FOTO 2. Fotografía que ilustra el equipo utilizado para la obtención de los registros de la actividad contráctil del músculo liso visceral.

Se tomó un período de equilibrio de 30 min de la actividad espontánea, con velocidad de desplazamiento del papel de 2.5 mm/min.

Cada experimento se realizó bajo el siguiente protocolo:

1.-Se obtuvo un registro control con duración de 10 min pre-administración del fármaco, con velocidad del papel de 50 mm/min, para obtener la respuesta basal del músculo liso intestinal.

2.-Una vez administrado algún fármaco, se registró la respuesta post-administración durante 10 min a esa misma velocidad.

3.- Posterior a ello se efectuó el lavado del tejido tres veces con solución Krebs-Ringer-Bicarbonato a 37°C y se permitió un nuevo equilibrio del tejido durante 15 minutos, antes de registrar la siguiente respuesta basal.

Este procedimiento se repitió sucesivamente para cada una de las dosis de MEL y GABA utilizadas.

Al inicio y al final de cada experimento se realizó un registro control pre y post-administración de 10 µl de etanol al 10% en el baño, esto con la finalidad de caracterizar algún posible efecto del etanol sobre la actividad que se registró.

Las dosis de MEL que se aplicaron fueron de 21, 43, 86, 172, 344 y 688 nM/ml y su administración se realizó a partir de la menor a la mayor dosis. Mientras que las dosis de GABA fueron de 25, 50 y 75 nM/ml.

Los efectos de alguno de los fármacos sobre la actividad espontánea del duodeno de rata se cuantificaron midiendo el área bajo la curva de los registros pre y post-administración de cada una de las dosis, utilizando un planímetro digital (Tamaya). Se calculó el porcentaje de efecto con respecto a la actividad control y se obtuvo un número estadístico manejable de datos (n=16). Con el fin de obtener porcentajes promedio para cada dosis, con los respectivos errores y desviaciones estandar, los datos promedio se utilizaron para obtener una curva dosis-respuesta transformando los valores a una escala semilogarítmica para determinar la dosis efectiva media (DE<sub>50</sub>) respectiva.

Se obtuvieron 18 registros de la actividad espontánea de músculo liso visceral en los cuales se analizó el efecto de la MEL,

y del GABA.

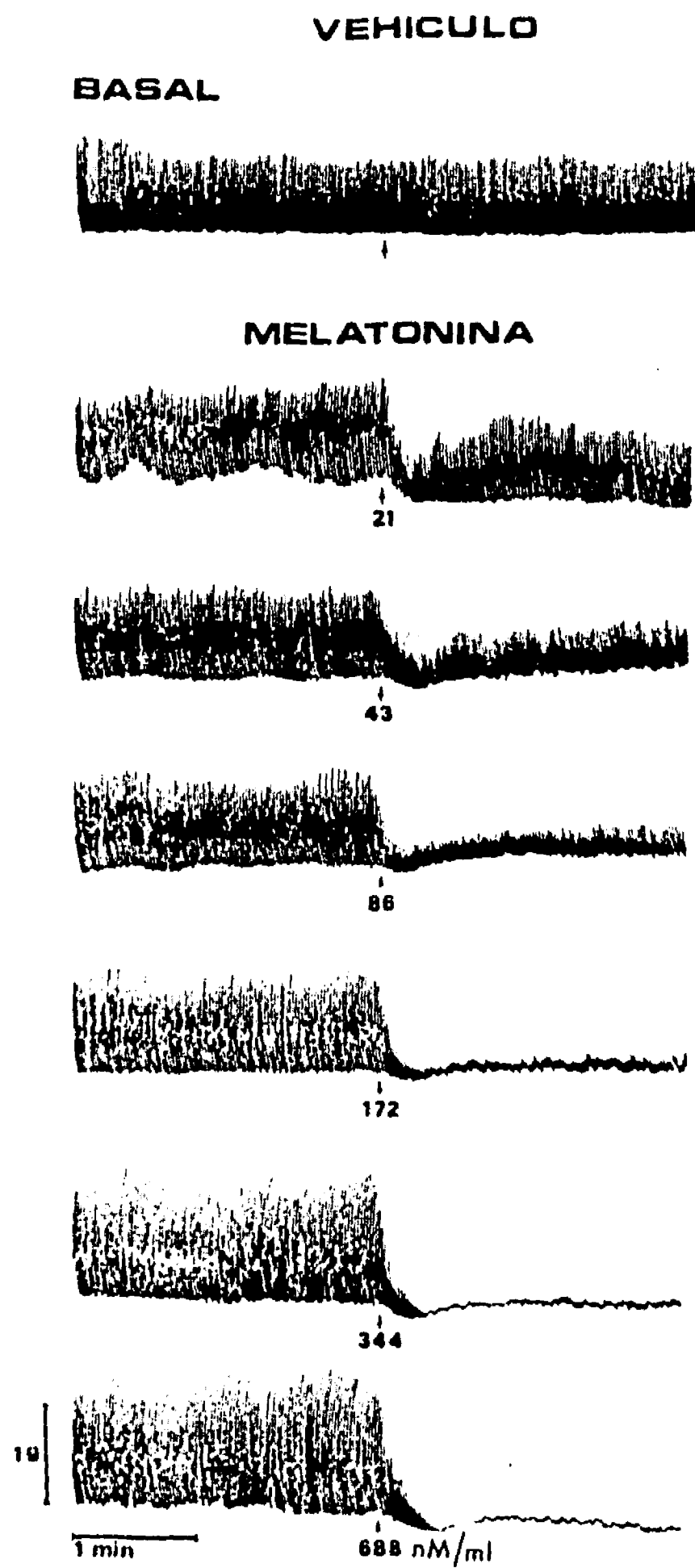


FIG. 16. Respuestas obtenidas sobre la actividad espontanea de segmentos de duodeno de rata in vitro, por aplicación directa de melatonina

La actividad del músculo liso visceral se caracteriza por ser rítmica y, una vez alcanzado el equilibrio, bastante estable (FIG. 16). La actividad contráctil espontánea, aunque generada por marcadores del paso intrínsecos es modulada por factores tanto nerviosos como hormonales. Cuando la contracción de este músculo es provocada por estímulos eléctricos, entonces la contracción tiene una connotación particularmente neurogénica.

Se mostró que la aplicación de diferentes dosis nanomolares por mililitro (nM/ml) de MEL provocaron una disminución tanto en la amplitud como en la frecuencia de la actividad contráctil muscular lisa; así como una disminución en el tono de la misma. Este efecto depresor de la contractilidad se presentó entre 1 y 2 seg después de aplicar el indol sin que se mostrara recuperación alguna en los diez min posteriores a la administración de la sustancia (FIG. 16). Esta actividad se comparó con la respuesta basal obtenida durante diez minutos antes de aplicar a la MEL. Cabe mencionar que durante el registro basal, la actividad espontánea presentó las oscilaciones características de esta actividad.

La disminución de la contracción de la actividad espontánea provocada por la MEL en el músculo liso de la rata fue gradual y dependiente de la dosis (a mayor dosis, mayor disminución de la contracción) (FIG. 17). Así, la dosis de 21 nM/ml provocó una disminución de la contracción de  $14.35 \pm 1.6 \%$ ; mientras que la dosis de 43 nM/ml provocó una disminución de la contracción de  $47.06 \pm 3.3 \%$ ; para la dosis de 86 nM/ml fue de  $58.18 \pm 2.7 \%$ ; mientras que para la de 172  $\mu$ M fue de  $69.08 \pm 3.5 \%$ ; la dosis de 344 nM/ml provocó una disminución de  $81.5 \pm 3.3 \%$  y finalmente con la dosis de

688 nM/ml se encontró una disminución de la contracción de  $91.7 \pm 0.45 \%$ , TABLA II.

TABLA II  
EFFECTO DE LA MELATONINA SOBRE  
LA ACTIVIDAD ESPONTANEA DEL DUODENO DE RATA

FARMACO	DOSIS		% DE INHIBICION			n
	µg/ml	nM/ml	$\bar{X}$	±	E.S.	
MELATONINA	5	21	14.35	±	1.60	8
	10	43	47.06	±	3.30	8
	20	86	58.18	±	2.70	8
	40	172	69.08	±	3.50	8
	80	344	81.50	±	3.30	8
	160	688	91.70	±	0.45	8

$\bar{X}$  = Promedio

E.S. = Error Stándar

El efecto de disminución de la contracción se logró revertir fácilmente si después de adicionar la MEL se procedía a lavar el tejido tres veces con solución Ringer-Krebs-Bicarbonato.

Por otro lado, la administración de la solución vehículo no produjo efecto alguno en la amplitud, ni en la frecuencia ni en el tono de la actividad espontánea del músculo liso intestinal de la rata.

La curva dosis-respuesta correspondiente mostró que la Dosis Efectiva 50 de MEL en duodeno de rata in vitro ( $DE_{50}$ ) es de 79 nM/ml (18.4 µg/ml) (FIG. 17).

Por su parte la aplicación, de GABA en esta preparación, mostró una reducción importante de la actividad contráctil de este músculo. En este caso, una dosis de 25 nM provoca un decremento del  $23.4 \pm 0.8 \%$  de la actividad contráctil mientras que una dosis de 7% nM indica una reducción del  $95.4 \%$  (FIG: 18). Este efecto depresor fue muy constante se inició de 5 a 10 seg de aplicado al

fármaco y se mantenía constante hasta lavar el tejido. En varias preparaciones cuando el tejido se encontraba bajo la influencia de la MEL o del GABA se procedió a añadir bicuculina 500 nM, 2µM para intentar bloquear los efectos provocados por la MEL. o por el GABA. Sin embargo, la bicuculina fue incapaz de bloquear alguno de estos efectos.

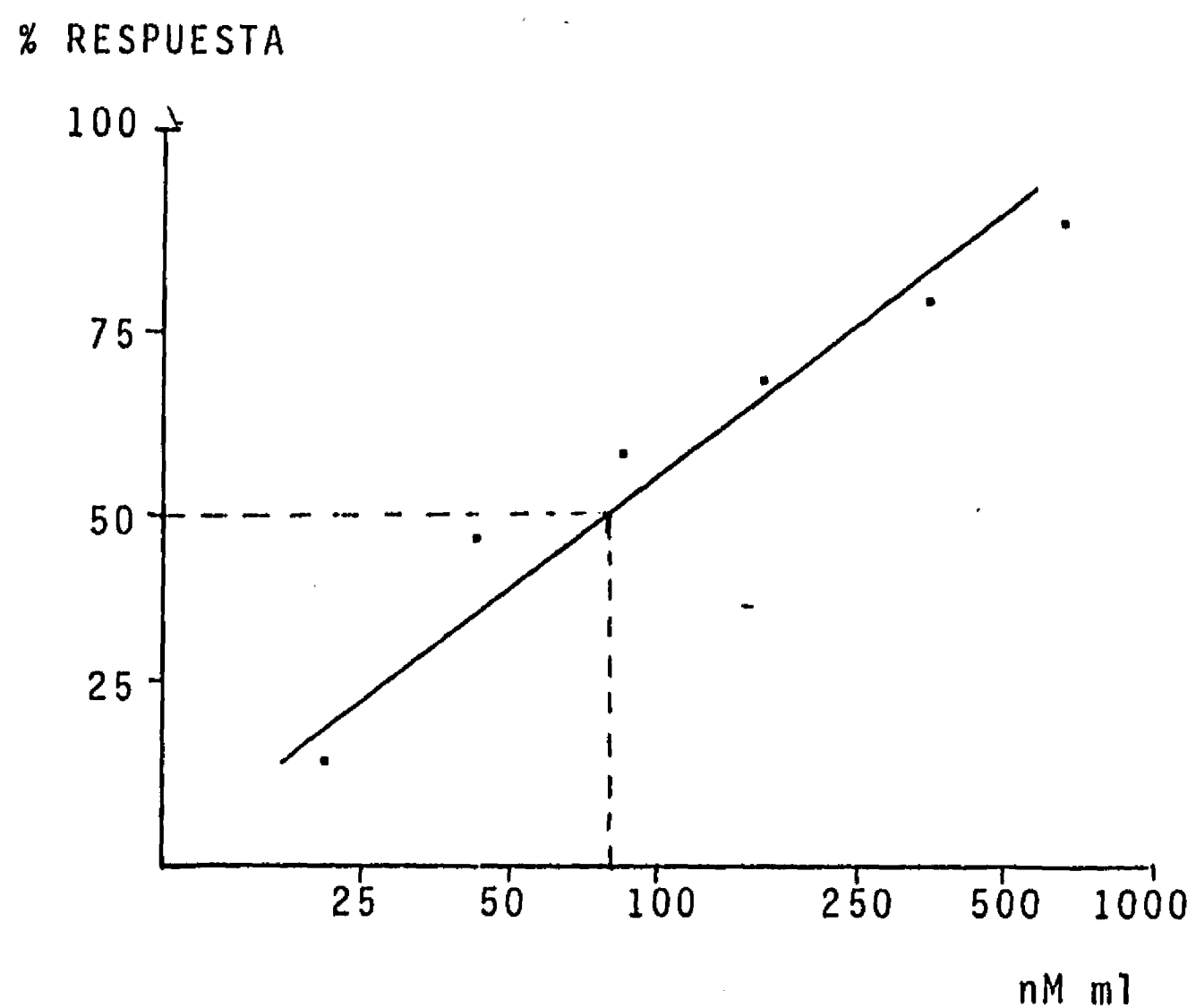


FIG. 17. Curva Dosis-Respuesta de Melatonina (MEL),  $r = 0.96$  sobre la actividad espontánea del duodeno de Rata in vitro. (Ordenada = Porcentaje de inhibición; Abscisa = Escala log de la concentración nM/ml.

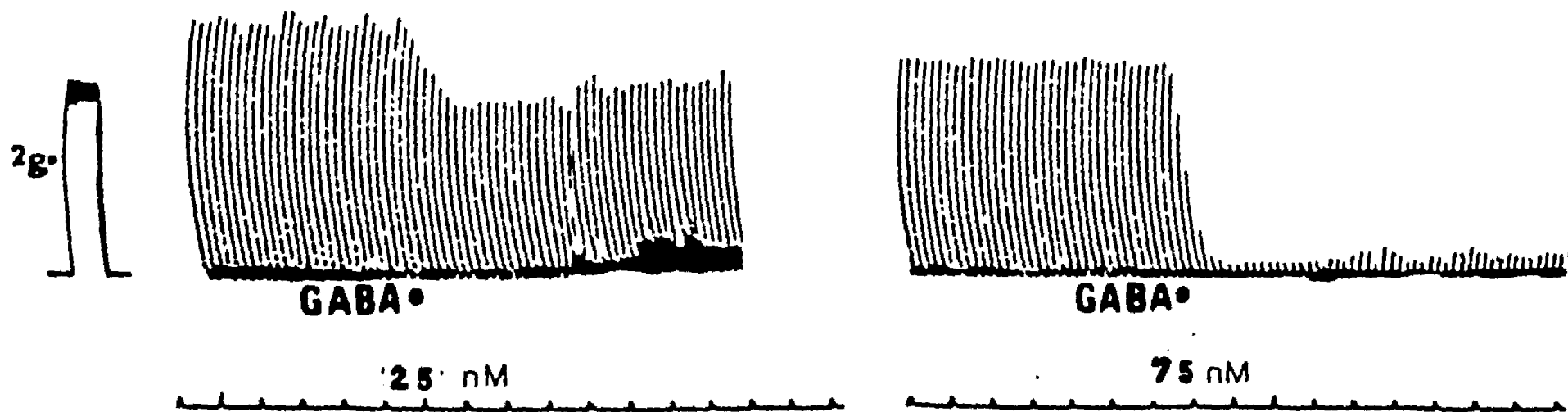


FIG. 18. La adición de GABA al baño de tejidos, siempre provocó una reducción de la actividad contractil muscular. Tal efecto fue dependiente de la dosis y se observaba todo el tiempo que permanecía el fármaco en el baño. La escala inferior corresponde a intervalos de 1 min. Los números indica la dosis añadida en nM.



### III. EXPERIMENTOS IN SITU.

#### IIIa) Microiontoforesis-Micropresion

Una de las formas para caracterizar la relación de efectos dentro del sistema nervioso central es la electrofisiología, es decir el análisis de la actividad eléctrica del sistema nervioso central provocada por ciertas sustancias. Las neuronas sólo tienen dos formas de responder eléctricamente a los efectos de determinado fármaco, por incremento o decremento de la frecuencia de descarga (llámese potenciales de acción) celular. Cuando se realiza un registro de actividad unitaria se registra la actividad eléctrica de una neurona exclusivamente y si a esto se le agrega la aplicación local (microiontoforesis) el resultado es una excelente manera de analizar en forma directa el efecto de uno o varios fármacos.

Entonces, continuando con el objetivo de caracterizar en forma más directa tanto el mecanismo de acción de la MEL como su interacción con el GABA, decidimos ampliar el enfoque experimental y realizar registros de una sola célula. De esta manera se determinarían las modificaciones electrofisiológicas celulares después de la aplicación local de mel, GABA o sus antagonistas por microiontoforesis o micropresión.

Mediante la técnica de microiontoforesis o micropresión es posible liberar cantidades extremadamente pequeñas de sustancias ionizadas en la vecindad inmediata de la célula en la que se está efectuando el registro. Para ello se elabora un ensamble de micropipetas, las cuales unidas entre sí y con la ayuda de calor y fuerza se estiran hasta lograr una punta común de entre 6 y 12  $\mu\text{m}$ . Las diferentes micropipetas se llenan con soluciones de altas

concentraciones de los diversos fármacos que se aplicarán. Debido a las características de los ensambles de micropipetas, ni la osmolaridad o el pH obtenido de las soluciones contenidas en la micropipeta, ni el flujo del líquido que se establece entre la micropipeta y el líquido extracelular, modifican las propiedades neuronales en forma significativa.

Los ensambles de micropipetas se introducen en la porción del sistema nervioso central (SNC) que se desea registrar. Cada una de las diferentes micropipetas es conectada a una fuente de voltaje directo o a una bomba de presión positiva en el caso de la micropresión, la cual al generar corrientes de signo igual o contrario al fármaco, puede expulsarlo o retenerlo dentro de la micropipeta. La cantidad expulsada del fármaco, dependerá básicamente de 3 factores; a) de la resistencia de la punta de la micropipeta, b) de la intensidad y duración de la corriente generada y c) de las propiedades fisicoquímicas del fármaco. De estas propiedades, las más importantes son la carga eléctrica, el pH de la solución, el pK y el punto isoeléctrico.

En estos experimentos utilizamos ratas macho (n=16) de la cepa Wistar (180-230 g), las cuales se anestesiaron con uretano (1.25 g/Kg). Los animales se fijaron en un aparato estereotáxico, y después de una craneotomía se descendía el ensamble de micropipetas hasta el sitio elegido (FOTO 3). Las micropipetas se llenaron con las siguientes soluciones: GABA, MEL, BIC (antagonista GABAérgico, Sigma), vehículo (propilenglicol y solución salina). Finalmente un microelectrodo de registro (1-2  $\mu$ m en la punta, 15-28 M $\Omega$ , resistencia Ohmica) llena con azul rápido y NaCl 4M se fijaba con

epoxy a un costado del ensamble de micropipetas. Este electrodo se colocaba de tal manera que su punta rebasaba en 8 a 15  $\mu\text{m}$  a la punta de las otras micropipetas. De esta manera se aseguraba un registro óptimo con electrodo de alta impedancia y una expulsión de fármacos adecuada, empleando pipetas de baja resistencia, la cual oscilaba entre 2 y 5  $\text{M}\Omega$ .

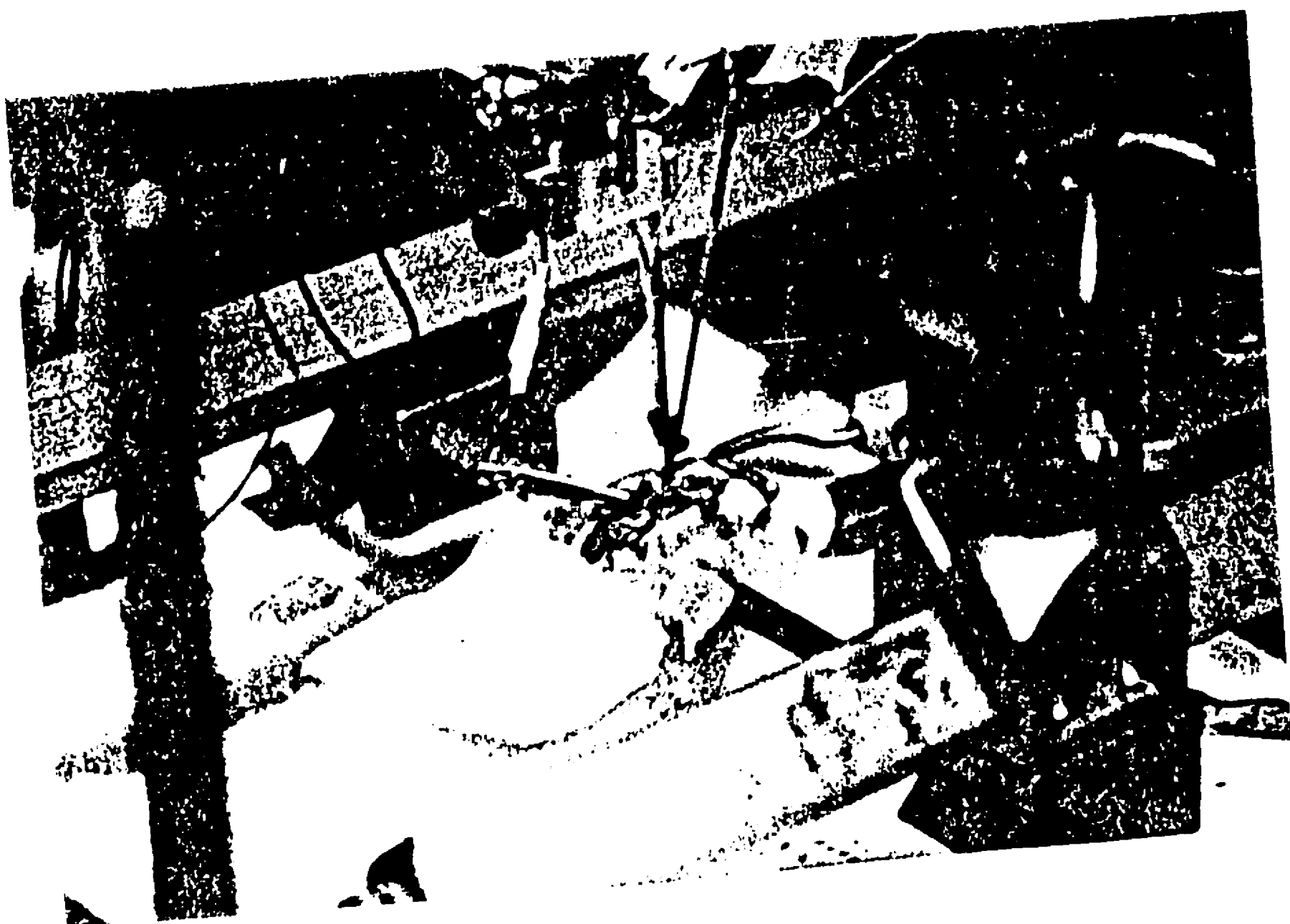


FOTO. 3. Los experimentos se realizaron en animales anestesiados colocados en un estereotáxico. El tiempo de registro fué de 3 a 4 horas. Se procuró que durante este tiempo se mantuviera al sujeto en las mejores condiciones posibles.

En estas circunstancias se realizó la expulsión microiontoforética de las sustancias, por corrientes catódicas que oscilaban entre 20 y 150 nA.

El ensamble de micropipetas se introdujo en el hipotálamo anterior, estructura localizada con el atlas estereotáxico de König y Klippel (59), un macroelectrodo de referencia se colocó en la corteza cerebral y el electrodo de tierra se fijó al cráneo. El ensamble de micropipetas se sostenía con un micromanipulador. El electrodo de registro se conectó a una sonda de alta impedancia asociadas a preamplificadores Grass 7F511J (con filtros de baja frecuencias en 10 Hz y de altas frecuencias colocado en 1KHz). La actividad eléctrica se visualizó en un osciloscopio y una computadora conectada en línea, se encargó de realizar el análisis de los datos.

Las sesiones de registro se realizaron siempre por la mañana, aproximadamente a las 10:00 AM. La actividad eléctrica cerebral se registró de 30 a 60 min por unidad. Frecuentemente se registraron de 1 a 2 unidades por rata. Después de introducir la punta del ensamble de micropipetas en el hipotálamo anterior, se movía en etapas de un minuto tratando de localizar células con actividad espontánea. Al encontrar una de estas células, se permitía un periodo de estabilización de 15 a 20 min antes de iniciar el registro basal, el cual duraba de 5 a 10 min. Los fármacos se aplicaban por pulsos de corriente o de presión con duración de 15 a 60 seg. En ocasiones se aplicaron 2 o hasta 3 fármacos en forma simultánea.

Una vez finalizado el registro, los animales recibían una

sobredosis de uretano. Una corriente anódica de 5 nA fue aplicada durante 8-10 seg a través del electrodo, para provocar posteriormente una mancha verde con el paso de la corriente. Los animales se perfundieron con una solución de formaldehído al 10 %. Los cerebros fueron extraídos y posteriormente cortados en un microtomo de congelación en cortes de 80  $\mu$ m. Después, se verificó en estos cortes histológicos la localización de los sitios de registro.

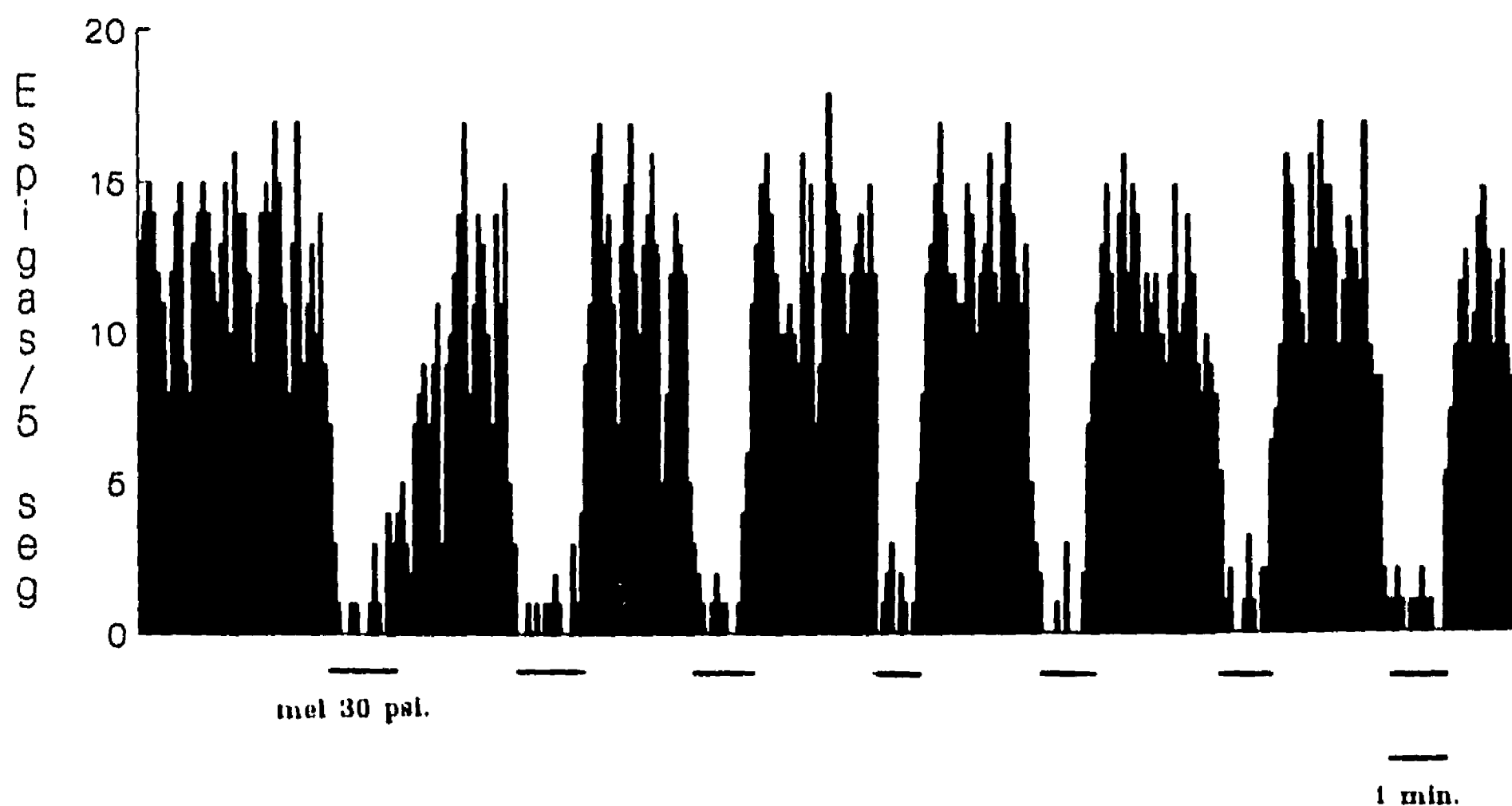


FIG. 19. Histograma de frecuencias que representa el número de espigas cada/3 seg, obtenido en una unidad registrada en el hipotálamo anterior. Se observa que la aplicación por micropresión de MEL produjo un decremento en la frecuencia de descarga. La línea horizontal representa el tiempo de expulsión.

Se registraron 28 células hipotalámicas, se consideró como significativa cualquier modificación igual o mayor al 40 % de la frecuencia de descarga espontánea.

La MEL produjo, en la mayoría de las células del hipotálamo anterior probadas (18/28) un decremento de la frecuencia de descarga. Estas acciones de la MEL logradas con una presión de 30 psi mostraron una latencia entre 1 y 2 seg. La duración de tal efecto dependió de la dosis empleada (FIG. 19) y la duración del pulso de eyección.

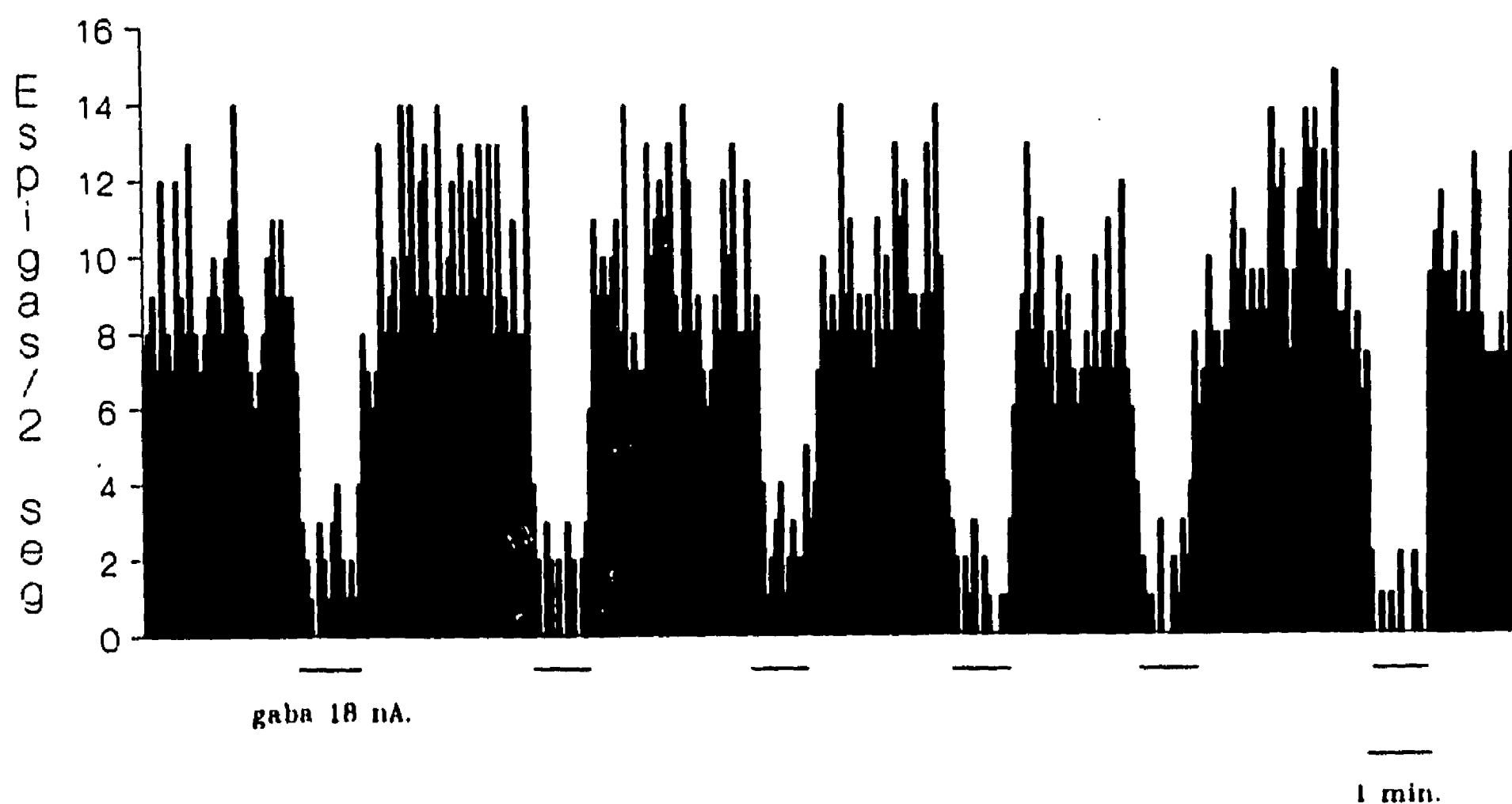


FIG. 20. Aplicación por micropresión de GABA (18 nA), también provoca un decremento en la frecuencia de descarga.

Por su parte, la aplicación microiontoforética del GABA mostró una acción similar a la de MEL cuando se administró entre 12 y 25 nA a estas mismas células. El número de células afectadas fue mayor (26/28), y se mostró una latencia de 1 seg de duración. Estos datos muestran que el hipotálamo anterior posee gran sensibilidad tanto a la MEL como al GABA (FIG. 20).

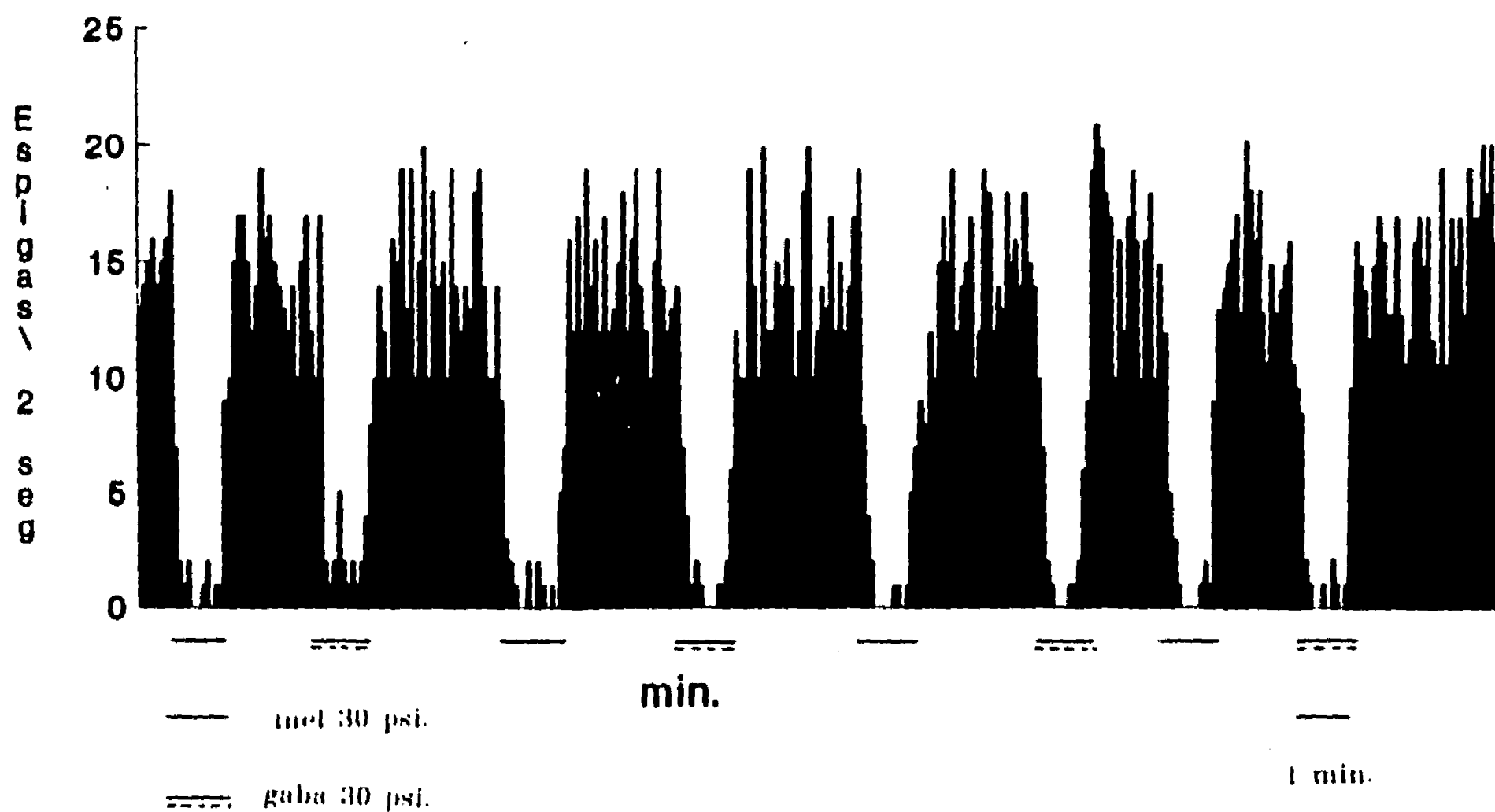


FIG. 21. Representación gráfica del análisis realizado por la computadora los efectos provocados por la aplicación de MEL y GABA sobre la misma unidad hipotalámica. Ambos fármacos provocan un efecto depresor similar.

El análisis computarizado de los datos mostró que la actividad eléctrica durante el periodo control fue de

aproximadamente 7.4 Hz (n=28), mientras que con 30 psi de MEL descendía hasta 1.2 Hz y con GABA a 0.4 Hz (FIG. 21). El efecto de ambos fármacos es muy constante y repetitivo y únicamente afectó la frecuencia de descarga, ya que ni la morfología ni la duración del potencial de acción modificados por acción de ambos fármacos.

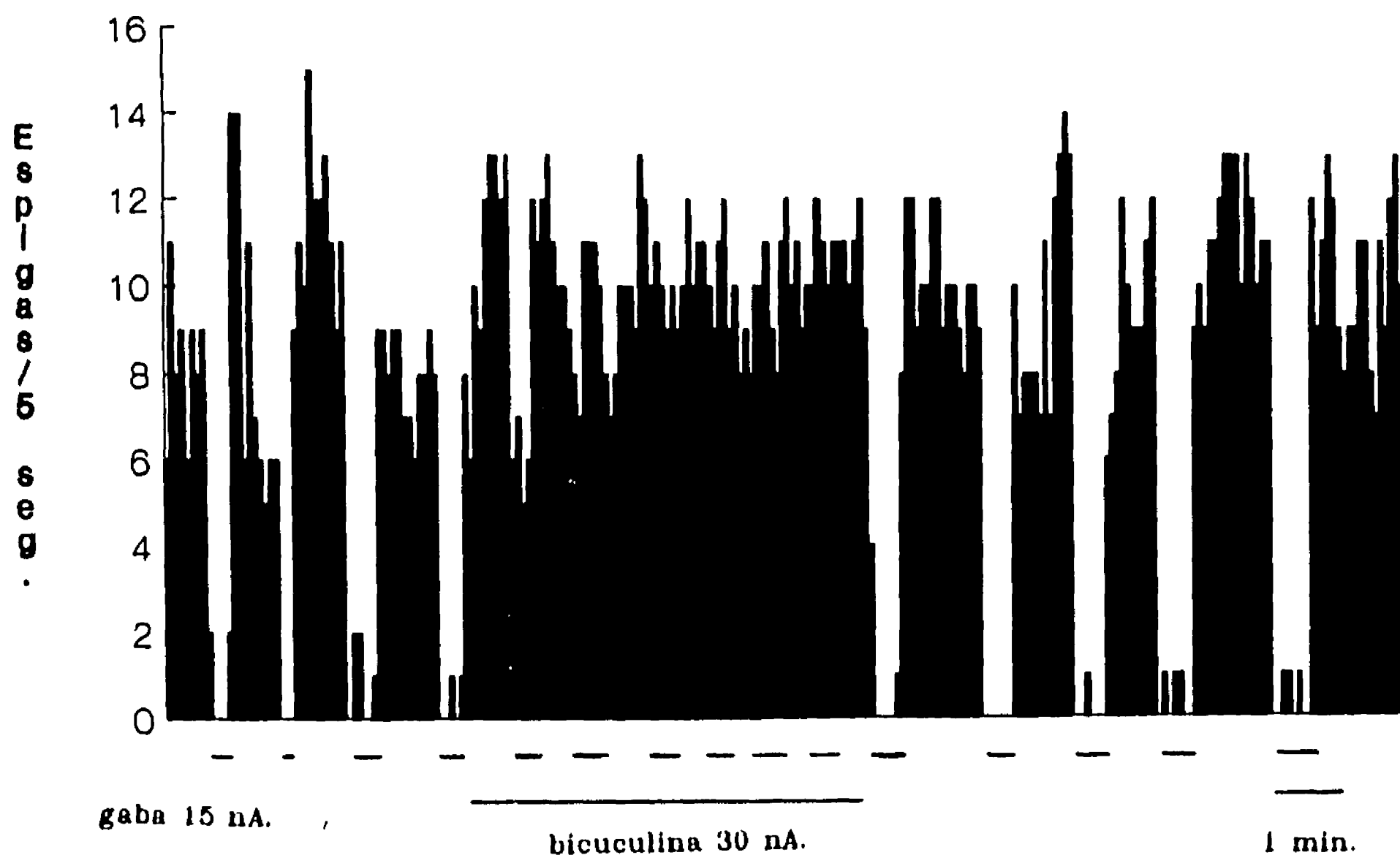


FIG. 22. La aplicación por microinyección de GABA 15 nA produjo una disminución importante de la frecuencia de descarga. Tal efecto fue bloqueado en presencia de bicuculina (30 nA). Sugiriendo una acción a través de receptores específicos, representan el tiempo durante el cual se aplicó la corriente de expulsión.

Todas las células nerviosas que respondieron a la aplicación tópica de MEL, también respondieron a la administración



de GABA, lo que indica que estas neuronas del hipotálamo anterior son sensibles a ambos tipos de fármacos. Tal aseveración se manifestó en forma más significativa cuando realizamos la aplicación alterna de ambos tipos de sustancias. La FIG. 21, muestra que la aplicación, ya sea de MEL o GABA por micropresión provoca una reducción de la frecuencia de descarga. Tal reducción es muy similar a la encontrada cuando solo se aplicó alguno de los fármacos. Es decir, la intensidad, latencia y duración del efecto provocado por alguno de los fármacos no es modificado por el otro.

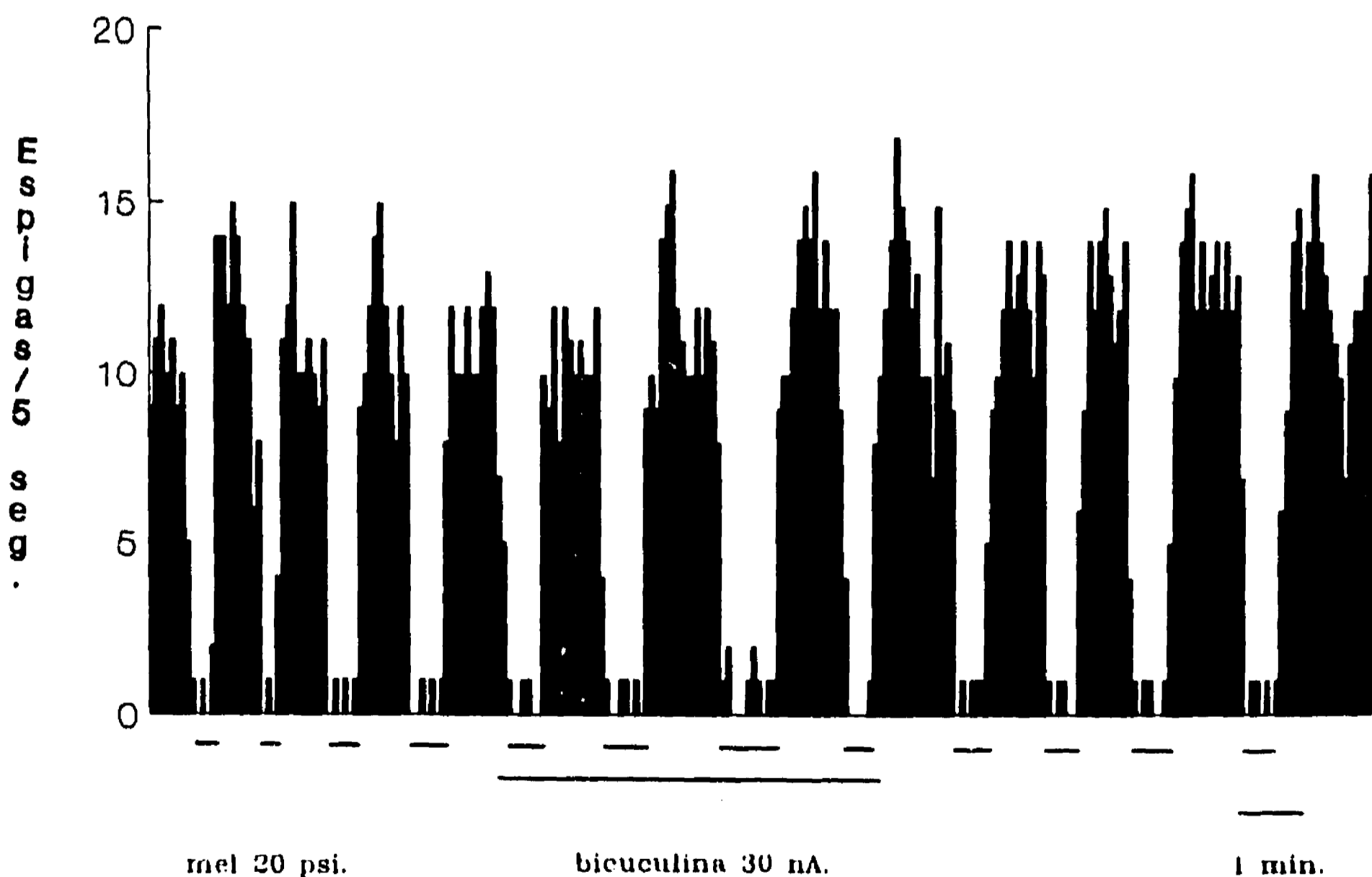


FIG. 21. Una muestra del tipo de comportamiento experimental se observó que la bicuculina no modifica en forma alguna los efectos provocados por este indol.

Los efectos provocados por el GABA en neuronas del SNC, se deben a una asociación de esta sustancia con receptores específicos, los cuales, una vez activados, modifican la conductancia de iones como el  $Cl^-$ . Por esta razón las acciones GABAérgicas pueden ser prevenidas o bloqueadas por antagonistas GABAérgicos del tipo de la bicuculina. Así, cuando una acción de algún fármaco GABAérgico es bloqueado o prevenido por un antagonista GABAérgico se sugiere que los efectos del primer fármaco sean debidos a una interacción con receptores específicos. En nuestro trabajo la FIG. 22, muestra el efecto de aplicar bicuculina conjuntamente con la aplicación de GABA. En este experimento varios pulsos de GABA de 20 seg y 15 nA, fueron administrados antes, durante y después de un pulso de 30 nA y 5 min de BIC, la figura muestra que la aplicación de este antagonista GABAérgico bloquea la acción GABAérgica. Cuando este mismo procedimiento fué realizado durante la aplicación de MEL (FIG. 23), se observó que la bicuculina no modificó en forma alguna la respuesta de estas neuronas a la MEL. Tal hallazgo sugiere que la MEL no interactúa en forma directa en el sitio de unión GABAérgico.

### III b) Experimentos en rebanadas de cerebro de cobayo.

Dentro del SNC otras estructuras han sido relacionadas en forma directa e indirecta con las hormonas indólicas de la glándula pineal. Una de ellas es el hipocampo donde es posible que la MEL ejerza efectos anticonvulsivos. Empleando técnicas inmunohistoquímicas se localizó MEL en esta región cerebral (13), además de que la actividad epileptiforme electrofisiológica del hipocampo se modifica en forma importante por la pinealectomía (11). El modelo de rebanada cerebral de hipocampo es un modelo que

ha permitido realizar un análisis análisis completo de fármacos GABAérgicos, para el análisis y cernimiento de este tipo de fármacos (115). La aplicación de antagonistas GABAérgicos tales como penicilina, BIC o picrotoxina produce cambios profundos en el patrón de descarga neural (31). La función de este sistema GABAérgico consiste en suprimir la capacidad intrínseca de disparar en ráfagas de los somas y dendritas de las neuronas piramidales (115). Cuando se bloquea esta inhibición GABAérgica, los potenciales postsinápticos excitadores provocan una descarga en ráfagas característica de estas células piramidales. Con base en estas consideraciones, este modelo resulta bastante útil para analizar el efecto de la MEL sobre la transmisión GABAérgica del hipocampo.

Los experimentos se realizaron en rebanadas transversas de hipocampo de cobayo adulto (3 a 6 meses de edad), mantenidas In Vitro. La composición de la solución de perfusión fue de (mM): NaCl, 124; KCl, 5; MgSO<sub>4</sub>, 2; CaCl<sub>2</sub>, 2; NaHCO<sub>3</sub>, 26 y glucosa, 10. La solución era burbujeada con 95 % de O<sub>2</sub> y 5 % de CO<sub>2</sub> para mantener a un pH = 7.4 y temperatura de 36.5 °C. El sacrificio de los animales y los experimentos se llevaron siempre a cabo entre las 10:00 y las 14:00 H, en los meses de verano. Se añadió MEL y BIC al baño de tejido, así como las soluciones vehículo correspondientes para realizar registros controles. Para registrar la actividad eléctrica de las células piramidales de la región CA3 se utilizó una micropipeta con filamento interno (WPI 150F) llenas con NaCl 3M y verde rápido, 2 electrodos de plata clorurada fueron colocados en la parte ascendente de las fibras musgosas, las cuales provocaron potenciales postsinápticos excitadores en las células piramidales.

La FIG. 24, muestra el efecto de la adición de 5 mM de MEL sobre el potencial de acción de estas células.

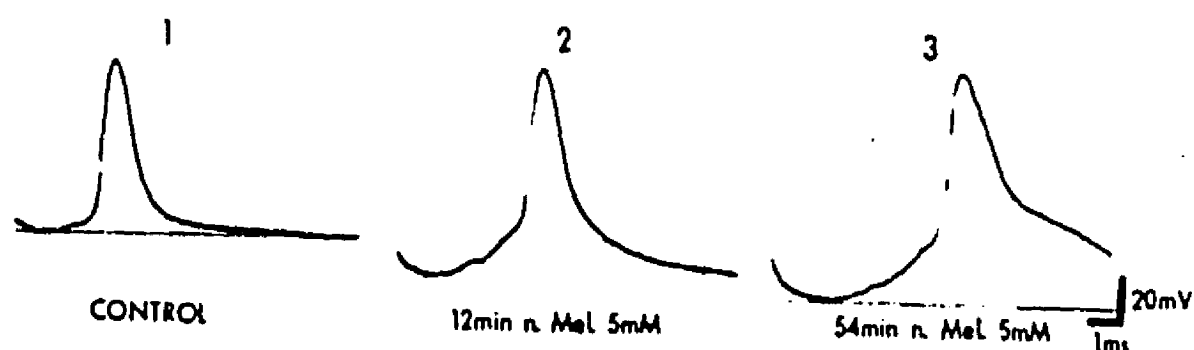


FIG. 24. Fotografías tomadas directamente de la pantalla del osciloscopio donde se muestran los efectos de la adición al baño de 5 mM de MEL sobre las características del potencial de acción de las células piramidales del hipocampo. Detalles en el texto.

En 1 se observa el potencial registrado antes de la aplicación del fármaco, mientras que en 2 y 3 son después de 12 y 54 min de perfundida la MEL, respectivamente. Se observa una hiperpolarización marcada, la cual aumenta tanto el tamaño como la duración del potencial de acción.

Cuando a esta preparación se le agrega BIC se observa la presencia de descarga en ráfagas, la cual es resultado de la inhibición GABAérgica, tal como se observa en la FIG. 25. Sin embargo, al agregar MEL (como se observa en 2 y 3 de la figura 25), se obtiene el bloqueo del efecto de la BIC.

Si se extrae la MEL (FIG. 25), panel B, se recupera el efecto de la BIC. En otras palabras la MEL restaura el efecto GABAérgico bloqueado por la BIC.

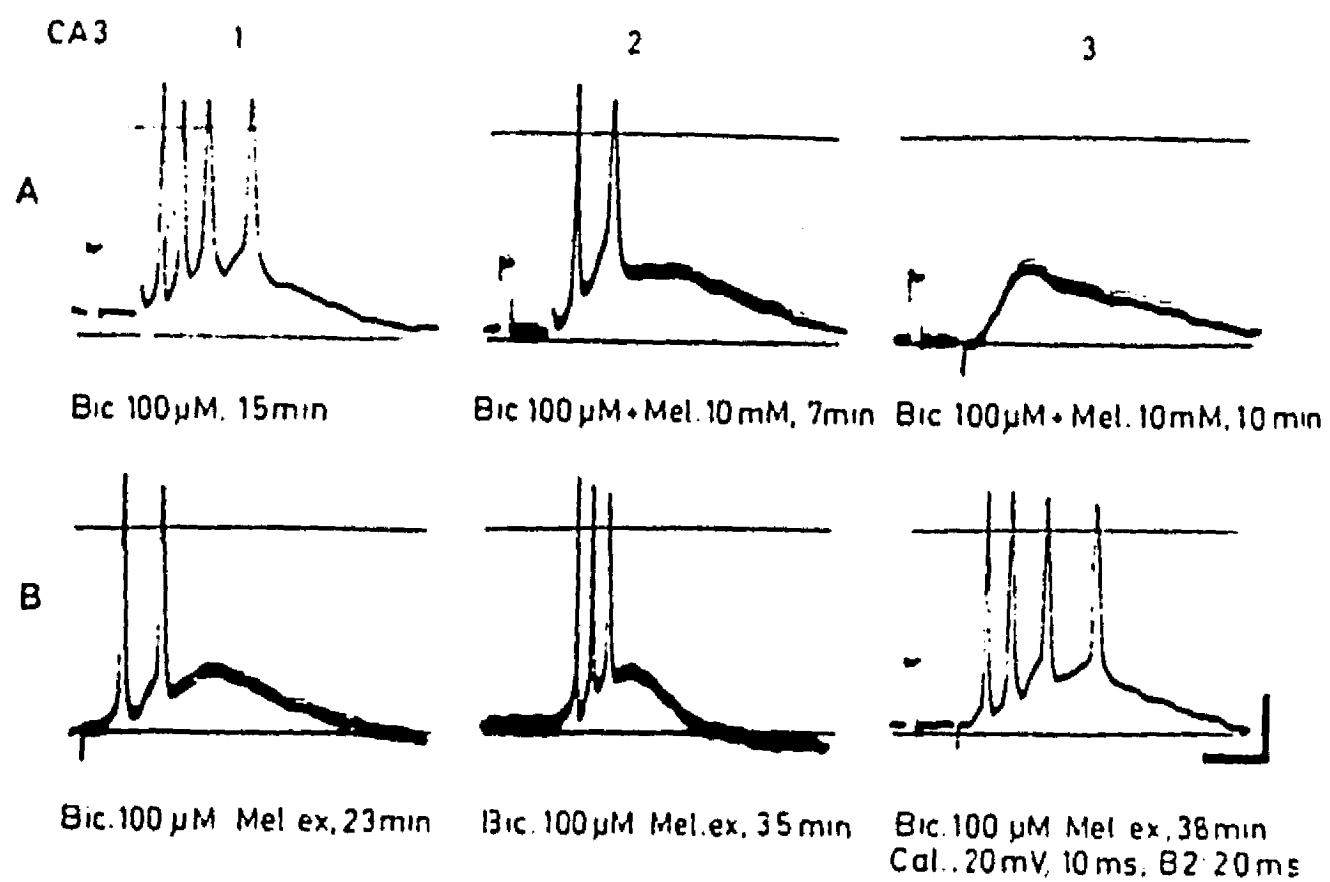


FIG. 25. La adición de bicuculina a esta preparación, provoca la aparición de descargas en ráfagas características. Tal acción sugiere una inhibición del tono GABAérgico ejercido sobre estas células. La adición de MEL en estas condiciones provoca un bloqueo reversible del efecto de la bicuculina.

## D I S C U S I O N

El objetivo principal de esta serie de experimentos consistió en analizar, utilizando varios modelos experimentales, la relación que existe entre los sistemas GABAérgicos cerebrales y la principal hormona de la glándula pineal, la melatonina. Esta relación ha sido ya documentada a nivel de la G.P donde se observó la existencia de GABA y la participación de éste, en la regulación de la producción y liberación de MEL (33). Sin embargo, debido a la similitud de los efectos provocados por varios agonistas GABAérgicos con los provocados con la MEL, es muy posible que estas interacciones se presenten en sitios cerebrales diferentes a la GP.

Tanto el GABA (104) como la MEL (16) modifican la producción y liberación de varias hormonas. Ambos tipos de sustancias poseen efectos anticonvulsivos (1,115). Estos fármacos producen además sedación e hipnosis (29,68). Por otro lado, las acciones ansiolíticas de varios fármacos GABAérgicos, del tipo de las benzodiazepinas ha sido ampliamente documentado (43). Aunque, no existen estudios dirigidos a probar en forma directa las acciones ansiolíticas de la MEL ésta ha sido postulada por algunos autores (61,94). En nuestros experimentos y utilizando el modelo de ansiedad descrito por Vogel (107) la melatonina ejerció efectos ansiolíticos.

Este modelo ha sido uno de los más utilizados en el cernimiento y análisis de fármacos ansiolíticos (98). En el sustancias ansiolíticas típicas como las BZF provocan un incremento de la respuesta de beber agua, independientemente de la cantidad de choques que recibe el animal (107). La MEL provocó un efecto muy

similar a las BZP utilizadas y a la buspirona. Es importante resaltar que este último fármaco no está relacionado químicamente con las BZP y carece de efectos sedantes, anticonvulsivos, relajantes musculares (101), alteraciones de la memoria, potenciación de efecto alcohólico y potencial aditivo (45). Tanto el CDP como el DZP ejercen sus efectos a través de mecanismos GABAérgicos (43), mientras que el mecanismo de acción utilizado por la BUS es controversial. Trabajos iniciales sugirieron una interacción con los sistemas dopaminérgicos cerebrales papel como un fármaco dopaminérgico (96). Aunque, recientemente estudios con radioligandos le adjudican propiedades serotoninérgicas en receptores 5-HT1A (81). Las propiedades ansiolíticas de la MEL, encontradas en el presente trabajo, asocian aún más los efectos de esta hormona con los sistemas GABAérgicos cerebrales. Aunque no hay que olvidar que la ansiedad es producto de toda una interacción de varios sistemas. En términos generales se piensa que la ansiedad es resultado de un desequilibrio entre los sistemas noradrenérgicos y GABAérgicos cerebrales (19). Usualmente el factor predisponente es una hiperactividad del sistema noradrenérgico. En este sentido un fármaco ansiolítico actuaría por incrementar el tono GABAérgico o por disminuir el noradrenérgico. Debido a los otros efectos cerebrales provocados por la MEL, muy probablemente su acción ansiolítica sea resultado de un incremento en el tono GABAérgico.

Realizamos estudios en torno a la posibilidad de que la MEL produjera, efectos analgésicos, hiperactividad motora, modificación del aprendizaje, o cambios en la ingesta de agua. Nuestros resultados mostraron que la MEL no posee un efecto analgésico propio. Tal hallazgo ya había sido reportado por varios autores en

pruebas realizadas en placa caliente en ratón (54) o en la de pinzamiento de la cola en ratón y disfunción inducida por dolor en una extremidad en la rata (95). Sin embargo, la combinación MEL-MOR provoca una potenciación muy marcada de la analgesia provocada solo por la administración de MOR. Así, la carencia de un efecto analgésico de la MEL, descarta una acción de supresión del dolor al choque eléctrico como responsable del incremento en el número de choques que recibió el animal.

La aplicación intraperitoneal de MEL provoca una reducción significativa de la actividad locomotriz, tal como lo observamos en el presente estudio y como ha sido descrito por otros autores (61,79,114). Por lo que es poco probable que un animal con disminución de su actividad locomotriz incremente por este hecho el número de choques recibidos, a menos que exista un impulso para resolver el conflicto en el que se encuentra. Tal impulso es proporcionado por el fármaco ansiolítico (40). Por esta razón, se descarta un efecto motor como el responsable de incremento de la ingesta de agua.

En lo relativo al aprendizaje, varios autores han abordado tal aspecto (29,61). La conclusión general de estos estudios, incluyendo el presente, es que la MEL no ejerce, un efecto significativo, ni sobre la adquisición o el mantenimiento de respuestas aprendidas. En un estudio realizado por Kovács (61), utilizando un paradigma de prevención activa como prevención pasiva encontró que la MEL no modifica la adquisición de la respuesta. Sin embargo, los animales tratados con MEL mostraron una extinción mucho más marcada que los sujetos controles. Tal efecto fue interpretado



por el autor como una acción ansiolítica. En nuestro estudio, aunque los sujetos tratados con CDP y MEL requirieron de un menor número de sesiones para adquirir una respuesta de prevención activa de 2 vías, el análisis de variancia mostró que no existen diferencias significativas en tales datos.

Finalmente, aunque no existe reporte alguno conocido en la literatura científica que relacione la conducta de ingesta de agua con la MEL, decidimos describir el efecto de esta hormona sobre la simple conducta de ingerir agua, utilizando el mismo dispositivo experimental para determinar también el número de lengüetazos que realizará el sujeto. Los resultados de este estudio mostraron que ni el número de lengüetazos, ni la cantidad de líquido que beben los sujetos tratados con 3 dosis de MEL difieren significativamente de lo mostrado por los sujetos controles. Con base en todos estos resultados, consideramos que el efecto de incrementar el número de choques, y como consecuencia de ingesta de agua, de los animales tratados con MEL en este modelo experimental, constituye una verdadera acción ansiolítica. Evidentemente, que sería deseable utilizar otros modelos experimentales que permitieran sustentar aún más fuertemente esta observación.

Los estudios realizados In Vitro en músculo liso intestinal indican también un efecto importante de la MEL sobre esta peculiar estructura. Es interesante mencionar que la maquinaria enzimática necesaria para sintetizar la MEL esta presente en sólo 3 estructuras: la pineal, la retina y el intestino delgado (118). En estos sitios existe un patrón rítmico circadiano de producción y liberación de MEL. En la retina el indol parece ser responsable de un proceso de modulación de las células horizontales y ganglionares

de la misma retina (109). Mientras que la función de la MEL producida y liberada en el intestino es desconocida. En nuestros estudios la MEL provocó un efecto depresor de la actividad contráctil, ya sea espontánea o de aquella provocada por estimulación eléctrica; el mecanismo de acción de tal efecto también es desconocido. Han existido algunos intentos de describir y clasificar a los posibles receptores de la MEL (120); sin embargo, tal parece que estos receptores están restringidos al sistema nervioso central, sin haberse descrito en tejidos periféricos. Es pertinente mencionar que las dosis empleadas para provocar tales efectos en el músculo intestinal son muy elevadas lo que podría sugerir un efecto farmacológico más que fisiológico. En este sentido debido a las características fisicoquímicas de la MEL, las cuales le confieren propiedades altamente lipofílicas, existe la probabilidad de que la MEL interactúe con algunos lípidos de la membrana celular y al incluirse dentro de la misma, modifique flujos iónicos, produciendo algo similar a lo que ocurre con los anestésicos (51). Es decir, un efecto inespecífico que modifique la excitabilidad celular. Tal sugerencia sin embargo, no está del todo comprobada.

En esta preparación, el GABA induce un efecto depresor significativo en dosis nanomolares. Sobre la contracción del músculo liso, tanto el GABA como la MEL poseen efectos similares; solo que la BIC, un bloqueador de receptores GABA<sub>A</sub> (100) no modificó ni las acciones GABAérgicas ni los efectos provocados por la MEL. La explicación a este hecho podría residir en un tipo de receptores insensible a la BIC; en el intestino, es decir en receptores GABA<sub>B</sub> (14). Aunque aún desconocemos el tipo de receptores GABAérgico que

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

se localiza en el musculo liso intestinal.

Por otro lado los trabajos de microiontoforesis mostraron que ambos fármacos provocan efectos similares en las neuronas del hipotálamo. En este sitio se han descrito receptores específicos para MEL (120) y para el GABA, de hecho el hipotálamo es una de las regiones cerebrales con mayor concentración de GABA (35). Todas las neuronas que respondieron a MEL también fueron deprimidas por el GABA, de igual manera la aplicación alterna de pulsos de presión de MEL y GABA en la misma neurona provocan efectos depresores de la frecuencia de descarga de estas neuronas hipotalámicas. En esta preparación, la aplicación de una corriente de BIC bloqueó el efecto depresor del GABA, pero es incapaz de modificar la respuesta a la MEL. Tal hallazgo sugiere, que ambos fármacos utilizan un mecanismo de acción diferente que los lleva a producir el mismo efecto.

La interrelación entre ambas sustancias, GABA y MEL resultó mucho más evidente en nuestros estudios de rebanadas de cerebro. En estos experimentos la administración de MEL, en dosis nanomolares bloqueó el efecto de la BIC, sugiriendo con ello una acción de tipo GABAérgico. Este efecto reversible, sugiere una acción directa sobre el complejo benzodiazepina-GABA-ionóforo-receptor (24), aunque en un sitio diferente al sitio de unión del GABA.

A este respecto en 1981, Marango y cols., (65) publicaron un interesante reporte en el cual mencionan que, en un intento de encontrar el ligando endógeno a los receptores benzodiazepínicos, encontraron que tanto la MEL como uno de sus metabolitos el 5-metoxi-N-acetil-kinurenamina, son capaces de inhibir la unión de [3H]-diazepam en sinaptosomas de membrana de cerebro de ratón.

Sin embargo, posteriormente se mostró que los antagonistas de BZF como el Ro 15-1795 no antagoniza los efectos sedativos de la MEL pero sí los efectos de DZF (41), lo cual aparentemente excluye un mecanismo de acción de la MEL sobre el sitio de unión a las BZF. Sin embargo, el complejo benzodiazepinas-GABA-receptor-ionóforo probablemente contenga otros sitios donde se unan otros compuestos; por ejemplo un sitio de unión para la picrotoxina al cual es independiente del sitio de unión del GABA y de las benzodiazepinas (75).

Independientemente del sitio de unión en el complejo benzodiazepinas-GABA-receptor-ionóforo, que poseen los indoles de la pineal existe un efecto agonista de la MEL sobre la unión del GABA con su sitio de unión. Así, en 1984, Coloma y Niles (21) mostraron que una dosis de MEL de  $10^{-7}$  M, mejora la unión In Vitro de [ $^3$ H]-muscimol en el cerebro de la rata. Posteriormente los mismos autores publicaron otro trabajo (22), en el que muestran que la MEL incrementa la unión esteroespecífica de [ $^3$ H]-GABA y [ $^3$ H]-muscimol en membranas sinápticas de la corteza cerebral de ratas. Estos autores muestran que una concentración de 100  $\mu$ M de MEL incrementan hasta 162 % la unión de [ $^3$ H]-GABA después de 60 min de preincubación. Comparativamente una dosis también de diazepam con 100  $\mu$ M durante 90 min de preincubación incrementa la unión esteroespecífica de [ $^3$ H]-GABA en 182 %.

Cuando las membranas fueron pretratadas con TRITON X-100, este efecto de incremento de unión de GABA se pierde. Aunque, los autores desconocen el mecanismo de tal efecto. Estos trabajos indican la existencia de un efecto GABAérgico de los indoles de la

pineal, lo que apoya los resultados de los presentes trabajos.

Sin embargo, existe la posibilidad de que todos estos efectos tanto conductuales, como electrofisiológicos y neuroquímicos descritos en el presente trabajo y por los autores aquí citados, sean de índole farmacológico. La razón de ello es que las concentraciones de MEL cerebrales detectadas hasta ahora son muy bajas, incluso durante la escotofase, y no alcanzan las concentraciones que alcanzan las dosis utilizadas en alguno de los experimentos. De hecho, este es uno de los constantes problemas que la mayor parte de los estudios con MEL enfrentan (69). A pesar de esta situación, nuestra información acerca de la fisiología y farmacología de la glándula pineal se incrementa exponencialmente por lo que nuestra comprensión sobre esta fascinante glándula es cada vez mayor.

## B I B L I O G R A F I A

- 1.- ALBERTSON, T.E., PETERSON, S.L., STARK, L.G. LAKIN, M.L. y WINTERS, W.D. (1981).: The anticonvulsant properties of melatonin on kindled seizures in rats. *Neuropharmacol.*, 20:61-66, 1981.
- 2.- ANTON-TAY, F.; DIAZ, J.L. y FERNANDEZ-GUARDIOLA, A. (1971).: On the effect of melatonin upon human brain. Its possible therapeutic applications. *Life Sci.*, 10:841-850.
- 3.- ANTON-TAY, F. y WURTMAN R.J. (1969).: Regional uptake of  $^3\text{H}$ -melatonin from blood and cerebrospinal fluid by rat brain. *Nature*, 221:474-475.
- 4.- ANTON-TAY, F. (1974).: Melatonin effects of brain function. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, 11:315-324.
- 5.- ARENDT, J., BORBELY, A.A., FRANEY, C. y WRIGHT, J. (1984).: The effects of chronic, small doses of melatonin given in the late afternoon on fatigue in man.: A preliminary study. *Neurosci. Lett.*, 43:317-321.
- 6.- ARENDT, J. (1985).: Mammalian pineal rhythms. *Pineal Res.*, 3:161-213.
- 7.- ARENDT, J. (1988).: Melatonin. *Clin. Endocrinol.*, 29:205-229.
- 8.- AXELROD, J. (1974).: The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science*, 184:1341-1348.
- 9.- BALEMANS, M.G.H. (1979).: Indole metabolism in the pineal gland of the rat; some regulatory aspects. *Prog. Brain Res.*, 52:221-229.
- 10.- BENSON, B. (1977).: Current state of pineal peptides. *Neuroendocrinol.*, 24:241-258.
- 11.- BINDONI, M. y RIZZO, R. (1965).: Hippocampal evoked potentials and convulsive activity after electrolytic lesions of the pineal body in chronic experiments on rabbits. *Arch. Sci. Biol. Biologica.* 49:223-233.
- 12.- BRAESTRUP, C. y SQUIRES, R.F. (1977).: Specific benzodiazepine receptors in the brain characterized by high affinity  $^3\text{H}$ -diazepam binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:3805-3809.
- 13.- BROWN, G., GROTA, L., BUBENIK, G., NILES, L. y TSVI, H. (1981).: Physiologic regulation of melatonin. In: Pirau, N. y Schloot, W. (eds). *Melatonin current status and perspectives.* *Adv. Biosc.*, 29:95-112.

- 14.- BROWNER, M., FERKANY, J.W. y ENNA, S.J. (1981).: Biochemical identification of pharmacologically and functionally distinct GABA receptors in rat. Brain J. Neurosci., 1:514-518.
- 15.- CARMAN, J.S., POST, R.M., BUSWELL, R. Y GOODWIN F.K. (1976).: Negative effects of melatonin on depression. Am. J. Psychiat., 133:1181-1186.
- 16.- CARDINALI, D.P. (1981).: Melatonin: A mammalian pineal hormone. Endocrine Rev., 2:327-343.
- 17.- CARDINALI, D.P. y VACAS, M.I. (1984).: Pineal gland, photoperiodic responses, and puberty. J. Endocrinol. Invest., 7:157-165.
- 18.- CARDINALI, D.P.; LOWENSTEIN, F.R.; ROSENSTEIN, R.E.; GONZALEZ-SOLVEYRA, C.; KELLER-SARMIENTO, M.I.; ROMEO, H.E. y ACUNA-CASTROVIEJO, D. Functional links between benzodiazepine and GABA receptors and pineal activity. GABA and Endocrine Function. Giorgio Racagni y Alfredo O. Donoso (eds). Raven Press. New York, 1986, pp. 155-164.
- 19.- CHARNEY, D.S. y REDMOND, D.E. (1983).: Neurobiological mechanisms in human anxiety. Evidence supporting Central Noradrenergic Hyperactivity. Neuropharmacol., 22:1531-1536.
- 20.- COHEN, M., ROSELLE, D., CHARNER, B., SCHMIDT, T.J. y LIPPMAN, M. (1978).: Evidence for a cytoplasmic melatonin receptor. Nature, 274:894-895.
- 21.- COLOMA, F.M. y NILES, L.P. (1984).: In Vitro effects of melatonin on  $^3$ [H]-muscimol binding in rat brain. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiat., 8:669-672.
- 22.- COLOMA, F.M. y NILES, L.P. (1988).: Melatonin enhancement of [ $^3$ H]- $\Gamma$ -aminobutyric acid and [ $^3$ H] muscimol binding in rat brain. Biochem. Pharmacol., 37:1271-1274.
- 23.- COOK, L. y SPINWALL, J. (1975).: Behavioral analysis of the mechanisms of action of benzodiazepines. Adv. Biochem. Psychopharmacol., 14:1-28.
- 24.- COSTA, E.: The role of gamma-aminobutyric acid in the action of 1,4-benzodiazepines. In: Towards understanding receptors. J. W. Lamble (ed)., Elsevier/Noth Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1987. pp. 176-183.
- 25.- CRAMER, H.J., RUDOLPH, J., CONSRUCH, U. y KENDEL, K. (1974).: On the effects of melatonin on sleep and behavior in man. Adv. Biochem. Psychopharmacol., 11:187-191.
- 26.- CRAWLEY, J.N.; MARANGOS, P.; PAUL, S.M.; SKOLNICK, P. y GOODWIN, F.K. (1981).: Interaction between purine and benzodiazepines: Inosine reverses diazepam-induced stimulation of mouse exploratory behavior. Science 211: 725-727.

- 27.- DAFNY, N. (1977).: Electrophysiological evidence of photic, acoustic and central input to the pineal body and hypothalamus. *Exp. Neurol.*, 55:449-457.
- 28.- DAFNY, N. (1980).: Two photic pathways contribute to pineal evoked responses. *Life Sci.*, 26:737-742.
- 29.- DATTA, P.C. y KING, M.G. (1980).: Melatonin: Effects on brain and behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 4:451-458.
- 30.- DEFEUDIS, F.V. (1983).: Psychoactive agents and GABA-Receptors. *Pharmacol. Res. Commun.*, 15:29-39.
- 31.- DINGLEDINER, R. y GJERSTAD, L. (1980).: Reduced inhibition during epileptiform activity in the in vitro hippocampal slice. *J. Physiol.*, 305:297-313.
- 32.- DODT, E. (1984). The third eye-superstition and reality. In European Pineal Study Group. Number 11. P. Pevet (ed), EPSSG. Estrasburgo, Francia. pp. 3-18.
- 33.- EBADI, M., CHAN, A., TOH, I., HAMMAD, H.M., SWANSON, S. y GROVITRAPONG, P.: The role of  $\Gamma$ -Aminobutyric acid in regulation of melatonin synthesis of the bovine pineal gland. In: Dynamics of Neurotransmitters function, Hanin, I. (ed). Raven Press. New York. 1984, pp. 177-187.
- 34.- ELLIS, G. y TUREK, F.W. (1979).: Changes in locomotor activity associated with the photoperiodic response of the testes in male Golden Hamsters. *J. Comp. Physiol.*, 132:277-284.
- 35.- FAHN, S. y COTE, L.J. (1968).: Regional distribution of  $\Gamma$ -amino-butyric acid (GABA) in brain of the rhesus monkey. *J. Neurochem.*, 15:209-213.
- 36.- FELLEBERG, A.J., PHILLIPOU, G. y SEAMARK, R.F. Urinary 6-sulphatoxymelatonin excretion and melatonin production rate: studies in sheep and man. In Pineal functions. Matthews, C.D. y Seamark, R.F. (eds). Elsevier, Amsterdam. 1981, pp. 143-149.
- 37.- FILE, S.E. (1987).: The contribution of behavioural studies to the neuropharmacology of anxiety. *Neuropharmacol.*, 26:877-886.
- 38.- FIELDS, H.L. y BASBAUM, A.I. (1978).: Brainstem control of spinal pain-transmission neurons. *Ann. Rev. Physiol.*, 40:217-248.
- 39.- FOLEY, P., CAIRNCROSS, K.D. y FOLDES, A. (1986).: Pineal indoles: Significance and measurement. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 10: 273-293.
- 40.- FREEDMAN, A.M. (1980).: Psychopharmacology in psychotherapy in the treatment of anxiety. *Pharmacopsychiat. Neuropsychopharmacol.*, 13:277-289.



- 41.- GREEN, R., NUTT, D.J. y COWEN, P.J. (1982).: Using Ro 15-1788 to investigate the benzodiazepine receptor in vivo: Studies on the anticonvulsant and sedative effect of melatonin and the convulsant effect of the benzodiazepine Ro 05-3663. *Psychopharmacol.*, 78:293-295.
- 42.- GUIDOTTI, A.; BARALDI, M.; LEON, A. y COSTA, E. (1980).: Benzodiazepines: A tool to explore to biochemical and neurophysiological basis of anxiety. *Fed. Proc.*, 34: 3039-3042.
- 43.- HAEFFELY, W.: The biological basis of benzodiazepine actions. In: The benzodiazepines current standars for medical practice. Smith, D.E. y Wesson, D.R. (eds). MTP Press Limited. Boston, 1985, pp. 7-41.
- 44.- HENDRICKSON, A.E., WAGONER, N. y COWAN, M. (1972).: An autoradiographic and electron microscopic study of retino-hypothalamic connections. *Z. Zellforsch.*, 135:1-26.
- 45.- HINER, B.C., MAUK M.D., PEROUTKA, S.J. y KOCSIS, J.D. (1982).: Buspirone, 8-OH-DPAT and ipsapirone effects on hippocampal cerebellar and sciatic fiber excitability. *Brain Res.*, 461:1-9.
- 46.- HISHIKAWA, Y., CRAMER, H. y KHULO, H. (1969).: Natural and melatonin-induced sleep in young chickens. A behavioral and electrographic study. *Exp. Brain Res.*, 7:84-94.
- 47.- HOFFMANN, R.A. Y REITER, R.J. (1965).: Pineal gland influence on gonads of male hamster. *Science* 148:1609-1611.
- 48.- ILLNEROVA, H. (1971).: Effects of light on the serotonin content of the pineal gland. *Life Sci.*, 10:955-960.
- 49.- JACOBS, M.S. y P.J. MORGANE. (1984).: Retino-hypothalamic connections in Cetacea. *Nature*, 203:778-780.
- 50.- JONES, R.L., McGEER, P.L. y GREINER, A.C. (1969).: Metabolism of exogenous melatonin in schizophrenic and non-schizophrenic volunteers. *Clin. Chim. Acta*, 26:281-285.
- 51.- JUDGE, S.E. (1980).: General anaesthetic action in the central nervous system. *Gen. Pharmac.* 11:337-341.
- 52.- KAPPERS, J.A. (1960). The development, topographical relations and innervation of the ephiphysis cerebri in the albino rat. *Z. Zellforsch.*, 52:163-215.
- 53.- KAPPERS, J.S. y SCHADE, V.P. (1965).: Structure and function of the ephiphysis cerebri. *Prog. Brain Res.*, 10:233-235.
- 54.- KAVALIERS, M., HIRST, M. y TESKEY, C.G. (1983).: Ageing, opioid analgesia, and the pineal gland. *Life Sci.*, 32:2279-2285.
- 55.- KENNY, G.C.J. (1961).: The "nervus conarii" of the monkey. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 23:563-470.

- 56.- KLEIN, D.C. y WELLER, J.L. (1970).: Indole metabolism in the pineal gland: A circadian rhythm in n-acetyltransferase. *Science*, 169:1093-1095.
- 57.- KLEIN, D.C.: The pineal gland: a model of neuroendocrine regulation. In: *The hypothalamus*. Reichlin, S., Baldessarini, R.J. y Martin, J.B. (eds). Raven Press, New York. 1978, pp. 303-325.
- 58.- KLEIN, D.C.: Circadian rhythms in the pineal gland. In *Endocrine Rhythms*. D.T. Krieger (ed). Raven Press. New York. 1979, pp. 203-223.
- 59.- KONIG J.F.R. Y KLIPPEL, R.A.: *The rat brain. A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem*. New York, 1970. R.E. Krieger Publishing Co., Inc.
- 60.- KOPIN, I.J., PARE, C.M.B., AXELROD, J. y WEISSBACH, H. (1961).: The fate of melatonin in animals. *J. Biol. Chem.*, 236:3072-3075.
- 61.- KOVACS, G.L., GALARI, I., TELEGDY, G. y LISSAC, K. (1974).: Effect of melatonin and pinealectomy on avoidance and exploratory activity in the rat. *Physiol. Behav.*, 13:349-355.
- 62.- KVEDER, S. y McISAAC, W.M. (1961).: The metabolism of melatonin (N-acetyl-5-metoxytryptamine) and 5-metoxytryptamine. *J. Biol. Chem.*, 236:3214-3220.
- 63.- LERNER, A.B., CASE, J.D., TAKAHASHI, Y., LEE, T.H. Y MORI. N. (1958).: Isolation of melatonin, pineal factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.* 80:2587-2595.
- 64.- LERNER, A.B. y CASE, J.D. (1960).: Melatonin. *Fed. Proc.* 19:590-593.
- 65.- LEWY, A.J.: Biochemistry and regulation of mammalian melatonin production. In: *The pineal gland*. Reikin, R. (ed). Elsevier Science Publishing, New York, 1983, pp. 158-171.
- 66.- MARANGOS, P.J., PATEL, J., HIRATA, F., SONDHUM, D., PAUL, S.M., SKOLMCK, A. y GOODWIN, F.K. (1981).: Inhibition of diazepam binding by triptophan derivatives including melatonin and its brain metabolite N-acetyl-5-methoxy kynurenamine. *Life Sci.* 29:259-267.
- 67.- MARCZIYNSKY, T.J., YAMAGUCHI, N., LING, G.M. y GRODZINSKA, L. (1964).: Sleep induced by the administration of melatonin (5-Metoxy-N-Acetyltryptamine) in the hypothalamus of unrestrained cats. *Experientia*, 20:435-436.
- 68.- MARKS, J. (1983).: The benzodiazepines. for good or evil. *Neuropsychobiol.*, 10:115-126.

- 69.- MINNEMAN, K.F. y WURTMAN, R.J. (1976).: Pharmacology of the pineal gland. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 16:33-51.
- 70.- MOORE, R.Y. (1973). Retinohypothalamic projection in mammals: A comparative study. *Brain Res.*, 49:403-409.
- 71.- MOORE, R.Y. (1978). The innervation of the pineal gland. *Prog. Reprod. Biol.*, 4:1-29.
- 72.- MOORE, R.Y. y LERNER, N.J. (1972).: A retinohypothalamic projection in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 146:1-14.
- 73.- NARANJO-RODRIGUEZ, E.B., PRIETO-GOMEZ, B. Y REYES-VAZQUEZ, C. (1991).: Melatonin modifies the spontaneous multiunit activity recorded in several brain nuclei of freely behaving rats. *Brain Res. Bull.* en prensa.
- 74.- NILES, L.P. WONG, Y.W., MISRA, R.K. y BROWN, G.M. (1979).: Melatonin receptors in brain. *Eur. J. Pharmacol.*, 55:219-220.
- 75.- NORDLUN, J.J. y A.B. LERNER (1977). The effects of oral melatonin on skin color and on the release of pituitary hormones. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 45:768-774.
- 76.- OLSEN, R. y LEEB-LUNDBERG, F. Convulsant and anticonvulsant drug binding sites related to the GABA receptor-ionophore system. In: Morselli, F.L., Loscher, W., Meldram, B. y Reynolds, E.H. (eds). *Neurotransmitters, Seizures and Epilepsy*. Raven Press, New York, 1981, pp. 165-173.
- 77.- PANG, S.F., BROWN, G.M., GROTA, L.J., CHAMBERS, J.W. y RODMAN, R.L. (1977).: Determination of N-acetylserotonin and melatonin activities in the pineal gland, harderian gland, brain and serum of rats and chickens. *Neuroendocrinol.*, 23:1-13.
- 78.- PANG, S.F. TANG, P.L., TANG, G.W.K. y YAM, W.C. (1984c).: Melatonin and the other hormonal changes during pregnancy in humans. *J. Steroid. biochem.*, 20:1462.
- 79.- PAVEL, S. (1978).: Arginine vasotocin as a pineal hormone. *J. Neural. Trans. Suppl.* 13:135-155.
- 80.- FAZO, J.H. (1979).: Effects of melatonin on spontaneous and evoked neuronal activity in the mesencephalic reticular formation. *Brain Res. Bull.*, 4:725-730.
- 81.- FEROUTKA, S.J. (1985).: Selective interaction of novel anxiolytics with 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptors. *Biol. Psychiat.*, 20:971-979.
- 82.- FEVET, P.: Anatomy of the pineal gland of mammals. In: *The Pineal Gland*. Reikn R. (ed). Elsevier Science Publishing, New York, 1983, pp 98-117. USA.

- 83.- QUIRION, R. (1984).: High density of (3H) Ro 5-4864 "Peripheral" benzodiazepine binding sites in The Pineal Gland. Eur. J. Pharmacol. 102:559-560.
- 84.- RAIKHLIN, N.I., KVETNOY I.M. Y TOLKACHEV, V.N. (1975).: Melatonin may be synthesized in enterochromaffin cells. Nature, 255:344-345.
- 85.- REISS, M., DAVIS, R.H., SIDEMAN, M.B. y FLIGHT, E.S. (1963).: Pineal gland and spontaneous activity in rats. J. Endocr., 28:127-128.
- 86.- REITER, R.J. y R.J. RESTER (1966). Interrelationships of the pineal gland, the superior cervical ganglia and the photoperiod in the regulation of the endocrine systems of hamsters. Endocrinol. 79:1168-1170.
- 87.- REITER, R.J. (1973).: Comparative Physiology. Pineal gland. Ann. Rev. Physiol., 35:302-328.
- 88.- REITER, R.J. (1980): The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. Endocr. Rev., 1:109-131.
- 89.- REITER, R.J.: Anatomy of the pineal gland of the mammals. In: The pineal. Vol. 6. Reiter, R.J. (ed). Eden Press. 1981, pp. 14-40.
- 90.- RELKIN, R.: The pineal gland. ed: Elsevier Science Publishing, Nueva York, 1983.
- 91.- REYES-VAZQUEZ, C. y DAFNY, N. (1985).: Interaction of norepinephrine and superior cervical ganglion input in the rat pineal body. Exp. Neurol. 90:522-528.
- 92.- REYES-VAZQUEZ, C., PRIETO-GOMEZ, B. ALDES, L. y DAFNY, N. (1986).: The rat pineal exhibits two patterns of response to microiontophoretical norepinephrine application. J. Pineal Res. 3:213-222.
- 93.- ROMIJN, H.J. (1973).: Parasympathetic innervation of the rabbit pineal gland. Brain Res., 55:431-436.
- 94.- ROMIJN, H. (1978).: Is the pineal gland a tranquilizing organ?. Life Sci. 23:2257-2274.
- 95.- SALAZAR, L.A., ANTON-TAY, F., LOPEZ, J.F., HERRERA, J.F. y VILLARREAL, J. : Potenciación de la analgesia morfinica por la melatonina en 2 modelos de dolor. X Congreso Nacional de Farmacología. Taxco, Gro. Feb. 27 a Marzo 6, 1986.
- 96.- SCHUCKIT, M.A. (1984).: Clinical studies of buspirone. Psychopathol., 17: Suppl. 3:61-68.

- 97.- SEEM, P., DEMAINE, C. y VOLLRATH, L. (1981).: Electrical responses of pineal cells to melatonin and putative transmitters. Evidence for circadian changes in sensitivity. *Exp. Brain Res.*, 43:361-370.
- 98.- SEPINWALL, J. Behavioral studies related to the neurochemical mechanisms of action of anxiolytics. In: *Anxiolytics Neurochemical Behavioral, and Clinical Perspectives*. Malica, J.B., Enna, S.J. and Yamamura, H.I. (eds). Raven Press, New York. 1983, pp. 147-172.
- 99.- SHERER, M.A. WEINGARTNER, A., JAMES, H.S.F. y ROSHENTAL, N.E. (1985).: Effects of melatonin on performance testing in patients with seasonal affective disorder. *Neurosci. Lett.*, 58:277-282.
- 100.-SIEGHART, W. (1989).: Multiplicity of GABA<sub>A</sub>-benzodiazepine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, 10:407-411.
- 101.-TAYLOR, D.P., RIBLET, L.A., STANTON, H.C., EISON, A.S., EISON, M.S. y TEMPLE, D.L. (1982).: Dopamine and antianxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 17 Suppl. 1:25-35.
- 102.-TAMARKIN, L., LEFEBVRE, N.G. HOLLISTER, C.W. y GOLDMAN, B.D. (1977).: Effect of melatonin administered during the night on reproductive function in the Syrian hamster. *Endocrinol.*, 101:631-634.
- 103.-TAMARKIN, L., BAIRD, C.J. y ALMEIDA, D.F. (1985).: Melatonin: A coordinating signal for mammalian reproduction. *Science* 227:714-720.
- 104.-TOMIKO, S.A., TARASKOVICH, P.S. y DOUGLAS, W.W. (1983).: GABA acts directly on cells of pituitary pars intermedia to alter hormone output. *Nature*, 301:706-707.
- 105.-URRY, R.L., DOUGHERTY, K.A., FREHN, J.L. y ELLIS, L.G. (1976). Factors other than light affecting the pineal gland: Hypophysectomy, testosterone, dihydrotestosterone, estradiol cryptorchidism, and stress. *Am. Zool.*, 16:79-91.
- 106.-VAZQUEZ-ALVAREZ, A. M. Efectos del mazindol sobre la hipercinesia inducida por plomo en ratones recién nacidos. Tesis de Posgrado. Maestría en Ciencias Biomedicas (Farmacología), 1989.
- 107.-VOGEL, J.R.; BEER, B. y CLODY, D.E. (1971).: A simple and reliable conflict procedure for testings anti-anxiety agents. *Psychopharmacol.*, 21:1-7.
- 108.-VRIEND, J. (1983).: Pineal-thyroid interactions. *Pineal Res. Rev.*, 1:183-206.

- 109.-WEICHMANN, A.F. XIONG-LI, L., WU, S.M. y HOLLYFIELD, J.G. (1988).: Melatonin enhances horizontal cell sensitivity in Salamander retina. *Brain Res.*, 453:377-380.
- 110.-WELSH, M.G. (1985).: Pineal calcification: Structural and Functional aspects. *Pineal Res. Rev.*, 3:41-68.
- 111.-WETTERBERG, L., ARENDT, J., PAUNIER, L. SIZONENCO, P.C., VAN DONSELAAR, W. y HEYDEN, T. (1976).: Human serum melatonin changes during the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 42:185-188.
- 112.-WETTERBERG, L. (1978).: Melatonin in humans: Physiological and Clinical studies. *J. Neural. Transm.*, Suppl. 13:289-310.
- 113.-WEVER, R.A. (1986). Characteristics of circadian rhythms in human functions. *J. Neural. Transm.*, Suppl. 21:323-374.
- 114.-WONG, R. y WHITESIDE, C..B.C. (1968).: The effect of melatonin on the wheel running activity of rats deprived of food. *J. Endocr.* 40:383-384.
- 115.-WONG, R.K.S. y WATKINS, D.J. (1982).: Cellular factors influencing GABA response in hippocampal pyramidal cells. *J. Neurophysiol.* 48:938-951.
- 116.-WOOD, J.D. Physiology of the enteric nervous system. In: *Physiology of the gastrointestinal Tract.* Johnson, L.R. (ed). Raven Press. New York, 1991, pp. 3-37.
- 117.-WURTMAN, R.J., AXELROD, J. y PHILLIPS, L.S. (1963).: Melatonin synthesis in the pineal gland: Control by the light. *Science.* 142:1071-1073.
- 118.-WURTMAN, R.J., AXELROD, J. y KELLY, D.E.: *The Pineal.* Academic Press. New York. London. 1968.
- 119.-WURTMAN, R.J. (1975).: The effects of light on man and other mammals. *Ann. Rev. Physiol.*, 37:467-483.
- 120.-ZISAPEL, N. (1988).: Melatonin receptors revisited. *J. Neural. Transm.*, 73:1-5.