

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

**EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE EL
METABOLISMO DE AMINAS BIOGENICAS
EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO
PRESENTA**

PATRICIA ILEANA JOSEPH BRAVO

MEXICO, D. F.

1972

3

8

5



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE:	ESTELA SANCHEZ DE JIMENEZ
VOCAL:	JAVIER PEREZ VILLASENOR
SECRETARIO:	LUIS CAÑEDO DORANTES
1er. SUPLENTE:	JAIME MARTUSCELLI QUINTANA
2er. SUPLENTE:	ALBERTO HUBERMANN

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, U.N.A.M.

SUSTENTANTE:

PATRICIA ILEANA JOSEPH BRAVO

ASESOR DEL TEMA:

LUIS CAÑEDO DORANTES

ASESOR TECNICO:

FERNANDO ANTON TAY

INDICE

PROLOGO	1
OBJETIVOS	3
CONCEPTOS GENERALES:	
Introducción Histórica	5
Filogenia de la Glándula Pineal	7
Estructura de la Glándula Pineal	9
La Pineal como un transductor neuroendócrino ...	13
Biosíntesis de la Melatonina	15
Efecto de la luz sobre la biosíntesis de..... melatonina	19
El papel fisiológico de la secreción pineal	21
Efectos de la melatonina administrada	23
MATERIALES Y METODOS.....	28
RESULTADOS	37
DISCUSION	46
REFERENCIAS	54

PROLOGO

Dentro del campo de las ciencias naturales el Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos y en especial el del hombre, es una de las barreras a nuestro conocimiento, la cual se ha mantenido a pesar del impresionante desarrollo tecnológico y conceptual de las últimas décadas. El desarrollo tecnológico nos ha permitido elaborar diagramas más o menos complejos de la organización cerebral e identificar en algunos casos, los sistemas que participan en el funcionamiento de estos circuitos.

De manera semejante, los conceptos generados por la neuroendocrinología han modificado no sólo el concepto clásico de la glándula endócrina sino también impulsado el desarrollo del conocimiento de la interrelación entre el SNC y el Endócrino para mantener la homeostasis del organismo y de fenómenos tan integrados como es la conducta (motora, sexual, sueño, etc.)

Debido a estos conocimientos, el estudio de la fisiología de la glándula pineal ha adquirido gran interés ya que este órgano de secreción interna produce hormonas como la melatonina, cuya estructura química, similar a la de neurotransmisores como serotonina, hacen suponer una participación en la modulación de la actividad del SNC. Los efectos observados después de la ad

ministración de esta hormona (inducción de sueño, euforia, etc) refuerzan la hipótesis de que el cerebro es el órgano blanco de las hormonas pineales.

Las implicaciones que tiene esta posible actividad de modulación sobre el SNC aunadas a la reciente descripción de los efectos terapéuticos de la melatonina en padecimientos neurológicos cuya fisiopatología se ha relacionado con disfunción del metabolismo de las aminas biogénicas que son probables neurotransmisores - (ej: epilepsia, parkinson) condujeron a estudiar los mecanismos que operan en los caminos metabólicos influenciados por la melatonina.

OBJETIVOS

Aún cuando existe evidencia de que la melatonina modifica la función cerebral, su mecanismo de acción permanece prácticamente desconocido. Es posible que la melatonina exógena aumente el contenido de - neurotransmisores (serotonina y ácido gamma amino butirico -GABA-) (71,72) y probablemente modifique otros procesos metabólicos particularmente en mesencéfalo e hipotálamo. Sin embargo un cambio en los niveles de un neurotransmisor no implica necesariamente una alteración de la función. Se puede obtener mayor información sobre la importancia de estos cambios si se estudian los factores que influyen en su biosíntesis, recambio y catabolismo.

El propósito del trabajo experimental presentado en esta tesis está encaminado a estudiar con mas detalle las modificaciones que en la biosíntesis y en la degradación de la serotonina cerebral se presentan después de la administración de melatonina, así también como analizar si estos cambios son causados por factores comunes que afectan la biosíntesis de otros neurotransmisores como es el GABA.

El GABA se forma a partir de ácido glutámico por medio de la descarboxilasa respectiva. La serotonina es sintetizada a partir de triptofano por la - triptofano hidroxilasa formando 5 hidroxí triptofano

el cual se descarboxila por la descarboxilasa de los L-aminoácidos aromáticos formando la serotonina (fig 4). Ambas descarboxilasas usan como cofactor el fosfato de piridoxal, el cual es sintetizado a partir del piridoxal por la kinasa del piridoxal. Debido a que esta última enzima se encuentra activada bajo el efecto de melatonina (75) es posible que los niveles de fosfato de piridoxal disponibles para las descarboxilasas se encuentren aumentados. Por lo tanto, se estudió el efecto de la administración de melatonina sobre la actividad de estas enzimas.

Por otro lado, la actividad de la triptofano hidroxilasa es muy baja en cerebro, por lo que se ha postulado como la enzima reguladora en la biosíntesis de serotonina. Sin embargo, la afinidad que tiene por su sustrato es muy baja y los niveles de triptofano en cerebro son inferiores a su K_m (99). Esto ha sugerido que la velocidad de síntesis de serotonina depende de los niveles de triptofano presentes en la neurona (99). De acuerdo con estos datos y para investigar si los aumentos en los niveles de serotonina observados eran debido a un aumento en la concentración de triptofano en cerebro, ésta se midió después de la administración de melatonina. Se determinaron también los niveles de serotonina y de ácido 5 hidroxí indol acético, que es su principal producto de degradación (100), en los animales tratados con melatonina.

INTRODUCCION

Se tiene conocimiento de la pineal desde hace más de 2000 años, sin embargo el concepto actual de este órgano ha sido elaborado con la investigación realizada en los últimos diez años.

1. En la literatura hindú se consideraba a la pineal como un órgano de clarividencia y meditación que permitiría al hombre recordar sus vidas pasadas.
2. Para Herófilo de Alejandría (325-280 A.C.) la glándula pineal funcionaría como un esfínter destinado a controlar el "flujo del pensamiento", regulando la cantidad de sustancia que pasa del tercer al cuarto ventrículo.
3. Galeno de Pérgamo (130-200), le restó importancia considerándola únicamente como una glándula linfática.
4. René Descartes (1596-1650) consideró que la pineal era el "asiento del alma" donde estarían localizados la imaginación y el sentido común: los ojos percibirían los acontecimientos del mundo real y transmitirían la imagen a la glándula, esta respondería mediante humores que pasarían por los nervios a los músculos que originan la respuesta apropiada (1).
5. A fines del siglo pasado Heubner (2) describió que niños con tumores de la glándula presentaban pubertad precoz.

6. En 1958 Lerner (3) aisló y caracterizó de la pineal de bovinos un compuesto que denominó melatonina. La melatonina se identificó como la N-acetil 5 metoxi triptamina. Su estructura química, su actividad biológica y el hecho de que en los mamíferos, la glándula pineal es el único órgano que la produce, propició el interés de esta área, describiéndose en la última década, los mecanismos que controlan su biosíntesis, su relación con el fotoperíodo y más recientemente su participación en la modulación del SNC.

Durante muchos años se sostuvo que la pineal en los mamíferos era un órgano vestigial. En los vertebrados inferiores la pineal está representada por una estructura compleja (parafisis, órgano parapineal, pineal) (4) cuya función se fué perdiendo progresivamente al ascender en la escala filogenética. Esta teoría se basó en tres observaciones:

1. En la mayoría de los vertebrados inferiores la estructura de la pineal es semejante a la de las células de la retina y en algunas especies es posible observar impulsos nerviosos originados por la exposición de este órgano a diferentes longitudes de onda. La información luminosa viaja al cerebro donde se supone integra la información acerca de la cantidad de calor y luz recibida por el animal (4,8).

2. En contraste con la estructura de los vertebrados inferiores, la pineal de los mamíferos carece de componentes que puedan ser sensibles a la luz. Aun más, la extirpación de la glándula no se acompaña de efectos deletereos en el organismo del animal (5).

3. La pineal del humano como la de la mayoría de los mamíferos sufre un proceso de calcificación con la edad (6). Este hecho es lógicamente asociado con procesos de destrucción y muerte celular (7).

Aún cuando estas observaciones son correctas, la información obtenida en los últimos años ha proporcionado una interpretación muy diferente.

FILOGENIA DE LA GLANDULA PINEAL.

A lo largo de la escala filogenética, la pineal muestra cambios radicales tanto en sus relaciones anatómicas como en su estructura microscópica. En los vertebrados inferiores es un órgano colocado superficialmente en la parte dorsal del cráneo y su estructura es la de un fotoreceptor (8). En los mamíferos por el contrario, la pineal está situada profundamente en el cerebro y su estructura es glandular (fig 1) (9).

En los peces y en los anfibios parte de los "órga

nos pineales" se han atrofiado, y la pineal muestra una estructura muy similar a la de la retina de los mamíferos. En estas especies se pueden distinguir tres tipos de células: las células fotoreceptoras de tipo ciliado, elementos de soporte y terminaciones nerviosas que llevan información del fotoreceptor al cerebro (10).

La actividad fotoreceptora de la pineal en los anfibios fué sugerida hace ya 60 años por los anatomistas suecos al notar la semejanza de las células de esta glándula con la de los conos de la retina. De aquí partió la especulación de que la pineal de la rana funciona como un "tercer ojo" (1,4).

Recientemente, Dodt demostró que la frecuencia del impulso nervioso en los nervios pineales varía con la longitud de onda a la que es expuesto el animal (12).

La pineal de los reptiles muestra un aumento en el número de células secretoras y disminución de células nerviosas que aún son capaces de responder directamente a estímulos luminosos (13).

En los mamíferos la mayor parte de la pineal está constituida por células llamadas pinealocitos y en menor proporción por células endimarias y gliales. Los pinealocitos se encuentran agrupados formando masas sólidas separadas entre sí por el tejido conectivo que penetra junto con los vasos y las separa en lóbulos.

Esta disposición es más clara en los individuos viejos. Las arterias se encuentran sólo en la periferia y no se acompañan por la correspondiente vena, las que se encuentran distribuidas en toda la glándula (14).

ESTRUCTURA DE LA GLANDULA PINEAL.

La pineal se origina como una invaginación del ectodermo en la parte posterior del techo del tercer ventrículo, justo arriba de la comisura posterior. Las células proliferan rápidamente para formar una estructura sólida y alrededor del sexto mes de la vida intrauterina se diferencian en pinealocitos (25).

En el adulto, la pineal forma parte del epítalamo; está unida al techo del tercer ventrículo por el tallo pineal que se continua con la comisura posterior y con la comisura habenuar; parte del tercer ventrículo se prolonga dentro de ella formando el receso pineal. Tiene forma ovalada de color gris, mide de 5 a 9 mm de largo por 3 a 6 mm de ancho y 3.5 mm de espesor. Su peso oscila entre 100 y 200 mg. Está rodeada casi en su totalidad por la piamadre de donde recibe vasos sanguíneos, nervios sin mielina (uno o dos nervios coronari) y tejido conectivo que penetra profundamente en el parénquima (4,25).

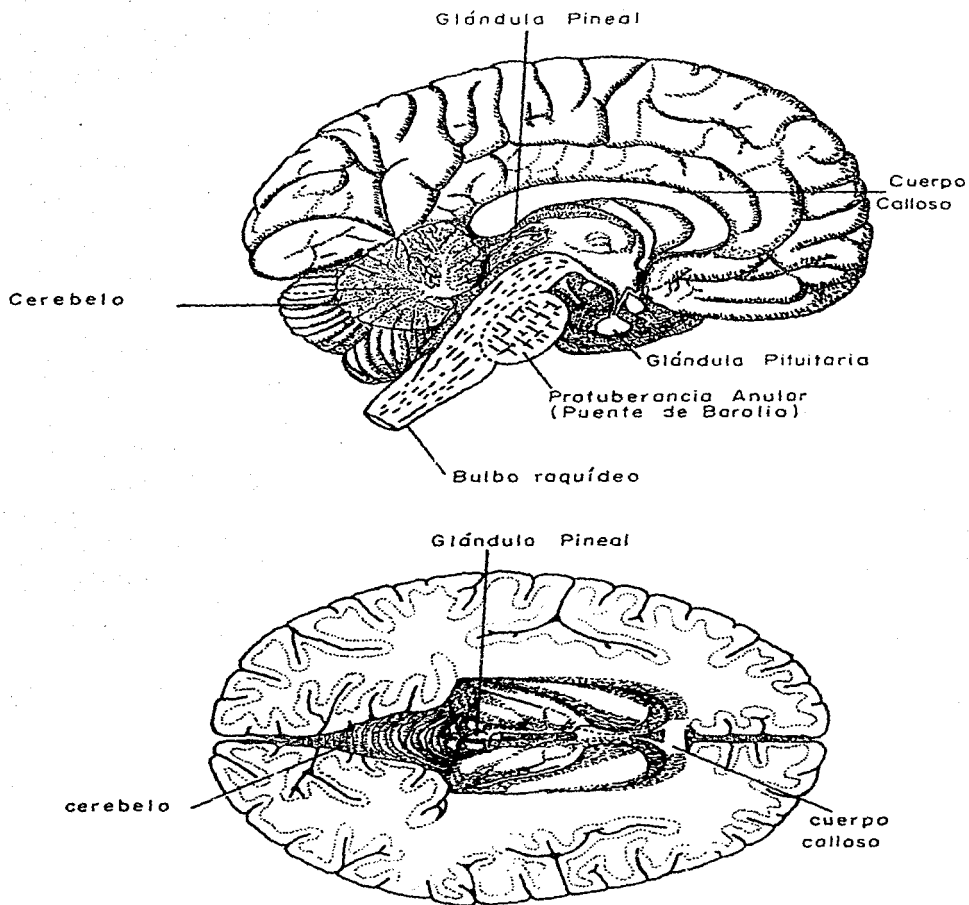


Fig. 1. Planos sagital y frontal del cerebro mostrando la localización anatómica de la Glándula Pineal (107).

Microscópicamente los pinealocitos de la periferia de la glándula son de forma redonda y ovalados en el centro de la glándula (15). El citoplasma contiene abundantes "gránulos de secreción" y muestra prolongaciones en forma de bastón que terminan cerca de los capilares. El núcleo y el nucleolo son muy grandes. Al microscopio electrónico las mitocondrias contienen gránulos oscurillos de 0.6 a 1.0 μ , probablemente de naturaleza lipoprotéica. El citoplasma es rico en serotonina, ácido 5 hidroxil indol acético y noradrenalina (16). El contenido y la distribución de los lípidos varía con el fotoperíodo y con el ciclo estral (17).

El tejido neurológico de la pineal está formado por astrocitos distribuidos entre los lóbulos o dentro de ellos, al microscopio electrónico muestran filamentos de 80 a 90 Å de diámetro con procesos pálidos y escasas mitocondrias.

El estroma está formado por linfocitos, células plasmáticas, macrófagos, células cebadas, fibroblastos, fibrocitos y melanocitos. En estas últimas se acumulan los pigmentos que ocasionalmente se ven en la glándula (18).

La situación anatómica de la pineal hizo pensar durante mucho tiempo que la inervación estaba dada por las fibras nerviosas provenientes del cerebro; en efecto

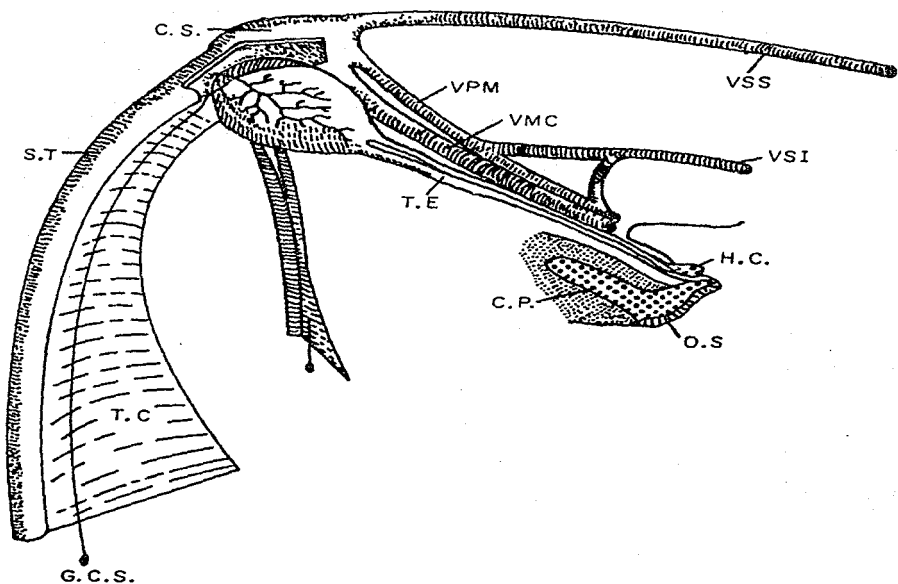


Fig. 2. Inervación autónoma de la Glándula Pineal de la rata. Fibras del ganglio cervical superior (G.C.S.) ascienden a lo largo del tentorium cerebelli (T.C.) para perforar la porción posterior de la pineal. El tracto epifisial (T.E.) se muestra conteniendo una fibra comisural aberrante que se origina en el epitálamo y regresa a esta región sin hacer sinapsis. H.C. comisura habenular; C.P. comisura posterior; C.S. confluencia de los senos; O.S. Órgano subcomisural; S.T. seno transverso; VMC vena cerebri magna; VPM vena proscenefálica mediana; VSI vena sagital inferior; VSS vena sagital superior. (4).

to, algunas fibras nerviosas provenientes del epitálamo entran a la glándula por el tallo pineal (tracto epitalamoepifisiario) (19). Sin embargo, estas fibras ya en el parenquima cruzan la línea media ó giran en 180 grados para regresar al cerebro (20). Es probable que las fibras hayan penetrado a la glándula durante el proceso de invaginación y por lo tanto son aberrantes (20).

La inervación de la pineal es autónoma y en su mayor parte simpática (21); está dada por las fibras post sinápticas que se originan en el ganglio cervical superior homolateral. Las fibras penetran a la glándula a través del nervio coronari y terminan directamente en el pinealocito (22). La norepinefrina es el neurotransmisor postulado en estas terminaciones (23).

En el hombre y en algunos primates, fibras parasimpáticas provenientes del nervio petroso superior penetran también a la pineal y establecen conexión con neuronas intraglandulares. La sección de las fibras parasimpáticas es seguida de degeneración transneuronal de los pinealocitos (24).

LA PINEAL COMO UN TRANSDUCTOR NEUROENDOCRINO

Se considera a la pineal como un "transductor neuroendócrino ya que convierte una entrada nerviosa a una

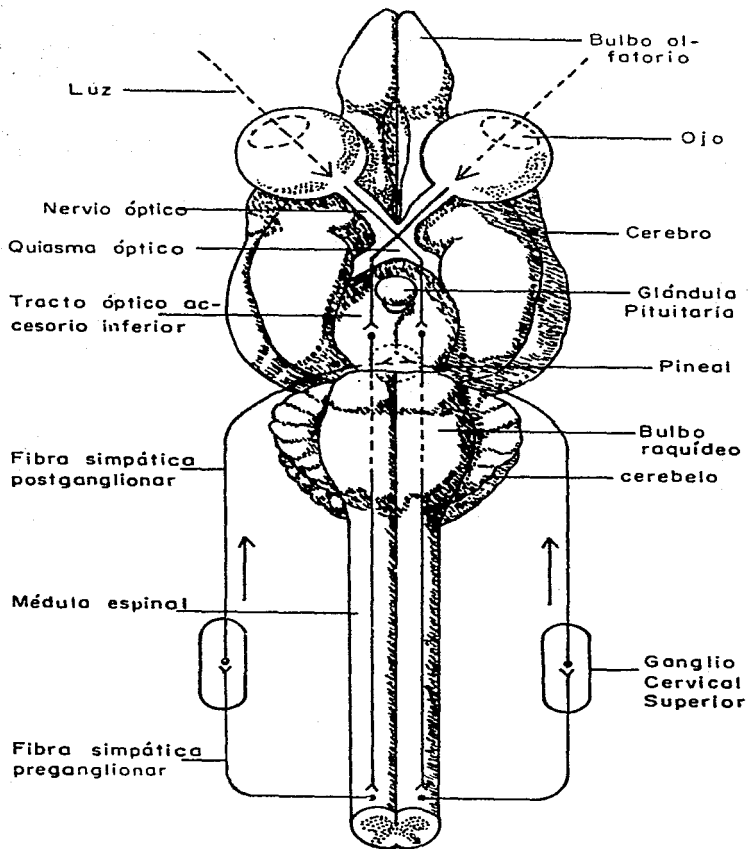
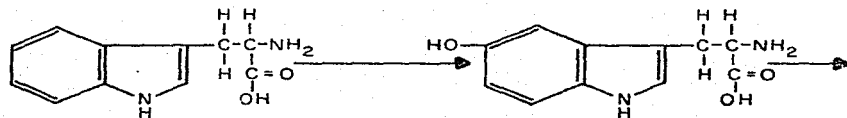


Fig. 3. El estímulo luminoso llega a la pineal a través del Sistema Nervioso Simpático. (109)

salida endócrina (26). En este sentido esta glándula pertenece al mismo tipo que las células hipotalámicas que reciben una señal nerviosa y producen factores de liberación que controlan la actividad de la hipófisis anterior (65). En el sentido clásico la glándula endócrina es un transductor humoral-humoral y la neurona es un transductor neuronal-neuronal (30). La entrada de la información a la glándula está mediada por la liberación de norepinefrina en las terminaciones nerviosas de las fibras postsinápticas del ganglio cervical superior. Estas fibras son la parte final de una vía multisináptica que lleva la información generada en los receptores retinianos por la luz ambiental (fig 3) (27, 28,29). Esta información es transformada en la glándula pineal, a información de tipo químico (humoral) mediante la biosíntesis de melatonina y quizá de otros metoxiindoles (29).

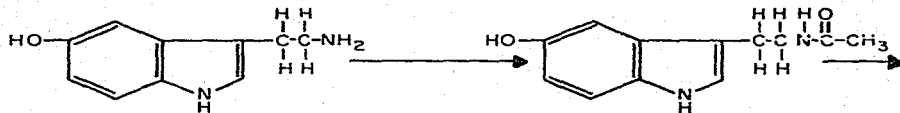
BIOSÍNTESIS DE MELATONINA.

La biosíntesis de la melatonina y de los otros metoxiindoles en la pineal (fig 4) se inicia por la captación por el pinealocito del triptofano circulante. Dentro de la célula, este aminoácido es convertido a 5 hidroxil triptofano por la enzima triptofano hidroxilasa,



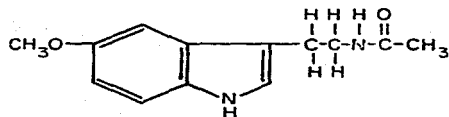
Triptofano

5- Hidroxitriptofano



Serotonina

N- Acetilserotonina



Melatonina

Fig. 4. Biosíntesis de la melatonina

cuya actividad es muy elevada en la pineal (31). El 5 hidroxí triptofano resultante se descarboxila por medio de la descarboxilasa inespecifica de los l-aminoácidos aromáticos (31) para formar la amina correspondiente, la 5- hidroxí triptamina ó serotonina (5HT). La acetilación de la serotonina produce N-acetil serotonina (32). Esta parte de la vía metabólica es común a muchos tejidos del organismo (cerebro, hígado, plaquetas) (33). En los mamíferos, el siguiente paso, la transformación de N-acetil serotonina a melatonina sólo se lleva a cabo en la pineal por la acción de la hidroxí indol orto metil transferasa (HIOMT) (34). La HIOMT presente en el citoplasma de los pinealocitos transfiere el grupo metilo de la S-adenosil metionina al grupo hidroxilo en posición 5 del anillo indólico. Esta enzima también puede orto metilar los productos desaminados de serotonina y convertirlos a los compuestos 5-metoxilados como son el 5 metoxi triptofol y el 5 metoxi indol acético (fig 5) (35). En la pineal de la rata, la actividad de la HIOMT (medida in vitro) es la que muestra menor velocidad de las cuatro enzimas involucradas en la biosíntesis de melatonina (34), lo que sugiere que es la enzima que determina la velocidad a la cual la melatonina es sintetizada "in vivo". Una de las consecuencias fisiológicas importantes de la HIOMT es que convierte indolaminas como la serotonina que no puede

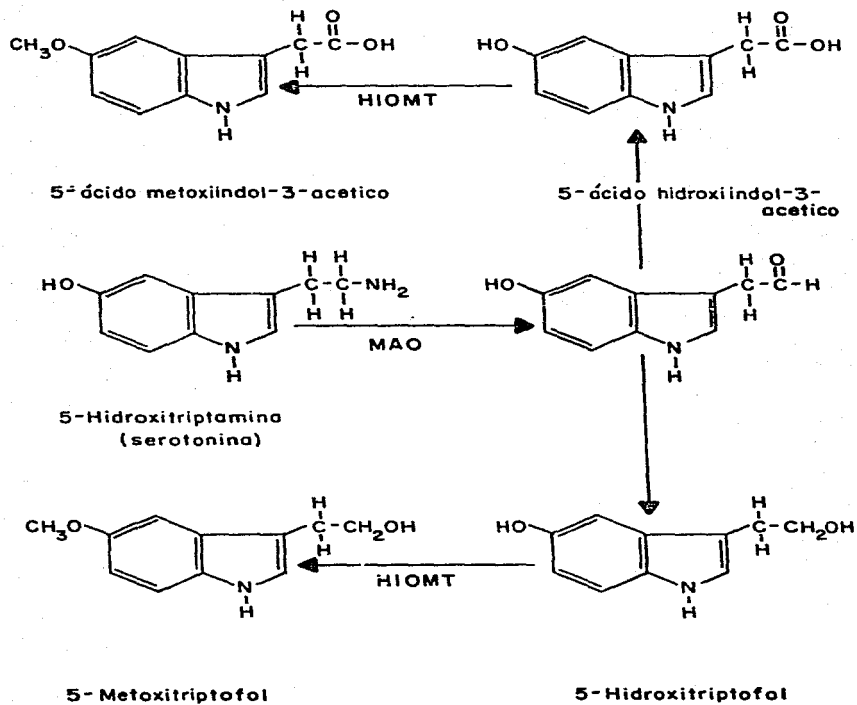


Fig. 5. Metoxiindoles producidos en la Glándula Pineal

cruzar la barrera hemato-encefálica a compuestos como la melatonina que tienen un fácil acceso al cerebro debido a su mayor solubilidad en lípidos (36).

Recientemente, la maquinaria biosintética crítica (HIOMT) ha sido detectada en la glándula de Harder (37) y en la retina de la rata (38).

EFFECTO DE LA LUZ SOBRE LA BIOSINTESIS DE MELATONINA.

La actividad de algunas de las enzimas que participan en la biosíntesis de la melatonina está regulada por la luz: la descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos (39), la N-acetil transferasa (40) y la HIOMT (41).

En la rata, la actividad de la HIOMT muestra un ritmo diario que corresponde al fotoperíodo (41, 42). La actividad de esta enzima es mínima al final del día y aumenta durante las cinco horas siguientes al inicio de la obscuridad, para alcanzar su máxima actividad a la media noche (42). Esta actividad rítmica desaparece al colocar a los animales bajo condiciones de luz continua (42). En los animales mantenidos en obscuridad, hay un aumento en la actividad de esta enzima que se continúa por varios días. El ritmo también se pierde en animales ciegos mantenidos bajo condiciones cíclic-

cas de luz. Debido a ésto se ha sugerido que la actividad rítmica de la HIOMT es una respuesta directa al ciclo luz/obscuridad natural de 24 horas (43).

La entrada de la información luminosa a el pinealocito se lleva a cabo por las terminaciones nerviosas de las fibras provenientes del ganglio cervical superior, las que liberan norepinefrina en la terminación nerviosa-pinealocito (44). El efecto de la norepinefrina sobre la biosíntesis de melatonina se ha comprobado en experimentos "in vitro" (44).

La pineal de la rata, mantiene su actividad enzimática en cultivo por más de 72 horas, en estas condiciones al agregar norepinefrina ($3 \times 10^{-4} M$) se estimula la síntesis de melatonina a partir de triptofano- C^{14} . Asimismo, se observa un aumento de la captación del triptofano por la glándula (45). La serotonina que se encuentra a este nivel no produce ningún efecto (44). El cultivo de pineales en presencia de propanolol y de norepinefrina está mediado por un aumento en la concentración de AMPc ya que en estos experimentos el dibutiril AMP reproduce los efectos de norepinefrina; con aumento concomitante de la actividad de N-acetiltransferasa, pero sin aumentar la captación de triptofano (46).

Por lo tanto, el mecanismo para la formación enzimática de la melatonina es influenciado por la norepi-

nefrina liberada: la norepinefrina estimula la adenil ciclasa y esto produce un incremento en la concentración intracelular del AMP cíclico; el aumento de la - concentración del AMPc incrementa la formación neta de la N-acetil transferasa y de la HIOMT, además de aumentar la poza metabólica del triptofano disponible (46).

En base a la ritmicidad observada en la actividad metabólica de la pineal, se ha propuesto que esta glándula en los mamíferos funciona como parte de un "reloj biológico" que libera señales generadas por cambios en la iluminación ambiental. Esta señal informa a centros en el cerebro los que a su vez, sincronizan otros ritmos biológicos (47).

EL PAPEL FISIOLÓGICO DE LA SECRECIÓN PINEAL.

El conocimiento de la fisiología del producto secretor de la pineal es poco satisfactorio. Aún cuando hay evidencia experimental de que la administración de melatonina es seguida de cambios en la actividad de diversos órganos, no es posible por el momento formular conclusiones generales sobre su papel fisiológico o su efecto farmacológico.

El estudio de los efectos de la melatonina enfrenta tres obstáculos importantes:

1. Por los datos de Axelrod y Wurtman (41, 42) se infiere que bajo condiciones fisiológicas, la melatonina es sintetizada y posiblemente secretada en forma rítmica, por lo tanto, los niveles de secreción hormonal se pueden representar como una onda sinoidal cuya fase está determinada por el fotoperíodo (42). En contraste, la concentración de melatonina en la sangre después de su administración, no reproduce este patrón "normal" de secreción ya que los niveles de melatonina aumentan rápidamente presentando un pico máximo de muy corta duración (48). Este pico es seguido por una rápida caída de tipo exponencial (la vida media de la melatonina en sangre es del orden de minutos) (48). Por lo tanto, si la respuesta de los Órgano blanco a la melatonina depende de su exposición a niveles bajos en forma más o menos continua, es afortunado que respondan a cambios bruscos en la concentración de melatonina.

2. La respuesta de los animales de experimentación a los compuestos pineales o a su ausencia (pinealectomía), varía importantemente con la edad, el sexo, la especie y las condiciones ambientales. Por ejemplo, la pinealectomía tiene poco ó ningún efecto en el peso de las gónadas de los hamsters que han sido mantenidos en condiciones de luz normales, pero si son colocados bajo obscuridad continua el peso de sus testículos está aumentado,

es decir, el procedimiento bloquea la atrofia inducida por la obscuridad (49). De manera semejante, la pinealectomía suprime el crecimiento gonadal en la codorniz sólo cuando se mantienen tanto al grupo experimental como al control, en un medio luminoso, ya que normalmente la luz regula este fenómeno (50).

3. Finalmente, no se conoce si la pineal secreta su hormona directamente a la sangre o al líquido cefalorraquídeo (10).

A pesar de estas restricciones, considerable evidencia indica que los compuestos secretados por la glándula pineal de los mamíferos actúa como señales que modifica la actividad funcional de órganos blanco distantes. Recientemente se ha propuesto al cerebro como el principal órgano blanco de la melatonina (51).

EFFECTOS DE LA MELATONINA ADMINISTRADA.

Los efectos de la melatonina exógena se pueden clasificar en dos grupos principales de acuerdo a el órgano blanco involucrado: a) efectos periféricos y b) efectos centrales.

Los efectos periféricos observados después de la administración de la melatonina agrupan: a la acción sobre músculo liso y a la inhibición de la esteroidogénesis por una acción directa sobre testículos (52). So

bre el músculo liso la hormona causa bronco-dilatación en el perro (53) e inhibición de la contracción espontánea del útero aislado de la rata (54). La melatonina inhibe competitivamente la contracción de músculo liso inducida por la serotonina (duodeno de rata, bronquios de perro y útero de rata) (55).

Los efectos centrales de la melatonina pueden ser subdivididos en aquellos que modifican al Sistema Endócrino y aquellos que influyen al SNC.

La melatonina disminuye la actividad de varias - glándulas endócrinas como el tiroides (56, 57), las gónadas (58, 59, 60), la corteza suprarrenal (61), y la pars intermedia de la pituitaria (62). La información que tenemos acerca del mecanismo de acción de la melatonina sobre el tiroides y la pituitaria son incompletos; sin embargo, es muy probable que dichos efectos estén mediados por el SNC como se piensa para los efectos sobre la actividad gonadal (63, 64, 65). La administración de melatonina inhibe el crecimiento de los ovarios y disminuye la incidencia del estro en ratas maduras (59). Los implantes de melatonina en la eminencia media ó en el mesencéfalo reproducen este efecto al bloquear la liberación de hormona luteinizante (LH) (64). Implantes de 5 metoxi triptofol, otro metoxi indol producido por la glándula pineal, disminuye en nivel de FSH en la hipófisis (65).

La acción de la melatonina exógena sobre el SNC se manifiesta por cambios neurofisiológicos, metabólicos, terapéuticos y conductuales. Aún cuando los estudios en este sentido son escasos, los efectos descritos son semejantes independientemente de la especie estudiada. La administración de melatonina produce un patrón de deactivación electrofisiológico en el pollito (66), en el gato (67) y en los seres humanos (68), en estas especies hay también disminución de los ritmos electroencefalográficos (EEG). En el gato (67), el ratón (69) y en el ser humano se presenta inducción de sueño e incremento en el umbral convulsivo. En el hombre, la modificación del EEG es concomitante a cambios en el talante (68). Recientemente se ha señalado mejoría de la enfermedad de Parkinson por la administración de melatonina (68, 70).

El mecanismo por el cual la melatonina ejerce sus efectos en el cerebro de los mamíferos no está claro, sin embargo la similitud que tienen los diferentes efectos observados sugiere que el mecanismo que regula los efectos electrofisiológicos, neuroendócrinos y en la conducta, es común.

El mecanismo que participa tanto en los efectos en dócrinos centrales como en las manifestaciones neurales observadas después de la administración de la melatoni

na, probablemente involucra modificaciones del metabolismo de los neurotransmisores. Dos horas después de la administración intraperitoneal de 50 µg/kg de melatonina a conejos, se observa un incremento en las concentraciones de ácido gamma amino butírico (GABA) en el hipotálamo, junto con un aumento en las concentraciones de ácido glutámico y glutamina (71).

Cuando se sacrifican ratas a los 90 minutos de haber recibido 150 µg de melatonina, la concentración de serotonina en mesencéfalo se elevó un 63% respecto a los animales controles (72). La concentración de serotonina en corteza cerebral, bulbo olfatorio y tubérculo permaneció dentro de los valores control (72). Las diferencias entre los niveles de serotonina encontradas en corteza y en mesencéfalo después de la administración de melatonina probablemente estén relacionadas al hecho de que aunque la serotonina se encuentra distribuida ampliamente en cerebro, su distribución no es uniforme (73). Este neurotransmisor central se encuentra preferentemente localizado en las neuronas del núcleo de Raphé en el mesencéfalo y en hipotálamo (74).

Existen varias posibilidades por las cuales la melatonina modifica el metabolismo de serotonina en el cerebro. Por ejemplo, el aumento en la concentración de serotonina en el mesencéfalo puede estar causado por una disminución de esta amina en la terminación nervio

sa (mayor liberación) y una subsecuente estimulación en la síntesis de serotonina en el cuerpo de la neurona. Otra posibilidad es que la melatonina eleve las concentraciones de serotonina por un efecto directo sobre el metabolismo neuronal. Recientemente se ha demostrado - que la melatonina aumenta la actividad de la kinasa del piridoxal (75), enzima que participa en la biosíntesis de dopamina, serotonina y GABA ya que es el grupo prostético de la descarboxilasa responsable de su formación (76,77).

Esta observación apoya la hipótesis de que la melatonina pudiera afectar los caminos biosintéticos de serotonina y GABA.

MATERIALES Y METODOS

Se emplearon ratas hembras, de la cepa Wistar, de 170 a 200 g de peso. Cuando menos dos semanas previas al experimento los animales se mantuvieron en condiciones controladas de luz-obscuridad (14-10 hrs), con acceso ad libitum de Purina Chow y de agua.

La melatonina se administró por vía intraperitoneal en una solución de etanol al 1%. Los grupos controles recibieron la solución alcohólica.

Los animales se sacrificaron por decapitación, los cerebros fueron extraídos en un tiempo aproximado de treinta segundos. El manejo posterior del tejido se hizo a 4°C. En los casos en que el cerebro se disecó, las estructuras cerebrales se obtuvieron de acuerdo al método de Glowinski (79).

Sustancias Químicas:

Se utilizaron las siguientes sustancias de grado analítico: Melatonina (Regis). Acido Glutámico (Mallin krodtt). Acido Ascórbico (Sigma). Hidróxido de Hiamina (Amersham). Formaldehído (Merck). Liquifluor (New England Nuclear Corp. -NEN-). Iproniazida (Hoffmann La Roche) Reserpina (Serpasil. Ciba).

Las demás sustancias utilizadas fueron de grado reactivo: Etanol (Sigma). Butanol (Merck). Acido tricloroa-

cético (Baker). NaOH (Baker). FeCl₃ (Merck) EDTA (Sigma). Eter (Merck).

Sustancias radioactivas: dl-ácido glutámico-1C¹⁴ (NEN) (13.1 mc/mM). 5 hidroxí triptofano 3C¹⁴ (NEN) (3.8 mc/mM), dl-3,4, dihidroxí fenil alanina carboxil C¹⁴ (DOPA) (NEN) (3.2 mc/mM).

Resinas: Amberlita CG 50 (malla 200-400) (Dow Chem Co.) Sephadex G 10 (Pharmacia Fine Chemicals). Dowex AG 50 WX 80 (malla 200-400) (Dow Chem Co.)

Antes de su empleo y cuando la técnica así lo ameritaron las resinas se prepararon de la siguiente manera: Amberlita: La resina (454 g) se lavó con dos litros de agua agitando hasta obtener un sobrenadante claro. Después de decantar se agitó durante tres horas con 675 ml de acetona seguido de un lavado con agua por dos horas hasta que la solución estuvo clara. El volúmen final de agua se ajustó con NaOH 10N (40%) a pH 11, agitándose por tres horas. Se lavó nuevamente con agua hasta tener un pH de 10 y se mantuvo durante 12 horas en agitación con 1660 ml de HCl 3.5 N. Nuevamente se lavó con agua y se agitó con 835 ml de buffer de fosfatos, Na/K₂0.2M pH 6.1, llevando el pH a 6.1 con NaOH 10N. Se dejó agitandando por 12 horas. Se lavó con buffer de fosfatos Na/K₂ pH 6.1 hasta obtener en el sobrenadante un pH de 6.1

Dowex: 454 g de resina se lavaron tres veces con dos litros de agua agitando durante 20 min. Posteriormente la resina se agitó durante 12 hrs. con Na OH 2N y se lavó con agua hasta tener pH 7.0. Nuevamente se agitó con HCl por 12 hrs. y se lavó con agua hasta tener un pH de 4-4.5.

Determinación de las enzimas.

La actividad de la descarboxilasa del ácido glutámico se determinó por el método de Roberts (81) modificado por Tapia y col. (82). El cerebro total se homogeneizó en agua (1:4). Se tomó 0.4 ml y se incubaron con buffer de fosfato de sodio 0.08M, pH 6:3; ácido glutámico 0.033M, neutralizado con buffer de fosfato, a pH 6.3 y 0.2 μ c de DL-glutámico 1-C¹⁴. Todo en un volumen final de 1.1 ml.

La incubación se llevó a cabo a 37°C en un dispositivo como el de la fig 6. La mezcla se colocó dentro del tubo y el CO₂-C¹⁴ producido en la reacción es captado por el hidroxido de hiamina colocado en el fondo del frasco. Se incubó durante 30 min. con agitación continua.

La reacción se detuvo con TCA 10% (0.2ml) inyectado a través del tapón y la agitación se continuó por otros 30 min. La hiamina se mezcló con liquifluor en tolueno

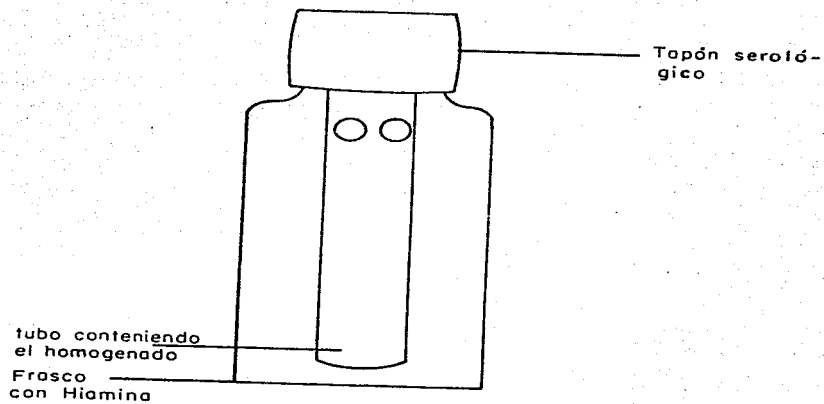


Fig. 6. Dispositivo empleado en la determinación enzimática de las descarboxilasas de ácido glutámico y DOPA.

y la muestra se contó hasta 5000 cpm en un detector de centelleo líquido; en nuestras condiciones, 1000 cpm equivalen a 7.6645 μM de GABA formado por g por hr.

Para la descarboxilasa de 5 hidroxí triptofano (5HTP) se empleó el método de Snyder y Axelrod (83). En este caso, el cerebro se homogeneizó en buffer de fosfatos 0.05M, pH 7.4 (1:150). El medio de incubación contuvo: 0.1 ml de buffer de fosfatos 0.5M pH 7.4; 0.1 ml de sol. de iproniazida (1mg/ml), este es un inhibidor de la monoamino oxidasa agregado para evitar la degradación de la serotonina); 0.05 μc de 5HTP y 0.4 ml del homogenado. El volumen final fue de 0.9 ml.

En tubos cónicos con tapón esmerilado se preincubó la mezcla durante tres minutos a 37°C. Después de agregar el homogenado, se incubó por 30 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 0.5 ml de buffer de boratos 0.5 M pH 10.0. La serotonina C^{14} formada se extrajo en 6 ml de una mezcla butanol:cloroformo, 3:2 y se saturó con NaCl, se agitó durante 10 min. La fase orgánica se lavó con 1.0 ml de buffer de boratos 0.05M pH 10.0 y 4.0 ml de la fase orgánica se transfirieron a un frasco de conteo, se evaporó a sequedad (80°) y se agregó 2 ml de etanol y 10 ml de líquido de centelleo. Se determinó la radiactividad de la manera habitual. 1000 cpm equivalen a 1.858476 μM de 5HT/g de tejido/ hora.

La descarboxilasa de DOPA se determinó con el método de Snyder y Axelrod (83). Como fuente de la enzima se utilizó un homogenado en cerebro total (1:150) en buffer de fosfatos 0.05M, pH 7.4. El medio de incubación consistió en: 0.4ml de homogenado, 0.1 ml de buffer de fosfatos 0.5M pH 7.4 y 0.05 μ c de DOPA C^{14} en un volúmen final de 0.9 ml.

La mezcla se incubó 30 min a 37°y el CO_2 producido se atrapó y midió de la manera descrita para la descarboxilasa del ácido glutámico. 1000 cpm equivalen a 2.63 5467 μ M de DOPA/ g de tejido/ hora.

La determinación de triptofano, serotonina y ácido 5 hidroxí indol acético (5HIAA) se llevó a cabo de acuerdo a la técnica de Díaz (84).

La muestra de tejido se homogeneizó en 6 ml de una solución al 0.5% de ácido ascórbico en HCl 0.1 N. Se centrifugó a 3000 g por 10 min y el precipitado se re-suspendió en 3 ml de la solución ascórbico-HCl y se centrifugó nuevamente. Los dos sobrenadantes se combinaron y se les agregó una gota de EDTA al 2% en agua y se ajustó a pH de 6.9 con NaOH 1N. Se centrifugó a 300 g - por 10 min y el sobrenadante se pasó por una columna de amberlita a pH de 6.1 (2 cm.) la cual se lavó previamente con 5 ml de buffer de fosfatos Na/ K_2 pH 6.1. Una vez que el sobrenadante fué pasado por la columna se agregó 1 ml de agua seguidos de 5 ml de buffer de fosfatos Na/

K_2 0.05M pH 6.1. La serotonina se eluyó con HCl 3.5N (85).

El primer efluente se reajustó a pH 1.5 con HCl 1N y se pasó a través de la columna de sephadex G10 (0.5 g de sephadex en HCl 0.1N) la cual se lavó previamente con 10 ml de una solución de ácido ascórbico al 0.1% en HCl 0.1N. El efluente se recolectó y se pasó por la columna de Dowex (2 cm) previamente lavada con 5 ml de agua. Una vez que la muestra ha pasado por la columna esta se lavó con 50 ml de agua con objeto de eliminar todo el ácido ascórbico. El triptofano y otros aminoácidos se eluyeron con 8 ml de NH_4OH (0.5N). El 5-HIAA queda retenido en la columna de sephadex de donde se eluyó después de un lavado de 4 ml de la sol. HCl-ácido ascórbico con 2.5 ml de NH_4OH 0.02N (86,87).

La serotonina se cuantificó en 3.5N HCl, espectro fotofluorimétricamente (λ de excitación 300, λ de emisión, 540) (88a).

El 5HIAA se extrajo del eluido ajustando a pH 2 con HCl 3.5N y 0.15 ml de ácido ascórbico 10% (para proteger el indol). La mezcla se saturó con NaCl y se le agregó 10 ml de éter libre de peróxidos. Después de agitar 10 min, 8 ml de éter se transfirieron a un tubo conteniendo 2.0 ml de buffer de fosfatos pH 7.0 y 0.2 ml de ácido ascórbico 1%. La solución se agitó por 10 min y se descartó la fase etérea. En la fase acuosa se determinó el 5HIAA formado agregando 0.4ml de HCl 12 N

(para tener una normalidad final de 3.5) fluorimétrica mente (300 exc.- 540 μ emisión).

La cuantificación de triptofano se efectuó convirtiéndolo a harmalano mediante la adición de HCl concentrado (pH de 5.0). A dos ml de esta mezcla se agregó 0.1 ml de FeCl_3 0.01M en TCA 85% y 0.1 ml Formaldehído al 18%; la mezcla se calentó a 100° durante 60 min. El harmalano se extrae después de enfriar la mezcla mediante la adición de 0.3 ml de NaOH 10N y 8 ml de acetato de etilo agitando 10 min. Se centrifugó a 5000 g por 10 min y 6.0 ml del acetato de etilo se transfirieron a un tubo conteniendo 2.0 ml de HCl 0.1M agitando por 10 min y centrifugando nuevamente. El harmalano fluoresce en la solución acuosa a 370 μ de excitación y 540 μ de emisión (89).

El método de Snyder, Axelrod y Zweig (90) también se usó para la cuantificación de serotonina. En este caso, el tejido se homogeneizó en 8 ml de ácido perclórico 0.4N a 4°C. Después de centrifugar a 900 g por 10 min se ajustaron cuatro ml. del sobrenadante a un pH de 10 con NaOH y se transfirieron a un tubo con tapón esmerilado conteniendo: 0.5 ml de buffer de boratos 0.5 M pH 10.0, 1.5 g NaCl y 15 ml de butanol. Los tubos se agitaron por 10 min y se descartó la fase acuosa. La fase orgánica se saturó con NaCl y se agitó por 3 min

en presencia de 2 ml de buffer de boratos 0.1M pH 10.0. La mezcla se centrifugó a 900 g por 10 min y a 10 ml de la fase orgánica se agregaron 2.0 ml de buffer de fosfatos 0.05M pH 7.0 y 15 ml de heptano.

Después de agitar 5 min el tubo se centrifugó, - 1.5 ml de la fase acuosa se transfirieron a un pequeño tubo conteniendo 0.1 ml de solución de ninhidrina 0.1 M y los tubos se calentaron por 30 min a 75°. Treinta min. después se leyó fluorométricamente a 385-409 mu.

Para la cuantificación de triptofano también se usó un método de extracción (89) en el cual el tejido se homogeneizó en HClO_4 0.4N (1:40) y se centrifugó a 2000 g por 10 min. A cuatro ml del sobrenadante se agregaron 0.1 ml de FeCl_3 0.1M en HCl. Esta mezcla se calentó durante 1 hr a 100°; después de enfriar se agregó 0.2 ml de NaOH 10N y 7.5 ml de acetato de etilo, agitando por 10 min y el triptofano se extrae en la fase acuosa. La concentración se mide fluorimétricamente a 373-452 mu.

En todos los experimentos, tanto en las determinaciones de la actividad de las diferentes descarboxilasas como en la cuantificación de serotonina, triptofano y 5HIAA se corrieron los blancos adecuados. En algunos experimentos se corrieron también recuperaciones.

RESULTADOS

Como se muestra en la tabla 1, después de la administración de melatonina, la actividad de las descarboxilasas del ácido glutámico, del 5HTP y de la DOPA no se modifican, aunque se aprecia una tendencia a su disminución que en ningún caso resultó significativa. La falta de cambios se observaron con rangos de dosis de 0.001 mg/k a 4.0 mg/k de peso y con tiempos de sacrificio que variaron entre 10, 15, 20, 30, 40, 45 min después de la administración de melatonina.

La distribución de estas enzimas no es uniforme en todo el cerebro (la descarboxilasa de los aminoácidos -aromáticos se encuentra preferentemente en el tallo cerebral, el hipotálamo, la formación reticular y en la base del tálamo (92)). Si a esto se añade el hecho de que la melatonina produce cambios diferentes tanto en la concentración de GABA como de serotonina de acuerdo con la estructura cerebral estudiada (71,72), se decidió estudiar la actividad de estas enzimas en la corteza y en el mesencéfalo ya que existía la posibilidad de que el cambio se enmascarara por el uso de homogenados de cerebro completo. La descarboxilasa del ácido glutámico y la de 5HTP no mostraron cambios en estas regiones (tabla 2).

También se exploró la posibilidad de que las enzimas se encontraran saturadas por el cofactor (fosfato de piridoxal) de manera diferente, in vivo, en los animales tratados con melatonina que en los animales control. Esta posibilidad se exploró midiendo la actividad de la descarboxilasa de DOPA y la de 5HTP ante diferentes concentraciones de fosfato de piridoxal. Los resultados no mostraron diferencias (tabla 3).

En ninguno de los experimentos efectuados se observó aumento en la concentración de serotonina después de la administración de melatonina (tabla 4 y 5). Con objeto de descartar la posibilidad de que esta falla en nuestros experimentos, con respecto a los descritos en la literatura, fuera debida a las diferencias en el método empleado, se corrieron experimentos paralelos con el método descrito en el trabajo original (72) y con el ahora empleado (84). También se probó este último - contra la acción de neurofármacos cuya acción es bien conocida (93,94). Con ninguno de los dos métodos se pudo observar incremento significativo en los valores de serotonina después de la administración de melatonina (tabla 6). La administración de iproniazida que es un inhibidor de la monoamino oxidasa y de reserpina que es un depletor de monoaminas, se acompañó del aumento y la disminución correspondientes de serotonina (tabla 6). Por tanto, consideramos que en nuestras condiciones

experimentales es válido aceptar que no hay cambios en los niveles de serotonina después de la administración de melatonina.

Como se observa en las tablas 4 y 5, tanto los niveles de triptofano en mesencéfalo como los de 5HIAA en homogenados de cerebro completo hay un aumento significativo ($P < 0.02$ para triptofano y $P < 0.001$ para 5HIAA) en sus concentraciones. Estos resultados fueron observados con los dos métodos empleados.

TABLA 1. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS DESCARBOXILASAS EN HOMOGENADOS DE CEREBRO COMPLETO.

DESCARBOXILASA	CONTROL	MELATONINA
ácido glutámico	9080 ± 273	8146 ± 412
5 hidroxil triptofano	886 ± 45	973 ± 91
DOPA	2076 ± 363	1503 ± 186

Grupos de 6 ratas recibieron 0.4 mg/k de peso de melatonina por vía intraperitoneal. Los animales se sacrificaron 30 min después. Los datos están expresados en CPM ± error estándar.

TABLA 2. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS DESCARBOXILASAS DEL ACIDO GLUTAMICO Y DEL 5 HIDROXI TRIPTOFANO EN DIFERENTES REGIONES CEREBRALES.

DESCARBOXILASA	GRUPO	CORTEZA	MESENCEFALO
ACIDO GLUTAMICO	CONTROL	4555 \pm 99	4182 \pm 77
	MELATONINA	3763 \pm 278	3847 \pm 1
5 HIDROXI TRIPTOFANO	CONTROL	788 \pm 88	1224 \pm 148
	MELATONINA	802 \pm 77	976 \pm 84

Grupos de 5 ratas recibieron intraperitonealmente 1 mg/k de peso de melatonina. Los animales fueron sacrificados 30 min después. Los datos expresados en CPM \pm error estándar.

TABLA 3. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA ACTI-
 VIDAD DE LA DESCARBOXILASA DE DOPA.

Grupos	Sin fosfato de piridoxal	Con fosfato de piridoxal
CONTROL	2557 \pm 684	5228 \pm 684
MELATONINA	2434 \pm 41	4640 \pm 742

Grupos de 5 ratas recibieron 0.1 mg/k de peso de mela-
 tonina por vía intraperitoneal. Los animales se sacri-
 ficaron 30 min después. El medio contenía 0.1 ml de
 solución de fosfato de piridoxal (1 mg/ml). Los datos
 están expresados en CPM \pm e.s.

TABLA 4. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LOS NIVELES DE TRIPTOFANO, SEROTONINA Y ACIDO 5 HIDROXI INDOL ACETICO EN CEREBRO COMPLETO.

GRUPOS	NIVELES DE TRIPTOFANO	NIVELES DE SEROTONINA	NIVELES DE 5HIAA
CONTROL	3.044 \pm 0.624*	0.515 \pm 0.0658*	0.141 \pm 0.012**
MELATONINA	4.4632 \pm 0.442	0.6683 \pm 0.0707	0.5177 \pm 0.032

Grupo de 5 ratas recibieron 200 ug de melatonina. Los animales fueron sacrificados 60 min después. Datos expresados en μ g de compuesto/g de tejido \pm error estándar. * P < 0.1, ** P < 0.001.

TABLA 5. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LOS NIVELES DE TRIPTOFANO, SEROTONINA Y ACIDO 5 HIDROXI INDOL ACETICO EN MESENCEFALO.

GRUPOS	μg DE TRIPTOFANO/ g DE TEJIDO	μg DE SEROTONINA/ g DE TEJIDO	μg DE 5HIAA/ g DE TEJIDO
CONTROL	2.834 \pm 0.3819*	1.8890 \pm 0.2423*	0.7250 \pm 0.2303
MELATONINA	4.4632 \pm 0.441	2.075 \pm 0.158	0.5984 \pm 0.0578

Grupos de 5 ratas recibieron intraperitonealmente 200 μg de melatonina. Los animales fueron sacrificados 60 min después. *P < 0.02, *P < 0.1

TABLA 6. EFECTO DE DIFERENTES FARMACOS SOBRE LA CON
CENTRACION DE SEROTONINA EN EL CEREBRO DE LA RATA.

	μg serotonina/ g de tejido
CONTROLES	0.5335 \pm 0.0682
MELATONINA	0.4923 \pm 0.0622*
IPRONIAZIDA	0.7167 \pm 0.0460**
RESERPINA	0.2966 \pm 0.0037***

Grupos de tres ratas recibieron intraperitonealmente 200 μg de melatonina, 75 mg/K de peso de iproniazida y 2.5 mg/k de peso de reserpina. Los animales fueron sacrificados para melatonina a los 60 min; para iproniazida a los 120 min y para reserpina a los 60 min. Los datos están expresados en μg de serotonina/ g de tejido húmedo \pm error estándar.

* P < 0.5, ** P < 0.01, *** P < 0.05.

DISCUSION

Los efectos que sobre la actividad del SNC tienen los diferentes metoxiindoles pineales y en especial la melatonina, sugieren que este tipo de compuestos modulan la actividad de los mecanismos serotoninérgicos cerebrales; bloqueo de secreción de LH (64), inducción de sueño (68), bloqueo en la integración de la crisis convulsiva (70), etc. Experimentos (71,71) en los que se ha demostrado que la administración de melatonina produce incremento en la concentración de serotonina en las estructuras que contienen a las neuronas serotoninérgicas (núcleo de Raphé en mesencéfalo y el hipotálamo) y discreta disminución en las regiones que reciben los axones de estas estructuras (corteza cerebral), proveen de un apoyo adicional para esta hipótesis.

Sin embargo, ya que los datos experimentales obtenidos en una especie no son posibles de ser extrapolados a otra (por ej., es bien sabido que el sueño de ondas lentas es serotoninérgico en los mamíferos inferiores (95) y dependiente de catecolaminas en el hombre (96)), y la escasa información que se tiene acerca de los mecanismos mediante los que la melatonina modifica la actividad de las neuronas serotoninérgicas (la concentración de un neurotransmisor no provee de información acerca de la actividad fisiológica ni de los meca

nismos del cambio) estas hipótesis deben ser tomadas con precaución.

Los experimentos aquí descritos fueron diseñados con el objeto de obtener información sobre los posibles mecanismos mediante los cuales la melatonina modifica la actividad de las neuronas serotoninérgicas. Algunos de los resultados fueron negativos, el resto refuerza la hipótesis de que la melatonina modifica el metabolismo de la serotonina cerebral, ya que los niveles de - - triptofano cerebral se encuentran elevados en las estructuras cerebrales que sintetizan serotonina y en las - - áreas con terminaciones de tipo serotoninérgico hay un incremento en la concentración de su catabolito, el 5-HIAA.

Con el objeto de discutir los resultados se revisará brevemente la vía metabólica de la serotonina cerebral, las dificultades que entraña su valoración y sobre este esquema, los resultados obtenidos.

La primera etapa en la biosíntesis de serotonina la constituye la captación del aminoácido triptofano de la circulación. Los niveles de triptofano en plasma y en cerebro presentan fluctuaciones diarias (98). La primera transformación en la biosíntesis de serotonina involucra la hidroxilación en posición 5 del triptofano para formar el 5HTP. Este aminoácido, al igual que el de DO

PA, se descarboxila por medio de la descarboxilasa de los l-aminoácidos aromáticos para formar la amina biogénica, serotonina. No se sabe si la hidroxilasa del triptofano juega el mismo papel que la hidroxilasa de la tirosina en la síntesis de catecolaminas. Cinéticamente es poco probable debido a que los niveles de triptofano cerebral son bajos y el Km para la hidroxilasa del triptofano es bastante superior que para la hidroxilasa de la tirosina (99). Por tanto, el nivel al cual la hidroxilasa del triptofano está saturada es más significativo en la velocidad de síntesis de serotonina, que la cantidad de enzima presente en la neurona. No se conoce si la hidroxilasa del triptofano está sujeta a una inhibición por producto final (serotonina).

El principal camino para el catabolismo de la serotonina involucra la deaminación oxidativa (catalizada por la monoamino oxidasa); el aldehído resultante puede ser oxidado a 5HIAA ó reducido a 5 hidroxí triptofol (100). No se conoce tampoco si la serotonina liberada de las terminaciones nerviosas es inactivada por reincorporación a la membrana sináptica.

Las dificultades en la valoración de esta vía son:

1. El conocimiento incompleto acerca de los procesos morfológicos y metabólicos que participan en el control fisiológico de la biosíntesis de las monoaminas (inhi

bición por retroalimentación, inactivación).

2. No se tiene evidencia que certifique que las aminas biogénicas se encuentran almacenadas en vesículas en la terminación sináptica como en el caso de la acetil colina. Este es un punto necesario en los estudios de recambio para poder considerarlo como un sistema abierto donde el recambio representa el equilibrio de flujo en el cual la síntesis y transporte al compartimiento metabólico es igual a su degradación y salida.

3. Al estudiar el efecto de las drogas no se puede aceptar axiomáticamente que la droga no cambia el proceso de transporte o de mezclado (78).

El aumento en la concentración de triptofano en mesencéfalo después de la administración de melatonina implicaría el favorecer la síntesis de serotonina, sin embargo, la poza de triptofano cerebral también provee de este aminoácido para la síntesis de proteínas. El mecanismo por el cual se incrementa el nivel de triptofano cerebral no es conocido, es posible que implique un mayor transporte de triptofano circulante a la neurona. Indirectamente este dato puede ser apoyado por experimentos en los que se ha demostrado que ratas sometidas a manipulación en el triptofano de la dieta, este mecanismo es el que opera para la regulación de la síntesis de serotonina cerebral (101). Además drogas como -

reserpina, anfetamina, carbonato de litio, etc, que afectan la velocidad de síntesis de la serotonina, incrementan los niveles de triptofano en cerebro (102).

Los bajos niveles de 5HTP cerebrales implican que su descarboxilación es muy rápida (103). Esta descarboxilasa es la misma que actúa sobre la DOPA (92) y al igual que la descarboxilasa del ácido glutámico es dependiente del fosfato de piridoxal (104). La administración de melatonina produce un aumento en la actividad de la kinasa del piridoxal, sin embargo, los experimentos aquí realizados no mostraron diferencias en la actividad de las descarboxilasas. Aunque la descarboxilasa del 5HTP no es reguladora de la velocidad de biosíntesis de este neurotransmisor, se han observado cambios en la actividad cuando se inyecta reserpina (que depleta los niveles de serotonina y aumenta su velocidad de síntesis y catabolismo) (105).

La actividad de la kinasa del piridoxal es influida por cambios en los niveles de serotonina, dopamina y norepinefrina (106). Después de la administración de iproniazida, 5HTP u otras sustancias que incrementan las concentraciones de serotonina (106), la actividad de la kinasa disminuye (106), sugiriendo una posible autoregulación. Sin embargo, el alto nivel de recambio que tiene este cofactor, que por lo demás participa en otras

muchas descarboxilaciones, unido al hecho de que la -
iproniazida por ejemplo, tiene otros efectos sobre la
actividad metabólica cerebral, dificulta la interpre-
tación de este hallazgo, por lo que este posible pa-
pel regulador del fosfato de piridoxal puede ser muy
discutido.

En nuestros experimentos la valoración de esta -
etapa implicó dificultades adicionales: por las condi-
ciones "in vitro" suponemos que la enzima trabaja en
condiciones óptimas (concentración de saturación para
el sustrato, pH óptimo, etc.) (81). Además, la estruc-
tura celular ha sido destruída ya que los experimentos
se efectuaron en homogenados de cerebro completo.

El producto catabólico de la serotonina, el 5HIAA
se encontró elevado sólo en los homogenados de cere-
bro completo y no el mesencéfalo. Las concentraciones
de 5HIAA en un momento dado dependen de la velocidad a
la cual se destruye la serotonina y de la velocidad a
la que es eliminada del tejido. Los niveles son en ge-
neral bajos debidos a que el mecanismo de transporte es
extraordinariamente rápido. De hecho, en nuestras con-
diciones experimentales se bloquea este transporte con
probenacida con objeto de medir la velocidad a la que
se acumula este catabolito. Es probable que el incremen-
to observado en 5HIAA sea debido a su mayor utilización

al nivel de la terminación sináptica y no por inactivación de la serotonina en el soma de la neurona. De hecho, la porción mesencefálica en la cual se encuentran prácticamente la totalidad de las neuronas con capacidad de síntesis de serotonina (73, 74) no mostró ningún cambio.

El incremento en la concentración de triptofano en mesencéfalo y el aumento de 5HIAA en las terminaciones nerviosas refuerza la hipótesis de que la administración de melatonina modifica el metabolismo de la serotonina.

El que en nuestras manos la concentración de la serotonina se encuentre dentro de límites semejantes a los valores control no invalida los resultados señalados en la literatura ni la posibilidad del efecto de esta hormona sobre su metabolismo, aún cuando experimentos en los que se midan tanto la velocidad de síntesis como el recambio de serotonina "in vivo", son indispensables.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue desarrollada en el Departamento de Neurobiología del Instituto de Investigaciones - Biomédicas, U.N.A.M. bajo la dirección del Dr. Fernando Antón Tay, a quien agradezco la ayuda y colaboración brindada. Asimismo, quiero expresar mi agradecimiento al Dr. José Luis Díaz y a mi compañera - Armida Baez por la ayuda técnica que permitió una mejor realización para el presente trabajo.

De igual forma quiero expresar mi más sincero reconocimiento al Dr. Ricardo Tapia y a su grupo, a Ma. Elena Sandoval, Socorro Soberón, Dr. Augusto Fernández Guardiola y al Dr. Luis Cañedo cuyo estímulo, guía y cariño fueron factores decisivos en esta etapa de mi formación profesional.

Patricia Ileana Joseph Bravo

REFERENCIAS

1. Kitay, J. I. y Altschule, M.D. "The Pineal Gland" University Press, Cambridge, Mass. (1954).
2. Heubner, O. Deutsh., Med Wschr. 24 (Vereins-Beilage, No. 29): 214, (1898).
3. Lerner, A.A. y Case J.D., J. Amer. Chem. Soc. 81, 6084 (1959).
4. Kappers, J.A. En: Kappers y J.P. Schade (eds) Progress in Brain Research. Elsevier Publishing Co. Amsterdam, 10, 87 (1965).
5. Wurtman, R.J. y Altschule, M.D., Amer. J. Physiol. 197, 108 (1959).
6. Bregmann, W., The Calcified Pineal Gland. Assen: van Gorcum (1940).
7. Wurtman, R.J., Axelrod, J. y Kelly, D. En: The Pineal Academic Press (1968).
8. Kelly, D.E., Progr. Brain Res. 10, 270, (1965).
9. Bargmann, W. En: Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen, IV/4, ed Möllendorff, E., von. Berlin: Springer (1943).
10. Kappers, J.A. En: The Pineal Gland. G.E.W. Wolstenholme J. Knight (eds). Churchill Livingstone (1971).
11. Kitay, J.I., The Pineal Gland, Harvard University Press Cambridge, Mass. (1954).
12. Dodt, E.J., Neurophysiol. 26, 752 (1963).

13. Orsche, A. y Kischstein, H., Z. Zellforsch. mikosk. Anat. 87, 159 (1968).
14. Orsche, A. y Vaupel-von Harnack, M., Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat. 68, 389 (1965).
15. Arstila, A.U. y Hopsu, V.K., Ann. Acad. Sci. Fennicae. Ser. A II 113, 3 (1964).
16. Quay, W.B., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 121, 946 (1966)
17. Quay, W.B., J. Histochem. Cytochem. 5, 145 (1957).
Quay, W.B., Gen. Comp. Endocrinol. 1, 211 (1961).
18. Bayerova, G. y Bayer, A., Acta Histochem. 10, 276 (1960)
Dill, R.E., Acta Anat. 54, 310 (1963).
19. Moore, R.Y., Heller, A., Bhatnagar, R.K., Wurtman, R.J.
y Axelrod, J., Arch. Neurol. 18, 208 (1968).
20. Hayhow, W.R. Welb, C. y Jerrie, A., J. Comp. Neurol. 115,
187 (1960).
21. Kappers, J.A., Z. Zellforsch. Anat. Mikroslop. 52, 163
(1960).
22. Wolfe, D.E., Prog. Brain Res. 10, 332 (1965).
Arstila et al ref 15.
23. Wurtman, R.J., Larin. F., Axelrod, J., Shein, H.M. y
Rosasco, K., Nature 217, 953 (1968).
24. Kenny, G.C.T., J. Neuropath. exp. Neurol. 20, 563 (1961)
25. Kappers, J.A., J. Neuro-visc. Rel. Suppl. 9, 140 (1969).
26. Wurtman, R.J. y Antón-Tay, F., Rec. Progr. in Hormone
Res. 25, 493 (1969).

27. Axelrod, J., Shein, H.M. y Wurtman, R.J., Proc. Natn. Acad. Sci.(U.S.A.) 62, 544 (1969).
28. Moore, R.Y., Heller, A., Bhatmagar, R.K., Wurtman, R.J. y Axelrod, J., Archs. Neurol.- Chicago 18, 208 (1968).
29. Axelrod, J. y Wurtman, R.J., Advances in Pharmacol. 6, Part. A 157 (1968).
30. Wurtman, R.J., En: The Neurosciences: Second Study Program F.O. Schmitl. Ed. Rockefeller Univ. Press. (1970).
31. Lovenber, W., Jequier, E. y Sjoerdsma, A., Science 155, 217 (1967).
- 31a. Snyder, S.H. y Axelrod, J., Science 194, 542 (1965)
32. Weissbach, H., Redfield, B.G. y Axelrod, J., Biochem. Biophys. Acta 43, 352 (1960).
33. Garattini, S. y Valzelli L., En: Serotonina. Elsevier (1965).
34. Axelrod, J. y Weissbach, H., Science 131, 1312 (1960).
35. McIsaac, W.M., Taborsky, R.G. y Farrell, G., Science 145, 63 (1964).
36. Anton-Tay, F. y Wurtman, R.J., Nature 221, 5179, 474 (1969).
37. Cardinali, D.P. y Wurtman, R.J., Endocrinology (9 72). En Prensa.
38. Cardinali, D.P. y Rosner, J.M., Endocrinology 89, 301 (1971).

39. Snyder, S.H., Axelrod, J., Wurtman, R.J. y Fischer, J.E., J. Pharmacol. Exptl. Therap. 147, 371 (1965).
40. Klein, D.C., Berg, G.R. y Weller, J., Science 168, 979 (1970).
41. Axelrod, J. y Weissbach, H. J., Biol. Chem. 236, 211 (1961).
42. Wurtman, R.J., Axelrod, J. y Fisher, J.E., Science 143 1329 (1964).
43. Axelrod, J., Snyder, S., Heller, A. y Moore, R.Y., Science 154, 898 (1966).
Fiske, U.M., Bryant, G.K. y Putnam, J., Endocrinology 66, 489 (1960).
44. Wurtman, R.J., Larin, F., Axelrod, J., Shein, H.M. y Rosasco, K., Nature 217, 953 (1968).
45. Axelrod, J., Shein, H.M. y Wurtman, R.J., Proc. Nat. Acad. Sci.(U.S. A.) 62, 544 (1969).
Shein, H.M. y Wurtman, R.J., Science 166, 519 (1969).
46. Shein, H.M., En: The Pineal Gland. Ciba Foundn. Symp. Wolstenholme, G.E.W., Knight, J. Churchill Livingstone 197, (D 71).
47. Axelrod, J. y Wurtman, R.J., Probleme actuels d'endocrinologie et de nutrition Série No. 10
48. Kopin, I.J.C., Pare, M.B., Axelrod, J. y Weissbach, H., J. Biol. Chem. 236, 3072 (1961).
49. Reiter, R.J. y Hester, R.J., Endocrinology 79, 1168 (1966).

50. Saylor, A. y Wolfson, A., Science 158, 1478 (1967).
51. Ant6n-Tay, F. En: The Pineal Gland Ciba Foundn. Symp. Wolstenholme, G.E.W., Knight, J., Churchill Livingstone 213, (1971).
52. LeGrande, C.E. Endocrinology 90, 17 (1972).
53. Kveder, S. y McIsaac, W.M., J. Biol. Chem. 236, 3214 (1961).
54. Quastel, M.R. y Rahaminoff, R. Brit. J. Pharmacol. 24, 455 (1965).
55. Hrtz-Eachel, J. y Rahaminoff, R., Life Sci. 4, 1367
56. Narang, G.D., Singh, D.V. y Turner, C.W., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 125, 184 (1967).
57. DeProspero, N.D., De Martino, L.J. y McGuinness, E.T., Life Sci. 7, 183 (1968).
58. Kappers, J.A., Gen-Camp. Endocrinol. 2, 16 (1962).
59. Wurtman, R.J., Axelrod, J. y Chu, E.W., Science 141, 277 (1963).
60. Sorrentino, S., Anat. Record. 160, 432 (1968).
61. Motta, M., Schiaffini, O., Piva, F. y Martini, L., En: The Pineal Gland (G.E.W. Wolstenholme J. Knight eds) P. 279 A. Churchill Livingstone London (1971).
62. Kastin, A.J. y Shally, A. V., Nature 213, 1238 (1967).
63. Clementi, F., Virgilis, G., Frascini, F. y Mess, B., Proc. 6th. Intern. Congr. Electron Microscopy, Kyoto

Abstract Maruzen Co., Ltd. Tokyo. (1966).

64. Frascini, F., Mess, B., Piva, F. y Martini, L.,
Science 159, 1104 (1968).
65. Martini, L., Frascini, F. y Motta, M., Recent.
Progr. Hormone Res. 24, 439 (1968).
66. Hishikawa, Y., Cramer, H. y Kuhlo, W., Exp. Brain.
Res. 7, 84 (1969).
67. Marazynski, T.J., Yamaguchi, N., Ling, C.H. y
Godzinska, Experientia 20, 435 (1964).
68. Antón-Tay, F., Díaz, J.L. y Fernández-Guardiola, A.,
Life Sci. 10, 841 (1971).
69. Barchas, J., Da Costa, F. y Spector, S., Nature 214,
919 (1967).
70. Antón-Tay, F. y Fernández-Guardiola, A. En: The Pineal
Gland, (1972) Workshop, En Prensa.
71. Antón-Tay, F., Ortega, B. y Cruz, R.M. Observaciones
no Publicadas (1966).
72. Antón-Tay, F., Chou, C., Antón, S. y Wurtman, R.J.,
Science 162, 277 (1968).
73. Dahlstrom, A. y Fuxe, K., Acta Physiol. Scand. 62,
Suppl. 232 (1964).
74. Anden, N.E., Dahlstrom, A. y Fuxe, K., Acta Physiol.
Scand. 67, 313 (1966).
75. Antón-Tay, F., Sepúlveda, J. y González, S., Life Sci.
9, 1283 (1970).

76. McCormick, D.B. y Snell, E.E., Proc. Natn. Acad. Sci. (U.S.A.) 45, 1371 (1959).
77. Roberts, E., Rothstein, M. y Baxter, C.F., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 97, 796 (1958).
78. Costa, E. y Neff, N.H., Handbook of Neurochemistry 4, 45 (1970).
79. Glowinski, J. e Iversen, L., J. of Neurochem. 13, 655 (1966).
81. Roberts, E. y Simonsen, D.G., Biochem. Pharmacol. 12, 113 (1973).
82. Tapia, R., Pasantes, H. y Massieu, G., J. of Neurochem. 17, 921 (1970).
83. Snyder, S.H. y Axelrod, J. Biochem. Pharmacol. 13, 805 (1964).
84. Díaz, J.L. y Juttunen, M.O., Science 174, 62 (1971).
85. Jonsson, J. y Lewander, T., Acta Physiol. Scand. 78, 43 (1970).
86. Bogdanski, D.F., Pletscher, A. y Brodie, B.B., Udenfriend, J., Pharmacol. Exp. Ther. 117, 82 (1956).
87. Welch, A.S. y Welch, B., Anal. Biochem. 30, 161 (1969).
88. Lin, R.C., Ngai, S.H. y Costa, E., Science 166, 237 (1969).
89. Denkla, W.D. y Dewey, H.K., J. Lab. Clin. Med. 69, 169 (1967).
90. Snyder, S.H., Axelrod, J. y Zweig, M., Biochem. Pharmacol. 14, 831 (1965).

92. Lovenberg, W., Weissbach, H. y Udenfriend, S.J., Biol. Chem. 237, 89 (1962).
93. Udenfriend, S. y Weissbach, H., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 97, 748 (1958).
94. Carlsson, A., Handbook of Experimental Pharmacology. Ed. Eichler O., 19, 529, Springer Berlin (1965).
95. Jouvét, M. En: Sleep and Altered States of Consciousness, S.S. Kety, E.V. Evarts, H.L. Williams, Eds. (Williams and Wilkins, Baltimore, 1967)
96. Matsumoto, J. y Jouvét, M., Compt. Rend. Soc. Biol. 158, 2135 (1964).
98. Wurtman, R.J., Rose, C.M., Chou, C. y Javin, F.N., Engl. J. Med. 279, 171 (1958).
99. Lovenberg, W., Jequier, E. y Sjoerdsma, A., Advan. Pharmacol. 6A, 21, (1968).
100. Weissbach, H., Redfield, B.G. y Udenfriend, S.J., Biol. Chem. 229, 953 (1957).
101. Fernstrom, J. J. y Wurtman, R.J., Science 173, 149 (1971)
102. Tagleamonte, A., Tagleamonte, P., Pérez Cruet, J. y Gessa, G., Nature 229, 4, 125 (1971).
103. Buzard, J.A. y Nitch, P.D., J. Biol. Chem. 227, 225, (1957).
104. Green, D.E., Leloir, L.P. y Noato, V.J., J. Biol. Chem. 161, 559 (1945).
105. Mirolli, M., Camp. Biochem. Physiol. 24, 847 (1968).

106. Ebadi, M.S., Russell, R.L. y Noe Cog, E.E., J. of Neurochem. 15, 659 (1968).
107. Wurtman, R.J., y Axelrod, J., Sci. Am. 213, 1, 50 (1965)
108. Wurtman, R.J., Endocrine Pathology 117, (1968)
109. Wurtman, R.J., Hospital Practice 4, 1, 32 (1969)