

11281
201
5

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

" MODIFICACION DE LA ACTIVIDAD UNITARIA DEL HIPOTALAMO
INDUCIDA POR LA APLICACION SISTEMICA
Y LOCAL DE MELATONINA EN RATAS "

Tesis que presenta:

M. en C. Bertha Prieto Gómez

para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

AREA: FISILOGIA

ASESOR: DR. EN C. CRUZ REYES VAZQUEZ.

OTONO DE 1989.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Página.
Resumen.....	3
Abstract.....	4
Prólogo.....	5
Introducción.....	8
Experimento I	
"Acciones de la melatonina sobre 3 diferentes regiones hipotalámicas".....	36
Método.....	36
Resultados.....	41
Experimento II	
"Efecto de la aplicación por micropresión de melatonina, 5-hidroxitriptofol y 5-metoxitrip- tofol en el hipotálamo lateral".....	47
Método.....	48
Resultados.....	52
Experimento III	
"Efectos de la melatonina y del 5-metoxi- triptofol sobre la actividad unitaria del hipotálamo lateral en animales pretratados con reserpina, 6-hidroxi dopamina y 5,7-di- hidroxitriptamina".....	57
Método.....	57
Resultados.....	59
Discusión.....	65
Bibliografía.....	77

RESUMEN

A pesar de que múltiples estudios han mostrado que la melatonina, principal hormona de la glándula pineal, posee importantes efectos, no sólo de índole endocrino sino también de tipo conductual, se desconoce con exactitud que estructuras nerviosas son afectadas por esta neurohormona y cual es el mecanismo celular utilizado para provocar estas acciones. Una forma de enfocar el problema, consistiría en analizar el efecto que esta hormona posee sobre la actividad eléctrica celular; si se considera que las modificaciones de este parámetro celular anteceden de alguna manera a los cambios en la secreción tanto de neurotransmisores como de hormonas. Adicionalmente, el empleo de otros derivados de la melatonina, así como la aplicación de otros fármacos, puede ser útil para discriminar un posible mecanismo de acción. Con estos planteamientos en mente, decidimos emprender este estudio, el cual consta de tres diferentes experimentos. Inicialmente, determinamos el efecto de la aplicación intravenosa de varias dosis de melatonina (100, 250, 500 y 1000 µg/Kg) sobre la frecuencia de descarga de 3 diferentes regiones del hipotálamo: anterior, lateral y posterior. Los experimentos se realizaron en animales anestesiados, registrándose la actividad unitaria durante 80 min. En este experimento se utilizó sólo una rata por unidad registrada. En el segundo experimento realizamos la aplicación tópica por micropresión de melatonina, 5-hidroxitriptofol y 5-metoxitriptofol sobre las neuronas del hipotálamo lateral. Nuevamente, analizamos el efecto de estas sustancias sobre la actividad unitaria. Finalmente, en el 3er. experimento, observamos los efectos provocados por la aplicación tópica de melatonina y 5-metoxitriptofol en el hipotálamo lateral; aunque, ello se realizó en animales pretratados ya sea con reserpina, con 5,7-dihidroxitriptamina o con 6-hidroxi-dopamina. Estos últimos 3 fármacos, producen una significativa depleción de monoaminas cerebrales. Observamos que la aplicación sistémica de melatonina modifica en forma significativa la actividad unitaria celular de las tres regiones hipotalámicas; aunque, la región más sensible a estos efectos resultó ser el hipotálamo lateral y la menos sensible el posterior. Cuando la melatonina o el 5-metoxitriptofol se aplicaron en forma local por micropresión también se encontraron efectos depresores significativos sobre la frecuencia de descarga de las neuronas del hipotálamo lateral, sin embargo, el 5-hidroxitriptofol, no mostró efecto alguno sobre las mismas células. Estos efectos depresores se redujeron considerablemente en animales pretratados con reserpina o con 6-hidroxi-dopamina, y no fueron afectados por el pretratamiento con 5,7-dihidroxitriptamina, lo que implica que es necesaria la integridad de los sistemas catecolaminérgicos del hipotálamo para que se manifiesten las acciones de estas hormonas. Estos estudios indican la importancia del hipotálamo en la génesis de los efectos provocados por la melatonina. En el texto se discuten los posibles mecanismos de acción de estas neurohormonas.

ABSTRACT

Besides its endocrinological effects, melatonin, the main hormone of the pineal gland, is able to induce a wide variety of behavioral effects. Sedative, anticonvulsive, hypnogenic and anxiolytic properties have been attributed to this pineal hormone. Furthermore, melatonin has been related to some psychiatric disorders. These effects suggest an action of melatonin on several brain regions, additional to those sites that mediate its endocrinological actions. However, the mechanisms used by melatonin to produce such effects is still unknown. We consider that an approach to these problems could be the analysis of the effects induced by this hormone on the electrical activity of the neurons, because the release of different neurotransmitters and hormones is a consequence of the modifications of the electrical properties of these secreting cells. In addition, several melatonin related drugs, and the interaction between melatonin and other drugs, could be a useful tool, in order to discriminate the melatonin's mechanism of action. With these objectives in mind, we decided initiate the present study, that encompasses 3 different experiments. First, we determined the effects of the intravenous application of several melatonin doses (100, 250, 500 or 1000 µg/Kg) on the frequency of discharge of 3 different hypothalamic sites: anterior, lateral and posterior. The experiments were conducted in anesthetized rats and the recordings were taken during 80 min. In the second experiment, we made the topic administration, using micropressure, of melatonin, 5-hydroxytryptophol and 5-methoxytryptophol on the neurons of the lateral hypothalamus. Again, we analyzed the effects of these drugs on the electrical discharges of these neurons. Finally, in the third experiment, we also recorded the effects of melatonin and 5-methoxytryptophol on the same neurons, but now in rats pretreated with reserpine or 5,7-dihydroxytryptamine or with 6-hydroxydopamine, these three last drugs elicit a very important depletion of brain monoamines. Our results show that the systemic melatonin administration induce a significant modification of the electrical discharges in the three hypothalamic sites recorded. However, the most affected site was the lateral hypothalamus and the lesser the posterior hypothalamus. When melatonin or 5-methoxytryptophol was locally applied we also observed significant depressive effects on the frequency of discharge on the same neurons from lateral hypothalamus. In contrast, the 5-hydroxytryptophol did not show any effect at all on the same parameter. Such depressive effects were significantly reduced when the melatonin or 5-methoxytryptophol were tested on the hypothalamus from rats pretreated with 6-hydroxydopamine or with reserpine. However, they were not affected when the animals were pretreated with 5,7-dihydroxytryptamine, suggesting the importance of the catecholaminergic hypothalamic systems on the effects elicited by these pineal indoles. The present studies indicate the participation of the hypothalamus on the effects provoked by melatonin. Some considerations about the mechanisms of action used by these neurohormones are discussed in the text.

PROLOGO

En su conjunto, la tendencia a la invariabilidad del medio interno y a los procesos de adaptación continua al medio externo, son regulados en los organismos por dos sistemas importantes denominados nervioso y endocrino. Ambos sistemas están sumamente interrelacionados e incluso utilizan algunos mensajeros químicos similares para transmitir la información pertinente. Esta estrecha interrelación generó el concepto de sistema neuroendocrino, el cual se entiende como una unidad que integra y coordina las actividades psico-neuroendocrinas y metabólicas de los organismos. Tal conceptualización quizá constituya una descripción más exacta de dichos sistemas.

Los mensajes químicos, transmisores de la información dentro del sistema neuroendocrino, pueden ser canalizados a través de 2 tipos de sustancias químicas definidas como mensajeros primarios, en el caso de neurotransmisores, neuropéptidos, hormonas, o como mensajeros secundarios, AMP cíclico, prostaglandinas, y algunos iones (28). Recientemente se añadieron a la lista de mensajeros primarios, otros neuropéptidos, los cuales se unen a receptores localizados en diferentes regiones del cerebro. Estas sustancias juegan un papel primordial en la modulación de la conducta, en el estado de ánimo, en el dolor y en las funciones endocrinas (11).

En un intento de simplificar el modelo neuroendocrinológico, se postula la existencia de un sistema de neurotransmisores que modula la secreción de las neurohormonas hipotalámicas (19,38,52). Estas últimas sustancias, en su momento, modulan la secreción de la pituitaria; para que ésta a su vez controle la secreción de la mayoría de las glándulas

periféricas (19). Tal conceptualización puede estimarse como la vía eferente del proceso de integración neuroendócrino. La vía aferente se supone, es la existencia de mecanismos de asas de retroinformación de corta o larga acción, las cuales se localizan a lo largo de todo el sistema endocrino. Las hormonas liberadas por las glándulas periféricas controlan la secreción, tanto de las hormonas pituitarias como de las respectivas hipotalámicas; mientras que el proceso de retroinformación realizado por las hormonas de la pituitaria, modula la secreción hipotalámica y probablemente la homeostasis de los neurotransmisores involucrados (28).

Algunos hallazgos recientes de la neuroendocrinología, están modificando la conceptualización original sobre las hormonas y sobre su mecanismo de acción propuesto. Por ejemplo, se mostró (92) que los neurotransmisores, las neurohormonas y las hormonas de la pituitaria, se encuentran también presentes en el líquido cefalorraquídeo, lo que sugiere que por el hecho de encontrarse en él, dichas hormonas pudieran estar regulando mecanismos centrales. Además, a diferencia de como se consideró hasta ahora, en el sistema porta hipofisiario la sangre fluye también de la glándula pituitaria hacia el hipotálamo, lo cual sugiere una interacción bidireccional entre ambas estructuras (92). Estudios versados sobre sitios de unión de neurotransmisores y hormonas, muestran que el número y sensibilidad de los diferentes receptores a estas sustancias, son modificados por otras hormonas secretadas en glándulas periféricas (11). Además, solo recientemente se empiezan a describir las complicadas interacciones que resultan en la modulación de las diferentes clases y tipos de receptores por parte de neurotransmisores y de neurohormonas.

Todos estos datos recientes, desafían muchos conceptos previos, por lo que resulta necesario revisarlos y entrelazarlos para obtener una mejor descripción y entendimiento de la notable complejidad de los mecanismos de integración de control neuroendocrino.

En este contexto, los trabajos incluidos en el presente estudio, pretenden describir los efectos provocados por una neurohormona reguladora, la melatonina, dentro del complejo funcional hormonal que constituye el hipotálamo. El enfoque es de índole electrofisiológico, considerando que los cambios en la actividad eléctrica constituyen la etapa previa a los efectos hormonales, y el por lo tanto un índice excelente que permite inferir el mecanismo de acción de tales sustancias.

INTRODUCCION

El hipotálamo y el sistema límbico constituyen las principales regiones del cerebro involucradas en el control del sistema endocrino. El sistema límbico tiene conexiones con varias regiones hipotalámicas a través del fornix, la estria terminalis y de fibras con origen en la amígdala. Además, estructuras como el tálamo, los ganglios basales y la formación reticular del tallo cerebral, mantienen importantes interacciones con este sistema (79).

Muchos aspectos funcionales de los organismos, como es el tono afectivo, los impulsos emocionales, los ritmos biológicos, el mantenimiento del balance endócrino y, como consecuencia, la conducta en general, son influenciados por el sistema límbico (65). Adicionalmente, las alteraciones endocrinas observadas en enfermedades afectivas psiquiátricas y neurológicas, sugieren que además del sistema límbico, otras regiones del telencéfalo, probablemente regiones contiguas a la corteza cerebral, pueden también estar involucradas en la modulación de la conducta y de los eventos endocrinos (54).

Anatómica y funcionalmente (80), el hipotálamo es la región neural que dirige a todos los ejes hormonales pituitaria-órgano blanco. Esta estructura es también el centro autonómico de mayor relevancia filogenética el cual une al cerebro anterior con el tallo cerebral. El hipotálamo se relaciona en su parte anterior con el quiasma óptico, posteriormente con los cuerpos mamilares y lateralmente con los lóbulos temporales. Dorsalmente se separa del tálamo por el sulcus hipotalámico, mientras que su parte ventral central, desde la cual emerge el tallo de la pituitaria, es conocida

como la eminencia media.

El hipotálamo mantiene conexiones funcionales con la corteza, el tálamo, el hipocampo y con otras porciones del sistema límbico, además del tallo cerebral; sus señales de salida son transmitidas por circuitos neurales que lo conectan con otras estructuras tanto superiores como inferiores. Estas, son vías complejas que transmiten información en ambas direcciones; los más importantes son : el haz longitudinal dorsal que une al hipotálamo con los núcleos del tallo cerebral; el tracto mamilotalámico que une los cuerpos mamilares al tálamo; la estria terminalis, la cual une a los núcleos amigdaloides a los núcleos preópticos y ventromediales del hipotálamo; las conexiones hipotalámico-corticales que unen al hipotálamo con el lóbulo frontal de la corteza; conexiones olfatorhipotalámicas que unen al hipotálamo con el rinencéfalo y finalmente, el tracto supraóptico-hipofisial, cuyas fibras van de los núcleos supraópticos y paraventriculares del hipotálamo hacia la neurohipófisis vía el infundibulum (79).

Como se observa, el hipotálamo está localizado estratégicamente entre el cerebro, y el tallo cerebral, lo que le confiere la capacidad de actuar como un modulador neuroendocrino, influyendo en los centros autonómicos del tallo cerebral, de la médula espinal y del sistema endocrino al controlar las secreciones de la glándula pituitaria.

Desde un punto de vista neuroendocrino, dentro del hipotálamo es posible distinguir tres diferentes regiones con cierto grado de independencia anatómica y funcional, éstas son (79): el área hipofisiotrófica, la cual se encarga de producir los factores tróficos

glandulares y que incluye a los núcleos paraventricular, supraóptico, arcuato, supraquiásmático, mamilar mediano, premamilar, ventromedial, dorsomedial y los núcleos hipotalámicos anteriores. Otra región la constituye el sistema tubero-pituitario encargado de transportar a las neurohormonas. Finalmente la eminencia media, sitio donde las neurohormonas secretadas por los varios núcleos hipotalámicos son colectadas y liberadas hacia la circulación porta hipofisiaria.

Por su parte, la glándula pituitaria está formada por 2 lóbulos distintos, el lóbulo posterior o neurohipófisis y el anterior o adenohipófisis (29). La neurohipófisis, contiene la hormona antidiurética (HAD) y a la oxitocina, recibe fibras hipotalámicas originadas en las neuronas del núcleo paraventricular, y del núcleo supraóptico y en las cuales las hormonas son sintetizadas conjuntamente con las neurofisinas, las cuales son lipoproteínas que las transportan. El complejo neurofisina-hormona migra desde las células nerviosas hipotalámicas hacia el lóbulo posterior de la pituitaria (15).

La HAD y la oxitocina se liberan al torrente sanguíneo en respuesta a varios estímulos fisiológicos, Tales como la reducción del volúmen plasmático y el aumento en la osmolaridad sanguínea (117). También la secreción de HAD es estimulada por la acetilcolina (ACh) y la β -endorfina; a su vez, ésta es inhibida por la noradrenalina (NA) (64). Por su parte, existen al menos dos mecanismos neurales que controlan la liberación de oxitocina; uno es el reflejo neuroendocrino, resultado de la estimulación del pezón (succión) y el otro es el reflejo originado en los receptores al estiramiento localizados en el tracto genital femenino, los cuales propician la

liberación de oxitocina durante las etapas finales del embarazo (108).

La adenohipófisis secreta 8 hormonas: prolactina (PRL), hormona de crecimiento (HC), hormona estimulante de los melanocitos (HEM), hormona foliculo-estimulante (HFE), hormona luteinizante (HL), hormona estimulante del tiroides (HET) y hormona estimulante de la corteza suprarrenal o adrenocorticotrofina (HACT) y β -endorfina (45). La secreción de todos estos mensajeros químicos es controlada por las neurohormonas de origen hipotalámico y extrahipotalámico (80). Dentro de estas últimas, se encuentran las neurohormonas provenientes de estructuras endimarias conocidas como órganos circunventriculares (62). El más estudiado de ellos es el órgano pineal, el cual tiene origen en las células endimarias del techo del tercer ventrículo; pero también estructuras como el órgano subcomisural, el órgano vasculoso de la lámina terminalis, el órgano subfornical, el área postrema y el endimario especializado del techo del tercer ventrículo, a nivel de la eminencia media, participan en tal regulación (115).

De acuerdo a la teoría clásica, enunciada por Harris (47), el control hipotalámico de cada una de las hormonas de la pituitaria es regulada por factores de liberación o de inhibición específicos para cada hormona. De estos factores hipotalámicos postulados, sólo unos cuantos han sido aislados y caracterizados hasta ahora. Los principales son: la hormona liberadora de gonadotrofinas (HLG), la hormona liberadora de la tirotrófina (HLT) y la hormona inhibidora de la hormona de crecimiento, denominada somatoestatina (43,84,42).

Sin embargo, y en desacuerdo con la teoría "clásica", todos estos neuropéptidos influyen en la secreción de más de una

hormona. Por ejemplo, la HLG, estimula la liberación y producción de HL y de HFE, la HLT estimula tanto a la HET como a la PRL; y la somatoestatina inhibe tanto a la HC como a la HET, sin considerar además, los poderosos efectos inhibidores que ejerce sobre dos de las hormonas pancreáticas, el glucagon y la insulina. Existen otras neurohormonas y neurotransmisores hipotalámicos que también son llevados por los vasos portales hacia la pituitaria e influyen sobre la liberación de las hormonas, aunque el papel fisiológico que ellos juegan, aún no está completamente dilucidado (26).

Varios neurotransmisores participan en la liberación de las neurohormonas como (68): la dopamina (DA), la noradrenalina (NA), y la serotonina (5-HT). También, la acetilcolina (ACh) el GABA y la histamina (HIS) han sido recientemente añadidas a esta lista (129). Dentro de los neuropéptidos, y neurohormonas de origen central involucradas en la regulación de los productos hipotalámicos, se encuentra una larga lista que incluye a la β -endorfina, la melatonina, encefalinas, el péptido intestinal vasoactivo (PIV), la neurotensina, la sustancia P y la bombesina. Estas sustancias probablemente interactuen con neuronas catecolaminérgicas y/o con las neuronas hipotalámicas que contienen las hormonas hipofisiotrópicas involucradas en la modulación de la secreción de la pituitaria (129).

Los sitios exactos de síntesis de las hormonas hipotalámicas no están aún lo suficientemente bien identificados y el hecho de que muchas de las neurohormonas fisiotrópicas, sean encontradas en diferentes áreas del cerebro, sugieren la hipótesis de que además de sus efectos en la pituitaria, estos neuropéptidos posean efectos

centrales, los cuales modulan la conducta, el aprendizaje y los procesos de memoria.

Los mecanismos de acción de las hormonas hipotalámicas, son también un punto muy controversial en la actualidad. Las neurohormonas se unen a receptores específicos localizados en la membrana de las células de la pituitaria (11), los cuales son modulados además, de por las hormonas hipotalámicas, por otras sustancias tanto centrales como periféricas, que en su momento, estimulan procesos biológicos. La interacción hormona receptor involucra la síntesis de AMP cíclico, de prostaglandinas o bien pueden inducir cambios en el flujo del calcio extracelular (113). Así, recientemente se mostró (82) que el Ca^{++} se considera como un segundo mensajero, el cual controla la secreción de hormonas como la insulina y la PRL. No es exagerado entonces el mencionar que el aspecto clave en el estudio actual de los procesos neuroendocrinos es la descripción de los mecanismos que controlan la secreción de las hormonas hipofisiotrópicas.

Las células hipotalámicas productoras de las neurohormonas son moduladas tanto por neurotransmisores como por hormonas secretadas en estructuras nerviosas centrales y en glándulas periféricas (129). Estos últimos productos de secreción periférica, actúan a través de mecanismos de retroinformación tanto negativos como positivos. Por ejemplo, los datos recabados sobre el mecanismo de control de la secreción de PRL, muestran que a nivel de la pituitaria, la DA, la NA, el GABA y la ACh y la melatonina, inhiben su secreción (77b). La acción de la DA es tan potente y persistente que se postula que este neurotransmisor es el factor inhibidor de esta hormona (44). Mientras

que la 5-HT, la HIS, así como también algunos neuropéptidos (HLT, β -endorfina, encefalinas, PVI, CCK, bombesina, neurotensina y sustancia P) la estimulan (88).

La hormona hipotalámica inhibidora de la hormona de crecimiento es un tetradecapéptido denominado somatoestatina. Esta hormona se encuentra en muchas estructuras cerebrales, donde parece ser producto de una síntesis local (13); y al parecer provoca importantes efectos conductuales; por ejemplo, la somatoestatina localizada en el hipocampo está particularmente involucrada en algunos aspectos de la memoria (34). Por su parte muchos neuropéptidos, tales como la β -endorfina, las encefalinas, el PIV, la bombesina, la neurotensina y la sustancia P, estimulan la secreción de HC en animales experimentales (31).

El factor liberador de la HACT, aún no está aislado e identificado, a pesar de que existen demostraciones de que los extractos hipotalámicos ejercen efectos liberadores de corticotrofina. Datos experimentales sugieren que la hormona liberadora de la HACT puede ser una hormona antidiurética "modificada" (38).

La hormona liberadora de tirotrófina (HLT), fué la primera neurohormona hipotalámica identificada, se trata de un tripéptido (Gli-His-Pro). Esta sustancia estimula la liberación y síntesis de la HET y de la PRL, además de estar ampliamente distribuída en muchas regiones cerebrales y poseer importantes efectos centrales conductuales (10).

No está descrito aún un factor, con acciones inhibitoras específicas sobre la síntesis de HACT y HET, el sistema de

retroinformación negativo (hormonas tiroideas para HET, y cortisol para HACT) parecen explicar mucho del control inhibitor para la liberación de HACT y MET. Sin embargo, algunos péptidos cerebrales, particularmente la melatonina, ejercen efectos inhibidores centrales de la secreción de estas hormonas, posiblemente actuando sobre los factores hipotalámicos liberadores o bien, sobre los sistemas de neurotransmisores que los regulan (126).

En lo relativo a la HLG, la cual es la hormona que estimula tanto la secreción de la HL como de la HFE, su inhibición se realiza por mecanismos de retroinformación negativos provocados por los niveles séricos de hormonas esteroideas. Además, la glándula pineal y sus hormonas, principalmente la melatonina (MEL), también modulan la secreción de gonadotrofinas en casi todas las especies estudiadas (120). En el caso de la secreción de gonadotrofinas en la mujer, la NA parece ser responsable del pico de HL que ocurre a la mitad del ciclo menstrual (131), mientras que los efectos de la DA y la 5-HT son aún inciertos. La melatonina ejerce un efecto central inhibitor sobre la secreción de HL (119), mientras que los estrógenos y la progesterona ejercen un control por retroinformación, tanto positivo como negativo, sobre la secreción de HL. En el caso del hombre, los efectos de la DA, la NA y la 5-HT no son claros, mientras que la melatonina ejerce un efecto inhibitor característico (104). El control ejercido por las hormonas esteroideas del hombre, aún no está bien esclarecido, así como el papel que juega la inhibina, hormona producida en el testículo.

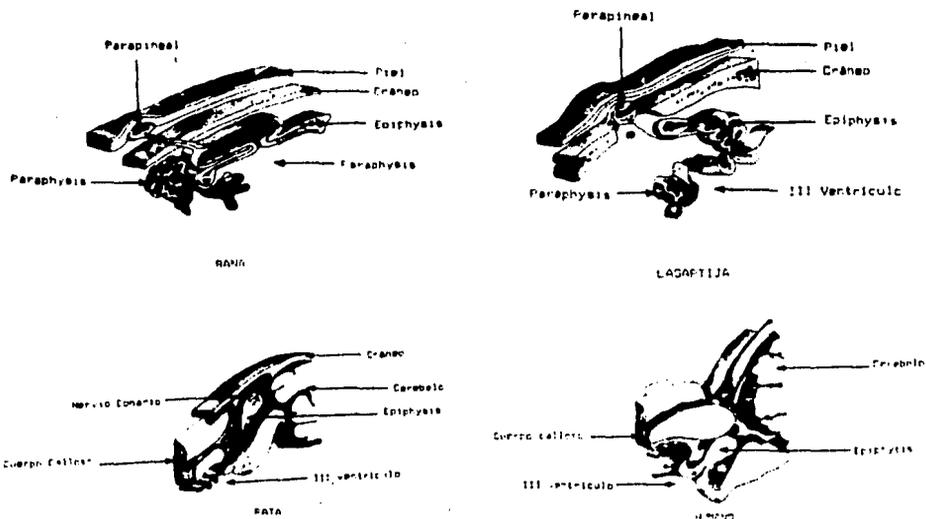


Fig. 1.- Representación esquemática de cortes sagitales de la glándula pineal proveniente de 4 diferentes especies. Es posible apreciar la enorme transformación filogenética que esta estructura ha sufrido a lo largo de la evolución. Particularmente, existen dos características que provocan una notable diferencia. La primera es que en animales inferiores, la pineal es todo un conjunto de estructuras, denominado como órgano pineal; mientras que en los animales superiores, sólo permanece una estructura conocida como glándula pineal. La otra característica es su conformación sacular, la cual desaparece en animales superiores. En este mismo diagrama se observan las relaciones anatómicas que la glándula mantiene con otras estructuras cerebrales.

Dentro de la teoría general del control neuroendocrino, los efectos provocados por los productos de la pineal sobre la regulación neuroendocrina, son variados, a veces difíciles de interpretar y frecuentemente controversiales. Tal situación parece ser consecuencia

del propio desarrollo filogenético de la glándula. Es decir, quizá el rasgo más característico de la pineal, es su marcada diversidad tanto morfológica como fisiológica en la diversas especies; existiendo diferencias substanciales en la estructura de la glándula aún en especies estrechamente relacionadas (Fig. 1). También las acciones que la glándula ejerce, difieren en todas las especies, incluyendo a los mamíferos (14). Por tal situación, aunque las interacciones de la pineal con algunos ejes neuroendócrino-pituifaria-órgano blanco están bien definidas en algunas especies, en otras, la pineal parece tener poca o ninguna influencia sobre los mismos. Sin embargo, es erróneo el considerar que en estos animales, la glándula pineal es un órgano inconsecuencial, porque probablemente este involucrado en otras funciones tales como regulación de la temperatura, ajustes conductuales, o en la regulación de la actividad metabólica generalizada, por mencionar algunas (21,37,51,75,102).

Esta condición también se manifiesta en el caso del sistema reproductor, donde su acción difiere de acuerdo a la especie de que se trate. Por tal motivo, lo que se aplica a una especie podría no ser aplicable a otra, aunque estos animales estén cercanamente relacionados.

Existen dos situaciones que hacen única la función de la glándula pineal. Una de ellas es su capacidad para sintetizar melatonina de acuerdo a un patrón circadiano, y la otra es su capacidad de sincronizar y modificar este patrón de secreción por efecto de la iluminación (25,63). El patrón de secreción de melatonina, alta en la noche y baja en el día (1,118), parece ser

relativamente uniforme en todas las especies hasta ahora examinadas, aún así, existe una amplia variedad de respuestas que el organismo puede mostrar (Fig. 2).

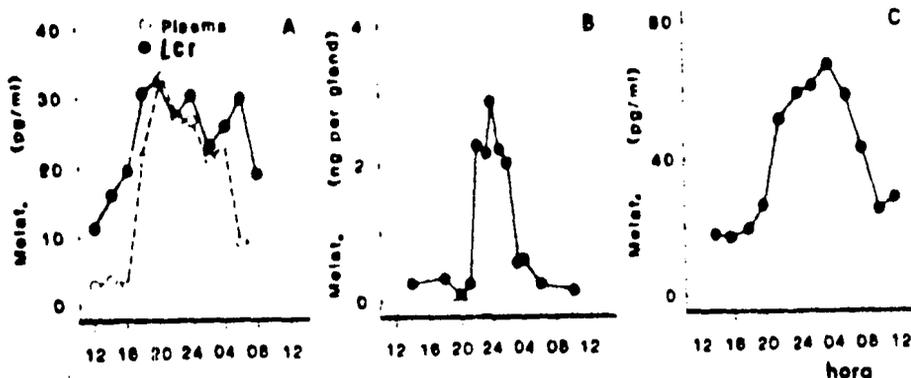


Fig. 2.- El patrón de secreción de melatonina, parece ser muy uniforme en todos los animales hasta ahora estudiados. En este esquema se muestran los perfiles de secreción del mono rhesus (A), en el plasma y el liquido cefalorraquídeo (LCR); en la pineal de la rata (B) y en el plasma del humano (C), en los cuales la diferencia más importante es la duración del pico de melatonina.

La melatonina proviene de una idolamina secundaria de la pineal, la 5-HT, a través de la acción de 2 enzimas, la N-acetiltransferasa (NAT), responsable de la N-acetilación de la 5-HT, y la Hidroxi-indol-O-metiltransferasa, la cual es responsable de la O-metilación del anillo indólico (Fig. 3) (7). Quay (101), mostró por primera vez que los niveles de 5-HT en la pineal son altos durante el día y bajos en

la noche y que las alteraciones en el ciclo de iluminación causan cambios correspondientes en el contenido de 5-HT en la pineal. Posteriormente, el mismo autor describió el ritmo diario en el contenido de melatonina, inverso al ritmo de serotonina (Fig. 3).

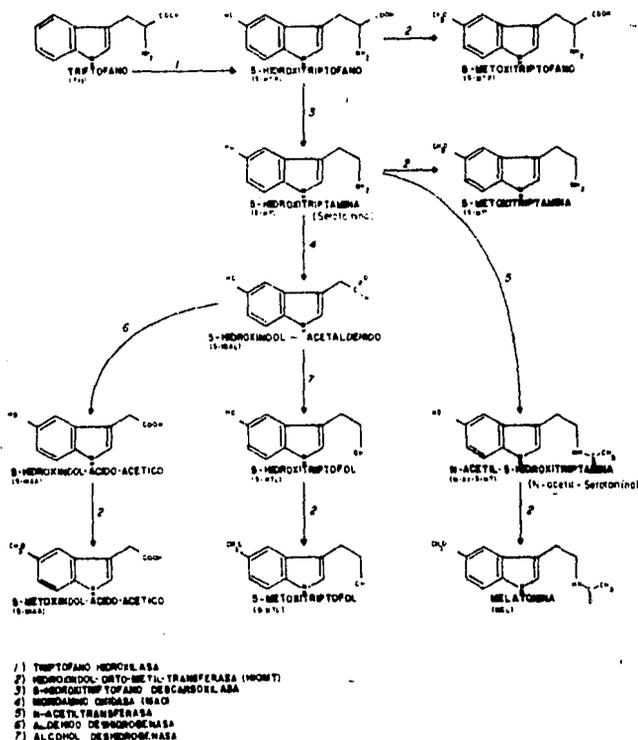


Fig. 3.- La biosíntesis de melatonina se inicia a partir del aminoácido triptófano y finaliza con la formación de 3 tipos de compuestos activos, estos son la N-acetil-5-metoxitriptamina o melatonina, los 5-metoxitriptofoles y los 5 metoxi-indoles conjugados con ácido acético. En esta figura se muestran las enzimas involucradas en esta síntesis.

Actualmente, se refiere que las concentraciones de melatonina están incrementadas durante la noche en la glándula pineal, la sangre, el líquido cefalorraquídeo y la orina en todos los animales hasta ahora estudiados, incluyendo al hombre (5). El perfil de liberación fotoperiódica de la melatonina se observa en todas las especies con ligeras variaciones (Fig. 2). En general las concentraciones de melatonina en la pineal se incrementan con el principio de la oscuridad y permanecen elevadas hasta el principio del período luminoso (Fig. 4).

La vía natural por la cual la información fotoperiódica alcanza a la pineal, aunque descrita en la rata (85), parece ser similar en todas las especies, se origina a nivel de la retina. De esa estructura los estímulos nerviosos provocados por la aplicación de la luz son transmitidos por el tracto retinohipotalámico hacia el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, considerado como el principal oscilador circadiano autónomo central (91). De este núcleo, la vía continúa hacia los núcleos paraventriculares, para dirigirse viajando por el haz prosencefálico medial, a través de la formación reticular, hacia el núcleo intermedio lateral de la médula espinal. En esta zona las fibras se convierten en fibras preganglionares adrenérgicas del sistema nervioso autónomo, las cuales conducen la información hacia el ganglio cervical superior. Este ganglio constituye la entrada final simpática hacia la glándula pineal (106) (Fig. 5). La modulación por parte del simpático sobre los pinealocitos, ocurre gracias a la liberación de NA, la cual actúa sobre un sistema β_1 -adrenérgico (107).

La respuesta de los pinealocitos de la glándula a la liberación de NA, por parte de las fibras postganglionares simpáticas, es la

síntesis y liberación de derivados indólicos, de los cuales la más importante es la melatonina (122).

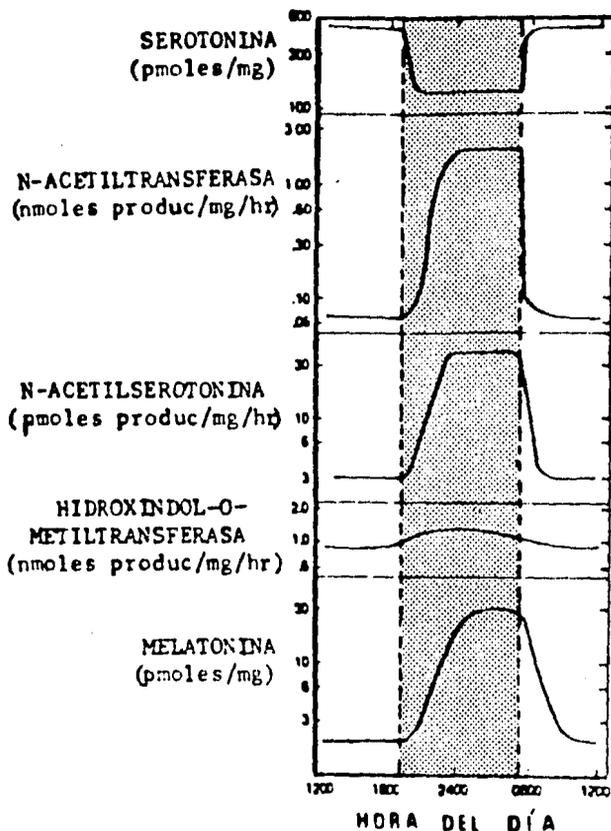


Fig. 4.- En todas las especies estudiadas, la secreción de melatonina alcanza sus niveles máximos durante la escotofase del fotoperiodo. Este incremento de la síntesis y liberación de melatonina, se acompaña de los cambios correspondientes en las concentraciones de sus precursores y de la actividad de las enzimas sintetizantes, como se muestra en el presente diagrama.

La luz ejerce una doble acción moduladora en la bioquímica de la glándula pineal (17), la primera acción es de índole supresor sobre

la actividad de la enzima NAT, y como consecuencia sobre la síntesis de melatonina. Este efecto es particularmente evidente cuando la luz se aplica con suficiente intensidad, durante el periodo de oscuridad. Sin embargo, en oscuridad continua el ritmo de melatonina persiste con una periodicidad aproximada a las 24 hrs, tal situación hace evidente la naturaleza circadiana endógena del ritmo de la pineal.

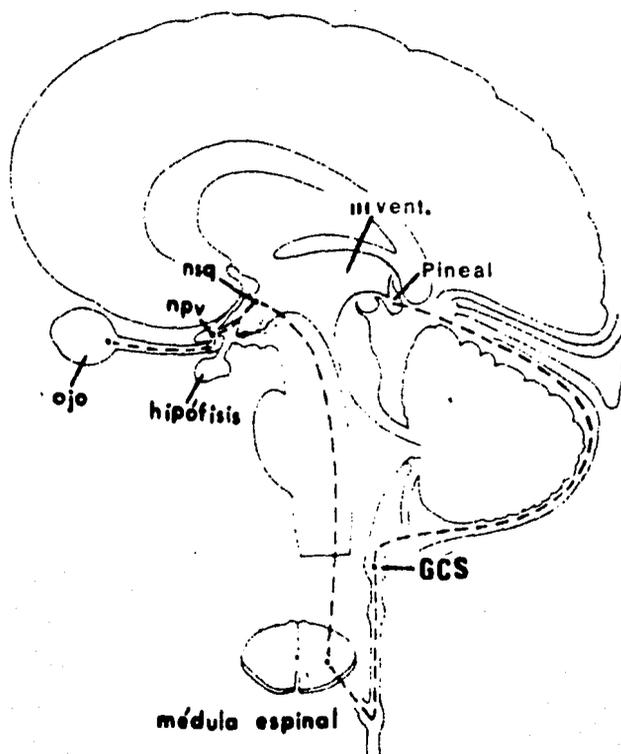


Fig. 5.- Esquema representativo de la vía neural que siguen las señales eléctricas provocadas por los estímulos luminosos para alcanzar la glándula pineal. Esta vía comprende al núcleo supraquiasmático y a una porción del simpático cervical.

La segunda acción ejercida por la luz es el poder sincronizante que posee sobre el ritmo de secreción de la pineal con las condiciones ambientales; tal acción probablemente requiere de la participación de los núcleos supraquiasmáticos (20). Tanto los efectos supresores como los sincronizadores que la luz ejerce sobre la pineal, determinan el momento en que la melatonina será sintetizada (la fase del ritmo), así como la duración de esta síntesis (41). Bajo estas circunstancias, una señal con estas características es capaz de brindar la información pertinente acerca del ciclo ambiental de luz-oscuridad. Una señal que puede ser modulada en estas formas, tiene el potencial de sincronizar procesos fisiológicos complejos en los cuales la coordinación temporal es crucial, puesto que las variaciones en la duración de la elevación sérica de melatonina, reflejan exactamente la duración de la fase de oscuridad, y como consecuencia, la longitud de los días naturales (53).

Gracias a esta propiedad funcional de la pineal, esta glándula es capaz de coordinar cambios estacionales, en el peso corporal (12), el color de la piel (49), el letargo invernal en roedores (56) y la regulación estacional del sistema reproductor (17); la cual, incidentalmente, ha sido más extensamente estudiada. Es necesario añadir que el tejido blanco forma parte activa en este proceso de coordinación y regulación, puesto que la forma en que el organismo utiliza la información fotoperiódica de la pineal, también está determinada por la sensibilidad del tejido blanco particular para la hormona. Entonces, las acciones ejercidas por la glándula pineal dependen, tanto de la responsividad del órgano, como de las fluctuaciones en la señal -niveles de melatonina-, proporcionada por

la glándula.

El papel que la pineal ejerce en la regulación de la actividad sexual de los roedores, se estableció a partir de la década de los 60's. En 1965 Hoffman y Reiter (50), mostraron que la pineal es necesaria para que la quiescencia gonadal inducida fotoperiódicamente se manifestara. Es decir, cuando algunos animales son mantenidos en días cortos (menos de 12.5 horas de luz por día), la quiescencia gonadal se observa en 8 semanas. Esta actitud se manifiesta por una regresión testicular en los machos y por un periodo de anovulación en las hembras. La pinealectomía previene esta respuesta a un fotoperiodo corto (73). Los machos pinealectomizados son aún capaces de producir espermas y de realizar la inseminación, mientras que las hembras privadas de pineal continúan ovulando, muestran una apertura vaginal normal, pueden embarazarse y llevar su embarazo a término (21).

La longitud crítica del fotoperiodo para inducir efectos atróficos gonadales varía entre los diferentes animales, en el caso del hámster, se estableció que es de al menos de 12.5 hrs de oscuridad (118).

Los cambios en el tamaño testicular y ovárico provocado por la melatonina, se acompañan de cambios importantes en las concentraciones de las hormonas correspondientes (120). Además, la regresión testicular inducida por la pineal en estas especies posiblemente se un proceso complejo que involucra la supresión no sólo de LH y FSH, sino de también de PRL (60). Los efectos antigonadotrópicos de la pineal no solo se presentan en animales adultos, sino que se producen también en animales en desarrollo; por ejemplo, algunos datos experimentales (98)

muestran que la melatonina retarda la maduración de todas las estructuras gonadales, postpone el principio de la pubertad e inhibe la síntesis de la HLG.

Probablemente la melatonina no sea la única hormona reguladora del eje neuroendócrino-reproductor que produce la glándula pineal, así por ejemplo, se mostró (96) que la arginina-vasotocina, un nonapéptido sintetizado en la pineal de los bovinos, ratas y humanos, inhibe la elevación de la HL provocada por la castración y estimula la liberación de prolactina en ratas macho tratadas con estrógenos y progestágenos. La inhibición de la liberación de prolactina por parte de los extractos de la pineal también fue observada (77b). Además, varios estudios recientes (24) han mostrado que la pineal puede también ser origen de factores liberadores de gonadotrofinas.

El papel regulador de la reproducción que ejerce la pineal se hace muy evidente en animales con reproducción estacional, en ellos la pineal está involucrada en la regulación del inicio de la pubertad, en algunos procesos cíclicos como el ritmo circadiano de LH y de secreción de prolactina; así como la presencia de la ovulación y las variaciones circanuales hormonales (118).

Muchas especies de mamíferos que habitan desde latitudes templadas hasta polares, muestran ciclos anuales de fertilidad e infertilidad (127). Estos ciclos estacionales de crianza garantizan que los descendientes nazcan en un momento óptimo para su supervivencia. Para determinar el tiempo de crianza, estos mamíferos han adaptado su fisiología para responder a señales provenientes del ambiente. La señal ambiental más frecuentemente utilizada por estos

animales, es el cambio anual en la longitud del día, conocido como fotoperiodo. Los mamíferos estacionales se catalogan como "criadores de días largos", algunos roedores, o como "criadores de días cortos", venados y ovejas (118), dependiendo de si sus gónadas se activan conforme la longitud del día se incrementa o disminuye. La existencia de estos dos tipos de animales está parcialmente determinada por el periodo de gestación de cada especie, así como por otros aspectos de su fisiología y de las características del ambiente.

La posibilidad de mimetizar los fotoperiodos largos y cortos en el laboratorio ha permitido entender parcialmente los eventos neurales y endocrinos subyacentes a la reproducción estacional. Por ejemplo, se mostró (119) que los eventos endocrinos precedentes a la activación gonadal son similares en ambos tipos de criadores. Dentro de los primeros días de exposición a un fotoperiodo estimulante gonadal, se inicia una serie de eventos que resultan de una reducción de la sensibilidad hacia los efectos negativos, dentro del proceso de retroinformación, de los esteroides, seguida por un "encendido" gradual de la pituitaria y de las gónadas. Por otro lado (119), la exposición a un fotoperiodo inhibitor gonadal, provoca un incremento de la sensibilidad del mismo proceso de retroinformación negativo de los esteroides, seguido por una reducción en la actividad de la pituitaria y como consecuencia de una involución gonadal. Tales efectos indican que estos mamíferos son capaces de medir la longitud del día con gran exactitud. Tanto la extirpación de la pineal, como de los ganglios cervicales superiores, así como las lesiones del núcleo supraquiasmático provoca que los hámsters y las ovejas sean incapaces de medir la longitud del día con lo cual no pueden coordinar su

actividad reproductora de acuerdo a las estaciones del año (114).

Las acciones de la melatonina sobre el eje neuroendócrino-reproductor, en animales con reproducción no estacional, no son muy claras. La historia de la asociación entre la pineal de este tipo de individuos y la función reproductora, se inició en 1898 cuando Heubner (48), describió la presencia de pubertad precoz en el hombre con tumores de la pineal. Tal relación le llevó a especular sobre la existencia de una sustancia, producida por la pineal, la cual inhibe la función reproductora; como consecuencia, los tumores que destruyen a esta glándula acarrearán el desarrollo sexual prematuro. Sesenta y cinco años después, Kitay y altschule (61) revisaron varios cientos de casos de tumores de la pineal y observaron que los tumores no parenquimatosos, con cierta frecuencia se asocian con la pubertad precoz. A pesar de ello, la sugerencia inicial de Heubner, es aún muy cuestionada, existiendo múltiples datos contradictorios, por lo que esta aseveración de ninguna manera es concluyente.

En algunos mamíferos, la melatonina ejerce efectos progonadotrópicos (23), en otros sus acciones son antigonadotrópicas (118) y en otros más carece de efecto alguno sobre la reproducción (1). Uno de los problemas compartido por muchos estudios realizados tanto in vitro como in vivo sobre melatonina, es la necesidad de emplear grandes cantidades de compuesto para que sus efectos sean detectados.

Si la glándula pineal sirve como una interfase entre el reloj ambiental y el eje hipotálamo-pituitaria-gónadas, uno podría esperar que los eventos reproductores también fuesen acompañados por cambios

en el ritmo de melatonina, existen datos indicativos de que en algunas especies con reproducción no estacional, esto puede ocurrir. Por ejemplo, la amplitud de la señal de melatonina parece ser un factor regulador del ciclo ovárico; así, el pico nocturno más bajo de melatonina en la rata ocurre en el día del estro (104) y un nadir en los niveles de melatonina plasmática matutina se presenta en la mujer durante la etapa preovulatoria (131). También durante los primeros meses del embarazo, la melatonina muestra niveles séricos muy elevados (93), en esta etapa del embarazo existe un estado antigonaotrópico característico.

Por otro lado, tanto la pinealectomía como las aplicaciones repetidas de melatonina, sobre todo cuando se realizan durante la fase de ascenso o descenso del ciclo de liberación de melatonina, provocan algunos efectos antigonaotrópicos. Así, Tamarkin y cols. (118), mostraron que la administración diaria crónica de melatonina consistentemente suprime la función reproductora en hámsters mantenidos en días largos (LD: 10-14). El elemento clave de su experimento fue el cuidadoso control del tiempo del día en que los animales fueron inyectados con melatonina. De igual manera, maniobras tales como cegar al animal (73), extirpar los ganglios superiores cervicales (18) o lesiones hipotalámicas (114), también provocan algunos efectos sobre los sistemas reproductores en algunos mamíferos, aunque no con la intensidad y claridad con que ocurren en los animales con reproducción estacional. Estos datos indican el papel que esta glándula ejerce sobre la coordinación de la reproducción en animales adultos con reproducción estacional.

El punto de vista tradicional endocrinológico de que las

hormonas tienen ya sea un papel inhibitor o un papel excitador, no parece aplicarse a la melatonina. De hecho el esperar efectos claros de esta índole ha impedido, durante casi dos décadas el entendimiento del papel que posee esta hormona en la reproducción. La melatonina no puede ser considerada como pro o antigonadal, sino más bien como una sustancia que provee información temporal al eje hipotálamo-pituitaria-gónada, y por lo tanto coordina las actividades reproductoras.

Las hormonas ejercen sus efectos fisiológicos en los sitios blanco por interactuar inicialmente con un receptor de alta afinidad. Para entender el mecanismo de acción de las hormonas a través de su interacción con receptores específicos, es necesario primero identificar el tejido blanco para después correlacionar a la interacción hormona-receptor con una respuesta biológica. Desafortunadamente, nada de esto ha sido posible obtener en el caso de la melatonina.

Puesto que la melatonina se encuentra tanto en el líquido cefalorraquídeo (93) como en la sangre periférica (79), es posible que esta hormona pueda ejercer sus efectos sobre el sistema nervioso central, sobre estructuras periféricas o sobre ambas. Los estudios de captación de melatonina tritiada, administrada sistémicamente, indican que la hormona podría de hecho actuar en ambos sitios, ya que esta se concentra en el hipotálamo, en el hipocampo, la pituitaria anterior, las gónadas el tracto reproductor y aún en la pineal misma (3).

Dentro del hipotálamo el núcleo supraquiasmático concentra la mayor cantidad de melatonina en comparación a cualquier otra área

hipotalámica (67,132). Sin embargo, a pesar de que se han realizado varios intentos para cuantificar el número de receptores a la melatonina en varios tejidos, los resultados son equívocos y no reproducibles hasta ahora, por lo que ningún método se emplea en forma rutinaria para investigar estos receptores.

Varias evidencia experimentales sugieren que los efectos reproductores de la melatonina son mediados a través de varios sitios del sistema nervioso central. Por ejemplo, la melatonina puede incrementar la sensibilidad del hipotálamo y la pituitaria hacia efectos provocados por retroinformación de los esteroides gonadales en animales carentes de gónadas (16), además induce una reducción en los receptores cerebrales a los estrógenos (112). Las manipulaciones que resultan en alteraciones del perfil de la melatonina (pinealectomía, ganglionectomía cervical superior y reemplazamiento y „suplementación de melatonina) provocan cambios en la secreción de la HFE y HL (76), cuya regulación ocurre a nivel del SNC. Adicionalmente, la secreción de prolactina de la pituitaria, cuya liberación está bajo control hipotalámico, se relaciona temporalmente con los cambios en la concentración de la melatonina circulante (35).

Cuando la melatonina se aplica dentro de los ventrículos cerebrales (39), o es implantada dentro del hipotálamo del ratón (39), en cantidades pequeñas y suficientes para asegurar una difusión mínima, ocurre, como consecuencia, una modificación en la secreción de gonadotropinas y en la actividad gonadal. La posibilidad de que estos efectos resulten de una acción directa de la melatonina sobre la liberación de gonadotrofinas, es apoyada por el hallazgo de que la

melatonina estimula la secreción de HLG de hipotálamos perfundidos in vitro (109).

Muchos de los efectos de la melatonina sobre la reproducción pueden ser mediados, dentro del hipotálamo, por el núcleo supraquiasmático; así, cuando se implanta melatonina cristalina en la cercanía de este núcleo, se observa una regresión gonadal importante. Tal efecto es mayor cuando la melatonina se administra por la tarde que a cualquier otra hora del día (40).

Los mecanismos propuestos por los cuales la melatonina podría modificar la actividad secretora de las células que contienen HLG, incluyen: 1) Alteraciones de la actividad eléctrica de la misma neurona; 2) Una alteración del proceso contráctil involucrado en el transporte axonal de los gránulos que contienen a la hormona y 3) Cambios en la síntesis y secreción de las catecolaminas, monoaminas y prostaglandinas, todas las cuales participan en la regulación de la liberación de HLG.

Cualquier mecanismo propuesto para explicar la acción de la melatonina, debe tomar en cuenta su aparición periódica en la circulación, lo que llevaría a investigar acerca del mecanismo por el cual las señales periódicas son procesadas, además de los mecanismos involucrados en la suma y procesamiento de la información de las señales diarias, sobre periodos de semanas y meses.

Es importante mencionar que los efectos descritos para la melatonina no se circunscriben a la esfera reproductora; así, dentro del campo de la neuroendocrinología, se describió que la melatonina provoca una inhibición tanto en la producción como en la liberación de

la hormona estimulante del tiroides (126), la hormona estimulante de la corteza suprarrenal (33), de la prolactina (90), de la hormona de crecimiento (116) y del páncreas (8). También en relación con estas hormonas, ni los sitios de acción ni el mecanismo empleado por la melatonina para ejercer tal efecto han sido descritos.

La melatonina también ejerce importantes efectos conductuales, la administración de 50 mg, dosis total, de esta hormona, induce sueño en humanos con un patrón muy similar al fisiológico (95). Dosis mayores pueden provocar efectos sedantes, incluyendo propiedades anticonvulsivas (2). Administraciones entre 0.5 y 2.0 mg/Kg en la rata, inducen efectos ansiolíticos muy similares a los ejercidos por las benzodiazepinas (87).

Además, recientemente se describió una relación muy importante entre algunos padecimientos psiquiátricos y alteraciones en la secreción de melatonina. Por ejemplo, Rosenthal y cols. (130) describieron la existencia de una entidad nosológica, denominada enfermedad depresiva estacional, caracterizada por un cuadro depresivo que se manifiesta en los meses de otoño-invierno y desaparece en primavera-verano. La depresión en los pacientes que sufren esta patología, se reduce o incluso desaparece con fototerapia. Aunque estos pacientes muestran concentraciones séricas de melatonina similares a las de los sujetos que no padecen la enfermedad, se especula sobre la posibilidad de que estos pacientes puedan padecer una hiperreactividad a la melatonina, asociada con un desfase del ciclo de liberación de la hormona, como causa de la enfermedad.

Aunque muchos de los efectos conductuales provocados por la

melatonina son farmacológicos, es decir se provocan con el uso de dosis elevadas, los resultados de estos experimentos indican que la melatonina puede ejercer acciones cerebrales en estructuras diferentes al hipotálamo. Estudios previos (86,97,134), muestran que desde un punto de vista electrofisiológico y neuroquímico, varios sitios cerebrales son afectados por la melatonina. Entre las estructuras más sensibles a esta sustancia se encuentra la formación reticular mesencefálica (86,97), lo que explicaría efectos como la hipnosis, sedación y efectos anticonvulsivos; el hipotálamo (100,135), los efectos endocrinológicos y acciones moduladoras de las emociones y la amígdala (86), efectos sobre la conducta sexual y el estado de ánimo. También el hipocampo y la corteza cerebral (134) son afectados por esta hormona.

Desde un punto de vista neuroquímico, la melatonina es capaz de bloquear la liberación de DA inducida por la estimulación eléctrica o por K^+ , en rebanadas de hipocampo y de hipotálamo. Las dosis requeridas para este último efecto, sugieren una interacción con receptores específicos, aunque estos no han sido caracterizados aún en forma inequívoca (135).

Dentro del hipotálamo es posible que la melatonina ejerza varias acciones en varios núcleos hipotalámicos. Por ejemplo, las acciones reguladoras sobre las acciones gonadotróficas, pueden ser mediadas por el hipotálamo anterior y ventral, pero las regiones laterales y posterior pueden ser blanco de la melatonina en algunas acciones conductuales o también hormonales; aunque se desconoce si la melatonina ejerce alguna acción en estas áreas hipotalámicas.

En un estudio previo (86), mostramos que las neuronas del hipotálamo ventromedial, modifican su actividad multiunitaria por efecto de la administración sistémica de melatonina. Este efecto se asoció temporalmente con modificaciones de la actividad eléctrica de la amígdala, con la cual el hipotálamo mantiene una estrecha relación antomo-funcional. Esta misma región ventral-anterior del hipotálamo, se asocia anatómicamente con el área hipotalámica lateral. Así, cualquier acción provocada por la melatonina en el área hipotalámica lateral, podría ser consecuencia de una acción directa de esta sustancia sobre las neuronas de la misma área, o bien puede ser un efecto indirecto iniciado en otras estructuras afectadas por el fármaco. Un procedimiento para discriminar tal posibilidad, es la aplicación tópica y localizada de la sustancia en las estructuras correspondientes. También gracias a esta aplicación tópica, es posible detectar una interacción entre la melatonina, o algunos otros indoles de la pineal, y los neurotransmisores localizados en esta zona. Bajo estas circunstancias nuestros objetivos en los presentes experimentos consistieron en :

a) Determinar y caracterizar las respuestas eléctricas de diferentes regiones del hipotálamo, anterior, lateral y posterior, provocadas por la administración sistémica de melatonina.

b) Empleando la técnica de aplicación tópica por micropresión, analizar el efecto inducido por la aplicación de melatonina en las mismas regiones.

c) Realizar un análisis comparativo entre los efectos provocados por la melatonina y otros indoles provenientes de la pineal.

d) Describir los efectos provocados por la interacción de

melatonina con DA y 5-HT, empleando la administración de neurotoxinas, las cuales modifican a los sistemas dopaminérgicos y serotoninérgicos del hipotálamo.

I.- ACCIONES DE LA MELATONINA SOBRE TRES DIFERENTES REGIONES HIPOTALAMICAS.

El efecto antigonadotrópico de los indoles de la pineal, es inducido por una acción a nivel del hipotálamo anterior. Sin embargo, otras acciones descritas para esta sustancia, sugerirían un efecto a nivel de otras porciones hipotalámicas. Por ejemplo, sus efectos descritos sobre la ansiólisis (86) o la ingesta de alimento (57) podrían ser consecuencia de una acción en el hipotálamo lateral; mientras que sus efectos sobre la termoregulación, (102), pueden invocar una acción en el hipotálamo posterior. En un intento a determinar las porciones del hipotálamo afectadas por la melatonina decidimos realizar un registro de la actividad eléctrica de células localizadas en 3 regiones hipotalámicas anterior, lateral y posterior, en ratas anestesiadas a las cuales se les aplicó alguna dosis de melatonina. El parámetro que analizamos, modificación de la actividad unitaria eléctrica celular, probablemente constituye el mecanismo que antecedería cualquier acción, ya sea hormonal o conductual, desencadenado por la melatonina, por lo que corresponde a un índice adecuado para determinar la sensibilidad de una estructura a una neurohormona como la melatonina (99).

METODO

Se emplearon 64 ratas machos albinas de la cepa Wistar, con pesos que oscilaban entre 180 y 220 g en el momento del experimento. Los animales se mantenían en cajas individuales durante 10 a 15 días

antes de la sesión de registro. Durante este tiempo, las ratas tuvieron acceso a comida (Purina Rat Chow) y agua "ad libitum" y se mantuvieron en ciclos de luz oscuridad de 14:10 (8:00 A.M.-10:00 P.M) y temperatura controlada (21°C).

Las ratas se anestesiaron con uretano (Sigma. Chemical, Co.) I.F. (1.5 g/Kg peso). Una vez en la etapa quirúrgica se practicó una traqueostomía, colocando una cánula traqueal de 4 mm. Un cateter de polietileno de 0.5 mm de diámetro, fue introducido dentro de una vena yugular, para la administración de anestesia adicional; en caso de que fuese necesario, y para la administración de los fármacos a utilizar. Posteriormente, se rasuraba el cráneo del sujeto y se colocaba en un aparato estereotáxico (David Kopf) (Fig. 6). Se realizó una incisión de 2 cm en la parte superior del cráneo, y se trepanó el hueso (3 mm) que correspondía a las coordenadas de alguna de las porciones hipotálamicas, en concordancia con las coordenadas del atlas estereotáxico de Köning y Klippel (66):

Hipotálamo anterior AP= de 0.6 a 1.5 mm posterior a bregma.

LAT= de 0 a 1.2 mm de la línea media.

ALT= de 6.2 a 8.0 mm a partir de la corteza.

Hipotálamo lateral AP= de 3.0 a 4.2 mm posterior a bregma.

LAT= de 0 a 1.0 mm de la línea media.

ALT= de 6.3 a 8.5 mm a partir de la corteza.

Hipotálamo posterior AP= de 1.5 a 2.6 mm posterior a bregma.

LAT= de 1.0 a 2.2 mm de la línea media.

ALT= de 6.4 a 8.0 mm a partir de la corteza.

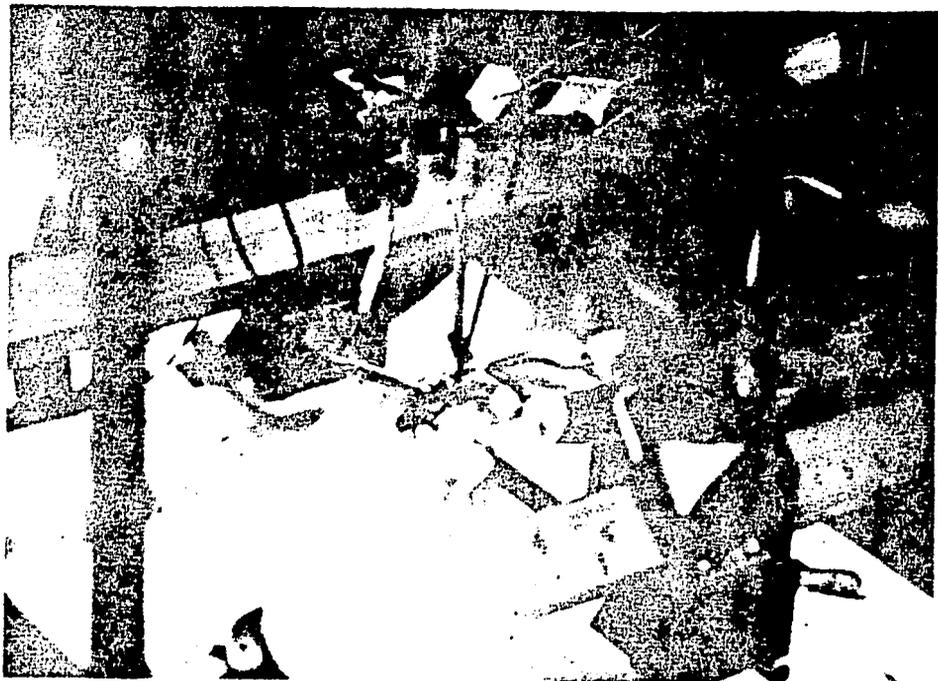


Fig. 6.- Los registros de la actividad unitaria, en los cuales se realizó la aplicación, ya sea sistémica o local de indoles de la pineal, se efectuaron en animales anestesiados con uretano y montados en un estereotáxico como el que aquí se muestra. Tales experimentos tenían una duración de 2 a 3 horas y siempre se procuró mantener a los animales en las mejores condiciones generales.

Un pequeño orificio (0.8 mm de diámetro) en el cráneo, servía para anclar un tornillo de acero inoxidable el cual hacía las veces de electrodo indiferente. Todas las heridas del animal fueron infiltradas con xylocaína (Astra Chemicals, S.A) y se controló su temperatura al colocar al animal sobre un colchón térmico a 35 °C.

El electrodo de registro fue una micropipeta de vidrio (WPI F-

150) con diámetro externo de 1.2 mm y diámetro interno de 0.9 mm, con filamento interno para fácil llenado. Una vez estirada la micropipeta se llenaba con una solución de NaCl 4 M (Baker Labs.) con verde rápido (Sigma Chemical Co.) en solución sobresaturada. La resistencia ohmica del electrodo de registro, medida in situ, osciló entre 5 y 25 Ω Ohms. La micropipeta fue descendida en etapas de 1 μ m, utilizando un micromanipulador (David Kopf) hasta los sitios de registro elegidos. Una vez dentro de alguna región hipotalámica se buscaban unidades que mostraran descargas espontáneas. Unicamente se realizaron registros cuando la descarga era unitaria y el tamaño de la espiga fue al menos 4 veces el tamaño del ruido basal. Después de localizar una espiga con estas características se procedía a determinar su estabilidad eléctrica durante aproximadamente 10 min. Cuando la descarga unitaria se mantenía estable, se iniciaba el registro control, que consistía de un registro continuo o durante 10 min. Posterior a los cuales se procedía a administrar intravenosamente una dosis de melatonina (Sigma, Chemical Co.) (100, 250, 500 ó 1000 μ g/Kg) o de solución control (propilenglicol al 10 %. J.T. Baker).

Las soluciones de melatonina fueron preparadas inmediatamente antes de su aplicación, disolviendo 2 mg de la sustancia en 1 ml de propilenglicol al 10 %. De esta solución se tomaba la dosis calculada para cada animal y se aforaba con agua bidestilada hasta 500 μ l. Los sujetos controles recibían una administración intravenosa de 500 μ l de solución de propilenglicol al 10 %, lo cual constituía una concentración de 3 a 4 veces mayor de la administrada en conjunto con la melatonina. Una vez realizada la aplicación del

fármaco, lo cual ocurría en 30 seg, el registro unitario se continuaba durante 50 min más.

La actividad unitaria fue registrada utilizando amplificadores GRASS P511J conectados en línea con un osciloscopio (Tektronix 5113), un audiomonitor (GRASS AMB) y un discriminador de ventana (Frederik Haer). Los pulsos de salida de este discriminador se alimentaron a una microcomputadora (Digital 11/03) a través de un convertidor analógico-digital. Una vez capturados estos datos la computadora guardaba esta información en disketes para ser procesados posteriormente.

Cuando la sesión de registro finalizaba, se administraba, a través de la pipeta de registro, una corriente catódica (1-2 mA) durante 20 min, con la finalidad de expulsar el colorante de la micropipeta y de esta forma marcar, y posteriormente localizar, los sitios de registro. Después de esto, el animal fue sacrificado con una sobredosis de uretano y perfundido con 200 ml de una solución de formaldehído (J.T. Baker) al 10 %. El cerebro fue extraído del cráneo y almacenado también en formaldehído al 10 % durante al menos 15 días; para posteriormente ser seccionado en cortes de 60 μ m con un microtomo de congelación (American Optical Co.). Las manchas de verde rápido y las coordenadas de los tractos del microelectrodo visualizados en los cortes histológicos, fueron trazados en esquemas obtenidos del atlas Köhning y Klippel (66). Ya que únicamente se utilizó una micropipeta por rata y sólo se obtuvo un registro por animal, fué posible determinar los sitios de registro en todos los animales incluidos en el experimento.

El análisis de los datos consistió en realizar histogramas de frecuencia y acumulativos para cada unidad así como la frecuencia de descarga promedio y el porcentaje de cambio post-administración del fármaco, con respecto a la actividad control o espontánea. Cada célula fue evaluada para determinar un posible incremento o decremento en su frecuencia de descarga, al comparando la actividad control con la registrada después de la administración de la melatonina. Si esta comparación mostraba un cambio igual o mayor al 40%, entonces la célula se consideraba afectada por el tratamiento.

RESULTADOS

Los animales incluidos en esta sección fueron sólo aquellos sujetos en quienes la localización del sitio de registro ocurrió en la zona deseada, y en quienes la unidad registrada mantuvo su descarga durante todo el experimento. "

Los 64 animales registrados se distribuyeron de la siguiente manera: 20 fueron registrados en el hipotálamo anterior; 24 en el hipotálamo lateral y 20 en el posterior; en cada sitio 4 animales fueron sujetos que recibieron solución vehículo, por lo que el total de sujetos registrados y que recibieron alguna aplicación de melatonina se redujeron a 16, 20 y 16 para el hipotálamo anterior, lateral y posterior respectivamente.

Los registros obtenidos fueron estables con descargas espontáneas muy regulares y con frecuencias promedio que presentaron oscilaciones menores al 15 % de la frecuencia basal. En el 93 % de los casos, las espigas fueron trifásicas, siendo siempre el primer

componente el más grande. La duración de las espigas fue variable oscilando entre 0.8 a 2.3 msec. Un componente caracterizado como "A/B Brake" fué notado en la fase inicial positiva de casi todas las espigas, sugiriendo que los registros fueron obtenidos cerca de los somas neurales.

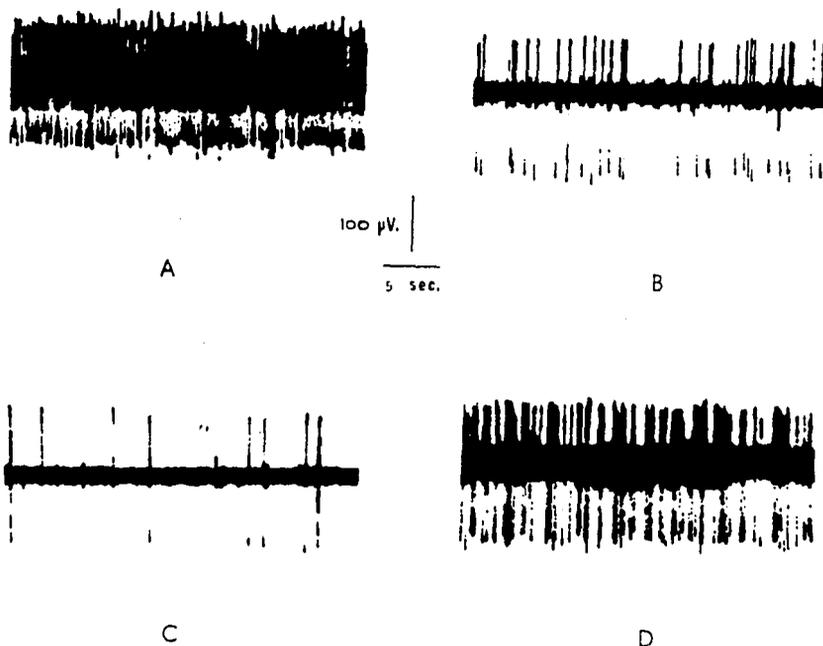


Fig. 7.- Actividad analógica representativa registrada del hipotálamo anterior, antes (A) y 20 (B), 40 (C) y 60 (D) minutos después de la administración intravenosa de 1 000 µg/Kg de melatonina. Cada fotografía corresponde a un trazo del osciloscopio de 50" sec, la amplitud de la espiga es de aproximadamente de 250 µV.

La frecuencia de descarga espontánea para las 3 regiones hipotalámicas fue en promedio de: a) 3.2 ± 1.8 espigas/seg (rango 0.6 a 18.3 espigas/seg) para el hipotálamo anterior; b) 2.1 ± 1.2 (rango 0.1 a 12.4 espigas/seg) para el hipotálamo lateral y c) $6.4 \pm$

2.8 (rango 0.1 a 19.6 espigas/seg) para el hipotálamo posterior.

La administración intravenosa de melatonina en las diferentes dosis siempre produjo un decremento de la frecuencia de descarga de las células registradas independientemente del sitio registrado (Fig. 7), la intensidad y duración del efecto dependieron de la dosis empleada.

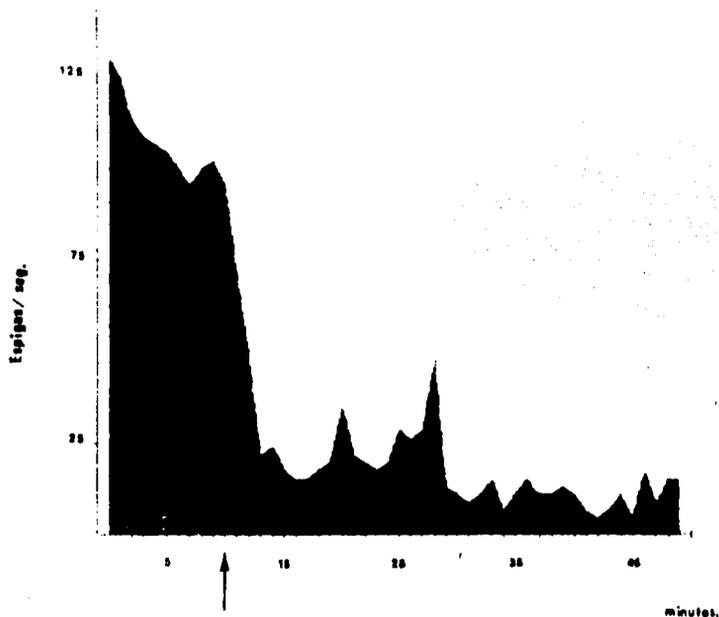


Fig. 8.- Histograma de frecuencias, donde se muestra la descarga espontánea por segundo de una unidad representativa del hipotálamo lateral. La aplicación sistémica de 500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de melatonina (señalada por la flecha), provocó un decremento significativo de la frecuencia de descarga de aproximadamente el 80% de la frecuencia basal. Tal efecto se mantuvo continuo durante todo el tiempo de registro.

En general, este efecto depresor se inició entre 80 y 140 segundos en el hipotálamo lateral y anterior, respectivamente; y de

240 a 500 segundos en la otra región hipotalámica posterior (Fig. 8, 9 y 10). La responsividad a la melatonina, de los 3 diferentes porciones (es decir el porcentaje de células afectadas por algunas de las dosis de melatonina) fué de 62.5 % (n = 10/16) para el hipotálamo anterior, 80 % (n = 16/20) para el hipotálamo lateral y de 42.8 % (n = 7/16) para el hipotálamo posterior.

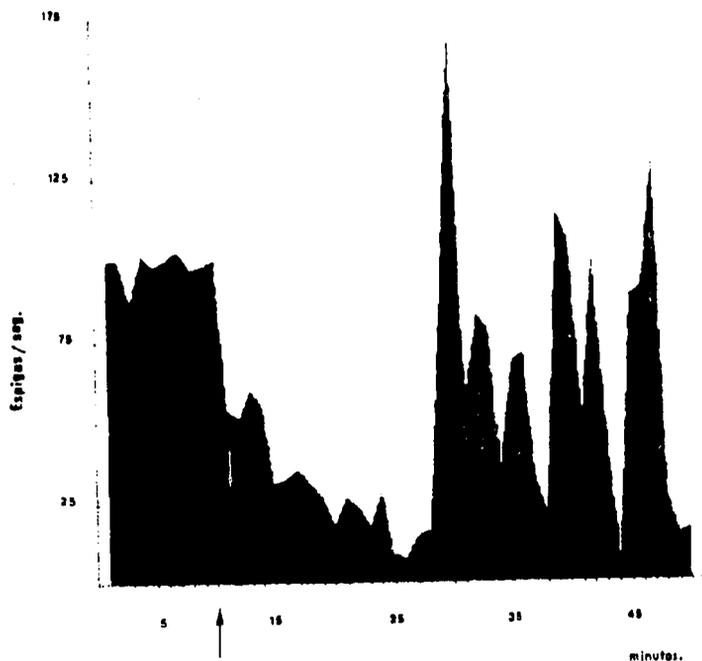


Fig. 9.- La administración sistémica de 250 $\mu\text{m}/\text{Kg}$ de melatonina en el hipotálamo anterior, también provocó una disminución de la frecuencia de descarga unitaria. Tal efecto se inició pocos segundos después de la administración y frecuentemente se acompañaba de cambios en la regularidad de las descargas unitarias.

Los efectos depresores de la melatonina mostraron un inicio brusco en el hipotálamo lateral (Fig. 8) y en el anterior (Fig. 9); mientras que en el posterior, estos se presentaron más

paulatinamente aunque tuvieron la misma duración (Fig. 10). Frecuentemente, cuando los efectos de la melatonina finalizaban en el hipotálamo anterior, la frecuencia de descarga se tornaba más irregular (Fig. 9). A pesar de ello, la melatonina no produjo cambio alguno en la morfología ni en la duración o tamaño de las espigas en alguna de las tres porciones registradas.

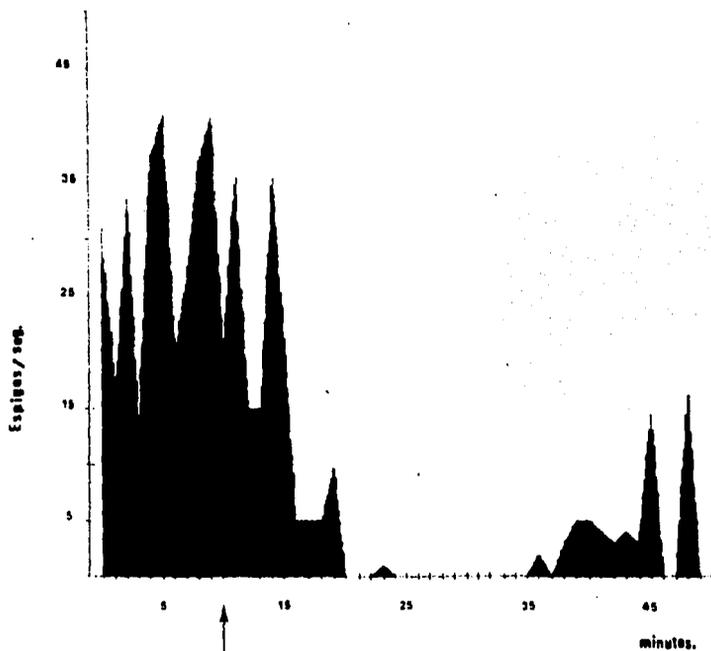


Fig. 10.- En el caso del hipotálamo posterior, los efectos mostraron una mayor latencia de inicio, aunque mostraron igual intensidad y duración que en las otras porciones hipotalámicas registradas.

El análisis de la localización de las unidades registradas en las 3 porciones hipotalámicas se resume en la Fig. 11. En esta figura se muestran la localización de las unidades que presentaron

alguna respuesta a la aplicación de melatonina y aquellas que no fueron afectadas por el fármaco. Las unidades del hipotálamo anterior y posterior que respondieron a la administración de melatonina se localizaron preferentemente en la porción medio basal; mientras que para el caso del hipotálamo lateral, tanto las neuronas que no respondieron como las que lo hicieron se distribuyeron homogéneamente (Fig. 11).

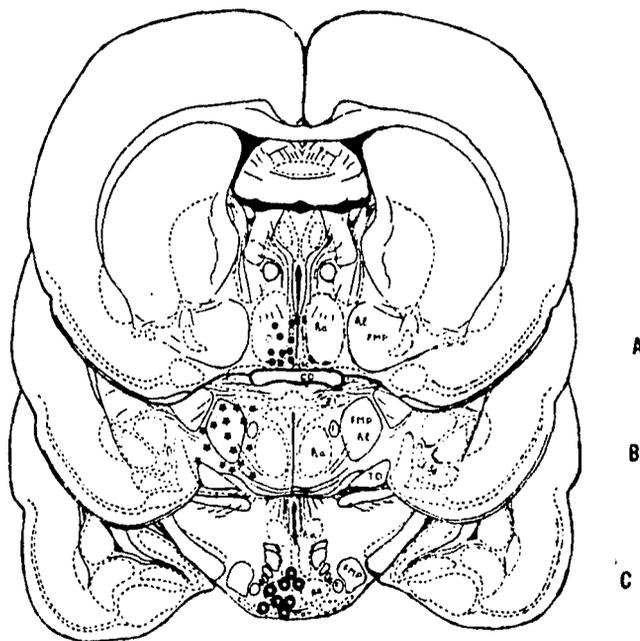


Fig. 11.- La descripción histológica de los sitios de registro, mostró que las unidades respondivas (Círculos oscuros) en el hipotálamo anterior y posterior, tienden a localizarse sobre las regiones medio y basal, a diferencia de las unidades no respondivas (Círculos blancos). En el caso del lateral, ambos tipos de unidades se distribuyen homogéneamente. ha= hipotálamo anterior; hl= hipotálamo lateral, sc= núcleo supraquiasmático, co= quiasma óptico; FMP= haz prosencefálico medial.

II EFECTO DE LA APLICACION POR MICROPRESION DE MELATONINA, 5-HIDROXYTRIPTOFOL Y 5-METOXITRIPTOFOL.

El experimento anterior mostró que las 3 regiones hipotalámicas registradas fueron sensibles a la aplicación sistémica de melatonina, aunque estos resultados no permiten determinar si se trataba de un efecto directo sobre las neuronas registradas, o si éste es consecuencia de una acción indirecta del fármaco. Tampoco brinda información sobre la especificidad farmacológica de estos efectos.

Por estas razones, decidimos realizar la aplicación tópica de melatonina sobre las unidades registradas en el hipotálamo lateral, región que mostró la máxima sensibilidad a esta sustancia indólica. En un intento de caracterizar la especificidad de tal respuesta decidimos aplicar en forma similar a 2 análogos estructurales de la melatonina, estos son el 5-hidroxitriptofol y el 5-metoxitriptofol (Sigma, Chemical Co.). Ambos compuestos son sustancias indólicas sintetizadas también por la glándula pineal (Fig. 4). El 5-metoxitriptofol posee efectos antigonadotrópicos similares a la melatonina; mientras que el 5-hidroxitriptofol carece de ellos.

También decidimos aplicar a la melatonina y sus análogos por micropresión, una técnica similar a la microiontoforesis, pero que en lugar de utilizar corriente eléctrica para expulsar el fármaco, utiliza presión. La razón fundamental de esta elección, reside en las propiedades fisicoquímicas de la melatonina y sus análogos; éstos indoles son prácticamente insolubles en agua, pero solubles en etanol o propilenglicol.

METODO

Se emplearon 16 ratas machos Wistar con pesos que oscilaban entre 180 y 230 g. Previamente a la lesión de registro, los animales se mantuvieron en cajas individuales con agua y comida (Purina Rat Chow) "ad libitum". Los ciclos luz oscuridad fueron de 14:10 (8:00-22:00 Hrs) y la temperatura controlada a 22°C.

Para la aplicación por micropresión de los fármacos se utilizó un ensamble de 4 micropipetas (WPI 150 F) con filamento interno, estiradas en conjunto, y el cual tenía una punta de 6-9 μm . Las diferentes micropipetas se llenaron con una solución de: a) melatonina 0.1 M a pH = 6.5 disuelta en una solución de propilenglicol (J.T. Baker), al 10 % en agua bidestilada. b) 5-metoxitriptofol (Sigma Chemical, Co.), 0.1 M a pH = 6.3 disuelto en solución de propilenglicol al 10 % en agua bidestilada. c) 5-hidroxitriptofol (Sigma, Chemical Co.) 0.1 M a pH = 5.6 disuelto en solución de propilenglicol al 10 % en agua bidestilada; d) micropipeta llena con propilenglicol al 10% en agua bidestilada, pH = 7.2, la cual sirve para verificar que los efectos observados no son debidos al disolvente ni al pH de las soluciones.

Todas las soluciones fueron preparadas inmediatamente antes de llenar las micropipetas, y éstas a su vez se fabricaban inmediatamente antes de su uso. Como electrodo de registro se utilizó una micropipeta de borosilicato sódico (WPI 150-F), con filamento interno para llenado rápido. Después de estirada, la punta de la micropipeta media de 1 a 2 μm y se llenaba con una solución de NaCl 4M en una solución saturada de verde rápido. La punta de la

micropipeta se doblaba ligeramente y utilizando un estereoscopio se adosaba y pegaba a la punta del ensamble de micropipetas, de tal forma que su punta protruía de 15 a 20 μm por delante de la punta del ensamble de micropipetas (Fig. 12). El empleo de este tipo de ensambles de micropipetas asegura un registro óptimo, unitario y sin la interferencia que se provoca cuando se aplica corriente o presión para expulsar a los diferentes fármacos.

Fig. 12.- El empleo de micropipetas diferentes para realizar el registro y la expulsión del fármaco, las cuales son posteriormente ensambladas bajo inspección con un estereoscopio, permite realizar registros con mínima interferencia y debido a la menor resistencia de las micropipetas llenas con fármacos, se logra una expulsión óptima.

La micropipeta de registro mostraba una impedancia ohmica, medida in situ, de 15 a 25 M Ω , mientras que la impedancia de las diferentes micropipetas llenas con los diferentes fármacos osciló entre 3 a 6 M Ω ; lo cual aseguraba una expulsión del fármaco adecuada.

Para realizarla expulsión por micropresión se utilizaron picobombas neumáticas de presión constante (WPI PV 800) conectadas a las micropipetas a través de tubos de polietileno. Estas bombas permitían aplicar presiones que oscilan entre 1 y 100 psi. En los intervalos interexpulsión, las bombas retienen el fármaco por aplicar una presión de vacío, la cual puede oscilar entre -1 y -30 psi, dependiendo de la impedancia de la micropipeta. En nuestro caso las presiones de retención utilizadas fueron de 3 a 6 psi y la expulsión de fármaco ocurrió utilizando presiones desde 10 hasta 60 psi.

Los animales fueron anestesiados con uretano (1.5 g/Kg), después de una traqueostomía y colocación de una cánula intratraqueal, estos se colocaban en una aparato estereotáxico, se realizaba una incisión de la piel, se retiraba el periostio, y se realizaban 2 perforaciones óseas en el cráneo. Una de ellas, de 6 mm sobre las coordenadas del hipotálamo lateral, otra de 0.6 mm sobre la región occipital donde se colocaba un tornillo que hacía las veces de electrodo indiferente.

La captura, visualización y análisis de la actividad unitaria se realizó utilizando el mismo equipo y diseño del experimento anterior.

Después de descendida la micropipeta, y dentro del hipotálamo lateral, se procedía a localizar unidades con actividad espontánea. Posterior a un periodo de registro para comprobar la estabilidad eléctrica de las unidades, cada una de ellas se sometió a la administración por micropresión de alguno o varios de los fármacos mencionados. La aplicación de los cuales se realizaba en forma secuencial, usualmente en pulsos de 30 a 60 segundos con presiones variables. Entre cada aplicación siempre transcurrió un mínimo de 5 minutos, con la finalidad de evitar efectos aditivos.

Con esta técnica de inyección es posible registrar varias unidades en el mismo animal. Así que para marcar el sitio de registro, se administró una corriente catódica (1.5 mA por 20 min) a través del electrodo de registro, al final de registrar la última unidad. El animal fue entonces sacrificado con una sobredosis de anestésico; se perfundía con una solución de formaldehído al 10 %, se extraía el cerebro y posteriormente se realizaban cortes de 60 μ m para localizar los sitios de registro. Las manchas de verde rápido y las coordenadas de los tractos del ensamble de micropipetas, observadas en los cortes histológicos, fueron trasladados en diagramas correspondientes del atlas de Köning y Klippel (66).

Ya que solo un ensamble de micropipetas fue empleado a lo largo de un experimento, la localización de los sitios de registro diferentes a aquellos en que se aplicó el verde rápido fueron determinados indirectamente, por comparar las coordenadas obtenidas de los micrómetros de la torre del estereotáxico y de las barras laterales del mismo durante el experimento, con las coordenadas

determinadas histológicamente de los tractos del electrodo y de las manchas de verde rápido. Consideramos que el tratamiento fué efectivo, sólo si al comparar la actividad unitaria durante la aplicación del fármaco con aquella registrada inmediatamente antes, se obtenía una diferencia igual o mayor al 40 %.

RESULTADOS

Se registró la actividad unitaria de 54 células, de las cuales 8 de ellas se localizaron en regiones ajenas al hipotálamo y no modificaron su actividad eléctrica ante algún tratamiento. Del total de células restantes (n=46) se obtuvieron registros de actividad espontánea en todas ellas, 38 recibieron una o varias aplicaciones de melatonina con diferentes presiones, 22 fueron probadas por el efecto de 5-metoxitriptofol y sólo 18 de estas células recibieron una o varias expulsiones de 5-hidroxitriptofol.

En términos generales, la actividad espontánea del hipotálamo lateral fué muy regular. Las descargas siempre fueron de tipo simple, no se observaron descargas en "ráfagas" (bursts). La frecuencia de descarga promedio de todas las células registradas fué de 3.1 ± 1.8 (rango 0.2-19.4, espigas por segundo). Su tamaño siempre fué mayor a 4 veces el tamaño del ruido basal.

La aplicación de melatonina por micropresión provocó efectos en 24 de las 38 células registradas lo cual corresponde al 65 % de la población analizada. Esta neurohormona provocó un decremento significativo en la frecuencia de descarga de las espigas. Este decremento se inició pocos segundos (4-12) posteriores al inicio de la micropresión (Fig. 13) perdurando, aunque con oscilaciones,

durante todo el tiempo de aplicación de la micropresión.

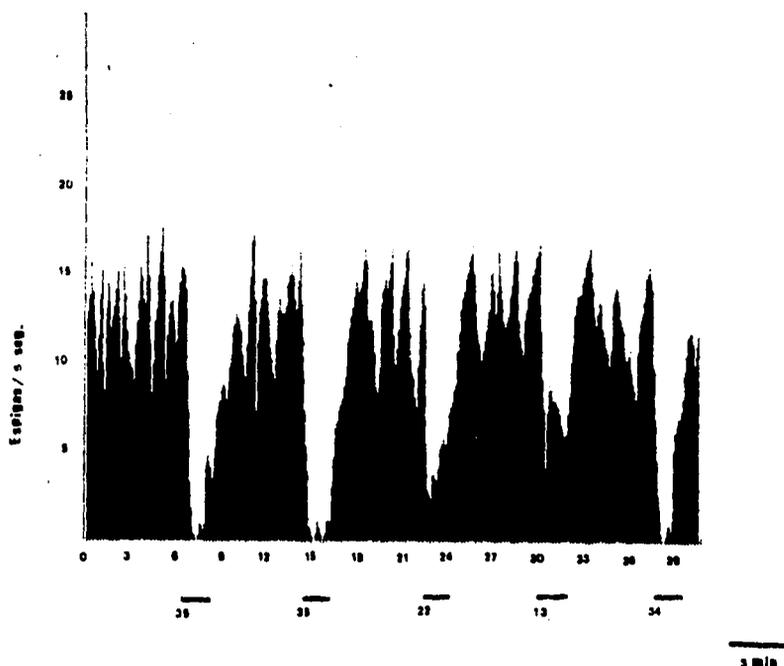


Fig. 13.-La aplicación por micropresión de melatonina a neuronas del hipotálamo lateral produjo una clara depresión de la frecuencia de descarga. Tal acción tuvo un inicio inmediato y una recuperación paulatina, aunque siempre se mantuvo durante todo el tiempo que la presión se aplicó (barras horizontales). Los números indican la cantidad de presión aplicada en psi.

La intensidad del efecto depresor de la melatonina administrada por este mecanismo, mostró una relación directa con la cantidad de presión aplicada. Así, en el 80 % de las neuronas que respondieron a una intensidad de 10 psi, con 35 a 40 psi, la inhibición de la actividad unitaria fue total. Los efectos depresores fueron muy constantes, repetibles y no produjeron cambios

significativos en la forma, tamaño o duración de las espigas, ni durante ni después de la aplicación de la sustancia.

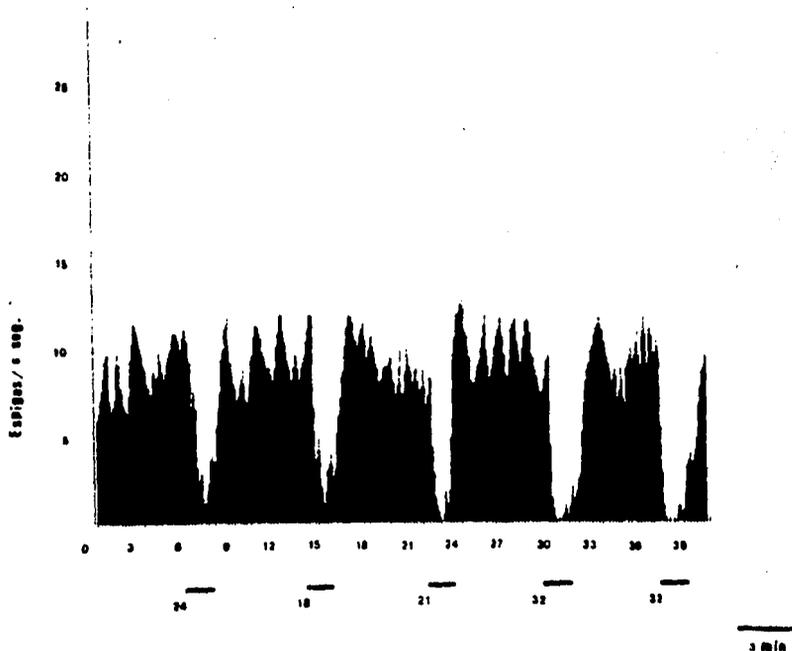


Fig. 14.- Histograma representativo que muestra los efectos depresores provocados por la aplicación local del 5-metoxitriptofol en las neuronas del hipotálamo lateral. Estos efectos son muy similares a los observados durante la aplicación también tópica de melatonina.

Para el caso del 5-metoxitriptofol los efectos encontrados fueron similares. Este indol fue probado en 22 unidades de las cuales 18 (lo que corresponden al 81.8 %), mostraron algún cambio provocado por esta sustancia. El efecto observado fue también un importante y significativo decremento, el cual se asoció a la cantidad de presión utilizada. Con la aplicación de esta sustancia fueron suficientes presiones de 5 a 8 psi para obtener algún efecto

observable y, usualmente, la depresión de la frecuencia de descarga se convertía en una inhibición total con presiones de 28 a 32 psi (Fig. 14). Comparativamente, se requirieron presiones menores para provocar los mismos efectos con 5-metoxitriptofol que con melatonina.

Las depresiones provocadas por 5-metoxitriptofol también mostraron un patrón muy similar a las provocadas por la melatonina; a saber, éstas se iniciaban entre 3 y 7 segundos posteriores al inicio de la micropresión, y perduraban todo el tiempo que se aplicaba ésta. Posteriormente la célula retomaba su frecuencia basal. Tampoco se observó algún cambio significativo tanto en morfología, como en el tamaño o duración del potencial de acción registrado durante o después de la aplicación del 5-metoxitriptofol (Fig. 14).

Los resultados observados después de la aplicación de 5-metoxitriptofol, fueron sin embargo, muy diferentes. Este indol metoxilado en el carbono no. 5 del anillo cíclico indólico, fué aplicado también por micropresión a 18 unidades, en las cuales se observó sólo un ligero (menor al 30%) efecto excitador en sólo 2 unidades. En términos generales, la aplicación de este fármaco no provocó un efecto observable y significativo sobre la frecuencia de descarga (Fig. 15); ni siquiera a presiones superiores a 50 psi, las cuales se acompañan de procesos desestabilizadores de la excitabilidad celular, (Fig. 15). El fármaco tampoco modificó alguna otra característica en la morfología o patrón de las descargas unitarias.

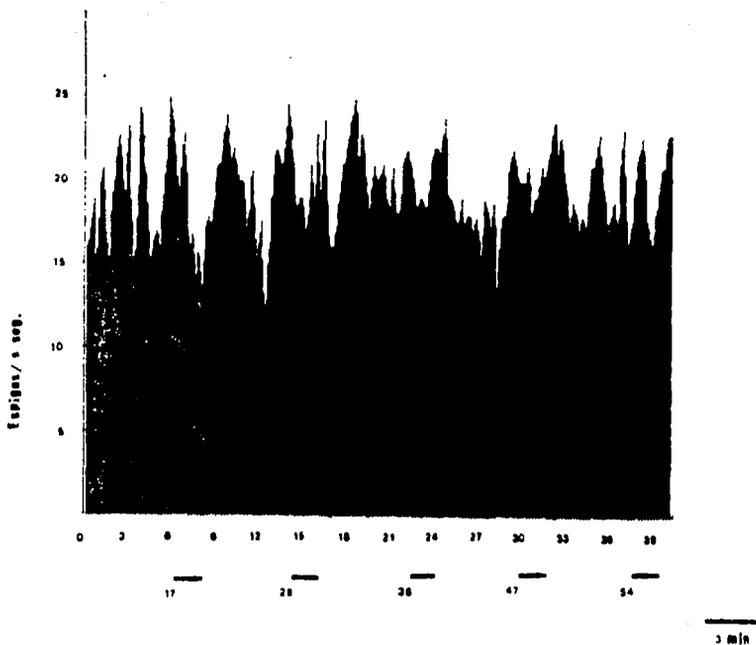


Fig. 15.- A diferencia de los otros indoles, la administración local de 5-hidroxitriptofol, no provocó algún efecto observable sobre la frecuencia de descarga, ni sobre algún otro parámetro eléctrico observable, de las unidades del hipotálamo lateral.

En 18 de las unidades registradas, fue posible aplicar los 3 fármacos consecutivamente; mientras que en 9 células sólo se aplicaron 2 fármacos y en 16 del total de unidades registradas, se aplicó un solo fármaco. Entonces una misma célula, o 2 células del mismo animal, podrían responder a un fármaco pero no a otro; lo cual garantizaba la funcionalidad del ensamble de micropipetas y la responsividad del sistema biológico.

III. EFECTOS DE LA MELATONINA Y DEL 5-METOXITRIPTOFOL SOBRE LA ACTIVIDAD UNITARIA DEL HIPOTALAMO LATERAL EN ANIMALES PRETRATADOS CON RESERPINA, 6-HIDROXIDOPAMINA Y 5,7-DIHIDROXITRIPTAMINA.

Los resultados del estudio previo mostraron que los indoles metilados de la glándula pineal modifican en forma directa la actividad eléctrica de las neuronas del hipotálamo lateral; aunque no brinda información sobre el tipo de neurona afectado. En lo relativo a sus acciones antigonadotrópicas, se sugiere que la melatonina actúa por modificar la actividad de un sistema dopaminérgico o serotoninérgico intrínseco del hipotálamo (135). Aunque se desconoce las características de tal modificación.

Si este es el caso, entonces es probable que el pretratamiento con neurotoxinas, las cuales provocan depleción de dopamina (6-hidroxi-dopamina) serotonina (5,7-dihidroxitriptamina) o de ambas (reserpina), modifiquen también las respuesta de estas neuronas a la administración tópica de estos indoles. El siguiente experimento fue diseñado con el objetivo de analizar esta hipótesis.

METODO

Cuatro lotes de 8 ratas macho Wistar fueron utilizadas, los pesos de los animales oscilaban entre 180 y 220 g al inicio del experimento. Los animales del primer lote recibieron una administración intracerebroventricular de 25 μ l de una solución salina isotónica (0.9 % Abbott). Los sujetos experimentales del segundo lote recibieron, por su parte una aplicación también intracerebroventricular de 200 μ g de 6-hidroxi-dopamina (Sigma, Chemical Co.) disueltos en 25 μ l de una solución de ácido ascórbico

(Sigma, Chemical Co.): como antioxidante, al 2%. En el caso de las ratas provenientes del tercer lote, éstas recibieron la aplicación intracerebroventricular de 200 µg de 5,7-dihidroxitriptamina, disuelta en solución salina isotónica (0.9 %). Finalmente, los 8 animales provenientes del cuarto lote fueron pretratados con la aplicación intraperitoneal de 1 mg/Kg de peso de reserpina, disuelta en solución salina.

Los pretratamientos con 6-hidroxi dopamina y 5,7-dihidroxitriptamina, se realizaron 5 días antes de la sesión de registro, tal procedimiento garantiza una depleción de dopamina y serotonina en el hipotálamo del 80 y 65%, respectivamente (123). Por su parte el pretratamiento con reserpina se efectuó 48 horas antes de la fase experimental.

La aplicación intracerebroventricular se realizó "bajo anestesia con pentobarbital sódico (Anestesal. Smith Kline) (40 mg/Kg). Una vez en etapa quirúrgica, se rasuraba el cuero cabelludo del cráneo y el animal se colocaba en un aparato estereotáxico. Se realizaba una pequeña insición (1 cm) sobre la línea media y se localizaba la unión bregma. Se realizaba un trépano de 0.3mm sobre las coordenadas del ventrículo lateral (2.0 mm posterior a bregma y 1 mm lateral; (66)), por donde se descendía una aguja de carpul (acero inoxidable calibre no. 27). Dicha aguja se montaba sobre una torre del estereotáxico y se conectaba con una microjeringa (Hamilton, Co.) de 25 µl de capacidad a través de un tubo de polietileno de 60 cms. de largo. A su vez, la microjeringa se colocaba sobre un microinyector, en el cual 10 vueltas equivalían a

un ml.

Los 25 μ l en que se disolvían los fármacos, se inyectaban a una velocidad de 2 μ l por minuto, por lo que el tiempo total de inyección fué de 12 a 15 minutos. Finalizada la microinyección, la aguja se dejó durante 5 minutos más y después fué retirada lentamente. Realizado esto, se colocaba un poco de cera para hueso (Ethicon) en el trépano y se sutura la piel con seda quirúrgica (Anacip). Los fármacos se prepararon inmediatamente antes de su aplicación.

La aplicación por micropresión de 5-metoxitriptofol y de melatonina, se realizó empleando un ensamble de pipetas similar al del anterior experimento: con las mismas concentraciones y pH mencionados. De igual forma los procedimientos de anestesia, montaje en el estereotáxico, captura, monitoreo y análisis de actividad unitaria siguieron el mismo patrón que en los experimentos previos.

RESULTADOS

La administración intracerebroventricular tanto de 6-hidroxidopamina como de 5,7-dihidroxitriptamina, Así como la administración intraperitoneal de reserpina, provocaron importantes cambios conductuales. En el caso de la administración de 6-hidroxidopamina, las ratas presentaron alteraciones motoras caracterizadas por un incremento del tono muscular, acinesia e inclinación hacia la derecha de la cabeza. Los animales tendían a bajar de peso y no se les veía ingerir alimento alguno.

Por su parte, las ratas pretratados con 5,7-dihidroxitriptamina, mostraron menos alteraciones motoras aunque en

ellos la anorexia fue más marcada y el descenso del peso corporal fue mayor.

Los animales pretratados con reserpina mostraron los cambios más marcados. Aproximadamente a las 2 horas de administrar el fármaco, los sujetos mostraron una profusa diarrea, hipotermia y temblores distales de las extremidades, usualmente se tornaban retraídos y no se movían.

De los 8 animales pretratados con 6-hidroxidopamina 2 fallecieron como consecuencia del fármaco. Mientras que 4 sujetos del grupo pretratados con reserpina también fallecieron. Por lo tanto la muestra final de sujetos fué de 8 sujetos controles, 8 con aplicación intracerebroventricular de 5,7-dihidroxitriptamina; 6 sujetos con pretratamiento de 6-hidroxidopamina y 4 sujetos que recibieron reserpina intraperitonealmente.

Registramos 16 unidades de cada grupo de animales, lo cual corresponde aproximadamente a 2 unidades por rata pretratada. En términos generales fue mucho más difícil encontrar unidades con actividad espontánea en los animales pretratados, con alguno de los fármacos, que en los animales controles. En todas las unidades registradas se procedió a realizar la aplicación por micropresión de melatonina y 5-metoxitriptofol.

De las 16 unidades registradas en las ratas que recibieron la administración intracerebroventricular de solución salina, y por lo tanto consideradas como controles, sólo 10 de ellas mostraban algún cambio significativo en su frecuencia de descarga, por efeto de

algunos de los 2 indoles. Tal número corresponde al 62.5 % de las mismas. Cuando una unidad respondía a la administración de melatonina, también respondía a la administración de 5-metoxitriptofol, nunca se observó el caso de que una unidad respondiera a un fármaco pero no al otro. Ambos fármacos modificaron solo la frecuencia de descarga, sin acciones sobre otros parámetros de estas descargas eléctricas.

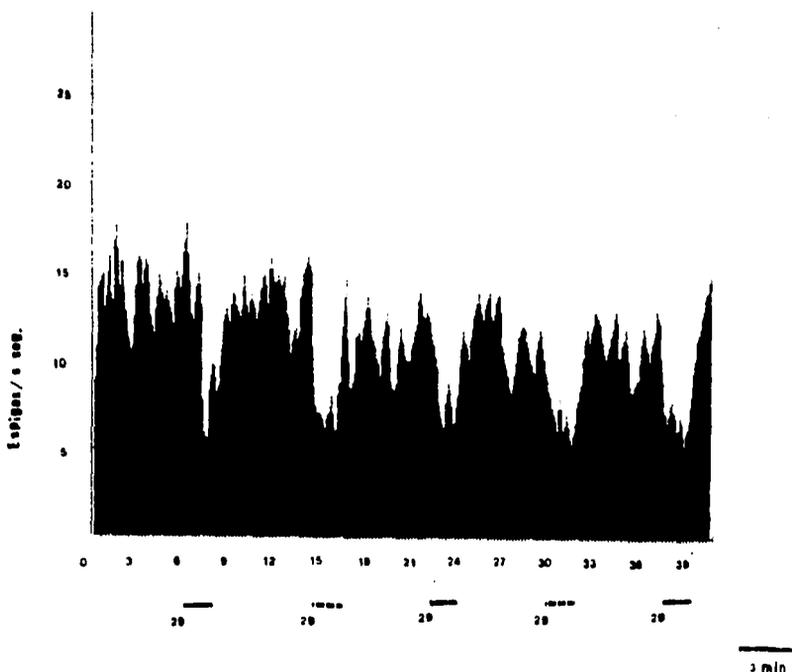


Fig. 16.- Histograma de frecuencias de una unidad proveniente de un animal pretratado con 1 mg/Kg de reserpina. Se observa el efecto de la aplicación local de melatonina (barras continuas) y de 5-metoxitriptofol (barras discontinuas) sobre la frecuencia de descarga. Estos efectos son comparativamente mucho menores que los que se observan en animales sin pretratamiento. Los números bajo las barras representan la cantidad de presión utilizada para la expulsión del fármaco de la micropipeta.

Los efectos depresores observados, mostraron características muy similares a las encontradas en el trabajo previo. También notamos que la administración de 5-metoxitriptofol provocó efectos depresores más intensos que los causados por la melatonina

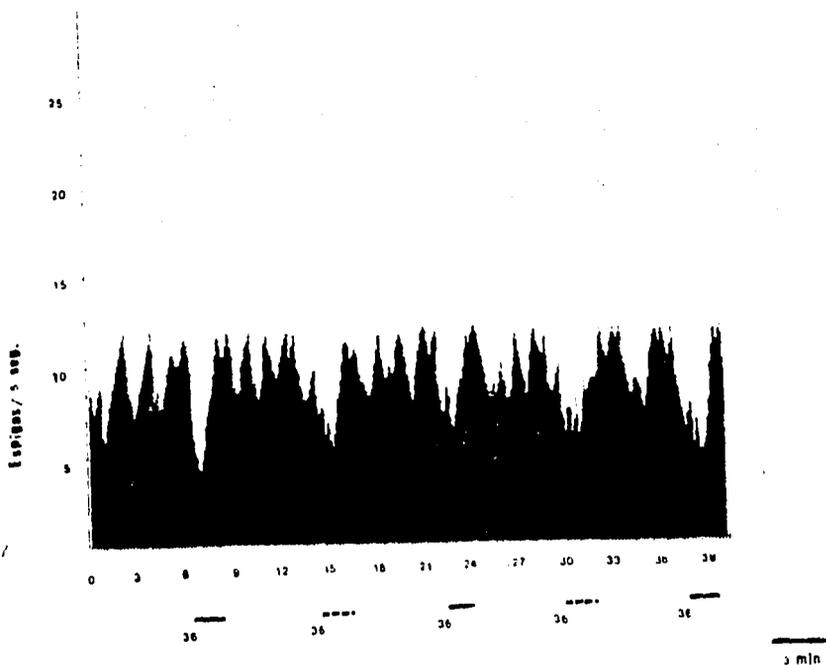


Fig. 17.- Cuando los 2 indoles de la pineal, aplicados por microperforación, se administraron a neuronas hipotálamicas provenientes de animales pretratados con 6-hidroxidopamina, los efectos depresores antes descritos, se amortiguaron muy significativamente. Entonces para provocar un efecto observable, fue necesario el administrar presiones mayores a 30 psi.

Los efectos de los indoles metilados, melatonina y 5-metoxitriptofol, fueron diferentes en animales pretratados con reserpina con respecto a los sujetos controles. En este caso, de 16

unidades registradas únicamente 6 mostraron algún cambio significativo por efecto de los fármacos. Este porcentaje (37.5 %) es significativamente diferente ($P < 0.05$; χ^2) cuando se comparó con el correspondiente de los sujetos controles. También la intensidad de la respuesta de las células responsivas decreció (Fig. 16). En esta situación, corrientes de 29 psi, que en unidades provenientes de sujetos controles provocaba una inhibición del 80%, en estas unidades solo provocó inhibiciones del 20 al 30% (Fig. 16). Sin embargo, las características y dinámica de los efectos fue muy similar a lo observado en el grupo control.

Cuando estos fármacos se aplicaron en unidades provenientes de animales pretratados con 6-hidroxidopamina, sus efectos se redujeron muy significativamente. Por ejemplo de las 16 unidades analizadas sólo 3 de ellas mostraron algún efecto observable. Esta porción de unidades corresponde a un porcentaje de sólo el 18.75% y es significativo con respecto al encontrado en los sujetos controles ($P < 0.01$, χ^2). De nueva cuenta, la intensidad de los efectos decrecieron significativamente (Fig. 17). En este caso, presiones de 36 psi, las cuales provocan inhibiciones de casi el 100% de la frecuencia de descarga (Fig. 13), en estas células sólo redujeron la actividad de un porcentaje del 20 al 30% (Fig. 17). A pesar de ello, las características y dinámica de los efectos no fue modificada por el pretratamiento con 6-hidroxidopamina.

Finalmente, cuando ambos fármacos se aplicaron en animales pretratados con 5,7-dihidroxitriptamina, éstos afectaron a 11 unidades representando el 68.75 % del total de células registradas.

Los efectos fueron muy similares a los encontrados en los sujetos controles (Fig. 18). Nuevamente la única respuesta observada fue un decremento de la frecuencia de descarga, más significativa para el 5-metoxitriptofol que para la melatonina (Fig. 18). La dinámica y característica de tal efecto fue similar al observado en los sujetos controles.

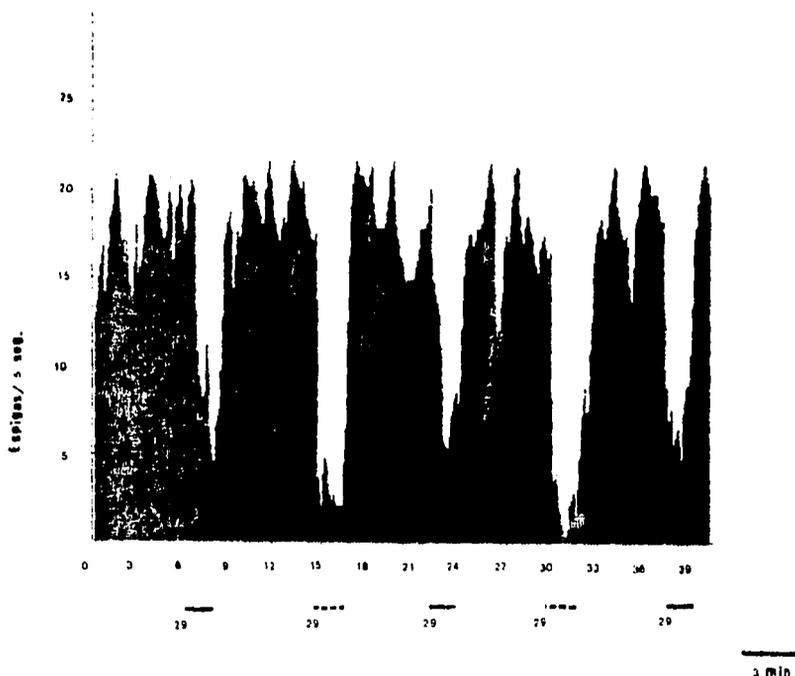


Fig. 18.- Las acciones depresoras de la melatonina y el 5-metoxitriptofol no se vieron afectadas por el pretratamiento con 100 μ g de 5,7-dihidroxitriptamina. Tanto el número de células afectado, así como la intensidad del efecto fueron muy similares a los observados en el grupo control.

DISCUSION

Los resultados observados en el presente trabajo, muestran que las 3 regiones hipotalámicas registradas, anterior, lateral y posterior, son sensibles a los indoles metilados de la glándula pineal, aunque tal sensibilidad fue mayor para el hipotálamo medial, y menor para el posterior. Estos efectos sobre la actividad eléctrica neuronal parecen ser debidos a un efecto directo de estas sustancias sobre la membrana celular, puesto que la aplicación local por micropresión, al igual que la sistémica, inducen efectos similares y afectan también un número similar de unidades.

Debido a la latencia con que estos efectos se presentan, probablemente estas acciones sean consecuencia de una interacción entre estos fármacos y alguna porción de la membrana celular. Si estas acciones representan una interacción con un receptor específico es algo aún difícil de afirmar.

La búsqueda de sitios de unión específicos de la melatonina, ha sido tortuosa y puede decirse que infructuosa hasta ahora (70). Se realizaron varios intentos para localizar tal receptor utilizando ³H-Melatonina, pero los resultados obtenidos por varios estudios (22, 27, 89), son controversiales.

Recientemente, un grupo de Investigadores dirigidos por E. Zizapel (70) mostró resultados sugerentes a la existencia de un receptor específico a la melatonina. Estos autores utilizaron ¹²³I-Melatonina, en vez de utilizar ³[H]-Melatonina. De acuerdo a

su teoría, la densidad de receptores a la melatonina es tan pobre que la intensidad de la emisión de la radiación por tritio es tan baja que la hace indetectable; en cambio, si utilizamos un radioisótopo que emita una radiación más potente, será posible detectar una ~~menor~~ ^{mayor} densidad de los sitios de unión (70).

Con base en esta sugerencia, estos autores determinaron tales receptores en el hipotálamo, hipocampo y corteza cerebral (71). Dentro del hipotálamo, al parecer, únicamente el hipotálamo anterior mostró tales sitios de unión. Contrariamente, ni el lateral ni el posterior fueron capaces de fijar a la ¹²³I-11-melatonina.

Si estos datos fuesen confirmados, esto sugeriría que algunos de los resultados obtenidos en el presente estudio, no son mediados por receptores específicos a la melatonina, y por lo tanto podrían representar una acción farmacológica inespecífica de los mismos.

La uniformidad en los efectos provocados por los indoles, —únicamente observamos depresión de la actividad eléctrica, sugerirían también una acción inespecífica, tipo anestésico local de estas sustancias; aunque existe cierta selectividad en tales efectos, puesto que el derivado hidroxilado de los indoles carece de algún efecto sobre este parámetro celular en estas neuronas:

En relación a la aplicación tópica de melatonina dentro del hipotálamo, existe únicamente otro trabajo realizado por Demaini y cols. (32) quienes aplicaron melatonina y 5-metoxitriptofol por microiontoforesis, a neuronas localizadas en el hipotálamo rostral-

predóptico. Los registros se realizaron ya sea durante la fotofase o la fotofases, en un intento de encontrar una diferencias en la sensibilidad, propiciada por el fotoperiodo, a estas neurohormonas.

De acuerdo a los resultados obtenidos por estos autores, la aplicación microiontoforética de melatonina en la fase diurna, propicia un incremento de la frecuencia de descarga en aproximadamente el 80% de las neuronas registradas; mientras que el mismo procedimiento durante la escotofase, provoca ahora un efecto depresor significativo del mismo parámetro en las misma neruonas. Sin embargo, Resulta bastante difícil el confontrar estos datos a la luz de los hallazgos actuales.

Así, aunque Tamarkin y Cols. (118), mostraron que la aplicación sistémica de melatonina, con la finalidad de provocar efectos antigonadotrópicos, sólo es efectiva cuando se administra en el momento del cambio de fase del patrón de secreción de esta hormona; es decir, de 6-7:30 ó de 18-19:30 hrs, siendo aún más efectiva en el segundo horario, nadie ha demostrado aún que exista un cambio en la sensibilidad hormonal del hipotálamo a los indoles de la pineal con relación al fotoperiódoo.

En otro sentido, la técnica empleado por estos autores, adolece, en el caso particular de los indoles de la pineal, de serias restricciones. El principal problema reside en las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos, básicamente en su nula solubilidad en agua. Tal situación desencadena un proceso de cristalización dentro de las puntas de las micropipetas de estas sustancias, lo cual induce su precipitación y la consiguiente

obstrucción de las micropipetas llenas con el fármaco. Tal obstrucción siempre se acompaña de un incremento neto de la impedancia de estas pipetas, por lo que para lograr la expulsión de los fármacos se requieren de corrientes cada vez mayores. Muchas veces estas corrientes son las que provocan los cambios observados en los registros, o inducen una expulsión marcada del vehículo, que en el caso de la melatonina puede ser el propilenglicol, sustancia que excita a las neuronas (36), o bien el etanol, alcohol que inhibe a estas células (59). Por esta razón, es preferible utilizar ya sea micropresión (100), o bien difusión térmica (55), cuando se requiere aplicar en forma local a estos fármacos. En este sentido los resultados presentados por estos autores deben ser analizados con reserva.

Los efectos depresores observados en el presente trabajo, parecen no restringirse exclusivamente al sistema nervioso central. Así, se reportó que en cultivo de células provenientes de retinas de salamandras, la adición al baño de dosis micromolares de melatonina, provoca una hiperpolarización sostenida de las células horizontales (128). La retina conjuntamente con el intestino, la glándula harderiana y la glándula pineal son las únicas estructuras que contienen la maquinaria enzimática necesaria para sintetizar metoxi-indoles (56).

La adición de melatonina, al baño de tejido donde se encuentran fragmento de dudodeno de rata, también provoca una disminución significativa del tono, intensidad y frecuencia de las contracciones espontáneas de esta estructura (46). Tal efecto, logrado con dosis milimolares, fué capaz de provocar una atonia muscular sostenida

durante todo el tiempo que se mantuvo a la melatonina en el baño de tejido.

Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio, muestran que en preparaciones de ileo aislado de cobayo, la melatonina provoca una disminución significativa de las contracciones provocadas por estímulos eléctricos (77). En esta preparación, la contracción depende de un mecanismo colinérgico, el cual es modulado por un sistema opioide (94). En el mismo sentido, en preparaciones del conducto deferente de la rata, donde esta involucrado un sistema adrenérgico-purinérgico, en la contracción inducida por estimulación eléctrica, la melatonina provoca una caída importante en la intensidad y tono de estas contracciones (125). Finalmente hemos realizado estudios en útero de rata estrogenizada, donde el neurotransmisor involucrado es de índole serotoninérgico. También en esta preparación, la melatonina provoca una depresión significativa en las contracciones tónicas inducidas por la adición de K^+ al baño de tejidos. En todos estos casos sin embargo, la dosis requerida para provocar estos efectos es del orden milimolar, lo que constituye una dosis suprafisiológica.

Todos estos efectos descritos, aunados a las múltiples acciones mencionadas en la literatura, indican que los indoles de la pineal, o al menos la melatonina, puede utilizar 3 mecanismos de acción general. El primero de ellos consistirá en un efecto netamente genómico, el cual se manifiesta en los efectos tróficos negativos que estas sustancias poseen sobre varios tipos celulares (9). De particular relevancia son los efectos citostáticos que esta

sustancia ejerce sobre células germinales y sobre células tumorales (69). Tal propiedad está siendo ampliamente estudiada en múltiples laboratorios, con la posibilidad de utilizarla clínicamente en el tratamiento de problemas oncológicos.

Por regla general, la mayor parte de estos efectos genómicos se manifiestan hasta después de 12 horas de haber administrado el fármaco, acompañándose de cambios en las concentraciones de varias proteínas estructurales y en la actividad de varias enzimas, además de que también provocan modificaciones en las concentraciones y recambio de ADN y ARN (18), lo cual le confiere la característica de genómico.

No se ha descrito algún receptor de membrana para la melatonina o para alguno de sus derivados metoxi-indólicos que medien sus efectos genómicos. Puesto que los compuestos de la pineal son sumamente liposolubles, es posible que estas acciones se realicen gracias a la participación de un receptor intracelular, similar al utilizado por las hormonas esteroideas (78) en estas células. De hecho, se sugirió la existencia de una interacción entre estos indoles y los esteroides a nivel de este receptor intracelular, aunque tal interacción no parece ser aún muy clara (30).

El segundo mecanismo de acción se relaciona con sus efectos endocrinológicos, es posible que este efecto sea mediado por receptores específicos localizados en la membrana celular de las neuronas involucradas en la síntesis y liberación de las hormonas liberadoras o inhibidoras hipotalámicas. Esta acción, la cual ocurre a los pocos minutos posteriores de la aplicación de la neurohormona,

involucra cambios en las características electrofisiológicas de estas mismas neuronas, los cuales anteceden a los cambios hormonales (99).

De acuerdo a esta sugerencia, entonces es posible que los receptores a la melatonina sean modulados por los niveles séricos de varias hormonas, entre ellas las principales serían las hormonas sexuales. Esto parece ser el caso, por ejemplo Laudon y Cols. (71) mostraron que tanto la densidad como la sensibilidad de los sitios de unión a la ¹²³[I]-melatonina, varían de acuerdo a la etapa estrol, es decir nivel de estrogenización, de las ratas hembras. La aplicación de dosis elevadas de estrógenos provoca una disminución muy significativa en la densidad de tales sitios de unión (71).

Sin embargo, es necesario mencionar que otros estudios señalan que, en ocasiones, ni la densidad ni la sensibilidad de estos receptores a la melatonina se correlaciona en forma precisa a los cambios gonadales y estrols provocados al mantener a los animales ya sea en luz continua o en oscuridad permanente (81). A pesar de ello, existen en la literatura bastantes observaciones sugerentes de que estos receptores sean los responsables de los efectos endocrinológicos de los indoles de la glándula pineal.

A este respecto, entonces resulta por demás interesante el investigar cual es la función de los sitios de unión específicos a la ¹²³[I]-melatonina localizados en el hipocampo y la corteza cerebral, y que fueron descritos por Zisapel y cols (70). ¿ Poseen algún papel en la regulación neuroendócrina ?; ¿ Participan en alguno de los efectos conductuales descritos para estas sustancias?.

Estas son aún preguntas sin respuesta. De acuerdo a este mecanismo de acción, las dosis requerida para provocar estos efectos debe ser muy parecida a las concentraciones fisiológicas que estas sustancias alcanzan duante el fotoperiodo y, que en la rata, oscilan entre 10 y 30 pg/ml (118).

El tercer mecanismo de acción, consiste en una acción puramente farmacológica y como consecuencia sólo se logra producir con el uso de dosis farmacológicas. Estas acciones teóricamente no se presentan en condiciones fisiológicas y constituyen todo un rango de efectos que desde un punto de vista conductual, dependen de la dosis empleada; esto es: dosis entre 1 y 4 mg/kg en rata, provocan un estado de ansiolisis, sin modificar el umbral analgésico o el estado de alerta (87). Dosis mayores, 10-20 mg totales, provocan un estado de sedación característico, y aunque no provocan analgesia, si tienen un efecto potenciador sobre la analgesia provocada por los opioides (58).

En humanos, dosis de 25-50 mg total, induce hipnosis con un patrón muy similar al sueño fisiológico, básicamente la única fase de sueño que se acrota es la fase 1 y no se modifica la fase de MOR (4). Estas mismas dosis inducen un estado anticonvulsivo importante, tal efecto se manifiesta tanto en humanos (2) como en modelos experimentales con animales (). En estos casos, además de una reducción en el número, duración y frecuencia de los ataques convulsivos, existe una normalización de los patrones electroencefalográficos (2).

Probablemente, muchos de los efectos descritos por varios

autores constituyen parte de estas acciones farmacológicas y no necesariamente esten implicando el papel fisiológico que la melatonina o sus congéneres metilados posean. El mecanismo celular de estas acciones farmacológicas no ha sido aún descrito. Sin embargo, estudios realizados en nuestro laboratorio sugieren que se trata de un mecanismo inespecífico el cual no involucra la participación de receptor alguno, ocurre a nivel de la membrana celular y se asocia con un bloqueo del flujo transmembranal del ión calcio. Así, en preparaciones in vitro de útero provenientes de rata estrogenizada, tanto la melatonina como el 5-metoxitriptofol bloquean la acontractura provocada por la adición al baño de K^+ . Tal efecto no se presenta en preparaciones libres de calcio.

Es muy probable que el mecanismo utilizado por estas sustancias para provocar estos efectos farmacológicos, sea similar al utilizado por las hormonas esteroideas, las cuales también ejercen efectos depresores de la actividad eléctrica cerebral (). Este mecanismo consiste en provocar una desorganización de la membrana celular como consecuencia de su presencia física en la misma. Esto a su vez, podría ser resultado de la asociación, por medios físicos, de la molécula del indol con las cabezas de los fosfolípidos de la membrana celular (). Hasta ahora, no hay todavía evidencias de la existencia de un mecanismo específico de transporte de calcio, digamos un canal de calcio, involucrado en este proceso, lo cual es una posibilidad a descartar.

En el presente trabajo existen 2 situaciones que sugieren una acción, sino específica, sí selectiva, de estos indoles de la pineal.

La primera se relaciona con la observación de que sólo los derivados metilados en el carbono 5 del anillo indólico mostraron alguna acción sobre la actividad unitaria de las neuronas del hipotálamo lateral. La segunda evidencia reside en el hallazgo de que la depleción de catecolaminas reduce consistente y significativamente los efectos depresores provocados por la melatonina y el 5-metoxitriptofol. Contrariamente, cuando se realizó la depleción de serotonina, utilizando el pretratamiento con la administración intracerebroventricular de 5,7-dihidroxitriptamina, los efectos provocados por estos dos indoles fueron muy similares a los encontrados en los animales controles.

Estos datos sugieren que a nivel del hipotálamo, la melatonina podría estar modulando la liberación de Dopamina. Este neurotransmisor ha sido invariablemente involucrado en la regulación y liberación de muchas de las diferentes hormonas hipotalámicas liberadoras o inhibidoras, además de la síntesis y liberación de las hormonas tróficas de la pituitaria (). En el mismo sentido, el hipotálamo lateral, una de las regiones cerebrales ricas en fibras dopaminérgicas (), mostró la mayor sensibilidad a la melatonina. Estos efectos selectivos sugieren un efecto fisiológico de la melatonina; por lo que quizá nuestros resultados estén reflejando tanto efectos fisiológicos como farmacológicos de estos indoles.

Es imprescindible mencionar que una de las desventajas del sistema de aplicación local utilizado en los presentes experimentos, es la imposibilidad de conocer con exactitud la dosis administrada. Básicamente, la cantidad de fármaco expulsado es proporcional,

dentro de ciertos límites, a la intensidad de la presión utilizada, así como a la concentración del fármaco dentro de la micropipeta. Sin embargo, otros factores, tales como la impedancia de la micropipeta (la cual se encuentra oscilando continuamente y es muy variable de una micropipeta a otra), el grado de disociación y solubilidad de la sustancia, su coeficiente de actividad termodinámica, entre otros, contribuyen a hacer extremadamente difícil y errático el cálculo de la sustancia expulsada con una micropresión determinada. A pesar de ello, es muy probable que la cantidad de melatonina con que inundamos a las células que registramos, sean de índole suprafisiológico.

Independientemente de que se trate de un efecto fisiológico o farmacológico, los resultados descritos en el presente trabajo muestran el mecanismo subyacente, a muchos de los efectos conductuales observados posterior a la administración de esta neurohormona de la glándula pineal. El hipotálamo lateral, la región más sensible a los efectos de la melatonina y 5-metoxitriptofol, ha sido implicado en múltiples aspectos conductuales (). De hecho, quizá sólo existan unas cuantas funciones que se escapan de la influencia del hipotálamo lateral ().

Sería deseable el determinar si la sensibilidad de esta región hipotalámica a estas neurohormonas pineales, las cuales muestran un patrón de liberación cíclico circadiano, es modificable a lo largo de un ciclo de 24 horas, o si ésta, es constante y lo único que determina la intensidad del efecto es la concentración del fármaco en las inmediaciones de la célula.

Entonces, los resultados obtenidos de los experimentos aquí relatados, contribuyen a entender en mayor detalle el mecanismo o mecanismos de acción utilizados por estas fascinantes neurohormonas pertenecientes a una estructura no menos fascinante: La glándula Pineal.

REFERENCIAS

1. ALMEIDA, D.F.X., G.A. LINCOLN. Photoperiodic regulation of reproductive activity in the rat: evidence for the involvement of circadian rhythms in melatonin and prolactin secretion. *Biol. Reprod.* 27:1062-1075, 1982.
2. ANTÓN-TAY, F. Melatonin: Effects on brain function. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, 11:315-324, 1974.
3. ANTÓN-TAY, F., R.J. WURTMAN. Regional uptake of ³H-melatonin from blood or cerebrospinal fluid by rat brain. *Nature* 221: 474-475, 1961.
4. ANTÓN-TAY, F., J.L., DIAZ, A. FERNANDEZ-GUARDIOLA. On the effect of melatonin upon human brain. its possible therapeutic implications. *Life Sci.* 10:841-850, 1971.
5. ARENDT, J. Radioimmunoassayable melatonin: Circulating patterns in man and sheep. *rog. Brain Res.*, 52:249-258, 1979.
6. ARENDT, J., L. WETTERBERG, T. HEYDEN. Radioimmunoassay of melatonin: human serum and cerebrospinal fluid. *Horm. Res.* 8:65-75, 1977.
7. AXELROD, J. The pineal gland: A neurochemical transducer. Chemical signals from nerves regulate synthesis of melatonin and convey information about internal clocks. *Science*, 184:1341-1348, 1974.
8. BAILEY, C.J., T.W. ATKINS. A.J. MATTY. Melatonin inhibition of insulin secretion in the rat and mouse. *Hormone Res.*, 5:21-28, 1974.
9. BARTSCH, H. C. BARTSCH. Effect of melatonin on experimental tumors under different photoperiods and times of administration. *J. Neural. Transm.*, 52:269-279, 1981.
10. BARKER, J.L. T.G. SMITH. Peptides as neurohormones. In: *Biological Approaches to Neurons. Neuroscience Symposia, Vol. 11* (Cawan, W.M. and FERRENDELLI, J.A. eds.), 1977. Society for Neurosciencia, Bethesda, M.D. pp. 340-373.
11. BAXTER, J.D., J.W. FUNDER. Hormone receptors. *New England. J. Medicine.* 301:1149-1161, 1972.
12. BECK-FRIIS, J., D. VON ROSEN., B.F. KJELLMAN., J.G. LJUNGREN L. WETTERBERG. Melatonin in relation to body measures, sex, age, season and the use of drugs in patients with major affective disorders and healthy subjects. *Psychoneuroendocrinol.*, 9(3):261-277, 1984.
13. BENNETT-CLARKE, H., M.A. ROMAGNANO. S.A. JOSEPH. Distribution

- of somatostatin in the rat brain: Telencephalon. *Brain Res.*, 188:473-486, 1980.
14. BINKLEY, S. Comparative biochemistry of the pineal glands of birds and mammals. *Am. Zool.*, 16:57-65, 1976.
 15. BISSET, G.W., M.L. ERRINGTON. C.D. RICHARDS. The distribution of vasopressin and oxytocin in the hypothalamo neurohypophysial system of the Guinea-pig. *Br. J. Pharmacol.*, 48:263, 1973.
 16. BITTMAN, E.L., R.J. DEMPSEY., F.J. KARSCH. Pineal melatonin secretion drives the reproductive response to daylength in the ewe. *Endocrinol.* 113:2276-2283, 1983.
 17. BITTMAN, E.L., F.J. KARSH. Nightly duration of pineal melatonin secretion determines the reproductive response to inhibitory day length in the ewe. *Biol. Reprod.* 30:585-593, 1984.
 18. BLASK, D.E., R.J. REITER. L.Y. JOHNSON. Pineal-induced alterations in reproductive function and pituitary prolactin in the female rat: The effects of bilateral superior cervical ganglionectomy and nervi conarii transection. *J. Neurosci. Res.*, 3:127-133, 1977.
 19. BOSLER, O., A. BEAUDET. Relations ultrastructurales entre systèmes monoaminergiques et peptidergiques dans l'hypothalamus. *Ann. Endocrinologie* 46:19-26, 1985.
 20. BROWN, G., L.GROTA., G. BUBENIK., G. NILES., H. TSUI. Physiologic regulation of melatonin. *Adv. Biosci.*, 29:95-112.
 21. CARDINALI, D.P. Melatonin: A mammalian pineal hormone. *Endocrine Rev.* 2: 327-346, 1981.
 22. CARDINALI, D.P., M.I. VACAS., É.E. BOYER. Specific binding of melatonin in bovine brain. *Endocrinol.* 105: 437-441, 1979.
 23. CARTER, D.S., B.D. GOLDMAN. Antigonadal effects of timed melatonin infusion in pinealectomized male Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*): Duration is the critical parameter. *Endocrinol.* 113:1261-1267, 1983.
 24. CARTER, D.S., V.D. HALL, L. TAMARKIN., B.D. GOLDMAN. *Endocrinology* 111:863- (1982).
 25. CHAN, M., S.F. PANG, P.L. TANG, G.M. BROWN. Studies on the kinetics of melatonin and N-acetylserotonin in the rat at mid-light and mid-dark. *J. Pineal Res.* 1: 227-236, 1984.
 26. CSABA, G. Hormonal regulation: Morphogenetic and adaptive systems. *Biol. Rev* 52:295-303, 1977.
 27. COHEN, M., D. ROSELLE, B. CHABNER, T.J. SCHMIDT, M. LIFFMAN. Evidence for a cytoplasmic melatonin receptor. *Nature*, 274: 894-895, 1978.

28. CUATRECASAS, P., M.D. HOLLENBERG. Membrane receptors and hormone action. *Adv. Protein Chem.* 30:251-451, 1976.
29. DANIEL, P.M. The Anatomy of the Hypothalamus and Pituitary Gland. In: Martini, L., Ganong, W.F. (eds.): *Neuroendocrinology*. vol. 1, New York, Academic 1966, p. 15.
30. DATTA, S. Sex hormone effects on excitable membranes. Goldstein, P.J. (ed.): *Neurological Disorders of Pregnancy*. Mount Kisco, New York. Futura Publishing Co., INC. vol. 13, 1986, pp. 265-277.
31. DAUGHADAY, W.H., A.C. HERINGTON., L.S. PHILLIPS. The regulation of growth by endocrines. *Ann. Rev. Physiol.* 211-243, 1975.
32. DEMAINI, C., R. STOVUGHTON. Circadian variation in the electrical responses of hypothalamic neurons to methoxyindoles in the hamster. *J. Physiol.* 219: 62P-63P, 1981.
33. DICKSON, K.L., D.L. HASTY. Effects of pineal gland in unilaterally adrenalectomized rats. *Acta endocrin.*, 70:438-444, 1972.
34. DODD, J., J.S. KELLY. Is somatostatin an excitatory transmitter in the hippocampus?. *Nature* 273:674-675, 1978.
35. DOMANSKI, E. et al *Neuroendocrinology* 17:265 (1975).
36. DREISBACH, R.H., W.O. ROBERTSON. Propilenglicol. *Manual de Toxicologia Clínica*. edit. 6a. Ed. El Manual Moderno, México, D.F., 1988, pp. 163-348.
37. ELLIOT, J.A. in: *Biological Clocks in Seasonal Reproductive Cycles*, B.K. Follet and D.E. Follet, Eds. (Wiley, New York, 1980). pp. 203-217.
38. FELDMAN, S., N. CONFORTI. Adenocortical responses in dexametasone-treted rats with septal, preoptic and combined hypothalamic lesions. *Hormone Res.*, 12:289-295, 1980.
39. GLASS, D.J., G.R. LYNCH. Melatonin-identification of sites of antigonadal action in mouse brain. *Science*, 214: 821-823, 1981.
40. GLASS, J.D., G.R. LYNCH. *Neuroendocrinol.* 35:117 (1982).
41. GOLDAMN, B.D., J.M. DARROW. The pineal gland and mammalian photoperiodism. *Endocrinol.* 109:1796-1798, 1981.
42. GORSKI, R.A. The neuroendocrinology of reproduction : An overview. *Biol. Reprod.*, 20:11-127, 1979.
43. GOTTESMAN, I.S., MANDARINO, L.J., J.E. GERICH. Somatostatin: Its role in health and disease. *Topics Endocrinol. Metab.* 4:177-243, 1982.

44. GREEF, W.J. DE., G.H. ZEILMAKER. Regulation of prolactin secretion during the luteal phase of the rat. *Endocrinol.*, 102:1190-1198, 1978.
45. HALÁSZ, B., L. PUPP. Hormone secretion of the anterior pituitary gland after physical interruption of all nervous pathways to the hypophysiotrophic area. *Endocrinol.*, 77:553, 1975.
46. HARLOW, H.J., B. WEEKLY. Effect of melatonin on the force of spontaneous contractions of in vitro rat small and large intestine. *J. Pineal Res.* 3: 277-284, 1986.
47. HARRIS, G.H. Neural Control of the pituitary gland. Edward Arnold, (ed). London. 1955.
48. HEUBNER, D. Tumor del glandula pinealis. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 24:214-215, 1898.
49. HOFFMAN, K. The influence of photoperiod and melatonin on testis size, body weight, and pelage colour in the Djungarian Hamster (*Phodopus sungorus*). *J. Comp. Physiol.*, 85:267-282, 1973.
50. HOFFMAN, R.A. R.J. REITER. Pineal gland: Influence on gonads of male hamsters. *Science* 148:1609-1611, 1965.
51. HOLMES, S.W., D. SUGDEN. Effects of melatonin on sleep and neurochemistry in the rat. *Br. J. Pharmac.* 76: 95-101, 1982.
52. IBATA, Y., K. WATANABE., H. KINOSHITA., S. KUBO., Y. SANDO., N. NAKURA., C. YANAHARA N. YANAHARA. Dopamine and α -Endorphin are contained in different neurons of the accurate nucleus of hypothalamus as revealed by combined fluorescence histochemistry and immunohistochemistry. *Neurosc. Lett.*, 17:185-189, 1980.
53. ILLNEROVÁ, H., J. VANĚČEK. Circadian rhythm in inducibility of rat pineal N-acetyltransferase after brief light pulses at night: control by a morning oscillator. *J. Comp. Physiol. (A)* 154:739-744, 1984.
54. ISAACSON, R.L. A perspective for the interpretation of limbic system function. *Physiol. Psychol.*, 8(2):183-188, 1980.
55. KANN, H.C. Modification of the electrical activity of hypothalamic neurons by pineal indoles. *Prog. Brain. Res.* 52:373-375, 1979.
56. KAPPERS, J.A. The mammalian pineal gland, a survey. *Acta Neurochir.* 34:109-149, 1976.
57. KAVALIERS, M., M. HIRST., C. TESKEY. Nocturnal feeding in the mouse-opiate and pineal influences. *Life Sci.* 36(10):973-980, 1985.
58. KAVALIERS, M., M. HIRST, G.C. TESKEY. Ageing, opioid analgesia

and the pineal gland. *Life Sci.* 32:2279-2287, 1983.

59. KELLY, M., A.L. MYRSTEN., A. NERI., U. RYDBERG. Effects and aftereffects of alcohol on physiological and psychological functions in man: A controlled study. *Blutalkohol*, 7:422-436, 1970.
60. KENNAWAY, D.J., T.A. GILMORE., R.F. SEAMARK. Effects of melatonin implants on the circadian rhythm of plasma melatonin and prolactin in sheep. *Endocrinol.* 110:2186-2188, 1982.
61. KITAY, J.I., M.D. ALTSCHULE. "The Pineal Gland: A Review of the Physiologic Literature" Cambridge, Mass., Harvard University Press. 1954.
62. KIZER, J.S., M. PALKOVITS., M.J. BROWNSTEIN. Releasing factors in the circumventricular organs of the rat brain. *Endocrinol.*, 98:311-317, 1979.
63. KLEIN, D.C., J.L. WEELER. A rapid light induced decrease in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Science*, 169:1093-1095, 1970.
64. KNEPEL, W., D. NUTTO., H. ANHUT, G. HERTTING. Vasopressin and ? β -Endorphin release after osmotic and non-osmotic stimuli: Effect of naloxone and dexamethasone. *Eur. J. Pharmacol.* 77:299-306, 1982.
65. KOIKEGAMI, H. Amygdala and other related limbic structures: Experimental studies on the anatomy and function. II. Functional experiments. *Acta Med. Biol. (Niigata)*., 12:73, 1964.
66. KONING, J.F.R., R.A. KLIPPEL. The rat brain. A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem. R.E. Krieger Publishing. Co. Inc, New York, 1963.
67. KOPP, N., B. CLAUSTRAT, M. TAPPAZ. Evidence for the presence of melatonin in the human brain. *Neurosci. Lett.* 19:237-242, 1980.
68. KURLICH, L. Central neurotransmitters and the secretion of prolactin, GH, LH and TSH. *Ann. Rev. Physiol.*, 41:603-615, 1979.
69. LAFIN, V. Pineal influence on tumor. *Prog. Brain Res.* 52:523-533, 1979.
70. LAUDON, M., N. ZISAPEL. Characterization of central melatonin receptors using 125 I-Melatonin. *FEBS Lett.* 197: 9-12, 1985.
71. LAUDON, M. N. ZISAPEL. Impact of circulating estradiol on melatonin binding sites in discrete areas of the female rat brain. *Brain Res.*, 402:146-150, 1987.
72. LEYSEH, J. P. LADURON. N-Methylation of indolealkylamines in the brain with a new methyl donor. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, 11:65-74, 1974.

73. LEWY, A.J., D.A. NEWSOME. Different types of melatonin circadian secretory rhythms in some blind subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 56:1103-1107, 1983.
74. LEWY, A.J., M. TETSUO, S.P. MARKEY. Pinealectomy abolishes plasma melatonin in the rat. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 50:204-205, 1980.
75. LIEBERMAN, H.R. Behavior, sleep and melatonin. *J. Neural Transm. suppl.* 21: 233-241, 1986.
76. LINCOLN, G.A., D.F. X. ALMEIDA., H. KLANDORF., R.A. CUNNINGHAM. *J. Endocrinol.* 92:237, 1982.
77. LOBATO, C., E.B. NARANJO-RODRIGUEZ, C. REYES-VÁZQUEZ. Efecto de los metoxi-indoles sobre la actividad contráctil espontánea e inducida del intestino aislado de rata y cobayo. XXXII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Oaxtepec Mor. Sept. 3-6, 1989.
- 77b. MACLEOD, R.M.. Regulation of prolactin secretion. In: *Frontiers in Neuroendocrinology*. Vol.4, Martini, L. and Ganong, W..F., eds., pp. 169-194, Raven Press, New York, 1976.
78. MAGGI, A. J. PÉREZ. Role of female gonadal hormones in the CNS: clinical and experimental aspects. *Life Sci.* 37(10):893-906, 1985.
79. MESS, B. Functional anatomy of the hypothalamus and its afferent and efferent pathways. Knigge, K.M., D.E. Scott., A. Weinal. (Eds.). *Brain endocrine interaction International Symposium*. Munich, 1971. Basel Karger, 1972, pp. 3-16.
80. MESS, B., F. FRASCHINI., M. MOTTA., L. MARTINI. The topography of the neurons synthesizing the hypothalamic releasing factors. In: Martini, L., Fraschini, F., (eds.): *Hormonal steroids*, Milan, 1966. International Congress Series, vol. 132. Amsterdam, Excerpta Medica, 1967, p. 1004.
81. MILES, A. Melatonin: Perspectives in the life sciences. *Life Sci.* 44 (6) :375-385, 1989.
82. MILLER, R.J. Calcium signalling un neurons. *Tins*, 11(10):415-419, 1988.
83. MINNEMAN, K.F., R.J. WURTMAN. The pharmacology of the pineal gland. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 16: 33-51, 1976.
84. MITSUMA, T. Distribution, secretion and metabolism af TRH: an overview. TRH & Spinocerebellar Degeneration. Sobue, I. (Ed.). 1986 Elsevier Science Publishers (Biomedical Division).
85. MOORE, R.V. The inervation of the pineal gland. *Prog. Reprod. Biol.*, 4:1-29, 1978.

86. NARANJO-RODRIGUEZ, E.B., B. PRIETO-GÓMEZ, C. REYES-VÁZQUEZ. Melatonin modifies the spontaneous multiunit activity recorded in several brain nuclei of freely behaving rats. *Brain Res. Bull.* in press.
87. NARANJO-RODRIGUEZ, E.B., B. PRIETO-GÓMEZ, C. REYES-VÁZQUEZ. Anxiolytic-like actions of melatonin on a conflict procedure. Submitted, *Pharmacol. Biochem. Behav.*
88. NEILL, J.D. Prolactin: Its secretion and control. In: *Handbook of Physiology*, Section 7, Endocrinology. Vol. IV, pp. 469-488, 1974.
89. NILES, L.P., Y.W. WONG, R.K. MISHRA, G.M. BROWN. Melatonin receptors in brain. *Eur. J. Pharmacol.* 55: 219-225, 1979.
90. NIR, I. Non-reproductive systems and the pineal gland. *J. Neural. Transm. (Suppl.)*. 13:225-244, 1978.
91. NISHINO, H., K. KOIZUMI, McC. BROOKS. The role of suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus in the production of circadian rhythm. *Brain Res.* 112:45-59, 1976.
92. FALKOVITS, M., M.J. BROWNSTEIN, A. ARIMURA, H. SATO, A.V. SCHALLY, J.S. KIZER. Somatostatin content of the hypothalamic ventromedial and arcuate nuclei and the circumventricular organs in the rat. *Brain Res.* 109:430-434, 1976.
93. PANG, S.T. Melatonin concentrations in blood and pineal gland. *Pineal Res. Rev.* 3: 115-159, 1985.
94. PATON, W.D.M. The action of morphine and related substances on contraction and on acetylcholine output of coaxially stimulated guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol.* 11:119-127, 1957.
95. PAVEL, S., R. GOLDSTEIN, L. POPOVICIU. Pineal vasotocin: REM sleep dependent release into cerebrospinal fluid of man. *Waking Sleeping.* 3:347-352, 1979.
96. PAVEL, S. Arginine vasotocin as a pineal hormone. *J. Neural Transm. Suppl.* 13:135-155, 1978.
97. PAZD, J.H. Effects of melatonin on spontaneous and evoked neuronal activity in the mesencephalic reticular formation. *Brain Res. Bull.* 4: 725-730, 1979.
98. PENNY, R. Melatonin excretion in normal males and females: increase during puberty. *Metabolism* 31:816-823, 1982.
99. POULAIN, A.D. D.T. THEODOSIS. Coupling of electrical activity and hormone release in mammalian neurosecretory neurons. *Curr. Topics Neuroendocrinol.* 9:73-104, 1988.
100. PRIETO-GÓMEZ, B., C. REYES-VÁZQUEZ. Electrophysiological effects induced by the micropressure application of melatonin, dopamine

- and 5-HT on hypothalamic neurons. *Endocrinol.* (abst) 234:675, 1988.
101. QUAY, W.B.: *Gen. Comp. Endocrinol.* 3, 473. 1963; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 115, 710. 1964.
 102. RALPH, CH.L., B.T. FIRTH., W.A. GERN., D.W. DWENS. The pineal complex and thermoregulation. *Biol. Rev.* 54:41-72, 1979.
 103. REITER, R.J. Comparative physiology: Pineal gland in: *Annual Review of Physiology.* Vol. 35, edited by V. Hall, A.C. Giese, and R.R. Sonnenshein, pp. 305-328. *Ann. Rev. Inc., Palo Alto, Calif.* 1973.
 104. REITER, R.J. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endoc. Rev.* 1:109-131, 1980.
 105. REITER, R.J. The pineal gland: an intermediary between the environment and the endocrine system. *Psychoneuroendocrinol.* 8:31-40, 1983.
 106. REYES-VÁZQUEZ, C., N. DAFNY. Interaction of norepinephrine and sympathetic cervical ganglion input in the rat pineal body. *Exp. Neurol.* 90: 223-231, 1985.
 107. REYES-VÁZQUEZ, C., B. PRIETO-GÓMEZ, L.D. ALDES, N. DAFNY. The rat pineal exhibits two electrophysiological patterns of response to microiontophoretical norepinephrine application. *J. Pineal Res.* 3: 213-222, 1986.
 108. RICHARD, P. The reticulo-Hypothalamic pathway controlling the release of oxytocin in the ewe. *Endocrinol.* 53:71, 1972.
 109. RICHARDSON, S.B., J.A. PRAJAD., S.C. HOLLANDER. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79:2686, 1982.
 110. ROLLAG, M.D. and G.D. NISWENDER. Radioimmunoassay of serum concentrations of melatonin in sheep exposed to different lighting regimes. *Endocrinol.*, 98:482-489, 1976.
 111. ROLLAG, M. D., P.L. O'CALLAGHAN., G.D. NISWENDER. Serum melatonin concentrations during different stages of the annual reproductive cycle in ewes. *Biol. Reprod.* 18:279-285, 1978.
 112. ROY, E.J., M.A. WILSON. *Science* 213:1525 (1981).
 113. RUBIN, R.P. The role of calcium in the release of neurotransmitter substances and hormones. *Pharmacol. Rev.*, 22(3):389-428, 1970.
 114. RUSAK, B. The role of the suprachiasmatic nuclei in the generation of circadian rhythm in the golden hamster. *Mesocricetus auratus.* *J. Comp. Physiol.*, 118:145-164, 1977.
 115. SIMPSON, J.B. The circumventricular organs and the central

- actions of angiotensin. *Neuroendocrinol.* 32:248-256, 1981.
116. SMYTHE, G.A., L. LAZAROUS. Growth hormone response to melatonin in man. *Science*, 184:1373-1373, 1974.
117. TALANTI, S. The incorporation of ³⁵S-labelled cysteine in the hypothalamic-hypophyseal Neurosecretory system of the dehydrated rat. *Z. Zellforsch.*, 115:110, 1971.
118. TAMARKIN, L., J. C.J. BAIRD., D.F.X. ALMEIDA. Melatonin: A coordinating signal for mammalian reproduction?. *Science*, 227:714-720, 1985.
119. TAMARKIN, L., W.K. WESTROM., A.I. HAMILL., B. D. GOLDMAN. Effect of melatonin on the reproductive systems of male and female Syrian hamsters: A diurnal rhythm in sensitivity to melatonin. *Endocrinol.* 99:1534-1541, 1976.
120. TAMARKIN, L., C.W. HOLLISTER., N.G. LEFEBVRE., B.D. GOLDMAN. Melatonin induction of gonadal quiescence in pinealectomized Syrian hamsters. *Science*, 198:953-955, 1977.
121. TAMARKIN, L., D. DANFORTH., A. LICHTER. Decreased nocturnal plasma melatonin peak in patients with estrogen receptor positive breast cancer. *Science*, 216:1003-1005, 1982.
122. TAN, C.H., J.C.M. KHOO. Melatonin concentrations in human serum, ventricular and lumbar cerebrospinal fluids as an index of the secretory pathways of the pineal gland. *Horm. Res.* 14:224-233, 1989.
123. THOENEN, H., J.P. TRANZER. The pharmacology of 6-hydroxydopamine. *Annu. Rev. Pharmacol.* 13:169-180, 1973.
124. VACAS, M.I., D.P. CARDINALI. Diurnal changes in melatonin binding sites of hamster and rat brains. Correlations with neuroendocrine responsiveness to melatonin. *Neurosci. Lett.* 15:259-263, 1979.
125. VEGA, L., E.B. NARANJO-RODRÍGUEZ, C. REYES-VÁZQUEZ. Efecto de la melatonina sobre las contracción neurogénica de la porción prostática del conducto deferente de rata. XXXII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Oaxtepec. Mor., Sept 3-6, 1989.
126. VRIEND, J., F.P. GIBBS. Coincidence of counter-antigonadal and counter-antithyroid action of melatonin administration via the drinking water in male golden hamsters. *Life Sci.* 34:617-623, 1984.
127. WALKER, M.L., T.P. GORDON., M. E. WILSON. *Biol. Reprod.*, 29:841-1983.
128. WIECHMANN, A.F., X.L. YANG, S.M. WU, J.G. HOLLYFIELD. Melatonin

- enhances horizontal cell sensitivity in salamander retina. *Brain Res.* 453: 377-380, 1988.
129. WEINER, R.I., W.F. GANONG. Role of brain monoamines and histamine in regulation of anterior pituitary secretion. *Physiol. Rev.*, 58:905-976, 1978.
130. WHER, T.A., F.M. JACOBSEN., D.A. SACK., J. ARENDT., L. TAMARKIN. N.E. ROSENTHAL. Phototherapy of seasonal affective disorder. *Arch. Gen. Psychiatry*, 43:870-875, 1986.
131. WETTERBERG, L., J. ARENDT., L. PAUNIER., P.C. SOZONENKO., W. VAN DONSELAAR, T. HEYDEN. Human melatonin changes during the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 42:185-188, 1976.
132. WURTMAN, R.J., J. AXELROD, L.T. POTTER. The uptake of ³H-melatonin in endocrine and nervous tissues and the effects of constant light exposure. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 143: 314-318, 1974.
133. ZATZ, M. The pineal gland: Shedding light on the internal clock. *Trends Pharmacol. Sci.*, 230-233, 1980.
134. ZISAPEL, N., Y. EGOZI, M. LAUDON. Inhibition of dopamine release by melatonin: regional distribution in the rat brain. *Brain Res.* 246: 161-163, 1982.
135. ZISAPEL, N., M. LAUDON. Dopamine release induced by electrical field stimulation of rat hypothalamus in Vitro: Inhibition by melatonin. *Life Sci.* 104: 1610-1616, 1982.