

11261



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

18
2 es.

MODULACION DE LA EXCITABILIDAD DE LAS
NEURONAS DEL HIPOTALAMO ANTERIOR POR
EFECTO DE LOS 5 -METOXI-INDOLES DE LA
GLANDULA PINEAL

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P R E S E N T A :

LIDIA RANGEL TRUJANO



1998

269365

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A MIS PADRES

Porque en todos los momentos me han brindado su apoyo y amor, por ello les doy las gracias y les ofrezco este trabajo que es una meta más en mi vida.

A MIS HERMANOS

Por brindarme toda su comprensión y confianza, por decirme mis verdades y corregirme en mis errores

LOS QUIERO

AL DR. CRUZ

Es cierto que el amor verdadero es raro, pero más rara aún es la verdadera amistad, por eso te **doy las gracias** por brindarme tu amistad

PROFA MARICELA:

Le doy las gracias por hacerme pensar
y reflexionar en mis momentos de
desesperación, además por brindarme
su amistad sin ninguna condición.

MARIBEL, LUPITA, AMPARO

Por su apoyo, amistad y comprensión

LAS QUIERO

A: José Luis, Cristina, Belén y a
todos los que de algún modo
han cruzado en mi vida dando
una luz en mi camino.

A MI JURADO, POR EL TIEMPO BRINDADO

PRESIDENTE: DR. FERNANDO ANTON TAY
SECRETARIO: DR. RAFAEL SALIN PASCUAL
PRIMER VOCAL: DR. CRUZ REYES VAZQUEZ
SUPLENTE: DRA. MA. LUISA FANJUL DE LA PEÑA
SUPLENTE: DRA. MA. DE LOURDES MASSIU TRIGO

INDICE:

Resumen	3
Abstract	5
Introduccion	7
Objetivo General	21
Objetivos Particulares	21
Hipótesis	21
Metodologia	22
Registro en Animales Integros	22
Registros en Rebanadas de Hipotálamo.	25
Resultados	29
Resultados de Animales Integros.	29
Melatonina	29
5-metoxi-triptofol	34
5-metoxi-indol-ácido acético	37
Resultados de Rabanadas de Hipotálamo.	41
Melatonina	41
5-metoxi-triptofol	44
5-metoxi-indol-ácido acético	44
Discusión.	46
Conclusiones	55
Bibliografia.	56

RESUMEN

A pesar de los múltiples estudios existentes sobre la participación de las hormonas de la pineal en el proceso de la reproducción, tanto los sitios afectados por estas hormonas, como el mecanismo de acción empleado son aún desconocidos. Los estudios que marcan la localización de receptores a la melatonina, la principal hormona de la pineal, indican que cuando menos existen 5 regiones con receptores tanto de alta afinidad (ML1) y de baja afinidad (ML2). Dentro de estos sitios el más interesante es el hipotálamo anterior. Tal interés deriva de los efectos antigonadotrópicos desencadenados por la administración de melatonina en casi todas las especies estudiadas, aunque estos son más marcados en los animales con reproducción estacional. La melatonina provoca una reducción en la producción y liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la cual se produce en células conocidas como gonadotropos localizadas en regiones del hipotálamo anterior y preóptico. Sin embargo, estas células carecen de receptores a la melatonina, por lo que los efectos deben ser mediados por algún otro sistema neuronal localizado en las regiones del hipotálamo anterior. El objetivo del presente estudio consistió en caracterizar la respuesta de las neuronas del hipotálamo anterior y preóptico a la administración de melatonina, 5-metoxitriptofol y 5-metoxi-indol-ácido acético por vía sistémica y por administración local en rebanadas de hipotálamo. El parámetro que se analizó fue la frecuencia de descarga neuronal de estas células, la que se consideró como un índice de su grado de excitabilidad. La aplicación de los dos últimos indoles mencionados, se realizó con el objetivo de establecer un análisis comparativo con la melatonina y otros compuestos con origen y estructura similares, aunque la afinidad de los receptores hacia estas dos hormonas es inferior a la mostrada hacia la melatonina. La administración sistémica de los indoles se realizó en ratas anestesiadas con uretano (1.5 g/Kg de peso) y montadas en un aparato esterotáxico, a las ratas se les colocó una cánula endotraqueal que facilitaba la ventilación pulmonar y un catéter endovenoso para la aplicación de fármacos. Una micropipeta de vidrio (1 μM en la punta y de 15 a 30 $\text{M}\Omega$ de impedancia óhmica) se descendía hasta el hipotálamo anterior en busca de células con actividad espontánea. La frecuencia de descarga fue registrada extracelularmente empleando equipo y técnicas convencionales. Después de un período de registro basal de 15 minutos se procedió a administrar una dosis de 0.2, 1.0, 1.5, 2.0 ó 2.5 mg/Kg de peso de melatonina, 5-metoxitriptofol o 5-metoxi-indol-ácido acético por vía endovenosa. El registro fue continuó por 60 minutos más, dividido en 4 períodos de 15 minutos cada uno con fines de análisis estadístico. Al final, se sacrificaron a las ratas con una sobredosis de anestésico, se extraía el cerebro y se localizaba el sitio de registro. Para los experimentos "in vitro" se empleó rebanadas de hipotálamo obtenidas de ratas adultas. Tanto las técnicas como el equipo utilizado también fueron las convencionales. Se registro la actividad extracelular de células con actividad espontánea durante 15 minutos antes de añadir alguna de las concentraciones melatonina 200 ó 790 μM , o de alguno de los otros indoles (790 μM) y 60 minutos después de tal adición. La aplicación sistémica de los indoles indujo importantes efectos en 73.12, 60.5, y 92% de las células registradas con melatonina, 5-metoxi-triptofol y 5-metoxi-indol-ácido acético, respectivamente. La melatonina indujo un efecto bifásico dependiente de la dosis, con incrementos de la frecuencia de descarga en dosis menores de 1.5 mg/Kg de peso, mientras que dosis \geq de 1.5 mg/Kg de peso deprimen este parámetro. Por su parte el efecto del 5-metoxitriptofol en dosis de 1.5, 2.0 y 2.5 mg/Kg de peso fue el incremento en la frecuencia de descarga. El efecto más importante en intensidad y

duración y número de células afectadas fue provocado por el 5-metoxi-indol-ácido acético, el cual indujo una profunda inhibición de la frecuencia de descarga en todas las dosis. La gran mayoría de células que respondieron a estos compuestos fueron localizadas en el hipotálamo anterior cercano al núcleo ventromedial, mientras que las células que no mostraron efecto alguno se localizaron en el área preóptica. Cuando estos fármacos se aplicaron en forma local, en las rebanadas de hipotálamo, la melatonina indujo efectos en el 60%, mientras que el 5-metoxi-triptofol afectó sólo el 30% y ninguna célula fue modificada en su frecuencia por el 5-metoxi-indol-ácido-acético. Nuevamente la mayoría de células afectadas se localizaron en las inmediaciones del núcleo venromedial hipotalámico. Estos efectos indican que estos compuesto ejercen acciones en estrucutras diferentes al hipotálamo preóptico. Lo cual sugiere una mediación por otros sistemas de neurotransmisores en sus efectos antigonadotrópicos. Las diferencias en cuanto al patrón e intensidad de la respuesta pueden ser consecuencia de una afinidad diferencial del receptor por estas sustancias. De particular interés es la carencia de efectos del 5-metoxi-indol-ácido-acético cuando se aplica en forma "in vitro", pero de una importante acción cuando se aplica sistémicamente. Esto sugiere que la influencia indirecta extrahipotalámica de esta sustancia es muy importante en este proceso.

ABSTRACT:

In spite of the great deal of information available concerning the antigonadotropic actions of melatonin, neither the brain nuclei nor the mechanism of action of these melatonin effects, had been described. Several studies had described the presence of two kinds of melatonin receptors in at least 5 different brain structures. Particular interest had been focused in those receptors located in the hypothalamus, mainly because of the effects induced by this pineal indol. However, it had been shown that the gonadotrops, the gonadotropin releasing hormone (GnRH) producer cell, do not express this kind the receptors, which means that melatonin actions on GnRH releasing are indirect. The aim of the present study is related with the characterization of the responses induced by of systemic and local applications of melatonin and two other pineal indoles, 5-methoxy-tryptophol and 5-methoxy-indol-acetic acid in both the anterior and preoptic hypothalamus. The electrophysiological parameter analyzed was the frequency of neuronal discharge, that is considered as an indicator of the cell excitability. The objective in using another two pineal compounds besides melatonin, resides in the possibility to make a comparative analysis between this hormone and two other substances with similar source and structure; although both kind of melatonin receptors show a lower affinity for these two indoles as compared to melatonin. Systemic administration of these three indoles was made in Wistar adult anesthetized rats (urethane 1.5 g/Kg) placed on stereotaxic frame. These rats had an endotracheal cannula for assisted ventilation and an intravenous catheter for drug administration. A glass micropipette filled with 4 M NaCl and saturated fast green with a 1 μ m tip and 15 to 30 M ohmic impedance, was lowered to either anterior hypothalamus or preoptic area searching for cells with spontaneous activity. The rate of discharge was extracellularly recorded using conventional techniques and equipment. After a 15 min basal recording a dose (0.2, 1.0, 1.5, 2.0 or 2.5 mg/Kg) of any of the three indoles was applied iv and the recording continued to at least another 60 min. For statistical analysis such 60 min period was divided in four of 15 min. At the end of the experiment the animal was sacrificed by an anesthetic overdose, the brain was extracted to localize the recording site. Local application of the indoles was made in hypothalamic slices from adult Wistar rats. The extracellular activity of hypothalamic spontaneously active cells was recorded in both the anterior and preoptic slices. All solutions, techniques and equipment used are considered as conventional. After a 15 min control recording a 200 or 790 μ m indol concentration was added to the bath and the recording continued for another four periods of 15 min. The systemic indol applications elicited significant effects on 73.12, 60.5 and 92 % of the recorded cells with melatonin, 5-methoxy-tryptophol and 5-methoxy-indol-acetic acid, respectively. Melatonin induced a biphasic effect with increases of the frequency of discharge with lower doses application; however, higher doses always induced a decrease of such activity. On the other hand, 5-methoxy-tryptophol in higher doses induced an increase of the same parameter whilst the most significant effect was induced by 5-methoxy-indol-acetic acid, with the highest depressing action in the majority of the cells. Most of the indol sensitive cells were found to be in the anterior hypothalamus, mainly around the ventromedial hypothalamic nuclei. Only few were found in the preoptic area. In brain slices, melatonin modified the frequency of discharge in 60%, while 5-methoxy-tryptophol did it in 30% of cells and 5-methoxy-indol-acetic acid had no effect at all. The main effect induced by the two effective indoles were decreases of the discharge rate. The responding cells were also located in the anterior hypothalamus in the vicinity of

the ventromedial hypothalamic nuclei. These results suggest that the pineal control on the releasing of GnRH are indirect, mediated by cells located in the anterior hypothalamus, which means that melatonin should interact with another neurotransmitter systems in order to exert antigonadotropic actions. This interaction could be made through GABAergic or catecholaminergic neurons. The differences related to the pattern and intensity of responses induced by these indoles could result from a different receptor affinity for these compounds. Since 5-methoxy-indol-acetic acid did not induce any effect when it was applied locally, it is possible that the changes observed after its systemic administration were mediated by extrahypothalamic structures, suggesting the important role that this structures had in this reproductive function.

INTRODUCCION

La reproducción constituye el proceso adaptativo gracias al cual los individuos perpetúan su especie. La modulación de este proceso requiere de la integración funcional del sistema endocrino con el sistema nervioso central (SNC); los que al comunicarse de una forma neuroendócrina inician una secuencia de eventos que garantizan la función reproductora (87).

Para reproducirse los individuos requieren de una conducta sexual definida, correlacionada con los eventos gonadales y neuroendocrinos. Cada una de estas etapas es inducida y modulada por la concentración secuencial y sincronizada de un conjunto de hormonas producidas y liberadas principalmente en dos estructuras cerebrales; la hipófisis y el hipotálamo. Además, estas zonas cerebrales reciben influencias muy importantes de centros nerviosos superiores, como la corteza cerebral o estructuras del sistema límbico, las cuales participan en la integración emocional que modula también este proceso (37).

Dentro del hipotálamo, son las regiones mediobasales y anteriores las encargadas de secretar las hormonas moduladoras de la reproducción. Sin embargo, la localización, características y número de células productoras de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la principal hormona sexual, es variable dependiendo de la especie que se trate (83). En la mayoría de los animales, es la región preóptica medial la que contiene la mayor cantidad de estas células (57). De esta estructura se originan fibras que se dirigen hacia la eminencia media para terminar rodeando a los capilares del plexo primario del sistema porta-hipofisiario (5) (Fig. 1).

Además de contener a algunas de las células productoras de GnRH, el hipotálamo anterior interviene en otros aspectos de la reproducción. Por ejemplo, participa en la modulación de las conductas sexuales que los sujetos muestran antes del apareamiento como la lordosis en las ratas hembras y la copulación en los machos. En la rata albina existe una correlación entre tal conducta y la descarga unitaria de las neuronas de la región anterior hipotalámica. Adicionalmente esta conducta es facilitada por la estimulación eléctrica de esta estructura (100). Por otra parte, la información olfatoria y gustativa que desencadena respuestas sexuales hace un relevo sináptico en tal estructura hipotalámica (84).

La información actual sobre la reproducción indica que el principal centro nervioso de control se localiza a nivel del hipotálamo anterior, por lo que esta estructura debe de

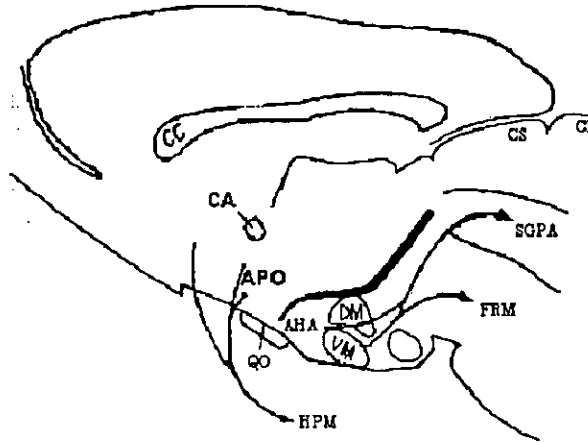


Fig. 1. La región preóptica-anterior del hipotálamo, contiene los elementos neuronales responsables de regular el proceso de la reproducción. Hacia estas áreas se vierte bidireccionalmente una enorme cantidad de información a través del haz prosencefálico medial (HPM) y de las vías de la formación reticular mesencefálica (FRM) y de la sustancia gris periacueductal (SGPA) entre otras importantes vías. CC = cuerpo calloso, CA = comisura anterior, CS = colículo superior, CI = colículo inferior, APO = área preóptica, AHA = área hipotalámica anterior, DM = núcleo dorsomedial, VM = núcleo ventromedial. QO = quiasma óptico.

poseer los elementos y circuitos necesarios para coordinar tal actividad. Entonces esta estructura debe recibir información sobre múltiples factores como el estado nutricional, el estado gonadal, niveles hormonales, estímulos ambientales y propioceptivos; entre otros, los cuales influyen en este proceso (19,39,80). Tal información sugiere una complicada interacción neuronal, neuroquímica y neurohormonal. Además, esta estructura debe ser fundamental en la acción de retroinformación esencial para el control de los esteroides ováricos (88).

La reproducción por lo tanto resulta de una interacción de múltiples señales, cada una de las cuales verterá su información en las células productoras de GnRH a través de sustancias químicas, las cuales influirán sobre el grado de excitabilidad de estas células y modificará por lo tanto la liberación de GnRH (36).

Estas influencias químicas se originan desde las hormonas esteroideas como los estrógenos y la progesterona, las cuales ejercen diferentes efectos en la secreción de GnRH, ya que pueden incrementar su liberación o inducir su inhibición; dependiendo de la dosis, del momento en el ciclo estral o menstrual, del estado de maduración sexual, del estado de nutrición y de la estación del año (16).

También, los aminoácidos excitadores como el glutamato y el aspartato influyen en la reproducción por una acción sobre el locus coeruleus, el área preóptica, el núcleo arqueado y la eminencia media. Estos aminoácidos al asociarse a receptores tipo NMDA, AMPA y Kainato incrementan la secreción de GnRH (92,100).

Además, algunos aminoácidos inhibidores, del tipo del ácido gama-amino-butírico (GABA) provoca una inhibición en la liberación de GnRH. Este aminoácido parece ejercer una acción directa sobre las neuronas que contienen GnRH del área preóptica. Es posible que el efecto inhibitorio de los esteroides sexuales sea ejercido a través de estas neuronas (16). Además, éstas son muy sensibles a las concentraciones de estrógenos y la aplicación de bloqueadores GABAérgicos reduce casi en su totalidad la respuesta a los estrógenos sanguíneos; mientras que la aplicación de agonistas del tipo de muscimol provoca una inhibición sostenida de la secreción de GnRH (81).

Es necesario considerar también a algunos péptidos hipofisiotrópicos como las encefalinas y endorfinas, los cuales regulan la liberación de otras hormonas hipofisiotróficas al hacer contactos axo-axónicos en la capa externa de la eminencia media (40). Su influencia parece ser inhibitoria, ya que la aplicación de morfina bloquea el ciclo estral de la rata (1). Existen datos sugerentes de que los sistemas catecolaminérgicos hipotalámicos sean los que medien los efectos de los opiodes. La administración de naloxona modifica el recambio de las catecolaminas, lo cual altera entonces la secreción de GnRH (30).

En el caso de las catecolaminas, éstas actúan directamente sobre las células productoras de GnRH para modular su actividad. Estudios anatómicos muestran que las terminales nerviosas que contienen norepinefrina (NE) y epinefrina (E) se localizan en la inmediata vecindad con estas neuronas, tanto en el área preóptica como en la eminencia media (54). De igual forma, ambas catecolaminas estimulan la liberación de GnRH (6), y particularmente la NE puede inducir la liberación de GnRH, en ausencia de cualquier otro

factor hormonal, por lo que se considera como el "marcador del paso" de la liberación episódica de éste producto (42). Igualmente, estos neurotransmisores cuando se aplican como implantes en la región preóptica de ratas pretratadas con estrógenos, son capaces de inducir respuestas conductuales del tipo de la lordosis en hembras (49).

Las neuronas catecolaminérgicas también llevan información somatosensorial desde las regiones genitales hasta los núcleos hipotalámicos, ya que la destrucción de los tractos adrenérgicos inhibe la conducta de lordosis; mientras que la estimulación del tracto genital produce una activación de los mismos (49).

Uno de los aspectos más importantes en relación a la regulación catecolaminérgica de la liberación de GnRH, es la participación de los sistemas dopaminérgicos del hipotálamo mediobasal. Este sistema varía en concentración de dopamina (DA) de acuerdo a la etapa estral en que se encuentre el animal (6). Además, la actividad tanto bioquímica (86), como electrofisiológica (78), se modifican de acuerdo a la etapa estral del animal. Esta modificación se asocia invariablemente con un cambio en la concentración de la GnRH (54). Estas proyecciones mediobasales dopaminérgicas parecen ejercer un efecto directo y sostenido sobre la secreción de GnRH, esta acción es mediada por un receptor tipo D2 sensible a bromocriptina, y no asociado a proteínas G. Finalmente este sistema dopaminérgico parece ser el intermediario de varias señales ambientales que actúan sobre la reproducción, tal como las influencias cíclicas provenientes de los núcleos supraquiasmáticos (61).

También se ha descrito un efecto facilitador de la noradrenalina sobre la secreción de LH (hormona luteinizante) y GnRH de ratas adultas hembras; esta sustancia sufre un incremento en su tasa de recambio en el área preóptica y en el hipotálamo mediobasal al inicio de la pubertad, lo cual ocurre a los 20 días de edad, tal incremento se acompaña de un aumento en la concentración de LH (60).

Otra monoamina, la serotonina (5-HT) ejerce una influencia importante en este proceso de secreción de GnRH. La acción de este neurotransmisor depende de la edad de los animales; por ejemplo, en ratas de 16 a 20 días de edad, induce un incremento de la LH, pero en ratas inmaduras su efecto es la inhibición de esta misma secreción (60).

Dentro de las sustancias capaces de influir la secreción de GnRH, las prostaglandinas (Pgs) juegan un importante papel. Estas sustancias ejercen un papel

estimulador de la adenil-ciclasa, lo cual incrementa la acumulación del AMPc a nivel hipotálamico, lo que se traduce como un incremento en la secreción de GnRH, aunque se desconoce si este efecto puede ser debido a una acción directa sobre las neuronas que contienen GnRH o en neuronas intermediarias a nivel hipotalámico (20). Es posible una interacción entre la NE y las PGs, ya que durante la maduración sexual la NE induce la síntesis de PGs por una acción sobre receptores α -adrenérgicos, lo cual ocurre simultáneamente en el momento que la NE estimula la secreción de gonadotropinas en ratas peripuberales (63).

Entre el conjunto de sustancias que median los efectos de los factores ambientales sobre la reproducción se encuentra la melatonina (MEL). Esta hormona constituye el principal producto de secreción de la glándula pineal (95), cuya característica fundamental es su asociación con el fotoperíodo (alternancia luz-oscuridad) ambiental. De tal manera que sus concentraciones pineales y sanguíneas son mayores durante la escotofase (fase de oscuridad) y son mínimas o indetectables, durante la fotofase (fase de luz) (Fig. 2) El patrón de secreción de esta hormona es característico de cada especie (67), pero en todos ellos su asociación al fotoperíodo es definitiva (Fig. 2).

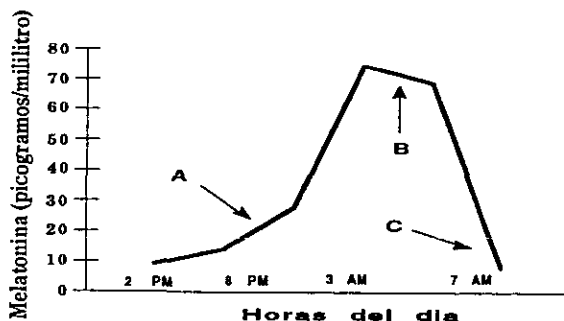


Fig. 2. En los humanos las concentraciones de melatonina empiezan a elevarse alrededor de las 8:00 PM (A), para alcanzar, alrededor de las 3:00 AM, es decir en medio de la escotofase su mayor concentración (B). Para las 7:00 AM las concentraciones se encuentran en su mínima expresión (C). La aplicación de un pulso luminoso de intensidad y duración suficiente puede bloquear esta secreción y reducir considerablemente esta concentración. En otras especies este "pico" en la concentración de melatonina se alcanza en horas diferentes, pero en todas ellas durante la escotofase.

En términos generales la acción de la melatonina consiste en ejercer efectos antigonadotrópicos en la mayoría de especies, aunque este efecto puede depender de la época del año y del tipo de especie que se trate (67). En particular los animales con reproducción estacional son los más sensibles a los efectos de tal hormona (66), de tal manera que la administración sostenida de melatonina exógena puede inducir una atresia gonadal.

Dentro de la glándula pineal también se secretan otros tipos de sustancias que son productos indólicos similares a la melatonina. La cantidad de productos y sus características químicas varían de especie a especie (82). En la rata, estos productos se dividen en general en indólico 5-metoxilados y 5-hidroxilados; siendo los 5-metoxilados los que muestran una mayor efectividad para reproducir y mimetizar las funciones de esta glándula (62).

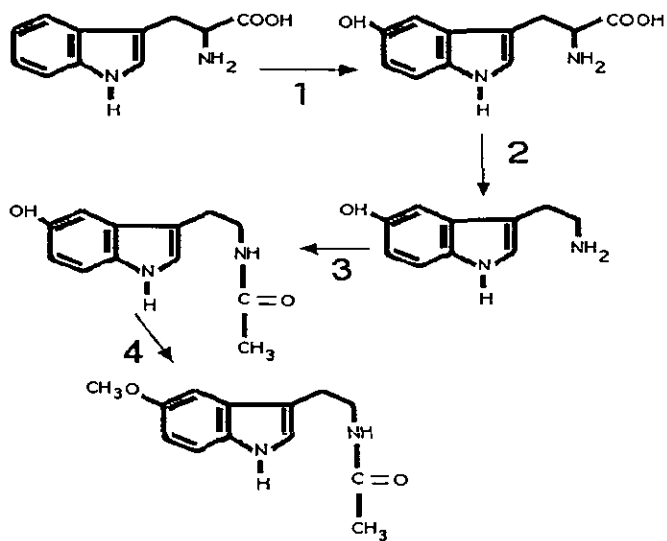


Fig. 3. La síntesis de melatonina se inicia con la captura del aminoácido triptófano, el cual al actuar sobre él la enzima hidroxilasa del triptófano (1), se transforma en 5-hidroxitriptófano. Sobre este compuesto interviene una enzima descarboxilasa inespecífica de aminoácidos aromáticos (2) para convertirla en 5-hidroxitriptamina o serotonina. Después interviene la enzima limitante N-acetil-transferasa (3), para formar N-acetilserotonina. Finalmente y gracias a la participación de la hidroximetil-O-transferasa esta N-acetilserotonina, se transforma en 5-metoxi-N-acetil-triptamina o melatonina.

En la figura 3 se esquematizan algunas de las vías metabólicas y las enzimas que emplea la pineal para sintetizar tales compuestos (29).

En los mamíferos el ritmo de producción de los compuestos indólicos por los pinealocitos, depende enteramente de la innervación simpática, la cual lleva la información fótica hasta la glándula pineal, de esta manera los pinealocitos, al ser activado a través de receptores β -adrenérgicos por la innervación simpática, la cual secreta NE durante la oscuridad, incrementa la captura de triptofano y acelera la síntesis de la MEL; gracias a esta modulación fotoperódica, la síntesis de melatonina es circadiana (23). La enzima clave en la síntesis de esta hormona, es la N-acetil transferasa (NAT), ésta es activada por un sistema de AMPcíclico, que a su vez es modulado por la adrenalina liberada de las terminaciones nerviosas que se une a sus receptores β adrenérgicos, (18,44) (Fig. 4).

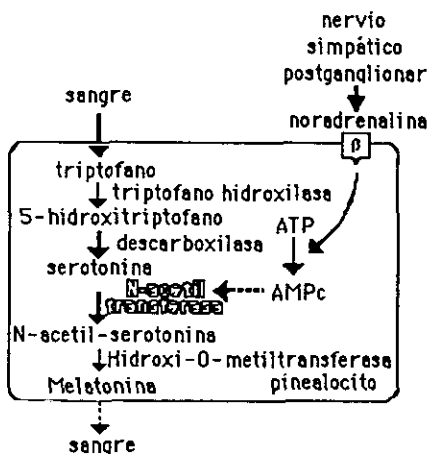


Fig. 4. Tanto la producción como la liberación de la melatonina esta bajo control de la innervación adrenérgica, la cual alcanza a la glándula pineal gracias a los nervios conarios procedentes del ganglio cervical superior. La adrenalina liberada en las terminaciones nerviosas actúa a través de receptores β adrenérgicos, los cuales emplean un sistema de AMPcíclico para activar a la enzima limitante de la síntesis de este indol, la N-acetil-transferasa.

Una vez secretada, la MEL está presente en diversos fluidos corporales, como la

orina, la sangre y el líquido cefaloraquídeo, en el hombre la concentración más alta de esta hormona ocurre alrededor de las 3.00 a.m (15) (Fig. 4).

También la edad influye en el patrón de secreción de la MEL. En las primeras etapas de la vida las concentraciones de esta hormona son máximas y descienden paulatinamente a partir del inicio de la pubertad, hasta alcanzar concentraciones muy bajas en animales viejos. Sin embargo, las concentraciones de melatonina, aunque muy bajas, siempre se mantienen a lo largo de toda la vida (Fig. 5) (73).

El género de los animales no tiene influencia en el modelo de secreción de la melatonina, pero los factores asociados con el fotoperíodo, como la estación del año es fundamental en el patrón de secreción. De este modo, durante el otoño y el invierno su concentración es la más alta, mientras que en la primavera y el verano su secreción es la más baja (26), esta alternancia anual en la secreción de melatonina da la bases para entender y explicar la reproducción estacional de algunas especies que habitan sobre todo en los polos de la tierra.

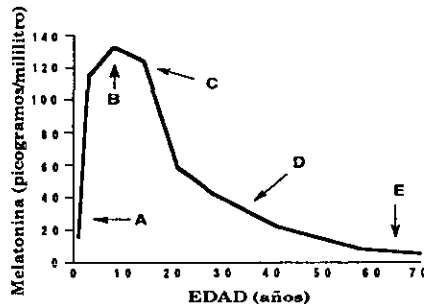


Fig. 5. En los humanos la concentración de melatonina es completamente dependiente de la edad de los individuos. Los recién nacidos producen muy poca melatonina (A). El nivel más alto en la concentración de esta hormona se alcanza durante la primera infancia (B). Cuando llega la pubertad los niveles de la hormona empiezan a descender (C). Durante la edad mediana los éstos continúan declinando (D). Los ancianos secretan cantidades mínimas de la hormona, aunque ésta no desaparece por completo (E).

En la mayoría de las especies con reproducción estacional, la glándula pineal o

epífisis es un órgano endocrino que en conjunto con sus secreciones ejercen un papel muy importante en la modulación de los parámetros reproductores, siendo determinantes en la aparición de la pubertad, el desarrollo somático del aparato genital y en la actividad sexual que más tarde definirá el ciclo procreativo estacional (66).

La primera evidencia de la actividad de la MEL en el eje reproductor fue la descripción de la relación existente entre esta hormona y la pubertad. Algunos experimentos mostraron que la administración de inyecciones diarias de MEL en ratas hembras, induce un retardo en la apertura vaginal, una reducción en el peso ovárico, y un decremento en la incidencia del estro vaginal (76). Además, en los humanos se ha observado, que la existencia de tumores de la pineal se asocia con anomalías en la maduración sexual; cuando los tumores son parenquimatosos productores de melatonina, esta secreción excesiva causa un retardo en la pubertad de los adolescentes; pero si los tumores son de tipo no parenquimatoso, como los teratomas no productores de melatonina, entonces el efecto observado es una reducción en el potencial antigonaotrópico, lo cual explica la pubertad precoz en los niños afectados (85, 98).

Algunos desórdenes del eje hipotálamo-hipofisis-gonadas provocan también ya sea un retardo de la pubertad, la pubertad precoz o una amenorrea hipotálamica. En estos padecimientos el problema fundamental parece ser una alteración en el perfil de secreción de melatonina (12). Lo cual sugiere también una relación entre la GnRH hipotálamica y la melatonina.

Existe otros datos funcionales que sugieren una interacción entre la GnRH y la melatonina; por ejemplo, los implantes de melatonina en el hipotálamo mediobasal y en el cerebro medio modifican el contenido de GnRH en la hipofisis de ratas castradas (65). También se mostró que la melatonina altera la frecuencia de la secreción pulsátil de LH por una acción directa sobre los sistemas adrenérgicos hipotalámicos (77).

A pesar de las amplias evidencias indicativas de la asociación funcional entre la melatonina y la GnRH, se desconoce el mecanismo tanto celular como molecular de tal interacción. Varios estudios sugieren que esta interacción no es directa, puesto que los implantes de MEL en regiones como la región preóptica, que contiene la más alta concentración de células productoras de GnRH, no ejerce efectos significativos sobre las concentraciones de esta hormona (33).

Una posibilidad de esta interacción reside en la acción de la MEL sobre la respuesta a los esteroides. Se sugiere que la melatonina incrementa la sensibilidad a la retroinformación negativa de los esteroides sexuales y por ende suprime en mayor intensidad la secreción de gonadotropinas (3). Además, la melatonina bloquea la interacción estrógeno-receptor, en el área preóptica medial y en el hipotálamo anterior por una acción sobre la expresión de receptores a estrógenos, lo que confiere la capacidad de actuar como una sustancia antiestrógena (50). Aunque existen datos contradictorios que apoyan la sugerencia de que la melatonina este ejerciendo su acción de forma independiente de los esteroides (31).

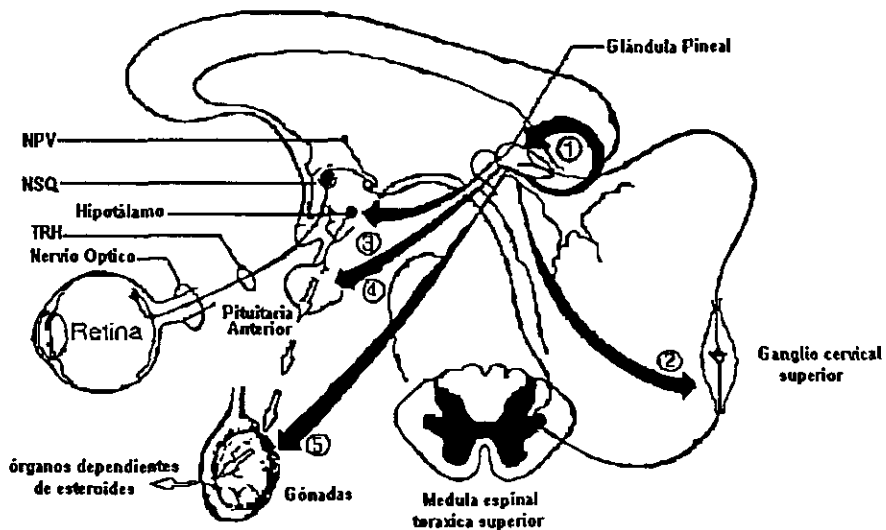


Fig. 6. Se esquematiza la vía multisináptica que provee de información lumínica a la glándula pineal. Esta vía que nace en la retina, a través del tracto retinohipotalámico (TRH) alcanza al hipotálamo anterior y posteriormente al lateral para descender hasta la médula espinal y por medio de las vías simpáticas alcanzar la glándula. También se esquematiza los sitios en lo que más frecuentemente se reporta la presencia de receptores de membrana específicos a la melatonina. Estos sitios son, la propia glándula pineal (1), el ganglio cervical superior (2), el hipotálamo anterior (3), la pituitaria (4) y las gónadas (5). NSQ = núcleo supraquiasmático, NPV = núcleo paraventricular hipotalámico.

Nakazawa y cols. proponen que la acción de la melatonina sobre la liberación de LH, ocurre en forma directa sobre sus receptores localizados en las células productoras de GnRH que sólo se encuentran en la pars tuberalis de la pituitaria y no las que se encuentran en el hipotálamo anterior o preóptico. La actuación de la melatonina en este sitio produce en estas células una disminución en la concentración del AMPc, y como consecuencia una reducción en la secreción de GnRH (64).

La localización de los sitios de unión a la melatonina puede brindar información sobre los posibles sitios de acción de la misma (72), (Fig. 6).

Inicialmente se describieron dos tipos de receptores a la MEL, uno de ellos, denominado ML-1, localizado en la retina, cerebro y pars tuberalis de pollo, mientras que el otro, referido como ML-2 se describió principalmente en el cerebro de hamster (21).

En 1989 Weaver localizó y caracterizó receptores a la MEL en el diencefalo de diversos roedores, en la rata los receptores se localizan en células de la región externa de la eminencia media, así como en células de la pars tuberalis y área postrema. Estos receptores también se localizaron en diversos órganos circunventriculares como el órgano vasculoso de la lamina terminalis, el órgano subfornical, el órgano subcomisural y la glándula pineal. Por otra parte, en el hamster sirio, estos sitios de unión se localizaron en el núcleo dorsomedial del hipotálamo, en el núcleo paraventricular del talamo y en la parte medial del núcleo habenular lateral. Mientras que en el hamster djungarian sólo se observaron en el Núcleo supraquiasmático (NSQ) y eminencia media del hipotálamo así como en los núcleos de la estria medular reunens y núcleo paraventricular del tálamo (96). En este reporte no se encontraron receptores en la región preóptica hipotalámica. Estos datos sugieren que el NSQ y la eminencia media son los sitios que median las acciones de la MEL (93). Situación similar a lo que observó en humanos (97).

La localización de estos receptores, además es dependiente de la especie, por ejemplo en la oveja se describieron receptores a la MEL en el hipotálamo mediobasal, en el núcleo arqueado, núcleo ventromedial, pars tuberalis, hipotálamo dorsolateral, hipotálamo anterior y el área preóptica; además, cuando se colocan microimplantes de MEL en estas zonas, la actividad neuroendocrina en el eje reproductor se ve estimulada, lo cual es completamente distinto en los carneros, en las distintas especies de roedores y en vertebrados inferiores (43, 62) (Cuadro 1).

Cuadro No.1 SITIOS DE UNION A LA MEL EN OVEJA Y ROEDORES

	Oveja	Hamster Sirio	Rata	Ratón
DIENCEFALO				
A. Preóptica medial	**	**		
HIPOTALAMO				
N. Anterior	**		**	**
N. Tuberal Medial Basal	**		**	
N. Supraquiasmático		**	**	**
N. Ventromedial	**	**		
N. Dorsomedial		**		**
TALAMO				
N. Paraventricular	**	**	**	**
N. Reuniens			**	
N. Anteroventral			**	
N. Anterodorsal			**	
N. Reticular de la región Anteroventral			**	
EPITALAMO				
N. Habenular Medial Lateral			**	
Comisura Habenular			**	
Pineal			**	
PITUITARIA				
Pars Tuberalis	**	**	**	**
Pars Distalis	**			
Ventrículo del Cuarto Plexo Coroideo				**
Ventriculos Laterales del Plexo Coroideo				**
OTROS				
Septum Mediolateral	**			
Septum Ventrolateral	**			
Lecho del Núcleo de la Estria Terminal	**			**
Corteza Cerebral	**			**
Hipocampo	**			
Girus Cingulado				**

Adicionalmente, también es posible que la acción indirecta de la melatonina sobre la

reproducción, se realice a través de una interacción con las catecolaminas y el ácido glutámico, ya que las fibras nerviosas hipotálamicas que contienen estos neurotransmisores, además de las que se localizan en las áreas como el núcleo accumbens, corteza prefrontal y región putamen-caudado contienen abundante receptores a la melatonina. Por otro lado, en estructuras como la retina y el caudado se mostró la existencia de receptores, los cuales median una inhibición en la liberación de dopamina provocada por la melatonina (25). Aunque tal situación no se ha descrito en el hipotálamo.

La glándula pineal además sintetiza, libera y secreta en forma fotoperiódica otros indoles aparte de la melatonina; de hecho existen por lo menos 18 diferentes compuestos descritos, los cuales mimetizan muchos de los efectos antigonadotrópicos de ésta. Aunque el grado de potencia de los mismos es menor que la melatonina, lo cual podría deberse a la pronunciada variación estacional en el ritmo diario de estos indoles (93). Entre los indoles más potentes se encuentran la 5-metoxitriptamina, el 5-metoxitriptofol y el 5-metoxi-indol-ácido acético (15)

En diferentes estudios se mostró que el 5-metoxitriptofol (MTF) ejerce un efecto inhibitor en el peso testicular de ratas y hámsters, aunque se trata de un efecto de menor intensidad que el producido por la melatonina. Se han propuesto diferentes hipótesis para explicar esta menor intensidad en su efecto: que el 5-metoxi-triptofol sea un compuesto de degradación no funcional de la pineal. Que sea un producto relacionado con el efecto de la melatonina en la ciclicidad estral de la rata, pero no determinante en la reproducción (91); o bien que el 5-metoxi-triptofol sea un compuesto rápidamente metabolizado a otro tipo de sustancia, ya que casi no es posible detectar su presencia en el plasma (11).

Por su parte, el 5-metoxi-indol-ácido acético es otro de los derivados pineales, que también ha mostrado tener efectos sobre el sistema reproductor, sobre todo en el hamster. En estos animales, su administración causa cambios degenerativos en los testículos; produciendo células necróticas dentro de los tubulos seminíferos, aunque el efecto de este indol es mucho menor al producido por la melatonina y al mismo 5-metoxi-triptofol (15)

Con base en la información precedente se ha sugerido que la acción de la melatonina se localiza en el Sistema Nervioso Central (SNC), aunque aún se desconoce que región del hipotálamo recibe la principal modulación. En realidad los sitios propuestos invocan al hipotálamo anterior y a la región preóptica (52).

El presente trabajo de tesis busca describir la probable participación del área preóptica y/o del área hipotalámica anterior, como sitios de acción de los indoles pineales, principalmente la melatonina, así como sugerir el posible mecanismo de acción utilizado por estas hormonas para inducir sus efectos moduladores sobre la reproducción; lo cual aunado al conocimiento de sus interacciones con otras estructuras, permitiría establecer un modelo hipotalámico de la reproducción. Gracias a este modelo, podría ser posible modificar este proceso en alguna de sus etapas, ya sea por un incremento o decremento en él, sin menoscabar el resto de la fisiología de la reproducción, ni provocar alteraciones por el uso de dosis farmacológicas como en el caso de los compuestos que actualmente se utilizan para tal fin.

Una forma de determinar el posible sitio de acción de la MEL, consistiría en utilizar una herramienta electrofisiológica que permitiera indicar que zonas del hipotálamo muestran una mayor selectividad y respuesta a la administración, ya sea sistémica o local de este indol. La especificidad de este efecto podría además ponerse a prueba con un análisis comparativo entre los efectos desencadenados por la MEL y aquellos provocados por otros 5-metoxi-indoles secretados por la pineal.

OBJETIVO GENERAL:

Analizar la participación de 2 estructuras hipotalámicas anteriores, los núcleos del hipotálamo anterior paraventricular y ventromedial, así como la región del área preóptica en la mediación de los efectos sobre la frecuencia de descarga unitaria, inducidos por la melatonina y dos indoles pineales, el 5 -metoxi-triptofol y el 5-metoxi-indol-ácido acético. Tal frecuencia de descarga unitaria constituye el mecanismo precedente de su acción moduladora de la liberación de las hormonas gonadotrópicas, las cuales son responsables del proceso de la reproducción.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Caracterizar el efecto de diferentes dosis de melatonina, 5-metoxi-triptofol y 5-metoxi-indol-ácido acético, sobre la frecuencia de descarga extracelular de neuronas del hipotálamo anterior y región preóptica en animales íntegros; con lo cual se pretende determinar el patrón de actividad eléctrica de estas estructuras e identificarlo como posible sitio de acción de estos indoles.
2. Caracterizar el efecto de diferentes concentraciones de los mismos indoles, sobre la frecuencia de descarga extracelular unitaria en células del hipotálamo anterior de rebanadas de hipotálamo; con la finalidad de determinar el patrón de actividad eléctrica de esta estructura aislada y correlacionar tales efectos con los obtenidos en la misma región *'in situ'*.

HIPOTESIS:

Si los efectos antigonadotrópicos provocados por la Melatonina, el 5-metoxi-triptofol y el ácido 5-metoxi-indolacético son debidos a una acción directa sobre las neuronas del hipotálamo anterior o de la región preóptica; entonces su aplicación en animales íntegros y en preparaciones in vitro de estas estructuras, provocará cambios en algunos de los parámetros electrofisiológicos que desencadenan los procesos de secreción y liberación de gonadotrofinas.

OBJETIVO GENERAL:

Analizar la participación de 2 estructuras hipotalámicas anteriores, los núcleos del hipotálamo anterior paraventricular y ventromedial, así como la región del área preóptica en la mediación de los efectos sobre la frecuencia de descarga unitaria, inducidos por la melatonina y dos indoles pineales, el 5 -metoxi-triptofol y el 5-metoxi-indol-ácido acético. Tal frecuencia de descarga unitaria constituye el mecanismo precedente de su acción moduladora de la liberación de las hormonas gonadotrópicas, las cuales son responsables del proceso de la reproducción.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Caracterizar el efecto de diferentes dosis de melatonina, 5-metoxi-triptofol y 5-metoxi-indol-ácido acético, sobre la frecuencia de descarga extracelular de neuronas del hipotálamo anterior y región preóptica en animales íntegros; con lo cual se pretende determinar el patrón de actividad eléctrica de estas estructuras e identificarlo como posible sitio de acción de estos indoles.
2. Caracterizar el efecto de diferentes concentraciones de los mismos indoles, sobre la frecuencia de descarga extracelular unitaria en células del hipotálamo anterior de rebanadas de hipotálamo; con la finalidad de determinar el patrón de actividad eléctrica de esta estructura aislada y correlacionar tales efectos con los obtenidos en la misma región "in situ".

HIPOTESIS:

Si los efectos antigonadotrópicos provocados por la Melatonina, el 5-metoxi-triptofol y el ácido 5-metoxi-indolacético son debidos a una acción directa sobre las neuronas del hipotálamo anterior o de la región preóptica; entonces su aplicación en animales íntegros y en preparaciones in vitro de estas estructuras, provocará cambios en algunos de los parámetros electrofisiológicos que desencadenan los procesos de secreción y liberación de gonadotrofinas.

OBJETIVO GENERAL:

Analizar la participación de 2 estructuras hipotalámicas anteriores, los núcleos del hipotálamo anterior paraventricular y ventromedial, así como la región del área preóptica en la mediación de los efectos sobre la frecuencia de descarga unitaria, inducidos por la melatonina y dos indoles pineales, el 5 -metoxi-triptofol y el 5-metoxi-indol-ácido acético. Tal frecuencia de descarga unitaria constituye el mecanismo precedente de su acción moduladora de la liberación de las hormonas gonadotrópicas, las cuales son responsables del proceso de la reproducción.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Caracterizar el efecto de diferentes dosis de melatonina, 5-metoxi-triptofol y 5-metoxi-indol-ácido acético, sobre la frecuencia de descarga extracelular de neuronas del hipotálamo anterior y región preóptica en animales íntegros; con lo cual se pretende determinar el patrón de actividad eléctrica de estas estructuras e identificarlo como posible sitio de acción de estos indoles.
2. Caracterizar el efecto de diferentes concentraciones de los mismos indoles, sobre la frecuencia de descarga extracelular unitaria en células del hipotálamo anterior de rebanadas de hipotálamo; con la finalidad de determinar el patrón de actividad eléctrica de esta estructura aislada y correlacionar tales efectos con los obtenidos en la misma región *'in situ'*.

HIPOTESIS:

Si los efectos antigonadotrópicos provocados por la Melatonina, el 5-metoxi-triptofol y el ácido 5-metoxi-indolacético son debidos a una acción directa sobre las neuronas del hipotálamo anterior o de la región preóptica; entonces su aplicación en animales íntegros y en preparaciones *in vitro* de estas estructuras, provocará cambios en algunos de los parámetros electrofisiológicos que desencadenan los procesos de secreción y liberación de gonadotrofinas.

METODOLOGIA:

Para cumplir con los objetivos de este trabajo se realizaron dos diferentes modelos experimentales. El primero consistió en el registro extracelular de la actividad eléctrica de células del hipotálamo anterior y de la región preóptica de ratas íntegras adultas. El segundo también consistió en el registro de la actividad eléctrica de las mismas células, pero ahora en "in vitro"

EXPERIMENTOS EN RATAS INTEGRAS:

Estos experimentos se realizaron en ratas wistar (49 hembras y 98 machos), con pesos que oscilaron entre 165 y 319 g (promedio 226.18 ± 37.96 g). Tres semanas antes de la fase de registro los animales permanecieron en condiciones de laboratorio y con un riguroso control de los ciclos de luz-obscuridad. Independientemente de la época del año, los ciclos fueron artificialmente controlados a una duración de 14 horas de luz por 10 de oscuridad. La luz se iniciaba a las 6:00 am y permanecía hasta las 20:00 horas. La temperatura fue también mantenida constante a 21 °C. Los animales se mantuvieron en jaulas colectivas de 3 a 4 ratas del mismo sexo por jaula con acceso libre al alimento (Purina-Rat Chow) y agua.

La sesión de registro se inició con la administración de uretano (1.5 g/Kg ip.) y una vez en plano quirúrgico se efectuó una traqueostomía para introducir una cánula endotraqueal que facilitara la ventilación. Además se introdujo un catéter (Nylon No. 27) intravenoso en alguna de las yugulares, para la administración de fármacos.

Posteriormente, los animales se colocaron en un aparato estereotáxico localizado en una mesa de registro limitada por una caja de Faraday, la cual tiene la finalidad de impedir la llegada de ruido eléctrico ajeno al registro celular. Para la colocación del electrodo de registro y de referencia, se realizó una incisión media longitudinal de 2 cms a lo largo de la línea media sagital del cráneo. Se infiltró anestésico local (xylocaína al 2%) en todos los puntos cutáneos de contacto con el estereotáxico y la región de la incisión. Una vez localizadas las coordenadas correspondientes al hipotálamo anterior o a la región preóptica, de acuerdo al atlas estereotáxico de König y Klippel (47), se realizó un trépano de 5 mm

METODOLOGIA:

Para cumplir con los objetivos de este trabajo se realizaron dos diferentes modelos experimentales. El primero consistió en el registro extracelular de la actividad eléctrica de células del hipotálamo anterior y de la región preóptica de ratas íntegras adultas. El segundo también consistió en el registro de la actividad eléctrica de las mismas células, pero ahora en "in vitro"

EXPERIMENTOS EN RATAS INTEGRAS:

Estos experimentos se realizaron en ratas wistar (49 hembras y 98 machos), con pesos que oscilaron entre 165 y 319 g (promedio 226.18 ± 37.96 g). Tres semanas antes de la fase de registro los animales permanecieron en condiciones de laboratorio y con un riguroso control de los ciclos de luz-obscuridad. Independientemente de la época del año, los ciclos fueron artificialmente controlados a una duración de 14 horas de luz por 10 de oscuridad. La luz se iniciaba a las 6:00 am y permanecía hasta las 20:00 horas. La temperatura fue también mantenida constante a 21 °C. Los animales se mantuvieron en jaulas colectivas de 3 a 4 ratas del mismo sexo por jaula con acceso libre al alimento (Purina-Rat Chow) y agua.

La sesión de registro se inició con la administración de uretano (1.5 g/Kg ip.) y una vez en plano quirúrgico se efectuó una traqueostomía para introducir una cánula endotraqueal que facilitara la ventilación. Además se introdujo un catéter (Nylon No. 27) intravenoso en alguna de las yugulares, para la administración de fármacos.

Posteriormente, los animales se colocaron en un aparato estereotáxico localizado en una mesa de registro limitada por una caja de Faraday, la cual tiene la finalidad de impedir la llegada de ruido eléctrico ajeno al registro celular. Para la colocación del electrodo de registro y de referencia, se realizó una incisión media longitudinal de 2 cms a lo largo de la línea media sagital del cráneo. Se infiltró anestésico local (xylocaina al 2%) en todos los puntos cutáneos de contacto con el estereotáxico y la región de la incisión. Una vez localizadas las coordenadas correspondientes al hipotálamo anterior o a la región preóptica, de acuerdo al atlas estereotáxico de König y Klippel (47), se realizó un trépano de 5 mm

METODOLOGIA:

Para cumplir con los objetivos de este trabajo se realizaron dos diferentes modelos experimentales. El primero consistió en el registro extracelular de la actividad eléctrica de células del hipotálamo anterior y de la región preóptica de ratas íntegras adultas. El segundo también consistió en el registro de la actividad eléctrica de las mismas células, pero ahora en "in vitro"

EXPERIMENTOS EN RATAS INTEGRAS:

Estos experimentos se realizaron en ratas wistar (49 hembras y 98 machos), con pesos que oscilaron entre 165 y 319 g (promedio 226.18 ± 37.96 g). Tres semanas antes de la fase de registro los animales permanecieron en condiciones de laboratorio y con un riguroso control de los ciclos de luz-obscuridad. Independientemente de la época del año, los ciclos fueron artificialmente controlados a una duración de 14 horas de luz por 10 de oscuridad. La luz se iniciaba a las 6:00 am y permanecía hasta las 20:00 horas. La temperatura fue también mantenida constante a 21 °C. Los animales se mantuvieron en jaulas colectivas de 3 a 4 ratas del mismo sexo por jaula con acceso libre al alimento (Purina-Rat Chow) y agua.

La sesión de registro se inició con la administración de uretano (1.5 g/Kg ip.) y una vez en plano quirúrgico se efectuó una traqueostomía para introducir una cánula endotraqueal que facilitara la ventilación. Además se introdujo un catéter (Nylon No. 27) intravenoso en alguna de las yugulares, para la administración de fármacos.

Posteriormente, los animales se colocaron en un aparato estereotáxico localizado en una mesa de registro limitada por una caja de Faraday, la cual tiene la finalidad de impedir la llegada de ruido eléctrico ajeno al registro celular. Para la colocación del electrodo de registro y de referencia, se realizó una incisión media longitudinal de 2 cms a lo largo de la línea media sagital del cráneo. Se infiltró anestésico local (xylocaína al 2%) en todos los puntos cutáneos de contacto con el estereotáxico y la región de la incisión. Una vez localizadas las coordenadas correspondientes al hipotálamo anterior o a la región preóptica, de acuerdo al atlas estereotáxico de König y Klippel (47), se realizó un trépano de 5 mm

por donde se introducía una micropipeta de vidrio (1 μm en la punta y de 20 a 30 $\text{M}\Omega$ de resistencia óhmica), llena con una solución 4M de NaCl saturada con el colorante verde rápido. Esta micropipeta fué descendida hasta el hipotálamo anterior en etapas de hasta 1 μm para registrar la actividad eléctrica extracelular de estas neuronas. Como electrodo indiferente se empleó un tornillo de acero inoxidable de 2 mm de diámetro y 4 de largo, fijado al cráneo pero haciendo contacto con la corteza cerebral. La preparación fue conectada a la tierra de referencia del sistema de registro a través de una pinza tipo caimán colocada en uno de los bordes posteriores de la incisión. La duración de estos registros en ningún caso fue menor a 75 minutos.

Para analizar el efecto de los 3 diferentes fármacos empleados en el presente estudio (melatonina, 5-metoxi-triptofol y 5-metoxi-indol-ácido-acético), se emplearon 3 diferentes lotes de animales. Cada lote, a su vez se dividió en 7 grupos de animales de acuerdo al tratamiento que recibieron, cada animal sólo recibió una dosis de alguno de los fármacos empleados. En el caso de los lotes de animales que recibieron melatonina y 5-metoxi-triptofol, los dos primeros grupos estuvieron constituidos por sujetos control. El primer grupo (n=8) estuvo formado por sujetos controles en los que se analizó el efecto temporal de la condición experimental sobre la frecuencia de descarga. Esto es, fueron animales a los cuales una vez localizada una neurona hipotalámica con actividad espontánea (control), se procedió a registrar durante un período de 75 min sin agregar ninguna otra variable experimental. Con ello se pretendió analizar el efecto del procedimiento quirúrgico, de la anestesia, y de las condiciones del laboratorio sobre tal parámetro electrofisiológico.

El segundo grupo (n=8) estuvo conformado por sujetos controles que recibieron en lugar de fármaco la administración de 400 μl de solución vehículo (50 % agua, 49% polietilenglicol y 1% etanol). Por otro lado, los grupos tercero, cuarto, quinto, sexto y séptimo (n=8, para cada grupo) recibieron la aplicación de una dosis de 0.2; 1.0; 1.5; 2.0 y 2.5 mg/Kg de peso respectivamente, ya sea de Melatonina, o de 5-Metoxi-triptofol. En el caso de los 7 grupos utilizados para el análisis de los efectos del 5-metoxi-indol-ácido-acético, su distribución fue exactamente igual a la de los dos lotes anteriores con la única diferencia de que cada grupo estuvo conformado por sólo 5 individuos.

Las sesiones de registro se iniciaban con la búsqueda de la actividad unitaria

"espontánea" en el hipotálamo anterior. Una vez localizada una espiga, se verificaba su estabilidad y persistencia durante 30 min. Si su frecuencia de descarga y tamaño de la espiga no se modificaban más allá del 20% en este tiempo, entonces se procedía a iniciar el registro de la actividad control. La duración del registro fué de 75 min, divididos por razones estadísticas en 5 periodos de 15 min cada uno. El primer periodo de 15 minutos, siempre correspondió al registro basal y al final del mismo se procedía a la aplicación intravenosa de una dosis del fármaco correspondiente. En los 60 minutos restantes se observaba el efecto del fármaco sobre el parámetro de la frecuencia de descarga.

Todos los fármacos empleados se obtuvieron de Sigma Chemicals con un grado de pureza cercano al 100%. Estos se mantenían en congelación (-20 °C) hasta su utilización. Tanto la Melatonina como el 5-metoxi-indol-ácido-acético se disolvieron inicialmente en 100 µl de etanol absoluto, después se le agregaban 4.9 ml de polietilenglicol (Merck) y se aforó tal solución hasta 10 ml con agua destilada. La concentración de esta solución fue calculada de tal manera que debían de administrarse 100 µl de esta solución por cada 100 g de peso corporal. Todas las administraciones fueron intravenosas y se realizaron a una velocidad de 400 µl por 90 segundos.

La actividad extracelular fué registrada usando técnicas y equipos convencionales; así, la micropipeta se conectó a travez de un electrodo de plata clorurada a una sonda de alta impedancia (Grass, HIP511E), la cual enviaba la señal hacia un preamplificador (Grass, P511J), alimentado con una fuente de poder (Grass, RPS 107). La salida del preamplificador fue visualizada en un osciloscopio analógico (Tektronix 2225), conectado en línea con un audiomonitor (AM8, Grass) y un sistema de captura por computación (Computerscope, RC electronics), con una velocidad de captura de 5 kHz. El mismo programa realiza los histogramas de frecuencia correspondientes, en los cuales se determinó el efecto provocado por el fármaco.

Una vez finalizado el registro, se aplicaba una corriente anódica a través del electrodo de registro, lo cual depositaba el colorante en la zona de registro. Posteriormente se sacrificaba al animal con una sobredosis de xilocaína y se extraía su cerebro para fijarlo en formaldehído al 10% durante al menos 2 semanas. Transcurrido este tiempo se realizaron cortes histológicos con un microtomo de congelación para determinar el sitio exacto de registro, gracias a la mancha verde resultado del depósito del colorante. La

localización exacta se obtenía de comparar el sitio de esta mancha con el resto de estructuras hipotalámicas visualizadas en el atlas esterotáxico correspondiente.

La existencia de algún cambio significativo en la frecuencia de descarga de las neuronas provocado por la aplicación de alguno de los fármacos empleados, se analizó utilizando la prueba de proporción crítica de McNemar(27). En este procedimiento estadístico se emplea una fórmula matemática con el número de espigas previo y posterior al tratamiento farmacológico. Un resultado de esta fórmula mayor o menor a 1.96, implica una diferencia a nivel de $p < 0.05$, según la tabla de distribución normal Z. Posteriormente para analizar la existencia de diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre los diferentes grupos tratados, se utilizó la prueba de ANOVA y la de Tukey para determinar los grupos que mostraron tal diferencia (27).

EXPERIMENTOS EN REBANADAS DE CEREBRO:

Se utilizaron ratas wistar hembras y machos con un peso que oscilo en el rango de 180 a 320 g (promedio 221.18 ± 34.6 g) mantenidas en condiciones de laboratorio durante al menos 3 semanas antes del experimento. En este ambiente los ciclos de luz oscuridad fueron también rigurosamente controlados; así, la fotofase duraba 14 horas y como consecuencia la escotofase sólo 10. La luz se iniciaba a las 6:00 y finalizaba a las 20:00 horas. Durante este tiempo los animales se mantuvieron en cajas individuales con libre acceso al agua y alimento (Purina-Rat chow).

Al inicio de la sesión experimental los animales fueron anestesiados con éter inhalado durante 25 segundos, suficiente para propiciar una anestesia quirúrgica. Una vez en este plano, los animales fueron decapitados rápidamente utilizando una guillotina de fabricación casera, para inmediatamente extraer el cerebro completo y colocarlo en una solución Ringer Krebs Henseleit (RKH) a 4 °C. Esta solución contenía la siguiente composición en mM: NaCl 125; KCl 5.5; NaH_2PO_4 1.25; MgSO_4 2.0; CaCl_2 1.5; NaHCO_3 25; dextrosa 10. Esta solución se aireaba continuamente con una mezcla de O_2 al 95% y CO_2 al 5%.

El tiempo transcurrido entre la decapitación y la inmersión del cerebro en esta solución, nunca fué mayor a 60 segundos. Posteriormente se procedía a eliminar por medio

de un corte transversal al cerebelo y a la corteza cerebral dejando un bloque que contenía desde la región preóptica hasta el hipotálamo anterior. Este bloque se fijaba a la platina de un vibratomo a través de colocar unas gotas de cianoacrilato (Super glue) por el polo caudal del bloque de tejido. Esta platina se colocaba en la base de un recipiente de 200 ml lleno con la solución RKH a 4 °C, el cual forma parte integral del vibrotomo (Campdem Instruments LTD). Una vez fijo el cubo del tejido, se obtenían rebanadas hasta localizar la zona en la cual el hipotálamo anterior fue visualizado entre las otras áreas del hipotálamo. Se obtuvieron rebanadas de 400 a 450 μm de grosor, con lo que se obtenían de 3 a 4 rebanadas de hipotálamo por animal.

Cada rebanada se transfirió a una cámara de incubación llena de solución RKH a 4 °C burbujeada constantemente con la mezcla de O_2 y CO_2 . En esta situación las rebanadas persistieron durante al menos 90 minutos para su equilibrio con la solución. Al final de este tiempo se transferían a la cámara de registro, la cual es de construcción casera y consistía de una base de acrílico (10.0 X 7.0 cm), en cuya parte central se encontraba el pozo (3.5 cm de diámetro y 1.0 cm de altura) de registro donde se colocó la rebanada, con una capacidad de 7.5 ml. La cámara poseía una base de vidrio intercambiable constituida por un portaobjetos (4 cm X 5 cm), fijado con parafina a lo largo de todo su borde. La cámara de registro se encontraba sobre la platina de un microscopio óptico (Carl Zeiss) y el tejido se transfería a la parte superior de un anillo de teflón cubierto con una malla de nylon colocado en la cámara de registro. Todo este sistema se encuentra sobre una mesa vibroaislante (Vibration Isolated Workstation, Newport), y dentro de una cámara de Faraday, con la finalidad de aislar completamente los ruidos ajenos al registro celular.

La solución de infusión (RKH) llegaba a la cámara de registro a una temperatura de 30 ± 0.5 °C gracias a un sistema de contracorriente, el cual consistía de un sistema de perfusión, que empleaba una bomba que hacía recircular agua caliente (40 ± 0.5 °C) por un tubo de mayor calibre (2.4 X 3.8 mm de diámetro interno y externo, respectivamente), mientras que la solución de infusión circulaba, gracias a la acción de la gravedad, por un tubo de menor calibre (1.19 X 1.7 mm; diámetros interno y externo, respectivamente) localizado dentro del primero. Tal arreglo permitió una transferencia de calor desde el agua caliente hacia la solución de tal manera que cuando ésta alcanzaba la cámara donde se encontraba la rebanada de cerebro, su temperatura fué de 30 ± 0.5 °C. La velocidad de

flujo de la solución de perfusión en el baño fué de 1.5 a 2.0 ml/min.

Después del tiempo de estabilización del tejido, se iniciaba el periodo de registro de la actividad eléctrica. Para lo cual se introducía una micropipeta de vidrio, hecha con borosilicato de sodio en un estirador vertical para pipetas de un solo paso (David Kopf Instruments, modelo 700C). Estos electrodos mostraron una punta de aproximadamente 1 μm , con resistencias ohmicas medidas en la preparación, que oscilaron entre 30 y 40 M Ω . La pipeta se llenaba con una solución 4.0 M de NaCl saturada con colorante Verde Rápido (Fast Green, Sigma Chemicals). El electrodo de registro fue colocado en la zona hipotalámica elegida de la rebanada mediante la ayuda de un micromanipulador (Newport MX300R) y un microscopio fótico (Carl Zeiss). El electrodo de registro se conectaba a una sonda de alta impedancia (Grass) y su señal alimentaba un preamplificador (Grass P5 AC) con una fuente de poder (Grass RPS 107); además de que se visualizaba en un osciloscopio (Tektronix 2225) conectado en serie con un audiomonitor (Winston Electronics, Modelo RAD-II y Serie 184-1).

El electrodo de referencia consistía de un alambre de plata clorurada colocado en el baño lejos de la rebanada. Por otro lado, también se colocaron electrodos de tierra a lo largo de todo el sistema para evitar fluctuaciones amplias de corriente ajenas al registro. Las señales así registradas, fueron filtradas en un ancho de banda de 300 Hz a 1 KHz, usando siempre una amplificación de 20 X 1000 y un filtro fijo de 60 Hz, para la eliminación del ruido provocado por la corriente alterna. Adicionalmente esta señal amplificada fue capturada gracias a una tarjeta convertidora analógica-digital (Digidata 2000, Axon instruments) con una frecuencia de captura de 20 KHz. La señal capturada fue analizada mediante el programa AxoScope (Axon Instruments) que determinaba el número de espigas por segundo y las características de tamaño y duración, así como el patrón de descarga de cada célula registrada.

En forma similar al experimento previo, los experimentos se realizaron durante 75 minutos divididos por razones estadísticas en 5 periodos de 15 min cada uno. Los primeros 15 minutos correspondía al registro de la actividad eléctrica basal de las neuronas del hipotálamo anterior y los 60 minutos posteriores correspondían al registro después de la administración de los fármacos. Los tres fármacos empleados se administraron al añadirse a la solución de infusión, a la concentración deseada. Estos fármacos se prepararon

inmediatamente antes de su aplicación de la misma manera que en el experimento anterior.

Se emplearon 50 rebanadas provenientes de 25 ratas. En estas rebanadas se analizó el efecto de los tres fármacos, así como de la solución vehículo. Las concentraciones finales utilizadas fueron, para la MEL de 200 y 790 μM ; para el 5-Metoxi-Triptofol y para el 5-Metoxi-indol-ácido acético de 790 μM . Los resultados obtenidos con la aplicación de cada una de estas dosis en sus respectivos fármacos fueron analizadas estadísticamente mediante la prueba de intervalo de confianza de Fisher, en donde se tomó el número mayor y menor de espigas del grupo control; para realizar la comparación con los otros grupos se utilizó la prueba de ANOVA y Tukey (27).

RESULTADOS.

ANIMALES INTEGROS:

Para la realización de los registros en ratas integras se utilizaron 250 ratas, de las cuales se lograron registros exitosos en 147 de ellas. El principal problema encontrado que disminuyó la muestra considerablemente fué un estado anestésico inadecuado que en ocasiones introducía artefactos en el registro que impedían un buen análisis.

En términos generales la actividad eléctrica del hipotálamo anterior registrada fue estable y de baja frecuencia, con un promedio de 2.32 ± 0.16 Hz, en un rango que osciló desde 0.02 hasta 5.7 Hz. Se trató de espigas únicas de mediano tamaño (2.3 mV) y trifásicas, usualmente con un patrón negativo-positivo-negativo. Similarmente, la región preóptica, se caracterizó por mostrar una frecuencia promedio de 3.06 ± 0.09 Hz, en un rango de 0.9 hasta 6.7. Las espigas también fueron únicas y de tamaño cercano a 2.0 mV, con un patrón generalmente bifásico.

Del total de células registradas 21 fueron utilizadas como grupo control temporal, este conjunto de animales recibió el mismo tratamiento experimental con la excepción de la aplicación de algún fármaco o solución vehículo. De los 4 períodos experimentales de registro en los 3 últimos hubo células, pertenecientes a este grupo, que modificaron en forma significativa su frecuencia de descarga. Así en el 2o período 3 células redujeron su frecuencia de descarga, mientras que en el tercero, 2 la incrementaron, estos cambios perduraron hasta el 4o período. Estos datos permitieron establecer un patrón de referencia para el análisis estadístico, de tal manera que el análisis contempla la probabilidad de un cambio espontáneo no provocado por el fármaco en la misma proporción que la de los sujetos del grupo control temporal.

Por otro lado, la aplicación endovenosa de los diferentes fármacos aplicados indujo importantes efectos en estas células registradas.

MELATONINA:

La administración de melatonina modificó significativamente la actividad eléctrica del 73.12% de las neuronas registradas en el hipotálamo anterior, mientras que el restante 26.88% no mostró cambio alguno durante los 60 minutos de registro

continuo postadministración. Tanto la latencia como la intensidad de los efectos encontrados fueron dependientes básicamente de la dosis administrada y del tiempo transcurrido después de su aplicación, tal como lo muestra la figura 7 y la tabla 2.

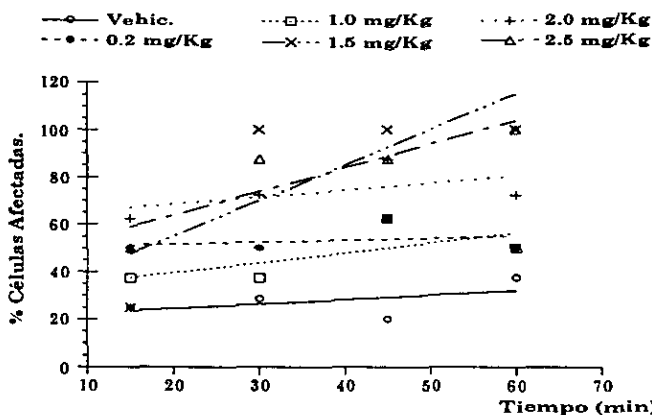


Fig 7. La administración endovenosa de MEL indujo efectos en la frecuencia de descarga los cuales son dependientes de la dosis. En esta gráfica se muestra que la dosis que provocó una mayor tendencia hacia la respuesta fue la de 1.5 mg/Kg.

Treat. mg/Kg	15 min	30 min	45 min	60 min
Vehículo	25.0	28.5	20.0	37.5
Mel 0.2	50.0	50.0	62.5	50.0
Mel 1.0	37.5	37.5	62.5	50.0
Mel 1.5	25.0	100.0	100.0	100.0
Mel 2.0	62.5	72.5	87.5	72.5
Mel 2.5	50.0	87.5	87.5	100.0

Tabla 2. Resumen de los resultados relacionados con el número de células, expresado en porcentaje, que mostraron algún efecto provocado por la melatonina.

En la figura 7 se observa que la dosis de 1.5 mg/Kg fue la que mostró el mayor reclutamiento de células, mientras que la dosis que afecto el menor número de células fue la de 1.0 mg/Kg; Además, durante el período de registro entre los 30 y 45 minutos fue cuando se observó la mayor cantidad de células afectadas, y debido al tiempo de latencia, el menor número de células que mostró algún efecto se encontró

en el 1er período (Fig. 8 y Tabla 2). La administración de la solución vehículo también provocó efectos, que sin embargo, fueron muy similares a los observados en los sujetos controles temporales (Fig. 8), por tal razón se aplicaron los mismos principios y límites de confianza en el análisis estadístico.

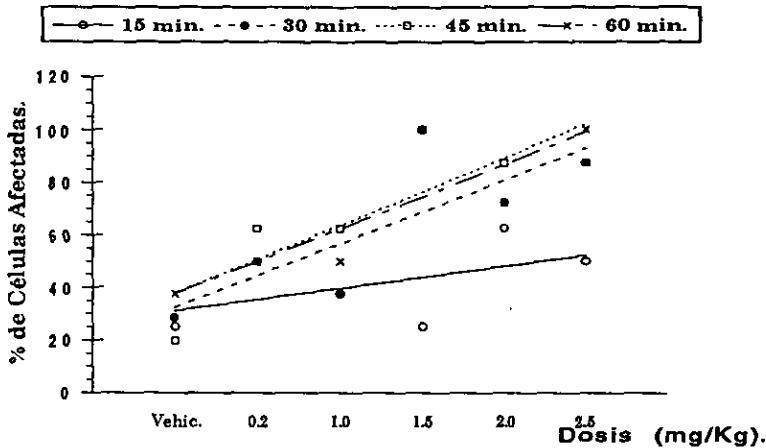


Fig. 8. Curva dosis respuesta que relaciona la dosis de melatonina con el número de células del hipotálamo anterior que respondieron en cada uno de los cuatro períodos registrados. Se observa que en todos los períodos hay una dependencia con respecto a la dosis. Esta tendencia es menor durante el primer período.

La dirección de las respuestas observadas también variaron con respecto a la dosis administrada. En términos generales se puede afirmar que la administración de dosis menores a 1.5 mg/Kg de peso, inducen principalmente incrementos de la frecuencia de descarga, mientras que la administración de dosis mayores provocan fundamentalmente decrementos de este parámetro, los cuales son indicativos de una reducción de la excitabilidad celular (Fig.9 y Tabla 3).

Por otro lado, la intensidad del efecto en cuanto a la profundidad de la inhibición y excitación, fue completamente dependiente de la dosis administrada. Así por ejemplo, en el caso de las depresiones de la frecuencia de descarga, la aplicación de la

dosis mayor de melatonina (2.5 mg/Kg) provocó una reducción total de este parámetro electrofisiológico. A pesar de ello, todos estos efectos fueron reversibles.

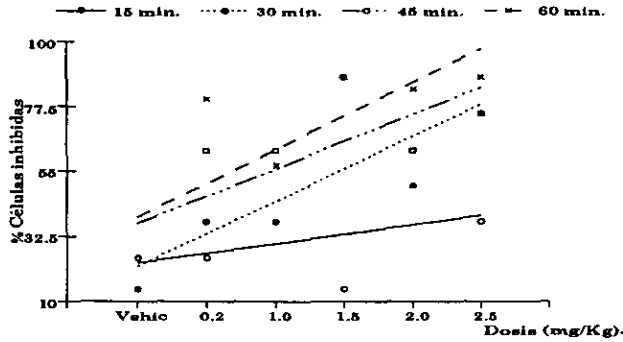


Fig. 9. Los efectos desencadenados por la administración de melatonina, siempre fueron dependientes de la dosis aplicada y del tiempo transcurrido. En la presente gráfica, la cual relaciona la dosis con el número de células del hipotálamo anterior afectadas con una disminución de su frecuencia de descarga durante cada uno de los cuatro periodos de 15 minutos, se observa una regresión que siempre tiende al incremento.

Trat. mg/Kg	15 min	30 min	45 min	60 min
Vehículo	25.0	14.2	14.2	14.2
Mel 0.2	25.0	37.5	62.2	80.0
Mel 1.0	37.5	37.5	62.2	57.1
Mel 1.5	14.2	87.5	87.5	87.5
Mel 2.0	50.0	50.0	62.2	83.3
Mel 2.5	37.5	75.0	75.0	87.5

Tabla No.3 Se muestra el porcentaje de células del hipotálamo anterior que respondieron con un decremento de la actividad espontánea a la aplicación de Melatonina en los 4 diferentes periodos de registro. La dosis de 1.5 mg/Kg inhibió reversiblemente al mayor número de células.

La melatonina modificó únicamente la frecuencia de descarga de las neuronas; esto es, el patrón, el tamaño y la duración de las espigas registradas no se modificaron por la aplicación de esta hormona indólica. La cinética de los efectos registrados, muestran que las acciones de esta hormona, administrada endovenosamente, se inician de 3 a 4 minutos después de su aplicación, y

dependiendo de la dosis, éstas persisten por varios minutos, con un inicio y final incidioso. Tales características cinéticas de los efectos descritos, fueron similares para las células que respondieron tanto con incrementos como aquellas que respondieron con decrementos en su frecuencia de descarga, lo cual se muestra en las Fig.10 a y b.

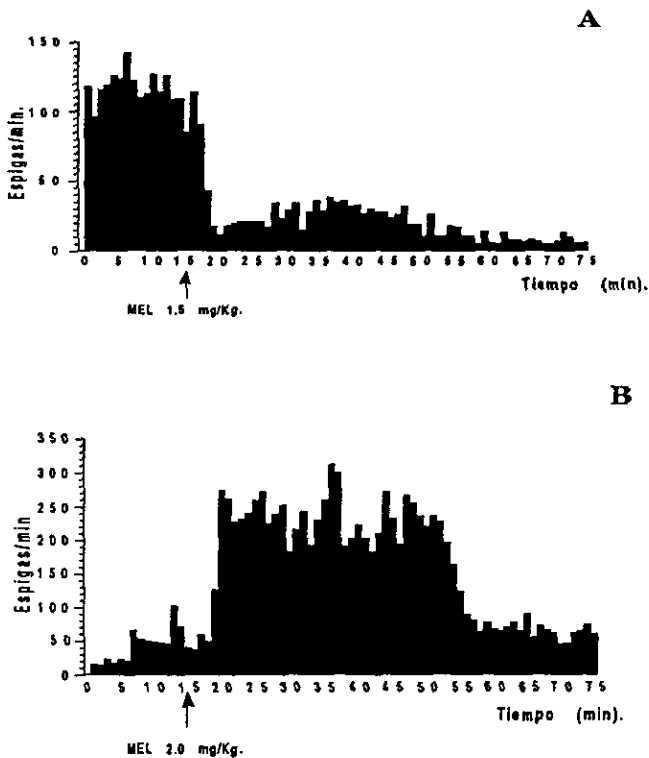


Fig. 10. A.- Histograma de frecuencia representativo del efecto depresor de la melatonina (1.5 mg/Kg). La aplicación se realizó a los 15 min como lo indica la flecha. Este efecto persistió durante los 60 min de registro posteriores a su aplicación. Mientras que B muestra el efecto estimulante de una dosis de 2.0 mg/Kg. En este caso el efecto observado se mostró 3 min después de su aplicación y se mantuvo durante 35 min, posteriormente la frecuencia tiende a sus valores basales.

El análisis de los resultados obtenidos del registro neuronal en la región

preóptica mostró que sólo 3 de 25 células registradas mostró algún cambio que fuera estadísticamente significativo (mayor al 40% de oscilación basal). Cuando estas células se compararon con las controles no se encontró diferencia estadística alguna.

5-METOXI-TRIPTOFOL

La administración endovenosa de este fármaco indujo efectos importantes en las células registradas. Sin embargo sus acciones fueron menos intensas que las provocadas por la melatonina. Por ejemplo, la frecuencia de descarga de estas neuronas se modificó de manera significativa sólo en un 60.5% de ellas, mientras que el restante 39.5% no respondieron a la aplicación de esta hormona durante los 60 minutos postadministración. Estos resultados contrastan con el 73.12% observado después de la aplicación de melatonina. Sin embargo, los efectos registrados, al igual que en el caso de la melatonina, fueron dependientes de la dosis administrada y del tiempo transcurrido como lo muestra la Fig 11 y la Tabla 4.

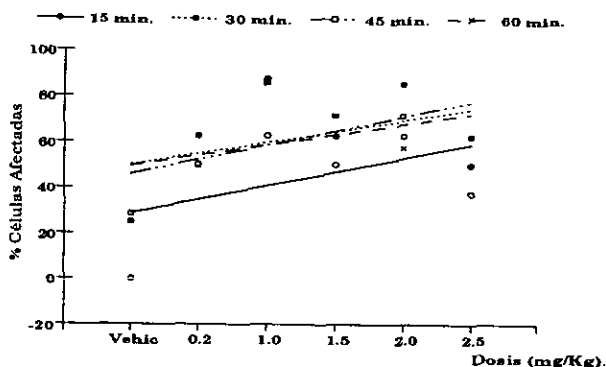


Fig. 11.- En esta figura se observa que la administración endovenosa de 5-metoxi-triptofol indujo efectos en la frecuencia de descarga de las células del hipotálamo anterior, los cuales son dependientes de la dosis y del tiempo transcurrido; aunque no existió diferencia significativa en esta tendencia entre los tres últimos períodos de registro.

La dosis de 1.0 mg/Kg modificó la actividad eléctrica de un mayor número de células sobre todo en los últimos 3 períodos. También en este grupo los sujetos controles

temporales y los que recibieron una aplicación de solución vehículo como único tratamiento, mostraron cambios en la frecuencia de descarga que se presentaron en forma azarosa, los cuales nunca fueron mayores al 40%. Estos cambios también fueron considerados en el momento de realizar el análisis estadístico para establecer un límite de confianza.

Tratam. mg/Kg	15 min	30 min	45 min	60 min
Vehículo	0	25	28.57	25
MTF 0.2	50.0	62.5	50.0	62.5
MTF 1.0	62.5	87.5	85.71	85.71
MTF 1.5	50.0	62.5	71.4	71.4
MTF 2.0	62.5	85.2	71.4	57.4
MTF 2.5	37.5	50.0	62.5	62.5

Tabla 4. Se describen los porcentajes de las células que fueron afectadas por la administración de 5-metoxitriptofol en cada uno de los cuatro periodos de registro.

Los resultados de este experimento indicaron que todas las dosis administradas fueron estadísticamente significativas cuando se compararon con ambos grupos controles, en lo relacionado tanto con el número de células afectadas ($p < 0.05$), como con la intensidad de este efecto ($p < 0.01$). Además y a diferencia de lo que ocurre con el grupo tratado con melatonina, la dirección de los efectos fue en ambas direcciones sin un predominio neto. Con las dosis que provocaron mayor efecto, la dirección de la respuesta tendió a ser hacia la inhibición; sin embargo en los grupos restantes fue mayor la excitación. Entonces la dirección de la respuesta no dependió de la dosis administrada (Tabla 5 y Fig. 11).

Aunque cualitativamente se mostró que este indol provoca tanto decrementos como incrementos de la frecuencia de descarga neuronal casi en la misma proporción, el análisis estadístico mostró que no hay diferencias con respecto a la dirección o intensidad de los efectos inducidos por el 5-metoxi-triptofol ($p < 0.164$). De la misma forma que sucede con la melatonina, el metoxi-triptofol sólo modificó la frecuencia de descarga; el patrón, tamaño y duración de las células registradas no sufrieron modificación alguna cuando se aplicó esta sustancia.

Trat. mg/Kg	15 min	30 min	45 min	60 min
Vehículo	0.0	12.5	14.48	14.28
MTF 0.2	25.0	50.0	50.0	50.0
MTF 1.0	37.5	62.5	42.85	33.3
MTF 1.5	50.0	52.0	42.85	42.85
MTF 2.0	50.0	71.4	42.85	33.3
MTF 2.5	12.5	25.0	37.5	25.0

Tabla 5. La administración de 5-metoxi-triptofol indujo efectos depresores significativos en un porcentaje elevado de células del hipotálamo anterior registradas. Sin embargo, estas cantidades no mostraron relación alguna con la dosis administrada, tal y como lo muestra esta tabla.

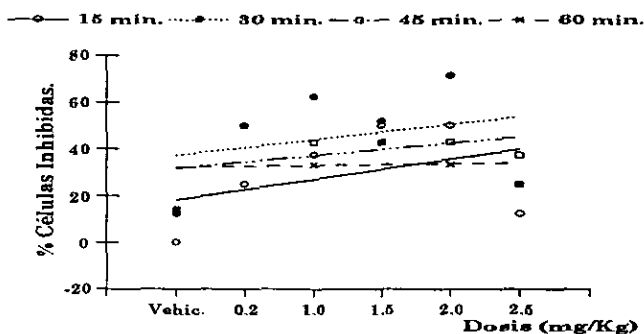


Fig. 12. La tendencia representativa de los efectos inducidos por el 5-metoxi-triptofol fue la inhibición de la frecuencia de descarga, aunque esta sólo se mostró en los 3 primeros periodos, ya que en el cuarto se observó la tendencia contraria.

Por otro lado, la cinética, duración e intensidad de los efectos provocados por esta sustancia fueron muy similares a los inducidos por la melatonina. Por ejemplo, la figura 13 muestra dos histogramas representativos de estos efectos. En A se muestra una acción depresora de la actividad eléctrica de este indol, mientras que B muestra una acción excitadora de la misma.

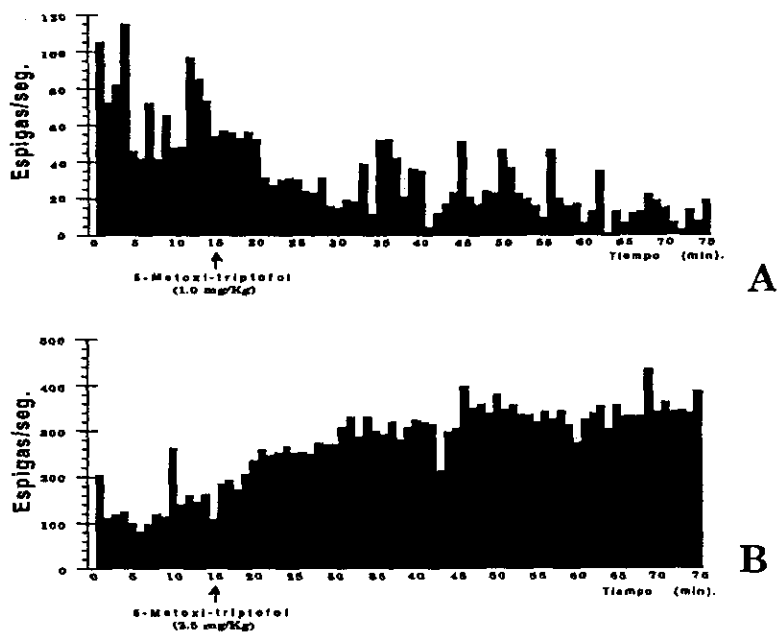


Fig. 13. Histograma de frecuencia representativos de los efectos depresores (A) y excitadores (B) ejercidos por la administración de 5-metoxi-triptofol. Ambos efectos se inician de una manera incidiosa durante 2 a 5 minutos después de realizada la aplicación (señalada por la flecha). En estos casos particulares el efecto desencadenado persistió durante los 60 minutos de registro postadministración, sin mostrar signos de aparente recuperación.

Similarmente a lo que ocurrió en el caso de la melatonina, la dministración de 5-Metoxi-triptofol a células de la región preóptica no indujo algún efecto estadísticamente significativo en alguna de las células registradas

5-METOXI-INDOL ACIDO ACETICO.

Los estudios que analizaron el efecto de 5-metoxi-indol ácido acético emplearon 35 sujetos divididos en 7 grupos de 5 individuos cada uno. Nuevamente los dos primeros constituyeron grupos controles temporales y controles de vehículo, mientras que los 5

grupos restantes recibieron la administración endovenosa de una dosis de 0.2, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mg/Kg, respectivamente. De los 3 indoles analizados, fue este indol el que modificó la frecuencia de descarga en mayor proporción (92%), ya que sólo el 8% de las células registradas no fueron afectadas por el mismo (Fig. 14 y tabla 6)

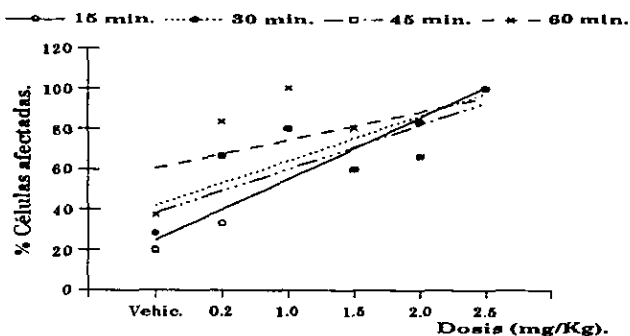


Fig. 14. De los 3 indoles analizados en el presente experimento, la administración endovenosa de 5-metoxi-indol ácido acético afectó el mayor número de células hipotalámicas. Así el 92% de las células registradas mostraron algún cambio significativo desencadenado por este indol. Estos efectos fueron dependientes de la dosis, y fueron mucho más evidentes durante los primeros 3 periodos de registro, tal como lo indica la presente gráfica.

Trat. mg/Kg	15 min	30 min	45 min	60 min
Vehículo	25.0	28.4	20.0	37.5
MIAA 0.2	33.0	66.6	66.6	83.3
MIAA 1.0	80.0	80.0	80.0	100.0
MIAA 1.5	60.0	60.0	60.0	80.0
MIAA 2.0	83.3	83.3	66.6	66.6
MIAA 2.5	100.0	100.0	100.0	100.0

Tabla 6. Se muestra la dependencia de la dosis, para los efectos desencadenados por el 5-metoxi-indol ácido acético. Por ejemplo el total de células registradas después de la aplicación de 2.5 mg/Kg de este indol, respondieron a tal administración.

La administración de la solución vehículo indujo los efectos característicos observados en los animales controles de los otros lotes de animales, por lo que se consideró estos cambios dentro del análisis estadístico para establecer nuestros márgenes de

confianza. El efecto primordial desencadenado por este indol fue una inhibición de la frecuencia de descarga; este efecto el cual se mostró en el 95.4% de las células afectadas, constituye la acción mas potente de los 3 indoles analizados en el presente estudio. La intensidad de este efecto depresor fue dependiente de la dosis, de tal manera que la aplicación de 2.5 mgKg de este compuesto inhibió el 100% de células registradas, durante los 4 períodos de registro postadministración (Fig 15 y Tabla 7).

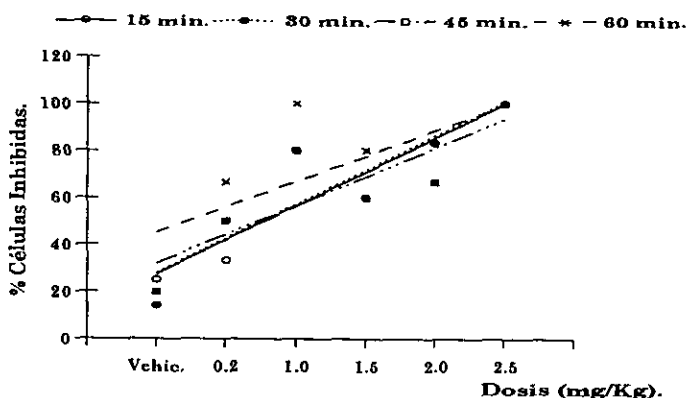


Fig.15.- En esta gráfica se observa que el principal efecto producido por el 5-metoxi-indol ácido acético fué una disminución en la frecuencia de descarga, lo cual es más evidente conforme se incrementa la dosis.

Tratam mg/Kg	15 min	30 min	45 min	60 min
Vehículo	25.0	14.2	20.0	20.0
MIAA 0.2	33.3	50.0	50.0	66.6
MIAA 1.0	80.0	80.0	80.0	100.0
MIAA 1.5	60.0	60.0	60.0	80.0
MIAA 2.0	83.3	83.3	66.6	66.6
MIAA 2.5	100.0	100.0	100.0	100.0

Tabla No. 7. Valores numéricos representativos del porcentaje de células que respondieron con un decremento a la aplicación del 5-metoxi-indol ácido acético.

Similarmente a lo ocurrido con la melatonina y el 5-metoxi-triptofol, este indol sólo modificó la frecuencia de descarga, mientras que el patrón, el tamaño y la duración de las espigas registradas no sufrieron ninguna modificación por la aplicación

de esta hormona indólica.

La cinética del efecto depresor desencadenado por este indol, cuando se administra endovenosamente, se inicia entre 5 a 8 minutos, dependiendo de la dosis, y se mantiene por todo el tiempo de registro (Fig. 17).

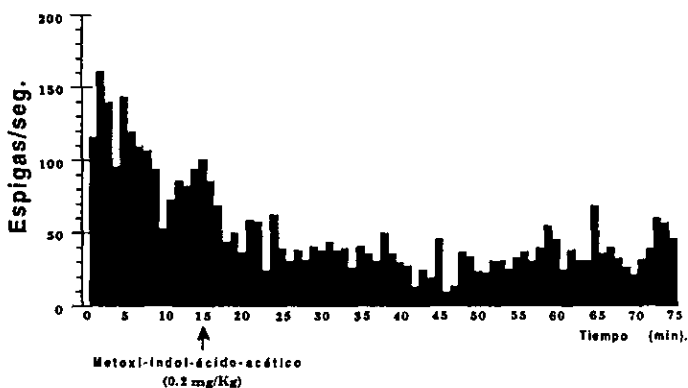


Fig. 17.- Histograma de frecuencia representativo del efecto depresor ejercido por 5-metoxi-indol ácido acético, en este caso en particular la dosis administrada fué de 0.2 mg/Kg, lo que provocó que dicho efecto se iniciara después de 10 minutos de aplicado y que la inhibición fuese de sólo 75% de la frecuencia basal.

A pesar de que este indol provocó efectos importantes en las neuronas del hipotálamo anterior, en la región preóptica, al igual que los otros dos indoles, no produjo efecto significativo alguno en la células analizadas.

REBANADAS DE HIPOTALAMO

La segunda etapa experimental diseñada para analizar la hipótesis propuesta, consistió en el registro extracelular en células de hipotálamo anterior de rebanadas de cerebro. Con esta técnica es posible determinar una acción directa del indol y detectar con mayor precisión los sitios del registro realizado. La colocación del electrodo de registro se realizó por medio de un microscopio óptico, lo que permitió determinar con exactitud la región hipotalámica a registrar.

Los potenciales de acción registrados en esta preparación se caracterizaron por ser mas estables que los registrados en animales íntegros, las variaciones de los sujetos controles fueron mucho menores que en el experimento anterior. Generalmente se trataba de espigas únicas con frecuencias que oscilaron entre 0.1 y 2.33 espigas por segundo, la frecuencia promedio de descarga en el hipotálamo anterior fue de 0.14 ± 0.0625 , mientras que en la región preóptica esta fue de 0.87 ± 0.74 espigas por segundo, es decir una frecuencia de descarga menor que la registrada en los sujetos íntegros. Estas espigas también mostraron una morfología trifásica, con un patrón positivo-negativo-positivo con una amplitud de aproximadamente 1.5 mV y una proporción ruido-síñal cercana al 2:1. Al igual que en los experimentos realizados en animales íntegros, la administración de los diferentes indoles indujo efectos únicamente sobre la frecuencia de descarga; esto es, ni la amplitud ni el patrón de descarga se modificó significativamente por la aplicación de estas sustancias.

MELATONINA

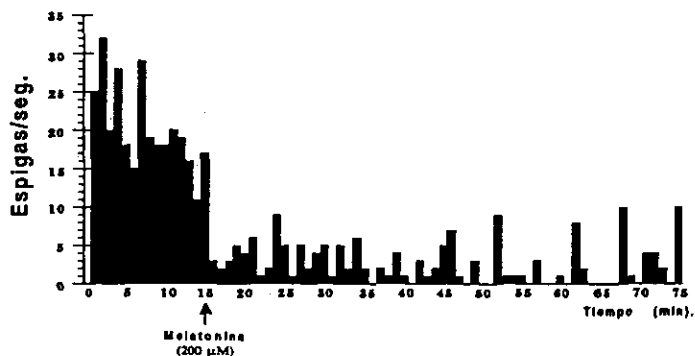
La administración de Melatonina en rebanadas del hipotálamo anterior indujo efectos que dependían de la concentración empleada. Cuando a la rebanada se le agregó una concentración de 200 μM , se mostraron efectos sólo en el 37% de las neuronas y el efecto encontrado más consistentemente fue un decremento de la frecuencia de descarga el cual fue consistente a lo largo de los 4 períodos de registro. Por otro lado, al agregar al baño de la rebanada una concentración de 790 μM , se encontraron efectos en el 60% de las células registradas y el efecto característico fue ahora un incremento de la frecuencia de descarga, el cual fue mas evidente en los

últimos 2 periodos (Tabla 8). Cuando estos datos se compararon con lo encontrados en el grupo control, se mostró que la adición de 200 μM provocó una diferencia estadística con una $p < 0.05$; mientras que este valor se incrementó a $p < 0.01$ al compara a este mismo control con el grupo tratado con melatonina en concentración de 790 μM .

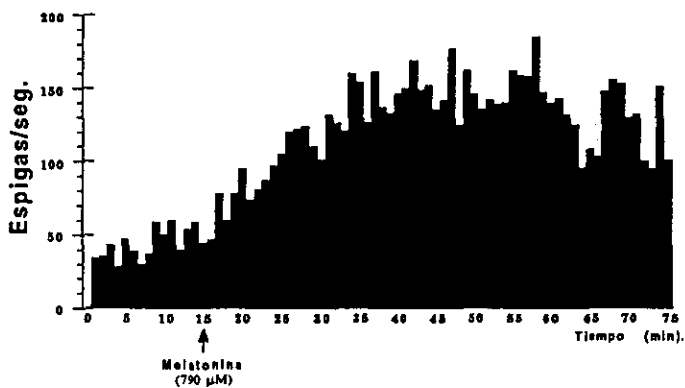
Concentración	n	Aumento (%)				Disminucion (%)				No respuesta (%)			
		15'	30'	45'	60'	15'	30'	45'	60'	15'	30'	45'	60'
Control	10	20	0	0	0	0	0	20	0	80	100	80	100
Mel 200 μM	10	0	0	30	10	20	30	30	30	80	70	40	60
Mel 790 μM	10	20	40	50	50	20	30	20	10	60	30	30	40
MTF 790 μM	10	20	0	0	0	20	20	30	30	60	70	70	80
MIAA 790 μM	10	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	100

Tabla 8.- Se resumen los resultados expresados en porcentaje de células que modificaron su respuesta después de la adición de los tres 5-metoxi-indoles de la glándula pineal sobre la frecuencia de descarga registrada extracelularmente en rebanadas de hipotálamo anterior. La aplicación 200 μM de melatonina (Mel) induce particularmente decrementos de la frecuencia de descarga; mientras que concentraciones de 790 μM provocan principalmente un aumento en este parámetro. Por otra parte una concentración equimolar de 5-metoxi-triptofol (MTF) indujo casi exclusivamente decrementos de la frecuencia de descarga; Mientras que no se observó un efecto significativo después de la adición de 790 μM de 5-metoxi-indol-ácido acético (MIAA).

La cinética de los efectos desencadenados por la melatonina fueron muy similares a los encontrados en animales íntegros. Esto es, se inician en forma paulatina a lo largo de 3 a 5 minutos después de adicionado el indol a la perfusión, y muestran una duración dependiente de la concentración. De hecho con la aplicación de la concentración mayor el efecto persiste durante los 60 minutos que corresponden a los 4 periodos de registro postadministración. La intensidad del efecto también fue dependiente de la concentración en una relación directamente proporcional (Fig. 18A y B).



A



B

Fig. 18.- La adición al baño de dos concentraciones diferentes de melatonina indujo efectos opuestos. La concentración menor ($200 \mu\text{M}$) se caracterizó por inducir efectos depresores del indol (A); mientras que durante la adición de una concentración mayor ($790 \mu\text{M}$) se observaron principalmente incrementos de la frecuencia de descarga (B). Ambos efectos aparecen de forma incidiosa durante los 3 a 5 minutos después de iniciada la perfusión del indol. El análisis histológico mostró que todas las neuronas registradas se localizaron dentro del hipotálamo anterior.

Similarmente a lo encontrado en los registros realizados en animales integros, la administración de melatonina en la región preóptica no causó un cambio significativo en este parámetro fisiológico registrado. Sólo 2 de 10 células mostraron un ligero cambio después de la administración del indol, pero al compararlo con el grupo control

este cambio no resultó estadísticamente significativo.

5-METOXI-TRIPTOFOL Y 5-METOXI-INDOL-ACIDO ACETICO.

Estos dos indoles pineales se aplicaron en una concentración equimolar, similar a la mas elevada de melatonina empleada. Esta cantidad de 5-metoxi-triptofol modificó la frecuencia de descarga del 30% de células registradas. Sin embargo, esta concentración de 5-metoxi-indol-ácido acético no provocó cambio alguno en el conjunto de neuronas registradas (Tabla 10). El efecto mostrado después de la aplicación del 5-metoxitriptofol fue un decremento de la frecuencia de descarga (Fig. 19), el cual fue muy intenso en la células registradas. De hecho fue el efecto depresor más intenso observado de todos los indoles. Sin embargo, la cinética de tal efecto y su duración fueron similares a los provocados por los otros indoles.

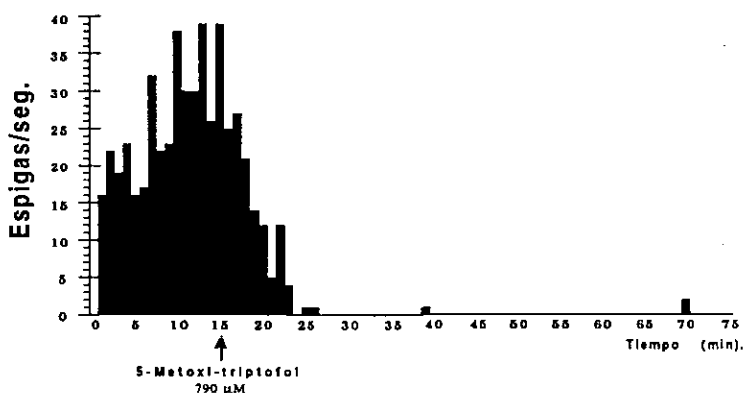


Fig. 18.- Histograma representativo del efecto depresor inducido por la adición de 790 μ M de 5-metoxi-triptofol al baño de perfusión de una rebanada de hipotálamo anterior. En esta gráfica se muestra el efecto inhibitor que produjo el 5-metoxi-triptofol en una de las células que respondieron a su aplicación. Este efecto depresor fue el más intenso registrado con alguno de estos indoles.

Desde un punto de vista estadístico los efectos desencadenados por el 5-metoxi-triptofol fueron diferentes con respecto a los mostrados en el grupo control ($p < 0.05$). En lo relacionado con el 5-metoxi-indol-ácido acético, como se muestra en la tabla 10,

éste no indujo algún efecto significativo a esta concentración empleada.

Como se esperaba, la administración de alguno de estos dos indoles a la concentración empleada no modifica en forma significativa alguna a las células de la región preóptica hipotalámica.

Nuevamente el análisis histológico determinó que los registros realizados con estos dos indoles, fueron hechos en células pertenecientes al hipotálamo anterior y a la región preóptica, respectivamente.

DISCUSION:

Durante la evolución, los procesos de adaptación a los cambios del medio ambiente implicaron la generación de estructuras capaces de detectar algunas de las variables del ambiente y transducirlas ya sea en señales nerviosas y/o hormonales (35). Dentro de este conjunto de estructuras sobresale la glándula pineal. Este órgano, a través de sus hormonas, principalmente la melatonina, actúa como un sincronizador entre las condiciones ambientales de luminosidad y la gran mayoría de los ritmos biológicos; aunque, la profundidad de sus efectos y el tipo de los mismos depende de la especie de que se trate y del medio en que se encuentren (82). Por ejemplo en los roedores con reproducción estacional esta glándula es fundamental en el control y desarrollo de los ritmos subyacentes a la reproducción y el metabolismo de estos animales (48). A pesar de la importancia y de que estas funciones de la pineal fueron descritas desde hace varias décadas, hasta ahora sigue sin describirse con precisión los sitios neuronales y el mecanismo de acción que sobre los ejes hipotálamo-hipófisis-órgano blanco producen las hormonas de esta estructura (58).

En el presente estudio, realizado tanto en ratas íntegras como en rebanadas de cerebro, se describe como tres indoles provenientes de la glándula pineal: la melatonina, el 5-metoxi-triptofol y el 5-metoxi-indol-ácido-acético, alteran la actividad eléctrica de las neuronas del hipotálamo anterior y no alteran a la región preóptica. Este tipo de actividad precede y es requisito indispensable para que ocurra la secreción hormonal (89); por lo que consecuentemente, una acción sobre esta función neuronal, representa la localización de un sitio blanco y un proceso a nivel de membrana implicaría un posible mecanismo de acción (69). La porción anterior del hipotálamo incluyendo a la región preóptica, contiene los grupos neuronales que secretan y producen hormonas liberadoras de gonadotrofinas; así como el resto de elementos neuronales que directa o indirectamente controlan tal secreción (25). Por tal razón, y debido a los efectos antigonadotrópicos descritos para estos indoles, resulta indispensable analizar un posible papel de estas hormonas sobre estas estructuras.

El parámetro electrofisiológico cuantificable que fue utilizado como un índice de los efectos de estas sustancias, fue la frecuencia de descarga. Este parámetro determina la

cantidad de mediador químico o de hormona que será liberada por una estimulación presináptica (10). A nivel de membrana un potencial de acción modifica la polaridad de la membrana del tal manera que actúa sobre canales de calcio dependientes de voltaje para producir un flujo transmembranal de calcio y un incremento en la concentración intracelular de este ion (9); tal incremento es el responsable de activar la maquinaria secretora (8). Como consecuencia, los procesos de liberación hormonal, del incremento del calcio intracelular y del flujo de calcio transmembranal, dependen de la frecuencia de descarga neuronal (71).

En el presente estudio, de todos los parámetros electrofisiológicos cuantificables por las técnicas utilizadas, las hormonas de la pineal únicamente modificaron la frecuencia de descarga, lo cual podría considerarse un efecto fisiológico; puesto que las sustancias que reducen ya sea el tamaño y/o el patrón de los potenciales de acción lo hacen de una manera farmacológica y en ocasiones modificando parámetros fisicoquímicos inespecíficos (32). Por ejemplo, los anestésicos locales, uniéndose a regiones inespecíficas de la membrana celular reducen los flujos de sodio transmembranal y el tamaño de los potenciales de acción, sin modificar inicialmente la frecuencia de descarga (32). Otro ejemplo son los opioides, los cuales en concentraciones elevadas y asociándose a regiones inespecíficas de la membrana neuronal (carentes de receptores opioides) reducen el tamaño de estos potenciales de acción (75). Tal información sugiere entonces que estos indoles actúan por medios fisiológicos, es decir sobre receptores específicos, para modificar el grado de excitabilidad neuronal. De hecho en esta región hipotalámica se describió la presencia de receptores a la melatonina (43), los cuales muestran afinidad por la mayoría de los indoles secretados por la pineal (44, 103). Hasta ahora se han descrito dos sitios de unión estereoespecífica a la melatonina, los cuales muestran diferentes cinéticas. Uno de ellos, localizado en la membrana celular y asociado a proteínas-G, descrito como el sitio ML1, muestra una unión saturable de media afinidad ($KD = 74 \pm 14$ pM, $B_{max} = 679 \pm 88$ fmol/mg proteína). Aunque esta afinidad puede oscilar entre media y alta afinidad dependiendo de la hora del día (99) La asociación de melatonina a este receptor se traduce en una inhibición de la formación de AMPc, ya sea en condiciones basales o de estimulación por forskolina. Además estos receptores pueden ser bloqueados por el luzindole ($IC_{50} = 1.5 \pm 0.22$ nM, $pK(B) = -7.3$), un antagonista específico de estos receptores (99).

El otro tipo de receptor a la melatonina descrito como ML2 muestra una cinética rápida de asociación/disociación, con una unión saturable de baja afinidad ($KD = 0.9-1.0$ nM; $B_{max} = 15.5 \pm 1.8$ fmol/mg proteína), sin cambios fotoperiódicos en su afinidad (22). Es posible que existan además diversos subtipos de estos receptores, aunque la información actual aún no permite establecer tal afirmación con certeza (22).

El hipotálamo anterior es una de las regiones más ricas en este tipo de receptores, aunque la mayoría se localiza en estructuras como los núcleos supraquiasmáticos, los núcleos arqueados y ventromediales así como la eminencia media y la pars tuberalis (43), mientras que la región preóptica, la cual contiene a la mayoría de los grupos celulares productores de factor liberador de gonadotropinas (83) contiene sólo medianas a bajas concentraciones de tales receptores (55). De hecho implantes de melatonina en esta región tienen un efecto pobre en la inhibición de la producción de este factor liberador (53). Lo que hace sugerir la existencia de un grupo celular mediador entre la melatonina y las células productoras de factores liberadores de gonadotropinas (53). En otras regiones cerebrales también existen estos dos tipos de receptores a la melatonina los cuales también muestran una diferente afinidad y concentración fotoperiódica (94). Estos receptores coexisten en varias estructuras cerebrales (22,74). Adicionalmente, algunos de los efectos de la melatonina parecen ser debidos una interacción entre esta hormona y algunos componentes intracelulares, como la calmodulina citoplasmática y la fosfodiesterasa dependiente de la calmodulina, lo que provoca cambios metabólicos y estructurales del citoesqueleto (7). Sin embargo, los cambios electrofisiológicos provocados por este indol, no parecen ser consecuencia de tal interacción, básicamente por comparar la cinética temporal en el desarrollo de estos efectos, los cuales tardan de horas a días en manifestarse (7), con la latencia de los descritos en el presente trabajo, cuya presentación es cuestión de minutos.

La aplicación de melatonina en el hipotálamo anterior modifica varios parámetros neuroquímicos, por ejemplo inhibe la liberación de dopamina e induce un incremento significativo en la liberación de glutamato y aspartato (24), estos últimos son neurotransmisores excitadores clásicos cerebrales. De particular interés son las vías dopaminérgicas localizadas en la región hipotalámica medio basal, las cuales al ser activadas ejercen una regulación inhibitoria de la secreción de gonadotropinas en el carnero. Estos

efectos pueden ser inhibidos por la bromocriptina, lo que implica la participación de un sistema dopaminérgico (90). Otro neurotransmisor afectado por la administración de melatonina es la noradrenalina localizada en la región mediobasal hipotalámica, la administración diaria de una dosis de 2.0 mg/Kg de peso corporal de melatonina induce un decremento significativo tanto en la síntesis como liberación de este neurotransmisor. Tal efecto no parece ser parte de la acción gonadotrópica de esta hormona (2).

En realidad la aplicación local de melatonina en el hipotálamo anterior modifica significativamente los niveles de la mayor parte de los neurotransmisores ahí existentes. Por ejemplo se ha descrito que su administración incrementa los niveles de ácido aspártico y del ácido gama-amino-butírico (GABA) en un 29 y 50%, respectivamente. Contrariamente las concentraciones de beta-endorfina hipotalámica se disminuyeron significativamente después de una administración de entre 5 y 100 mg/kg, los niveles de serotonina hipotalámica se redujeron también en un 46% (44,102). y las concentraciones de prostaglandinas en la eminencia media se redujeron considerablemente después de la aplicación de este indol (28). Estos resultados sugieren que algunos de los efectos hipotalámicos de la melatonina pueden ser mediados ya sea por una potenciación de la actividad de neuronas hipotalámicas que contienen GABA y ácido aspártico o por la inhibición de las neuronas beta-endorfinérgicas y serotoninérgicas. Tal aseveración considera que las acciones hormonales de la melatonina pueden ser mediadas a través de sus acciones sobre de neurotransmisores hipotalámicos (44,102). Sin tomar en cuenta además los efectos extrahipotalámicos que esta hormona ejerce sobre diversos neurotransmisores (2).

La gran variedad de estos efectos neuroquímicos que estas hormonas producen se reflejan además en una gran cantidad de efectos neuroendocrinos los cuales han sido descritos para la mayoría de estos indoles. Por ejemplo, se mostró la presencia de un tono inhibitor hipotalámico sobre la secreción de hormona liberadora de corticotrofina (46) y de la hormona estimulante de la tirotrófina en varias especies (79, 101); además de que la melatonina ejerce una influencia inhibitora sobre la secreción de prolactina (51). Todos estos efectos seguramente representan una acción de estas sustancias sobre varios grupos neuronales, además de una diversidad de efectos electrofisiológicos, puesto que todos estos sistemas hormonales poseen sistemas que pueden activarlos y grupos neuronales que los

inhiben.

En el presente trabajo, la aplicación ya sea sistémica o local de tres indoles 5-metoxilados de la glándula pineal desencadenaron efectos significativos en la frecuencia de descarga de la mayoría de células registradas. Cuando la aplicación se realizó en animales íntegros, las 5 dosis de melatonina, 5-metoxitriptofol y 5-metoxi-indol-ácido acético empleadas (0.2, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mg/Kg de peso) indujeron efectos en el 73.12%, 60.5% y 92%, respectivamente (tablas 2,4 y 6) de todas las células registradas. Las proporciones de células afectadas por la melatonina son bajas comparadas con otros estudios realizados en la misma región (101), y no existen estudios que analicen el efecto de los otros dos indoles sobre este parámetro celular. Las diferencias cuantitativas entre la melatonina y el 5-metoxitriptofol podrían residir en diferencias de afinidad sobre el mismo tipo de receptor.

Estudios de unión a ligandos en linfocitos humanos activados muestran que si la afinidad del receptor ML1 por la melatonina se considera como 1, la afinidad por el 5-metoxitriptofol se reduce hasta 0.55 (45). En el caso del sistema nervioso central algunos experimentos de competición con ligandos indólicos mostró que la afinidad del receptor ML1 presenta el siguiente orden: melatonina, 6-hidroximelatonina, N-acetil-5-hidroxitriptamina, 5-metoxitriptamina, 5-metoxitriptofol, 5-metoxi-indol-ácido acético, 5-hidroxitriptamina y 5-hidroxi-indol-3-ácido acético (38), es decir nuevamente el porcentaje de afinidad del 5-metoxitriptofol es cercano al 50% con respecto al de la melatonina. Tal situación puede explicar la diferencia en el porcentaje de células afectadas.

Sin embargo, el efecto del 92% de células afectadas mostrado por el 5-metoxi-indol-ácido acético, no es explicable sobre este tipo de bases, ya que la afinidad de estos receptores ML1 por este indol es una de las más bajas reportadas (38), y se desconoce cual es la afinidad del receptor ML2 por el mismo. Sin embargo, es necesario recordar que la aplicación sistémica de un compuesto aunado al registro en una región específica del cerebro, no necesariamente implica una acción directa del fármaco sobre esta región. Es decir; existe la posibilidad de una acción indirecta mediada por alguna otra estructura que mantiene una conexión eléctrica con la estructura en registro. De ser este el caso la administración tópica del compuesto debe inducir una cantidad mínima de efectos sobre la misma estructura. En el presente estudio, cuando este compuesto se aplicó en rebanadas de cerebro no se observó modificación significativa alguna de la frecuencia de descarga. Estos

resultados sugieren entonces que este compuesto, el 5-metoxi-indol-ácido acético, no ejerce efectos sobre el hipotálamo anterior o la región preóptica de la rata y que la gran cantidad de células afectadas por el compuesto después de su aplicación intravenosa, es debida a un efecto extrahipotalámico, ya sea en regiones con abundancia de receptores ML1 como el tectum óptico, el tálamo, algunas regiones telencefálicas, la medula oblongada y el cerebelo (38).

En los experimentos aquí descritos, se utilizaron dos tipos de animales controles, en uno se analizó el efecto de las condiciones ambientales y temporales sobre el parámetro en cuestión. Mientras que en el otro se observó el efecto de las soluciones utilizadas como vehículos de los diferentes fármacos empleados. El análisis estadístico mostró que no existen diferencias significativas entre ambos grupos. Sin embargo, a lo largo del tiempo estos sujetos mostraron cambios importantes en su frecuencia de descarga, cuando se comparó a los diferentes intervalos con el registro considerado como "basal" (Tablas 2,4,6). Debemos recordar que la frecuencia de descarga de cualquier neurona esta determinada por un gran número de factores (41), desde factores externos, como la estimulación ambiental, el grado de anestesia, el dolor inducido por el procedimiento quirúrgico, la inmovilización esterotáxica, etc. Hasta factores internos, como el grado de presión arterial, el nivel de glucosa sanguínea, la ventilación, y la estimulación interoceptiva (34).

Por tal razón no resulta extraño que esta frecuencia "control" o "basal" en realidad es una imposición de todo el paradigma experimental, el cual es sensado y experimentado en forma diferente por cada animal. De ahí la gran variabilidad en los valores de esta frecuencia basal. Sin embargo, el análisis estadístico utilizado consideró tal variabilidad y únicamente determinó un cambio como significativo cuando las modificaciones de este parámetro después de la aplicación del fármaco fueron al menos 5 veces mayores a las mostrados por las oscilaciones "basales" de este parámetro analizado.

El tipo de respuesta desencadenado por estos indoles fue tanto de incremento como de decremento de la frecuencia de descarga, lo cual sugeriría un respectivo incremento o decremento en la excitabilidad celular. En general, la dirección de este cambio dependió de la dosis administrada y del intervalo registrado. En el caso de la melatonina, la aplicación de dosis que oscilaron entre 0.2 y 1.0 mg/Kg de peso, indujeron principalmente incrementos de la frecuencia de descarga (Tabla 3); mientras que dosis de 1.5 y mayores se caracterizaron

por la presencia de decrementos de este parámetro, sobre todo en los últimos intervalos de registro. Contrariamente, en el caso del 5-metoxitriptofol, las dosis entre 0.2 y 1.0 se caracterizaron por inducir decremento de la frecuencia mientras que dosis mayores la incrementaron. Además estos efectos fueron más importantes durante los primeros intervalos de registro (tabla 5).

Finalmente, en el caso de la administración endovenosa de 5-metoxi-indol-ácido acético, se presentó una situación diferente, el tipo de respuesta fue unimodal con principalmente decrementos de frecuencia en todas las dosis analizadas y en todos los intervalos registrados, de tal manera que con la dosis de 2.5 mg/Kg, todas las células mostraron un decremento sostenido y reproducible de su frecuencia de descarga (Tabla 7).

El tipo de respuesta bifásica dependiente de la dosis que se mostró después de la administración de melatonina y 5-metoxitriptofol, puede representar varios mecanismos involucrados. Primero, debido a que su aplicación es endovenosa y afecta a la totalidad de estructuras cerebrales, esta respuesta bifásica puede ser consecuencia de una acción en más de un sitio cerebral, con diferente sensibilidad y relación con el hipotálamo anterior.

También es posible que debido a la amplia gama de efectos desencadenados por los indoles de la pineal en el hipotálamo anterior, se activen diferentes sistemas de neurotransmisores en esta región por estos indoles. Es decir, la administración de melatonina se asocia con un incremento en la actividad GABAérgica (44, 102) pero también con una disminución del tono serotoninérgico (59), lo que implica una acción en dos sistemas de neurotransmisores que quizá posean una sensibilidad diferente a la misma. En otras palabras, las dosis menores de melatonina podrían activar neuronas GABAérgicas y las dosis mayores inhibir neuronas serotoninérgicas.

En el caso del 5-metoxitriptofol, la diferencia entre sus efectos y los de la melatonina podrían ser consecuencia de la menor afinidad del receptor ML1 por este compuesto, o incluso de una asociación con el receptor tipo ML2, lo cual se ha sugerido (22). Tal diferencia funcional se ve reflejada en varios estudios que analizan la cinética de respuesta entre la melatonina y el 5-metoxi-triptofol. Por ejemplo la interacción entre la melatonina y el diazepam a nivel de la glándula pineal, provoca efectos opuestos en dirección cuando se analiza la interacción diazepam-5-metoxitriptofol (56). De igual manera, las modificaciones que se presentan por la aplicación de compuestos GABAérgicos sobre el patrón de

secreción fotoperiódica de este indol metoxilado son opuestas a las observadas después de la aplicación de melatonina (56).

Sin embargo, también algunos de los efectos desencadenados por este indol son similares a los provocados por la melatonina. De particular interés son sus acciones sobre los procesos oxidativos celulares, tanto la melatonina como el 5-metoxitriptofol, aunque en menor grado, ejercen una acción protectora contra los radicales libres. Tal efecto reside en su capacidad como aceptores de hidrogeniones (70).

Los presentes resultados indican entonces, que aunque el 5-metoxitriptofol ejerce importantes efectos sobre la excitabilidad de las neuronas del hipotálamo anterior, estos efectos y posiblemente su mecanismo de acción sean diferentes a los empleados por la melatonina.

Por los resultados aquí mostrados es de sugerirse que los potentes efectos mostrados por el 5-metoxi-indol-ácido acético son debidos a una acción de este indol en estructuras diferentes al hipotálamo anterior. Las dosis mas elevadas de este compuesto provocaron una respuesta intensa en el 100% de las neuronas registradas (Tabla 6). Pero su aplicación tópica en la rebanada de cerebro no indujo efecto alguno, lo cual sugiere una acción sobre los sistemas neuronales que mantiene conexiones estructurales con el hipotálamo anterior, como lo es la sustancia gris periacueductal o la formación reticular mesencefálica, la cual conecta a casi todo cerebro anterior con el hipotálamo anterior (5).

En los pocos estudios comparativos de los diferentes indoles que existen, el 5-metoxi-indol-ácido acético, posee sólo efectos pobres sobre muchos de los parámetros que se utilizan para medir su potencia. Por ejemplo, en estudios de unión a ligando, este indol clasifica dentro de los últimos en la afinidad que el receptor muestra por él (22). También en relación a algunos de los efectos sobre la reproducción, como es el caso de la reabsorción de fetos inducida por estos indoles, el 5-metoxi-indol-ácido acético a diferencia de la melatonina y del 5-metoxitriptofol que provocan una resorción activa y total de todos los productos con efectos embriotóxicos (14), este compuesto sólo induce un retardo en el desarrollo embrionario (13). Adicionalmente, los implantes de este compuesto en el hipotálamo anterior no ejercen efectos significativos sobre los pesos del útero y del ovario en ratones, lo que sugiere una carencia de efecto en esta región cerebral (68), similar a lo que sugiere los presentes resultados. Sin embargo cabe recordar que los tres indoles aquí

probados ejercen potentes efectos antioxidantes (70), lo cual le da similitudes funcionales.

Con base en lo escaso de la información con que se cuenta del 5-metoxi-indol-ácido acético en la literatura internacional, es difícil el establecer una teoría que explique consistentemente el efecto observado en el presente trabajo. Se considera que una etapa subsiguiente del presente estudio, consistiría en analizar con más detalle y empleando técnicas más discriminadoras, estos efectos observados después de la aplicación de esta hormona de la pineal.

Finalmente, debido a que ninguno de los indoles aquí estudiados ejercieron una acción significativa en las neuronas de la región preóptica, la cual contiene en la rata la mayor proporción de gonadotropos o células productoras de GnRH, es de sugerirse que los efectos inducidos por la glándula pineal sobre los procesos de la reproducción son mediados a través de otros sistemas de neurotransmisores, posiblemente localizados en el hipotálamo anterior, en los núcleos paraventricular y ventromedial y sus vecindades.

CONCLUSIONES:

A.-) La melatonina modifica la actividad eléctrica de las neuronas del hipotálamo anterior, lo cual se manifiesta como cambios en la frecuencia de descarga neuronal. Este efecto, sobre la excitabilidad neuronal posiblemente sea consecuencia de una interacción de esta hormona con su receptor a nivel de membrana, debido a que la latencia de la respuesta de las células del hipotálamo anterior a la administración de melatonina es rápida (entre 3 a 5 minutos), y no es de índole genómico, lo que representaría una latencia de al menos varias horas.

B.-) Este indol no produjo efectos significativos sobre la región preóptica del hipotálamo de ratas, lo que sugiere que sus efectos sobre los gonadotropos son de índole indirecta, mediados por un sistema de neurotransmisores. Es necesario analizar una interacción entre este indol y los sistemas GABAérgicos y catecolaminérgicos.

C.-) La administración del 5-metoxitriptofol, también ejerce efectos significativos en el hipotálamo anterior, pero a diferencia de la melatonina, éstos son de menor intensidad y con patrón diferente. A pesar de ello, estos datos muestran que esta estructura es sensible a los efectos de este indol de la pineal.

D.-) Este indol metoxilado tampoco provocó efecto sobre las neuronas de la región preóptica sugiriendo también una acción indirecta sobre la reproducción.

E.-) En el caso particular del 5-metoxi-indol ácido acético, los datos aquí mostrados sugieren que éste carece de una acción directa sobre las neuronas del hipotálamo anterior y la región preóptica. Aunque su administración sistémica provoca efectos intensos inhibidores sobre las células del hipotálamo anterior, lo que posiblemente represente una acción sobre zonas extrahipotálamicas.

BIBLIOGRAFIA

1. Akesson, T. R.; Micevych, P. E. Endogenous opioid-immunoreactive neurons of the ventromedial hypothalamic nucleus concentrate estrogen in male and female rats. *J. Neurosci. Res.* 28:359-366; 1991.
2. Alexiuk, N. A.; Vriend, J. P. Extrahypothalamic effects of melatonin administration on serotonin and norepinephrine synthesis in female Syrian hamsters. *J. Neural. Transm. Gen. Sect.* 94:43-53; 1993.
3. Anderson, R. A.; Lincoln, G. A.; Wu, F. C. Melatonin potentiates testosterone-induced suppression of luteinizing hormone secretion in normal men. *Hum. Reprod.* 8:1819-1822; 1993.
4. Anton-Tay, F; Díaz, J. L; and Fernández-Guardiola, A., On the effect of melatonin upon human brains: Its possible therapeutic implications. *Life Sci.* 10:841-850; 1971.
5. Balthazart, J. Dupiereux, V. Aste, N. Viglietti Panzica, Barrese, M. Panzica, G. C. Afferent and efferent connections of the sexually dimorphic medial preoptic nucleus of the male quail revealed by in vitro transport of DiI. *Cell. Tissue. Res.* 276:455-475, 1994
6. Barclay, S. R.; Harding, C. F.; Waterman, S. A. Correlations between catecholamine levels and sexual behavior in male zebra finches. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 41:195-201; 1992.
7. Benítez-King G, Huerto-Delgadillo L, Anton-Tay F. Melatonin modifies calmodulin cell levels in MDCK and N1E-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity in vitro. *Brain Res.* 557:289-292; 1991
8. Berridge, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361: 315-325, 1993

9. Canny,B.J. Rawlings,S.R. Leong,D.A. Pituitary adenylate cyclase- activating polypeptide specifically increases cytosolic calcium ion concentration in rat gonadotropes and somatotropes *Endocrinol.* 130: 211-215, 1992
10. Cardenas,H. Ordog,T.O'Byrne,K.T. Knobil,E *Single unit components of the hypothalamic multiunit electrical activity associated with the central signal generator that directs the pulsatile secretion of gonadotropic hormones.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 9630-9634, 1993
11. Carter,S.J. Laud,C.A. Smith,I. Leone,R.M. Silman,R.E. Hooper,R.J. Larson,C. Finnie,M.D. Mullen,P.E. 5-methoxytryptophol in rat pineal glands and other tissues *Prog.Brain Res.* 52:267-269, 1979.
12. Cavallo, A. Melatonin and human puberty: current perspectives. *J. Pineal. Res.* 15:115-121; 1993.
13. Chan, W. Y.; Ng, T. B. Development of pre-implantation mouse embryos under the influence of pineal indoles. *J. Neural. Transm. Gen. Sect.* 96:19-29; 1994.
14. Chan, W. Y.; Ng, T. B. Changes induced by pineal indoles in post-implantation mouse embryos. *Gen. Pharmacol.* 26:1113-1118; 1995.
15. Chan, W. Y.; Ng, T. B. Effects of pineal indoles on ovarian response to gonadotropin-induced ovulation in mice. *J. Neural. Transm. Gen. Sect.* 100:239-246; 1995.
16. Clarke, I. J.; Scott, C. J. Studies on the neuronal systems involved in the oestrogen-negative feedback effect on gonadotrophin releasing hormone neurons in the ewe. *Hum. Reprod.* 8 Suppl 2:2-6; 1993.
17. Claustrat, B.; Geoffriau, M.; Brun, J.; Chazot, G. Melatonin in humans: a biochemical marker of the circadian clock and an endogenous synchronizer *Neurophysiol. Clin.*

25:351-359; 1995.

18. Coon, S. L.; Roseboom, P. H.; Baler, R.; Weller, J. L.; Namboodiri, M. A.; Koonin, E. V.; Klein, D. C. Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis. *Science* 270:1681-1683; 1995.

19. Crowley, W. F., Jr.; Whitcomb, R. W.; Jameson, J. L.; Weiss XJ[^]; Finkelstein, J. S.; O'Dea, L. S. Neuroendocrine control of human reproduction in the male. *Recent. Prog. Horm. Res.* 47:27-62; discuss; 1991.

20. Dray, F. [Prostaglandins and reproduction. I. Physiological aspects] Prostaglandines et reproduction. I. Aspects physiologiques. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris)*. 20:7-17; 1991.

21. Dubocovich, M.L. Pharmacology and function of melatonin receptors *FASEB J.* 2: 2765-2733, 1988.

22. Dubocovich, M. L. Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends. Pharmacol. Sci.* 16:50-56; 1995.

23. Edmonds, K. E.; Rollag, M. D.; Stetson, M. H. Effects of photoperiod on pineal melatonin in the marsh rice rat (*Oryzomys palustris*). *J. Pineal. Res.* 18:148-153; 1995.

24. Exposito, I.; Mora, F.; Zisapel, N.; Oaknin, S. The modulatory effect of melatonin on the dopamine- glutamate interaction in the anterior hypothalamus during ageing. *Neuroreport.* 6:2399-2403; 1995.

25. Exposito, I.; Mora, F.; Oaknin, S. Dopamine-glutamic acid interaction in the anterior hypothalamus: modulatory effect of melatonin. *Neuroreport.* 6:661-665; 1995.

26. Fevre Montange, M. Estour, B. Abou Samra, A.B. Bajard, L. Tourniaire, J. Twenty-four

hour melatonin secretory pattern in men with idiopathic hemochromatosis. *Psychoneuroendocrinol.* 8:321-326, 1983

27. Fischer, F.E., *Fundamental Statistical Concepts* pp. 257-285, Canfield Press. San Francisco, 1973.

28. Franchi, A.M. Gimeno, M.F. Cardinali, D.P. Vacas, M.I. Melatonin, 5-methoxytryptamine and some of their analogs as cyclo-oxygenase inhibitors in rat medial basal hypothalamus *Brain Res.* 405: 384-388, 1988

29. Gan, J.; Alonso-Gomez, A. L.; Avendano, G.; Johnson, B.; Iuvone, P. M. Melatonin biosynthesis in photoreceptor-enriched chick retinal cell cultures: role of cyclic AMP in the K(+)-evoked, Ca(2+)-dependent induction of serotonin N-acetyltransferase activity. *Neurochem. Int.* 27:147-155; 1995.

30. Genazzani, A. R.; Petraglia, F. Opioid control of luteinizing hormone secretion in humans. *J. Steroid. Biochem.* 33:751-755; 1989.

31. Glass, J.D. Dolan, P.L. Melatonin acts in the brain to mediate seasonal steroid inhibition of luteinizing hormone secretion in the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*) *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 188: 375-380, 1988.

32. Goodman, G.A. and Gillman, A. *The Pharmacological Basis of Pharmacology.* 9th. ed. McGraw-Hill, New York. 1996.

33. Gorman, M. R.; Yellon, S. M. Three daily melatonin infusions alter gonadal development but not GnRH neuron number in the medial preoptic area or diagonal band of Broca in Siberian hamsters. *Neurosci. Lett.* 210:165-168; 1996.

34. Haller, E.W., Barraclough, C.A., Alterations in unit activity of hypothalamic ventromedial nuclei by stimuli which affect gonadotropic hormone secretion. *Exp. Neurol.*

29: 111-120, 1970.

35. Hardeland, R.; Balzer, I.; Poeggeler, B.; Fuhrberg, B.; Uria, H.; Behrmann, G.; Wolf, R.; Meyer, T. J.; Reiter, R. J. On the primary functions of melatonin in evolution: mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation, and scavenging of free radicals. *J. Pineal. Res.* 18:104-111; 1995.

36. Herman-Bonert, V. S.; Braunstein, G. D. Gonadotropin secretory abnormalities. *Endocrinol. Metab. Clin North. Am.* 20:519-538; 1991.

37. Hofman, M. A.; Swaab, D. F. Sexual dimorphism of the human brain: myth and reality. *Exp. Clin Endocrinol.* 98:161-170; 1991.

38. Iigo, M.; Kobayashi, M.; Ohtani-Kaneko, R.; Hara, M.; Hattori, A.; Suzuki, T.; Aida, K. Characteristics, day-night changes, subcellular distribution and localization of melatonin binding sites in the goldfish brain. *Brain Res.* 644:213-220; 1994.

39. Irianni, F.; Hodgen, G. D. Mechanism of ovulation. *Endocrinol. Metab. Clin North. Am.* 21:19-38; 1992.

40. Ito, K.; Tanaka, T.; Mori, Y. Opioid peptidergic control of gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the ovariectomized goat. *Neuroendocrinology.* 57:634-639; 1993.

41. Kandel, E. R. and Schwartz, J.H. *Principles of Neural Sciences.* Elsevier, New York. 3rd. Ed. 1995.

42. Karsch, F. J.; Moenter, S. M. Neuroendocrine regulation of seasonal breeding cycles in the ewe. *J. Exp. Zool. Suppl.* 4:17-21; 1990.

43. Kennaway, D. J.; Rowe, S. A. Melatonin binding sites and their role in seasonal

reproduction. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 49:423-435; 1995.

44. Klein, D. C; Moore R. Y. Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-o-methyltransferase: control by the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 174(2); 245-262. 1979

45. Konakchieva, R.; Kyurkchiev, S.; Kehayov, I.; Taushanova, P. Selective effect of methoxyindoles on the lymphocyte proliferation and melatonin binding to activated human lymphoid cells. *Journal. of Neuroimmunology*; 63. (2). p125-132. 1995.

46. Konakchieva, R.; Mitev, Y.; Almeida, O. F.; Patchev, V. K. Chronic melatonin treatment counteracts glucocorticoid- induced dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Neuroendocrinology* 67:171-180; 1998.

47. König, J.F.R. and Klippel, R.A. *The Rat Brain. A stereotaxic atlas.* The Williams and Wilkins Co. Baltimore, 1963.

48. Korf, H. W. The pineal organ as a component of the biological clock. Phylogenetic and ontogenetic considerations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 719:13-42; 1994.

49. Kow, L. M.; Johnson, A. E.; Ogawa, S.; Pfaff, D. W. Electrophysiological actions of oxytocin on hypothalamic neurons in vitro: neuropharmacological characterization and effects of ovarian steroids. *Neuroendocrinology.* 54:526-535; 1991.

50. Lawson, N.O. Wee, B.E. Blask, D.E. Castles, C.G. Spriggs, L.L. Hill, S.M. Melatonin decreases estrogen receptor expression in the medial preoptic area of inbred (LSH/SsLak) golden hamsters *Biol.Reprod.* 47: 1082-1090. 1992.

51. Lincoln, G. A.; Clarke, I. J. Photoperiodically-induced cycles in the secretion of prolactin in hypothalamo-pituitary disconnected rams: evidence for translation of the melatonin signal in the pituitary gland. *J. Neuroendocrinol.* 6:251-260; 1994.

52. Malpoux, B.; Daveau, A.; Maurice, F.; Locatelli, A.; Thiery, J. C. Evidence that melatonin binding sites in the pars tuberalis do not mediate the photoperiodic actions of melatonin on LH and prolactin secretion in ewes. *J. Reprod. Fertil.* 101:625-632; 1994.
53. Malpoux, B.; Viguie, C.; Skinner, D. C.; Thiery, J. C.; Chemineau, P. Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. *Brain Res. Bull.* 44:431-438; 1997.
54. Manickam, P.; Joy, K. P. Changes in hypothalamic catecholamine levels in relation to season, ovariectomy, and 17 beta-estradiol replacement in the catfish, *Clarias batrachus* (L.). *Gen. Comp. Endocrinol.* 80:167-174; 1990.
55. Maywood, E. S.; Hastings, M. H. Lesions of the idiomelatonin-binding sites of the mediobasal hypothalamus spare the lactotropic, but block the gonadotropic response of male Syrian hamsters to short photoperiod and to melatonin. *Endocrinology* 136:144-153; 1995.
56. Meissl, H.; Yanez, J.; Ekstrom, P.; Grossmann, E. Benzodiazepines influence melatonin secretion of the pineal organ of the trout in vitro. *J. Pineal. Res.* 17:69-78; 1994.
57. Melrose, P. A.; Pickel, C.; Cheramie, H. S.; Henk, W. G.; Littlefield-XChaubaud, M. A.; French, D. D. Distribution and morphology of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the basal forebrain of ponies. *J. Comp. Neurol.* 339:269-287; 1994.
58. Menaker, M.; Moreira, L. F.; Tosini, G. Evolution of circadian organization in vertebrates. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30:305-313; 1997.
59. Miguez, J.M. Martin, F.J. Aldegunde, M. Effects of pinealectomy and melatonin treatments on serotonin uptake and release from synaptosomes of rat hypothalamic

regions. *Neurochem. Res.* 20: 1127-1133, 1995.

60. Moguilevsky, J. A.; Arias, P.; Szwarcfarb, B.; Carbone, S.; RondinaXD, Sexual maturation modifies the catecholaminergic control of gonadotrophin secretion and the effect of ovarian hormones on hypothalamic neurotransmitters in female rats. *Neuroendocrinology* 52:393-398; 1990.

61. Morgan, I.G. Boelen, M.K. A retinal dark-light switch: A review of the evidence *Visual Neuroscience*; 13: 399-409. 1996.

62. Morgan, P. J.; Barrett, P.; Howell, H. E.; Helliwell, R. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem. Int.* 24:101-146; 1994.

63. Motta, A. B.; Franchi, A. M.; Gimeno, A. L.; Gimeno, M. A. Influences of oxytocin on the synthesis of prostaglandins by uterus from rats in different stages of the estrous cycle. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty. Acids* 51:133-139; 1994.

64. Nakazawa, K. Marubayashi, U. McCann, S.M. Mediation of the short-loop negative feedback of luteinizing hormone (LH) on LH-releasing hormone release by melatonin-induced inhibition of LH release from the pars tuberalis *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 7576-7579, 1991.

65. Ntoumi, F.; Martinet, L.; Mondain-Monval, M. Effects of melatonin treatment on the gonadotropin-releasing hormone neuronal system and on gonadotropin secretion in male mink, *Mustela vison*, in the presence or absence of testosterone feedback. *J. Pineal. Res.* 16:18-25; 1994.

66. Olcese, J. *The mammalian pineal gland and reproduction. Controversies and strategies for future research.* *Adv. Exp. Med. Biol.* 377:1-14; 1995.

67. Perez Clariget, R.; Forsberg, M.; Rodriguez-Martinez, H. Seasonal variation in live

weight, testes size, testosterone, LH secretion, melatonin and thyroxine in Merino and Corriedale rams in a subtropical climate. *Acta Vet. Scand.* 39:35-47; 1998.

68. Petterborg, L.J. Photoperiodic regulation of reproduction in the white-footed mouse. Neuroendocrine aspects. *Mo.Med.* 80: 313-316, 1983.

69. Pfaff, D.W. Patterns of steroid hormone effects on electrical and molecular events in hypothalamic neurons *Mol. Neurobiol.* 3:135-154, 1989

70. Poeggeler, B.; Reiter, R. J.; Hardeland, R.; Tan, D. X.; Barlowwalden, L. R. Melatonin and structurally-related, endogenous indoles act as potent electron donors and radical scavengers in vitro. *Redox. Report;* 2. (3). p179-184. 1996.

71. Rasmussen, H. The calcium Messenger system. *New Eng. J. Med.* 314:1094-1099, 1986

72. Reiter, R. J. Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: antioxidant protection and neuroendocrine regulation. *Front. Neuroendocrinol.* 16:383-415; 1995.

73. Reiter, R. J. Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals. *European. Journal. of. Endocrinology;* 134. (4). p412-420. 1996.

74. Reppert, S. M.; Weaver, D. R.; Ebisawa, T.; Mahle, C. D.; Kolakowski, L. F., Jr. Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary. *FEBS Lett.* 386:219-224; 1996.

75. Reyes-Vázquez, C. and Dafny, N.: Does naloxone have functional significant activity on medial thalamic neurons ?. Microiontophoretical study. *Life Sci.* 32: 1443-1448, 1983.

76. Rivest, R.W. Aubert, M.L. Lang, U. Sizonenko, P.C. Puberty in the rat: modulation by melatonin and light *J. Neural. Transm. Suppl.* 21: 81-108, 1986.

77. Robinson, J. E.; Kaynard, A. H.; Karsch, F. J. Does melatonin alter pituitary responsiveness to gonadotropin-releasing hormone in the ewe? *Neuroendocrinol.* 43:635-640, 1986
78. Rossi, G. L.; Bestetti, G. E.; Reymond, M. J. Tuberoinfundibular dopaminergic neurons and lactotropes in young and old female rats. *Neurobiol. Aging.* 13:275-281; 1992.
79. Sarkar, S.; Sarkar, N. K.; Bhattacharyya, S.; Das, P. Melatonin action on thyroid activity in the soft-shelled turtle, *Lissemys punctata punctata*. *Folia. Biol. (Krakow).* 45:109-112; 1997.
80. Schillo, K. K. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. *J. Anim. Sci.* 70:1271-1282; 1992.
81. Schumacher, M.; Coirini, H.; McEwen, B. S. Regulation of high-affinity GABA_A receptors in specific brain regions by ovarian hormones. *Neuroendocrinology.* 50:315-320; 1989.
82. Shedpure, M.; Pati, A. K. The pineal gland: structural and functional diversity. *Indian J. Exp. Biol.* 33:625-640; 1995.
83. Silverman, A. J., The gonadotropin releasing hormone (GnRH) neural system; Immunocytochemistry. In: *The physiology of reproduction*. Knobil, E. and J. Neill (eds). Raven Press, LTD. New York, 1988.
84. Simerly, R. B. Hormonal control of neuropeptide gene expression in sexually dimorphic olfactory pathways. *Trends. Neurosci.* 13:104-110; 1990.
85. Sizonenko, P. C.; Lang, U.; Rivest, R. W.; Aubert, M. L. The pineal and pubertal development. *Ciba. Found. Symp.* 117: 208-230, 1985.

86. Sotowska-Brochocka, J.; Martynska, L.; Licht, P. Dopaminergic inhibition of gonadotropic release in hibernating frogs, *Rana temporaria*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 93:192-196; 1994.
87. South, S. A.; Yankov, V. I.; Evans, W. S. Normal reproductive neuroendocrinology in the female. *Endocrinol. Metab. Clin North. Am.* 22:1-28; 1993.
88. Tetel, M. J.; Getzinger, M. J.; Blaustein, J. D. Estradiol and progesterone influence the response of ventromedial hypothalamic neurons to tactile stimuli associated with female reproduction. *Brain. Res.* 646:267-272; 1994.
89. Thiery, J.C. Martin, G.B. Neurophysiological control of the secretion of gonadotrophin-releasing hormone and luteinizing hormone in the sheep--a review *Reprod.Fertil.Dev.* 3:137-173, 1991
90. Tortonese, D. J.; Lincoln, G. A. Effects of melatonin in the mediobasal hypothalamus on the secretion of gonadotrophins in sheep: role of dopaminergic pathways. *J. Endocrinol.* 146:543-552; 1995.
91. Trentini, G.P. De Gaetani, C.F. Criscuolo, M. Balemans, M.G. Vaessen, L.M. Smith, I. The effect of melatonin and other indole derivatives in maintaining ovulation in rats kept in continuous light and the influence of these indoles on HIOMT activity in the pineal gland *J. Neural. Transm* 53: 305-314, 1982
92. van den Pol, A. N.; Trombley, P. Q. Glutamate neurons in hypothalamus regulate excitatory transmission. *J. Neurosci.* 13:2829-2836; 1993.
93. Vivien Roels, B. Pevet, P. Masson Pevet, M. Canguilhem, B. Seasonal variations in the daily rhythm of pineal gland and/or circulating melatonin and 5-methoxytryptophol concentrations in the European hamster, *Cricetus cricetus* *Gen. Comp. Endocrinol.* 86:

239-247, 1992.

94. Wan, Q.; Pang, S. F. 2-[125I]iodomelatonin binding sites in the quail liver: characterization and the effect of guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate). *Biol. Signals.* 4:24-31; 1995.
95. Warren, W. S.; Cassone, V. M. The pineal gland: photoreception and coupling of behavioral, metabolic, and cardiovascular circadian outputs. *J. Biol. Rhythms.* 10:64-79; 1995.
96. Weaver, D.R. Rivkees, S.A. Reppert, S.M. Localization and characterization of melatonin receptors in rodent brain by in vitro autoradiography *J. Neurosci.* 9: 2581-2590, 1989
97. Weaver, D.R. Stehle, J.H. Stopa, E.G. Reppert, S.M. Melatonin receptors in human hypothalamus and pituitary: implications for circadian and reproductive responses to melatonin *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76: 295-301, 1993).
98. Webb, S. M.; Puig-Domingo, M. Role of melatonin in health and disease. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 42:221-234; 1995.
99. Wittenderby, P. A.; Dubocovich, M. L. Characterization and regulation of the human ML(1A) melatonin receptor stably expressed in Chinese hamster ovary cells. *Molecular. Pharmacology.* 50. (1). p166-174. 1996.
100. Wong, M.; Moss, R. L. Modulation of single-unit activity in the rat medial amygdala by neurotransmitters, estrogen priming, and synaptic inputs from the hypothalamus and midbrain. *Synapse.* 10:94-102; 1992.
101. Wright, M. L.; Pikula, A.; Babski, A. M.; Labieniec, K. E.; Wolan, R. B. Effect of melatonin on the response of the thyroid to thyrotropin stimulation in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.* 108:298-305; 1997.

102. Xu, F.; Li, J. C.; Ma, K. C.; Wang, M. Effects of melatonin on hypothalamic gamma-aminobutyric acid, aspartic acid, glutamic acid, beta-endorphin and serotonin levels in male mice. *Biol. Signals*. 4:225-231; 1995.
103. Yie, S. M.; Niles, L. P.; Younglai, E. V. Melatonin receptors on human granulosa cell membranes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80:1747-1749; 1995.
104. Ying, S. W.; Rusak, B.; Delagrange, P.; Mocaer, E.; Renard,.; Guardiola-Lemaitre, B. Melatonin analogues as agonists and antagonists in the circadian system and other brain areas. *Eur. J. Pharmacol.* 296:33-42; 1996.