



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**El Catabolismo de la Melatonina
Exógena en Humanos**

**T E S I S
Q U I M I C O**

ARMIDA BAEZ SALDAÑA



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.

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE:

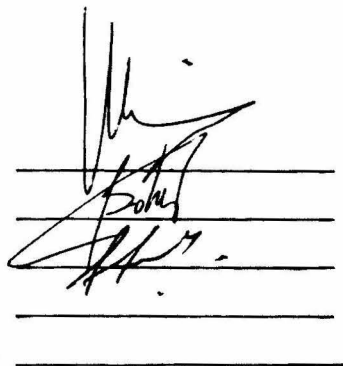
PRESIDENTE: Prof. José I. Bolívar Goyanes

VOCAL: Prof. Francisco Bolívar Zapata

SECRETARIO: Prof. Fernando Antón Tay

1er. SUPLENTE: Prof. Edmundo Chávez C.

2o. SUPLENTE: Prof. J. de Jesús Manrique O.



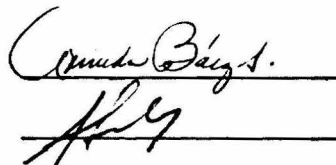
Handwritten signatures of the jury members over horizontal lines.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

SUSTENTANTE: Armida Báez Saldaña

ASESOR DEL TEMA: Dr. Fernando Antón Tay



Handwritten signatures of the presenter and advisor over horizontal lines.

Tesis
1975
FECHA
PROC. H.T. 34



QUIMICA

A ARTURO CON TODO MI AMOR

A MIS PADRES
CON TODO CARIÑO

A MIS HERMANOS:
LAURA, ANA MARIA,
ALEJANDRA RENATA
Y FRANCISCO JOSE

A LAS FAMILIAS
ROSALES GONZALEZ
Y BAEZ NARRO

A MIS AMIGOS

AL DR. ENRIQUE TOVAR
ZAMORA POR SU VALIOSA
Y DESINTERESADA AYUDA

C O N T E N I D O

	Páginas
I.- Introducción	1
II.- Función de la Glándula Pineal	4
III.- Biosíntesis de Melatonina	9
IV.- Distribución Tisular de Melatonina Circulante	14
V.- Metabolismo de Melatonina	18
VI.- Ritmos Circadianos de la Glándula Pineal	22
VII.- Objetivos	27
VIII.- Material y Métodos	29
IX.- Resultados	40
X.- Comentarios	46
XI.- Conclusiones	56
XII.- Bibliografía	57

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

En los últimos años la evidencia de que las sustancias producidas por la glándula Pineal de los mamíferos modifican la actividad de órganos blanco distantes se ha acumulado de manera impresionante; sin embargo, aún queda por demostrar si las variaciones espontáneas en la secreción de la pineal tienen un papel fisiológico en la actividad de éstos órganos.

En los mamíferos, la administración de una de éstas subtancias, la melatonina, produce diversos efectos; por ejemplo, inhibe la velocidad de crecimiento del pelo en ratones (41), inhibe la función del tiroides en las ratas (captación de I^{131} y crecimiento de las células tiroideas)(18, 122); en roedores disminuye la velocidad de contracción de músculo liso (tanto espontáneamente como por inducción con serotonina (36,88,90, 91); interfiere con la función de las gónadas en ratas, ratones y hámsters (1,47,71,75,125); disminuye el contenido de hormona

luteinizante en la hipófisis (1); produce sueño en gatos, ratas y ratones (16, 33, 39, 72). Con respecto a los efectos inhibidores de las gónadas, hay contradicciones en la literatura, ya que en algunos casos la pinealectomía produce efectos imperceptibles en el sistema de la reproducción (54). Actualmente sabemos que éstas contradicciones se deben a que las respuestas a la presencia o a la ausencia de los compuestos de la pineal en los animales de experimentación varían notablemente con la edad, el sexo, la especie y de manera muy importante con el fotoperíodo (93, 94, 103).

Para integrar conceptualmente a la pineal con el resto del Sistema Endócrino, se tuvo que aguardar al desarrollo de lo que ahora son conceptos básicos en neuroendocrinología, entre ellos el más importante es el de "Transductor Neuroendócrino", el cuál en el caso de la pineal implica la liberación de compuestos químicos provocada por una señal nerviosa (120, 126). Esta última, es la resultante de la señal luminosa recibida en la retina y transmitida hasta la pineal por las terminaciones nerviosas simpáticas del ganglio cervical superior. Esta información es convertida por la glándula en una señal endócrina (química) como la melatonina y otros metoxiindoles. Estos compuestos una vez liberados, son acarreados hasta los sitios de acción (quizás principalmente el cerebro) por la sangre o el líquido cefalorraquídeo.

En la actualidad se conoce con exactitud la biosíntesis de la melatonina en la pineal de la rata y de los factores que la regulan, así como el metabolismo cuando se administra por

vía intravenosa o intraperitoneal. Sin embargo, y especialmente en los mamíferos superiores como el hombre, poco o casi nada se sabe acerca del mecanismo por el cual éstas hormonas ejercen los múltiples y variados efectos endócrinos y de su papel fisiológico. Esto último se debe, entre otras cosas, a la falta de conocimiento de las vías catabólicas de la melatonina endógena que permita determinar la actividad funcional del órgano mediante la valoración de sus productos o sus catabolitos presentes en los líquidos biológicos.

F U N C I O N D E L A G L A N D U L A P I N E A L

Al tejido que transforma una señal nerviosa a una señal hormonal se le conoce como "Transductor Neuroendócrino" (123). Las células de éstos tejidos responden a señales de sustancias neurotransmisoras típicas (acetil colina y norepinefrina), las cuales llegan a ellas por difusión en los espacios sinápticos o en los botones nerviosos de la vecindad; la respuesta al mensaje así recibido por éste tipo de células es a su vez, una señal con características de hormona.

Las células parenquimatosas del órgano pineal de los mamíferos se consideran como células transductoras neuroendócrinas porque:

1) está demostrado anatómicamente que reciben innervaciones simpáticas de tipo noradrenérgico (2); y

2) secretan la hormona melatonina en las condiciones fisiológicas apropiadas (126).

EFFECTOS DE LA ADMINISTRACION DE MELATONINA Y ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE LA GLANDULA PINEAL

a) LA GLANDULA PINEAL Y EL CONTROL DE LAS HORMONAS HIPOFISIARIAS.- El potencial antigonadotrófico de la pineal se estimula en los animales de experimentación restringiendo su exposición a la luz. Así, los hámsters sexualmente maduros muestran severos cambios atróficos de los testículos cuando se someten de cuatro a seis semanas a una hora de luz por día. Sin embargo, los hámsters pinealectomizados no sufren regresión en sus órganos reproductores bajo las mismas condiciones luminosas (40). Por otra parte, en las ratas sexualmente inmaduras se retrasa la aparición de la pubertad cuando se les priva de luz; siempre y cuando no hayan sido pinealectomizadas (92).

También, se ha observado que la pineal tiene efectos sobre las gonadotrofinas. La eliminación de la glándula pineal en ratas macho jóvenes adultas, provoca un aumento en el contenido de hormona luteinizante (HL) en la hipófisis (1, 33), casi equivalente al que se obtiene después de la castración (93).

La administración intravenosa de melatonina no disminuye la concentración de HL en el suero. En cambio, la administración intraventricular sí ocasiona que los niveles de HL en suero se reduzcan transitoriamente a valores casi indeterminables. Pare-

ce ser, que éste efecto se media por una inhibición de la liberación del factor liberante de la HL (46, 93).

En la rata, después de la ovariectomía unilateral, hay un aumento transitorio en el contenido sérico de hormona estimulante del folículo (HEF) y un crecimiento compensatorio del ovario. La administración de melatonina retarda el grado de hipertrofia compensadora del ovario y previene la elevación asociada de la HEF en el suero (97, 109, 114). La inyección intraventricular de pequeñas cantidades de melatonina disminuye en 50% la concentración de HEF en la sangre arterial periférica (46). De los resultados de éste experimento se infirió que la melatonina regula la secreción del factor liberante hipotalámico de la HEF (46). Así pues, el mecanismo por el cuál el órgano pineal modifica la secreción de las hormonas hipofisarias es a través del Sistema Nervioso Central (SNC), ya que actúa directamente sobre las neuronas liberantes de los factores (45, 96).

Hasta la fecha no ha sido identificada con exactitud la hormona antigonadotrófica del órgano pineal, aunque está bien establecido que la melatonina posee dicha capacidad (95, 96, 110, 113, 126) y que polipéptidos de origen pineal de bajo peso molecular así como extractos de pineal libres de melatonina son también potentes inhibidores de la reproducción; por lo cual debe considerarse la presencia de otras hormonas pineales en potencia (19, 20, 76).

Las interrelaciones prolactina-pineal no se han estudiado mucho hasta ahora. Parece ser que la melatonina adminis-

trada a los ventrículos cerebrales produce una disminución en la descarga del factor inhibidor de prolactina y por lo tanto un aumento en la cantidad de prolactina en sangre periférica (46).

Por otra parte, la pinealectomía en roedores eleva el peso del tiroides y la secreción de hormonas tiroideas (41, 42). La administración de melatonina bloquea la hipertrofia tiroidea subsiguiente a la pinealectomía y disminuye el peso de las células tiroideas, la captación de I^{131} y la secreción de hormona (25, 31, 41, 42, 77).

La pinealectomía también aumenta el contenido de hormona estimulante del melanocito (HEM) en la hipófisis de la rata y bloquea la caída de los niveles normales de HEM en la hipófisis, producida al colocar al animal de experimentación en un ambiente de obscuridad (52). A su vez, la administración de melatonina baja los niveles hipofisarios de HEM aparentemente por la liberación de la hormona de la glándula (53).

Además de los efectos antes mencionados, la pineal tiene una función reguladora en la secreción de otras hormonas tróficas de la adenohipófisis (93).

b) LA GLANDULA PINEAL Y SU INTERRELACION CON EL CEREBRO.- Parece ser, que una de las principales funciones de la pineal es modular la actividad nerviosa (100, 101). La actividad electroencefalográfica (EEG) de diferentes regiones del cerebro de gato se modifica después de la administración intravenosa de extractos crudos de pineal de res (101). De igual forma, éstos

extractos crudos suprimen las convulsiones producidas por estimulación eléctrica de la corteza (100). La pinealectomía modifica permanentemente la actividad electroencefalográfica en conejos y ratas (21, 81) y la administración de extractos crudos de pineal modifica de manera importante tanto al EEG como a otras funciones cerebrales en conejos, ratas y humanos (21, 72, 81).

Recientemente, se ha señalado que la melatonina es útil para combatir los síntomas de epilepsia y de la enfermedad de Parkinson (5, 6). En los epilépticos, el tratamiento agudo con melatonina produce una mejoría clínica muy marcada, lo mismo que el tratamiento subagudo y crónico en los parkinsonianos. El mecanismo por el cual la melatonina produce éstos efectos es desconocido, sin embargo, se cree que puede deberse a la capacidad de la melatonina para alterar el balance de algunos de los neurotransmisores del SNC (3, 4). La administración intraperitoneal de melatonina a animales de experimentación induce el aumento de la síntesis de ácido gama amino butírico (GABA) y de 5-hidroxitriptamina ó serotonina (5HT). Se ha sugerido que éstos cambios pueden estar relacionados con la síntesis "de novo" de la cinasa del piridoxal. Esta vitamina forma parte del grupo prostético de las descarboxilasas que forman a dichos neurotransmisores; y también se ve estimulada su actividad por la administración de melatonina.

B I O S I N T E S I S D E M E L A T O N I N A

La biosíntesis de melatonina como la de todos los indoles de la pineal se inicia con la captación dentro de los pinealocitos del triptofano circulante. La fracción más considerable del aminoácido se utiliza para la síntesis de proteínas de la pineal (130). Para la biosíntesis de melatonina, el triptofano primero es hidroxilado en la posición 5 del anillo indólico por la acción de la triptofano hidroxilasa (67). El 5-hidroxitriptofano producido es rápidamente descarboxilado por la descarboxilasa de l-aminoácidos aromáticos y forma la 5HT (Fig. 1) (107).

La 5HT de la pineal sigue, por una parte, la ruta catabólica común a otros tejidos; y por otra, la formación de melatonina. En ésta última vía, es primero acetilada en el nitrógeno de la etilamina por la acción de la enzima N-acetiltransferasa (122) para formar la N-acetilserotonina (14, 118),

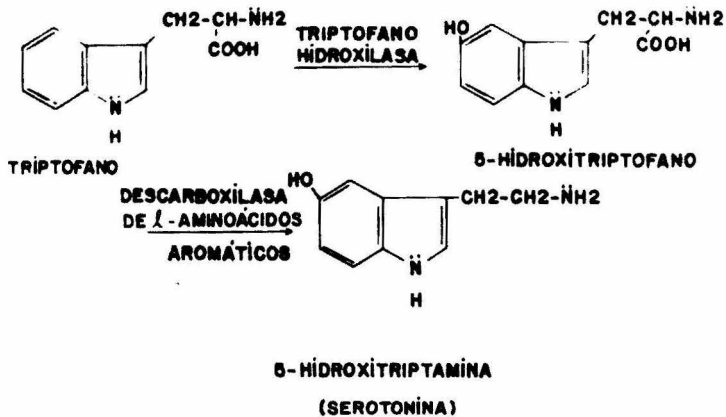


FIG 1.- BIOSÍNTESIS DE SEROTONINA EN LA PINEAL

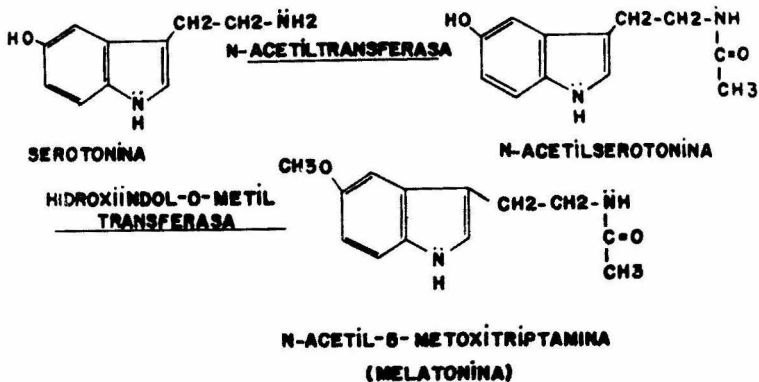


FIG 2.- BIOSÍNTESIS DE MELATONINA EN LA PINEAL

la cual es a su vez O-metilada por efecto de la enzima hidroxindol-O-metil transferasa (HIOMT) (Fig. 2). Esta enzima, está presente en el citoplasma de las células parenquimatosas de la pineal y transfiere el grupo metilo activo de la S-adenosilmetionina al grupo hidroxilo de la posición 5 del núcleo indólico formándose N-acetil-5-metoxitriptamina o melatonina (14).

Una de las principales consecuencias fisiológicas de la acción de la HIOMT es que al convertir indolaminas como la serotonina, que no puede cruzar la barrera hematoencefálica, a compuestos metoxilados como la melatonina, éstos tienen un fácil acceso al cerebro (12).

En la mayoría de los mamíferos examinados hasta la fecha la enzima HIOMT es característica de la pineal (15). Solamente en la retina de la rata se ha encontrado actividad de esta enzima además de la pineal (24).

REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE MELATONINA.- Las señales fisiológicas que estimulan la síntesis de melatonina en la pineal, son los impulsos nerviosos que se generan en los receptores de la retina para la luz. Del ojo, la información viaja por una vía multisináptica que finaliza en las terminaciones simpáticas de la pineal. Estas provienen del ganglio cervical superior (74, 119, 123). Está demostrado que el neurotransmisor liberado por los nervios simpáticos de la pineal es la norepinefrina (NE) y que la actividad nerviosa simpática actúa por medio de ésta catecolamina para estimular la función metabólica

pineal (120).

PAPEL DEL AMP-CICLICO EN LA BIOSINTESIS DE MELATONINA.-

La NE tiene cuando menos dos efectos sobre el receptor de las células pineales:

- a) Aumenta la captación celular de triptofano y tal vez de otras sustancias; y
- b) Estimula a la enzima membranal, adenil ciclasa, con el subsecuente aumento en la producción de 3',5' adenósín monofosfato cíclico (AMP_c) (99, 104, 116, 130)

Este nucleótido actúa a su vez como un "segundo mensajero" para mediar los efectos intracelulares de la catecolamina; como son la estimulación de la síntesis de serotonina y de melatonina (Fig. 3).

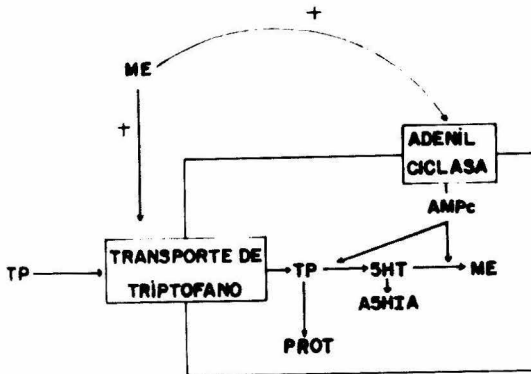


FIG 3.- EFECTO DE LA NOREPINEFRINA EN EL METABOLISMO DEL TRIPTOFANO EN LA PINEAL.

El dibutiril-AMP_c (DAMP) es un análogo del AMP_c que se usa para reproducir los efectos del mismo AMP_c. Este compuesto estimula la síntesis de melatonina y serotonina en pineales de ratas en cultivo. Sin embargo, éste nucleótido a diferencia de la NE no eleva la acumulación de triptofano en la glándula pineal. Por lo tanto, el paso metabólico en el cuál el DAMP y la NE estimulan la síntesis de melatonina es al nivel de la N-acetiltransferasa, probablemente favoreciendo la síntesis "de novo" de la enzima (104, 117, 130).

Debido a que la actividad de la HIOMT no sufre cambios notables en las glándulas estimuladas con NE o DAMP y como tampoco se ha encontrado ningún efecto directo de ninguna de éstas sustancias sobre la actividad de la HIOMT en la glándula pineal es válido concluir que la NE no regula la producción de melatonina por medio de la estimulación de la HIOMT (55,56,57).

En resumen, el mecanismo propuesto es como sigue: la estimulación de la adenil ciclase por la NE ocasiona un aumento en la concentración intracelular del AMP_c (115, 116, 117). Este nucleótido produce un aumento en la actividad de la N-acetiltransferasa dando lugar a una mayor síntesis de N-acetilserotonina con el consiguiente aumento en la concentración de éste compuesto en la célula (56). Esto da por resultado la formación enzimática de melatonina por simple acción de masas (59).

DISTRIBUCION TISULAR DE LA MELATONINA CIRCULANTE

En la Fig. 4 se ilustra la curva de desaparición que sigue la melatonina en el ratón entero (incluyendo excremento) después de la administración endovenosa de melatonina radiactiva. La curva señala cuando menos dos vidas medias; en los primeros 10 minutos hay una rápida desaparición de la melatonina: la vida media es de dos minutos. Al cabo de 40 minutos, la velocidad de desaparición es mucho más lenta con una vida media correspondiente a 35 minutos (63).

En la Tabla I están resumidos los datos reportados en la literatura sobre la disposición fisiológica de la hormona en tejidos de rata y de gato después de administrarla endovenosamente (63, 65, 128). Después de un minuto la hormona se encuentra en todos los tejidos incluyendo el cerebro; por lo que se infie-

re que, a diferencia de la serotonina, su acceso al SNC no está impedido por la barrera hematoencefálica. El hígado es el tejido que capta más melatonina, pero así mismo es el que más rápido la metaboliza (63, 65). 60 minutos después de administrada la melatonina, su concentración con relación a la del plasma es como sigue: 40 veces en la pineal; 10 veces en los ovarios y en el tejido iris-coroide; y en los tejidos endócrinos así como los nervios periféricos y la cadena simpática, de 3 a 5 veces (128). El tejido adiposo mostró la menor concentración de melatonina, lo que indica que la capacidad del ovario, la pineal y las adrenales para concentrar a la hormona radiactiva no está relacionado con su contenido relativamente alto de lípidos. El alto nivel de melatonina en la pineal puede deberse ya sea a un mecanismo de concentración específico, o bien, a la mezcla del trazador con la poza de melatonina endógena (128).

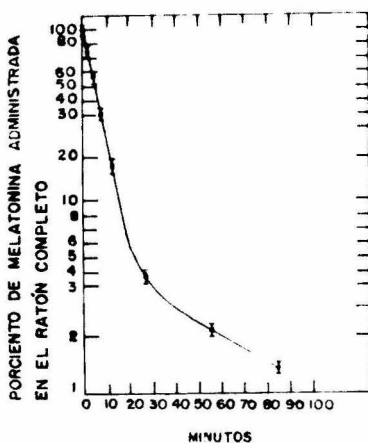


FIG 4 - DESAPARICIÓN DE MELATONINA-ACETIL-H³ EN RATÓN.

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
Adrenales	59.75	67.17	12.20	-----	-----	-----	-----
Bazo	67.89	30.90	5.90	30.0	12.8	3.0	1.03
Cadena simpática	----	----	20.1	-----	----	-----	-----
Cerebro	67.41	61.90	3.8	20.0	6.4	3.0	1.50
Corazón	64.01	27.81	4.5	60.0	16.0	2.0	0.5
Grasa mesentérica	73.09	34.71	----	----	----	-----	-----
Hígado	46.35	11.62	8.6	250.0	801.0	20.0	40.5
Intestino delgado	73.99	20.31	----	----	----	-----	----
Iris-coroide	----	-----	49.9	----	-----	-----	-----
Nervios periféricos	----	----	17.9	----	----	-----	-----
Ovario	----	----	45.5	----	----	-----	-----
Páncreas	----	----	7.2	----	----	-----	-----
Piel	58.62	19.48	4.1	----	----	-----	-----
Pineal	----	-----	202.3	----	----	-----	-----
Hipófisis	----	-----	23.4	----	----	-----	-----
Plasma	49.5	21.29	4.9	----	----	-----	-----
Pulmón	67.89	17.26	----	53.0	21.7	2.0	1.0
Riñón	-----	-----	10.5	220.0	153.0	14.0	10.0
Sangre	65.31	5.27	----	84.0	534.0	26.0	163.0
Tejido adiposo	-----	-----	1.9	----	----	-----	-----
Testículo	-----	-----	15.0	----	----	-----	-----
Tiroide	-----	-----	14.0	----	-----	-----	-----
Utero	-----	-----	10.0	----	-----	-----	-----

Tabla I .- (1) % de melatonina por gramo de tejido encontrada 1' después de administrar intravenosamente (IV) 401 m μ C de melatonina-acetilo-3H (63). (2) % de melatonina por gramo de tejido encontrada 30' después de administrar IV 802 m μ C de melatonina-3H. (128). (4) Act. Esp. de melatonina en m μ C/g 30' después de administrar intraperitonealmente (IP) 5 mg de melatonina- β 14C con una actividad específica de 989 μ C/g (63). (5) m μ C de melatonina encontrados después de 30' de haber administrado IP 4.945 μ C de melatonina- β 14C (63). (6) Act. Esp. de melatonina en m μ C/g 3 hs. después de administrar IP 4.945 μ C de melatonina- β 14C (63). (7) m μ C de melatonina encontrados 3 hs. después de haber administrado por vía IP 4.945 μ C de melatonina- β 14C (63).

La captación regional de melatonina en el cerebro varía cuantitativamente con la ruta de administración. Después de la administración de melatonina ya sea intraventricularmente o por vía endovenosa, el compuesto se encuentra concentrado selectivamente en el hipotálamo y en el tallo cerebral (Tabla II). Debido a su gran peso, la corteza cerebral retiene el porcentaje más alto de melatonina que cualquier otra región del cerebro, pero la concentración del indol por unidad de peso es la menor (8).

El porcentaje de la dosis de melatonina administrada retenido en el cerebro total, corteza y mesencéfalo es 100 veces mayor después de la inyección intraventricular que después de la inyección intravenosa.

DISTRIBUCION REGIONAL DE MELATONINA-H³ EN CEREBRO DE RATA

Región	Peso (mg)	Concentración de melatonina-H ³ ($\mu\mu\text{Ci/g}$)	
		Ruta de administración	
		Intra- ventricular	Intra- venosa
Cerebro completo	1786 \pm 40	2034 \pm 511	66 \pm 12
Corteza	1092 \pm 30	708 \pm 168	55 \pm 7
Mesencéfalo	260 \pm 20	1814 \pm 293	137 \pm 38
Bulbo raquídeo- protuberancia	264 \pm 20	1199 \pm 150	198 \pm 94
Hipotálamo	80 \pm 13	2300 \pm 511	309 \pm 64
Cerebelo	284 \pm 12	1284 \pm 128	128 \pm 77

Tabla II (8)

M E T A B O L I S M O D E M E L A T O N I N A

La rata excreta en la orina de las 24 horas siguientes a la administración intravenosa o intraperitoneal de melatonina- H^3 , del 70 al 80% de la radiactividad y en las heces el 20% restante (62, 63, 65, 66, 112).

Casi la totalidad de la melatonina- H^3 administrada es hidroxilada en la posición 6 del anillo indólico y posteriormente conjugada para su excreción; solo el 10% de la radiactividad excretada en la orina es 6-hidroximelatonina - (6OHM) libre (65, 66).

La 6OHM de la orina es fácilmente extraíble a pH 2 con acetato de etilo. La cromatografía en papel de la orina en isopropanol- NH_3 5% (2:1) presenta tres picos de radiactividad (Fig. 5), los cuales corresponden al conjugado con glucoronato de la 6OHM (5.5%; R_f 0.22), al conjugado con sulfa-

to (72%; R_f 0.52) y a un tercer metabolito no identificado (12.5%; R_f 0.80) que no reacciona con el reactivo de Ehrlich y que por consiguiente sufrió una sustitución en la posición 2 del anillo indólico o la ruptura del mismo (Fig. 6) (62, 63, 65, 66, 112).

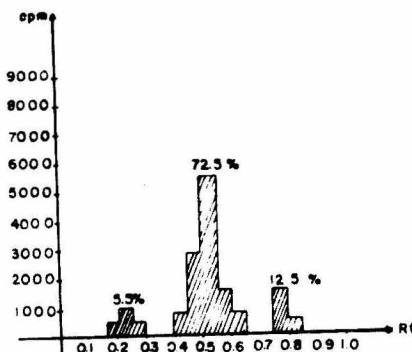


FIG 5. CROMATOGRAMA DE LOS METABOLITOS RADIOACTIVOS DE LA MELATONINA-ACETIL- H^3 EN ORINA. ARRIBA DE LAS BARRAS ESTÁN LOS PORCENTAJES DE RADIOACTIVIDAD EXCRETADOS DE LOS DIFERENTES METABOLITOS.

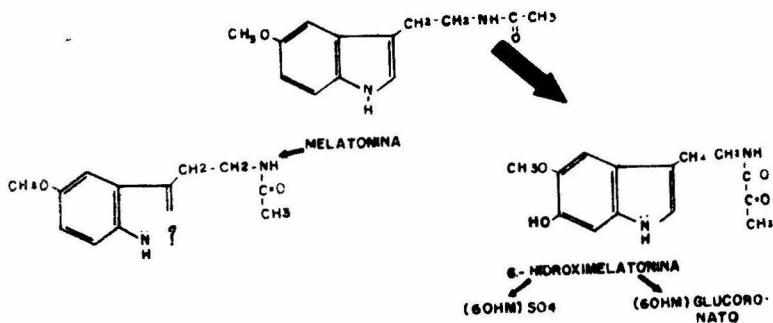


FIG 6.- METABOLISMO DE LA MELATONINA EXÓGENA ADMINISTRADA POR VÍA INTRAVENOSA.

En los humanos la melatonina exógena administrada intravenosamente se metaboliza de manera semejante a la descrita para la rata (44). Los sujetos utilizados para el estudio fueron cinco hombres; tres de los cuales padecían de esquizofrenia, uno Corea de Huntington y el quinto Daño Cerebral. Después de administrarles la melatonina-C¹⁴ el 90% de la radiactividad se excretó en la orina de las primeras 24 horas posteriores a la inyección y el resto en las siguientes 24 horas. Además de 6OHM y sus conjugados con sulfato y glucoronato excretaron un porcentaje relativamente bajo de compuestos ácidos desconocidos (Tabla III).

IDENTIFICACION TENTATIVA DE LOS METABOLITOS					
	%6OHM	%6OSO ₄ M	%6OGM	% Desconocidos	
Esquizofrénicos	A	1.5	59.4	24.4	14.6
	B	1.6	61.3	27.2	8.8
	C	1.2	65.0	24.6	8.9
Corea de Huntington	2.3	79.0	13.0	0.9	
Daño Cerebral	3.8	65.0	24.2	3.7	

TABLA III.- Distribución de la radiactividad entre los diferentes metabolitos de la melatonina en humanos (44).

Así pues, la melatonina circulante es metabolizada en el hígado. Este órgano contiene una enzima que hidroxila ciertos indoles en la posición 6 del anillo (43, 111). La enzima está localizada en los microsomas y requiere oxígeno y NADPH como cofactores. Cuando la melatonina se incuba con microsomas de hígado de rata y un sistema generante de NADPH, después de una hora, casi la mitad del indol es transformado a 6OHM (63).

Este sistema requiere forzosamente de NADPH. Las enzimas microsomales que requieren de éste cofactor se han encontrado capaces de metabolizar una gran variedad de drogas por diferentes vías; como desaminación (9), N- y O-desalquilación (10, 11), hidroxilación (73) y oxidación de la cadena lateral (26). La hidroxilación de melatonina constituye uno de los raros ejemplos en los cuales éste sistema enzimático microsomal actúa sobre un compuesto producido en el organismo.

RITMOS CIRCADIANOS DE LA GLANDULA PINEAL

Tanto la biosíntesis de melatonina en la pineal como la mayoría de los metabolitos intermediarios y las enzimas relacionadas con éste proceso tienen un ritmo diario que sigue al ciclo natural del día y de la noche (15).

La actividad enzimática de la N-acetil transferasa es máxima a la media noche y después de las 0200 hs. empieza a disminuir hasta alcanzar los niveles diurnos (60, 102). La HIOMT y la concentración de melatonina en la pineal oscilan de igual manera. La actividad de la HIOMT en las glándulas pineales de los animales mantenidos bajo condiciones cíclicas de luz tiene un mínimo a las 1800 horas (10 μ M melatonina/ mg pineal) 11 horas después de iniciarse la iluminación; y un máximo a las 2400 horas (34 μ M melatonina/ mg pineal), 5 horas después de establecerse la obscuridad (Figs. 7 y 8).

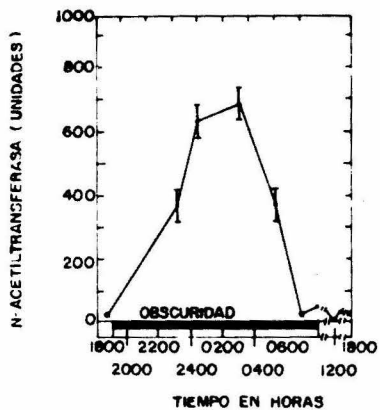


FIG 7 RITMO CIRCADIANO DE LA ACTIVIDAD DE LA N-ACETILTRANSFERASA EN LA PINEAL DE RATA.

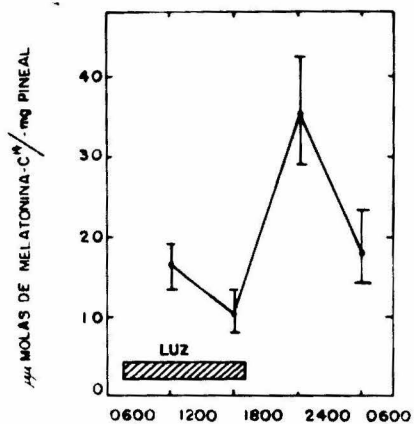


FIG 8 CAMBIOS DIARIOS EN LA ACTIVIDAD DE LA HIOMT.

Una vez alcanzado el máximo de actividad, ésta empieza a decrecer a pesar de permanecer aún la obscuridad y entre las 0600 horas y las 1800 horas la actividad enzimática continúa disminuyendo (15, 68).

De manera semejante, la concentración de NE en la pineal de la rata oscila con éste mismo patrón. Los niveles de éste neurotransmisor son bajos durante el período de luz y aumentan durante casi todo el período de obscuridad (Fig. 9) (127).

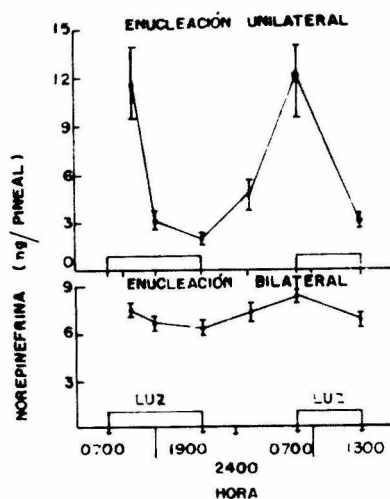


FIG 9 RITMO DIARIO EN EL CONTENIDO DE NE EN LA PINEAL DE RATA.

La descarboxilasa del 5-hidroxitriptofano muestra en su actividad un ritmo inverso al de la NE, ya que la actividad es alta durante el período de luz y baja en el de obscuridad (107). Como consecuencia, el contenido de 5HT en la pineal también presenta un ritmo circádico (106), el cuál concuerda con la actividad de la enzima, pues el contenido de 5HT en la pineal es alto durante el período luminoso y decrece cuando se

establece la obscuridad (89).

El contenido de melatonina en la glándula pineal sigue el mismo comportamiento de la NE. La concentración de melatonina en la pineal de rata es 13 veces mayor en la obscuridad que en la luz (0.5 ng el valor mínimo durante el período luminoso y 6.8 ng el valor máximo durante la obscuridad); solamente que a diferencia de la HIOMT, el contenido de melatonina en la glándula continúa elevándose durante la obscuridad por 10 horas después de establecida (68) (Fig. 10).

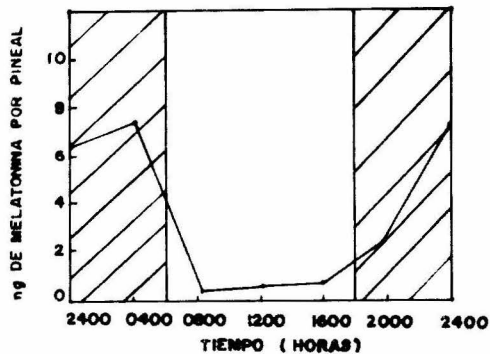


FIG 10 VARIACIÓN DIARIA EN EL CONTENIDO DE MELATONINA EN LA PINEAL DE LA RATA.

NOTA: LA PARTE SOMBREADA REPRESENTA OSCURIDAD.

La obscuridad constante, la luz constante, la ceguera y la ganglionectomía, suprimen los ritmos de NE, de la 5-hi - droxitriptofano descarboxilasa y de la hidroxindol-O-metil transferasa, lo cual significa que éstos ritmos no son generados por un mecanismo endógeno oscilante que use el ciclo día/noche como un simple marcador de tiempo, sino que más bien,

son una respuesta directa al ciclo luminoso natural de 24 horas (23, 58, 61, 106, 107, 108, 123, 127).

En contraste, el ritmo circádico de la 5HT persiste a pesar de la obscuridad constante o la ceguera, lo cual significa que éste ritmo puede estar generado por un ciclo ambiental diferente al de luz/obscuridad o por un oscilador endógeno. Por otra parte, el ritmo de la N-acetil transferasa persiste también en la obscuridad constante o la ceguera, pero la gangliotomía y la luz continua ocasionan una constante disminución en la actividad de la enzima (58). Estas características indican que el ritmo de la enzima está, como muchos otros ritmos de 24 horas, manejado por un mecanismo endógeno del SNC y puede suprimirse o desviarse por la luz ambiental (98).

O B J E T I V O S

Existe evidencia suficiente de que la pineal humana produce melatonina y de que ésta ejerce sus efectos sobre el SNC. Los nervios periféricos contienen melatonina (por ejemplo, 2 picogramos de melatonina por 100 mg en el nervio ciático (17)), pero no pueden sintetizar éste indol (13). El hecho de que los nervios periféricos capten la hormona se ha tomado como evidencia de que la melatonina endógena es secretada por la pineal al torrente circulatorio para su posterior captación por los órganos "blanco" de la misma (47, 48, 49, 51), más aún, se ha demostrado en material de autopsia y en algunos tumores ectópicos que la glándula sintetiza durante toda la vida melatonina (121, 124, 129). Sin embargo, a pesar de la sensibilidad de las técnicas que se han desarrollado para la identificación de la melatonina

y sus metabolitos (6OHM y sus conjugados) en sangre y orina humanas (28, 30, 35, 82, 84), la búsqueda de éstas sustancias bajo condiciones fisiológicas ha sido infructuosa (30, 35).

Este trabajo está enfocado al estudio catabólico de la melatonina administrada intratecalmente a humanos, al considerar la posibilidad de que la melatonina producida por la pineal humana pudiera secretarse directamente al líquido cefalorraquídeo; y al ser captada primero por el cerebro, éste órgano la metabolice a catabolitos diferentes a los descritos para la administración intravenosa, intraperitoneal u oral.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

SINTESIS DE MELATONINA-3C¹⁴.- En la síntesis química de melatonina-3C¹⁴ se empleó serotonina-3C¹⁴ (Nuclear Chicago) y diazometano. El diazometano es un compuesto explosivo, especialmente cuando se encuentra en estado gaseoso y concentrado. El diazometano necesario para una reacción generalmente se emplea en una solución etérea inmediatamente antes de usarse, la cuál ya es manejable con cierta seguridad; sin despreciar sus características venenosas y altamente tóxicas. La técnica a seguir para la síntesis de diazometano y melatonina-3C¹⁴ se describe con detalle a continuación.

SINTESIS DE DIAZOMETANO.- La síntesis de diazometano se efectúa a partir de acetamida en tres pasos: a) Acetilmetilurea; b) Nitrosometilurea; y c) Diazometano (Fig. 11) (87).

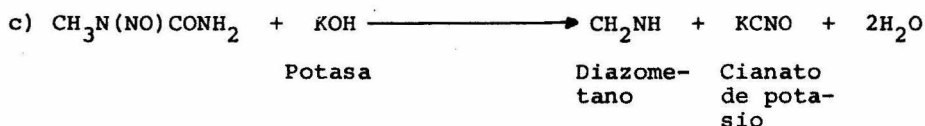
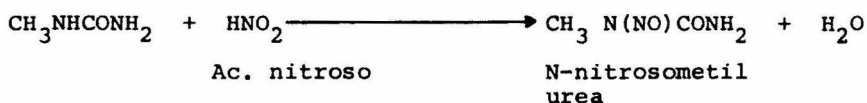
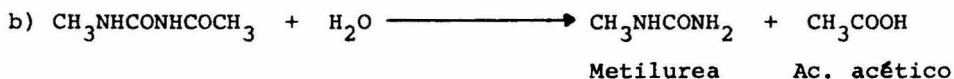
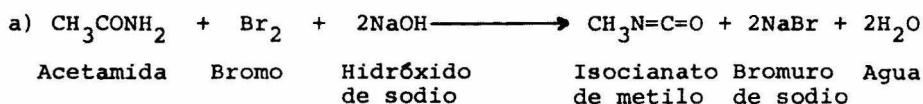


Fig. 11.- SINTESIS DE DIAZOMETANO (87).

a) ACETIMETILUREA.- En un vaso de precipitados de 4 litros de capacidad se preparó una solución de 59 gramos (1 mol) de acetamida en 88 gramos (0.55 mol) de bromo, calentando ligeramente en baño de vapor para ayudar a disolver la acetamida, pero con cuidado de que en el calentamiento se pierda la menor cantidad de bromo. A ésta solución se le añadió goteando y con agitación manual una solución de 40 gramos de hidróxido de sodio en 160 mililitros de agua. La mezcla de reacción resultante, de color amarillo, se calentó en baño de vapor hasta que se presentó efervescencia, después de la cuál se continuó el calentamiento por dos o tres minutos más. Ocasionalmente ésta efervescencia llega a ser muy enérgica y por ésta razón se usa un recipiente muy grande.

La cristalización del producto a partir de la solución colorida, desde amarilla hasta roja, generalmente comienza inmediatamente y se completa por enfriamiento en baño de hielo por una hora. Si la solución en éste punto está perfectamente descolorida el producto dá un bajo rendimiento en la cristalización, pues contiene más bromuro de sodio que producto. Por éstas razones se necesita un ligero exceso de bromo. La acetilmetilurea preparada se presentó como un sólido blanco cristalino, insoluble en ácido clorhídrico concentrado con P.F. de 168-170°C. El rendimiento de la reacción fué de 84%.

b) NITROSOMETILUREA.- Una mezcla de 49 gramos (0.42 mol) de acetilmetilurea (puede usarse húmeda) con 50 mililitros de ácido clorhídrico concentrado se calentaron con agitación manual sobre un baño de vapor hasta disolver totalmente la acetilmetilurea. El calentamiento se continuó por 3 o 4 minutos más (el tiempo total del baño de vapor es de 8 a 12 minutos); después de los cuales la solución se diluyó con un volumen igual de agua y se enfrió a menos de 10°C en un baño de hielo. A ésta preparación se le añadió lentamente y con agitación una solución saturada fría de nitrito de sodio (38 gramos de nitrito de sodio en 55 mililitros de agua). La mezcla se dejó en baño de hielo por varios minutos y se filtró la nitrosometilurea; la cuál se lavó con 8 o 10 mililitros de agua helada. Se obtuvieron 35 gramos de cristales de acetilmetilurea amarillo claro con P.F. de 123-124°C. El rendimiento de la reacción fué del 80%.

c) DIAZOMETANO.- 15 gramos de nitrosometilurea finamente divididos y en pequeñas porciones se añadieron con enfriamiento y agitación eficientes a una mezcla previamente enfriada a 5°C

de 150 mililitros de éter ordinario y 45 mililitros de hidróxido de potasio acuoso al 40%. La solución etérea intensamente amarilla de diazometano se separó de la fase acuosa con un embudo de separación. La solución etérea se secó por varias horas sobre lentejas de hidróxido de potasio puro. En ésta reacción se obtuvieron aproximadamente 4.2 gramos del gas en solución.

SINTESIS DE MELATONINA- $3C^{14}$.- 50 μ Ci de serotonina- $3C^{14}$ como sulfato de creatinina (Nuclear Chicago; Act. Esp. 57 mCi/mM) se hicieron reaccionar con un exceso de diazometano disuelto en éter, para obtener 5-metoxitriptamina- $3C^{14}$. Después de 48 horas de reacción, el diazometano y el éter se destilaron de la solución bajo corriente de nitrógeno. El residuo se redisolvió en 25 mililitros de hidróxido de sodio al 2% y dos veces con 10 mililitros de agua (85). La 5-metoxitriptamina- $3C^{14}$ en éter se secó con N_2 y se procedió a su acetilación con 20 mililitros de ácido acético glacial. Después de 18 horas, el anhídrido acético y el ácido acético se evaporaron hasta sequedad también bajo corriente de N_2 (63). El residuo se redisolvió en 20 mililitros de cloroformo y la melatonina- $3C^{14}$ sintetizada se lavó sucesivamente con 5 mililitros de carbonato de sodio al 5%; 5 mililitros de agua; 5 mililitros de ácido clorhídrico 0.1 N y finalmente dos veces con 5 mililitros de agua. El rendimiento de la primera reacción fué de 58.4% y el de la segunda de 72.0%, lo cuál da por resultado un rendimiento neto del 42.05% de melatonina- $3C^{14}$ (Fig. 12).

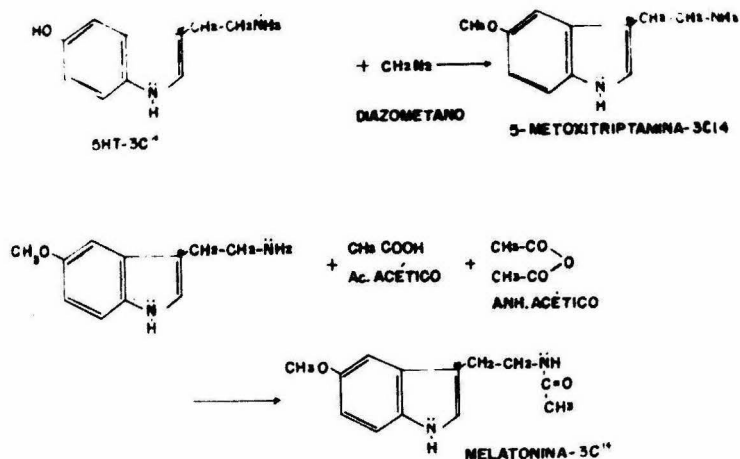


FIG 12- SINTESIS DE MELATONINA - 3C¹⁴

PURIFICACION DE MELATONINA-3C¹⁴.- El total del cloroformo se destiló bajo corriente de nitrógeno y el residuo se redisolvió en etanol para aplicarlo en papel Whatmann No. 3MM y hacer cromatografía descendente en benceno-acetato de etilo-agua (20:1:20), sistema en el que la melatonina tiene un R_f de 0.35 a 0.53 (63). Una vez que se determinó que el pico de radiactividad coincidió con el estándar de melatonina fría (Regis Chemical Co., Chicago, Ill.) se eluyó el papel con agua bidestilada y desionizada.

Alícuotas de 5 µl del levigado se aplicaron a dos placas finas de sílica gel para hacer cromatografía en butanol-ác. acético-agua (15:2:5) y en cloroformo-metanol (9:1) dando en ambos casos una sola mancha al revelar con yodo metálico. Los R_fs de 0.80 y 0.34 respectivamente coincidieron con los presentados

por el estándar de melatonina fría de Regis.

El levigado de la elusión del papel se ajustó a una concentración de melatonina- $3C^{14}$ de 1 μ Ci/2ml de disolvente (17.5 nM de melatonina) y con ésta solución se envasaron ampolletas estériles con 1 μ Ci de melatonina- $3C^{14}$, la cuál a su vez se esterilizó por filtración con millipore.

En el proceso de purificación de melatonina- $3C^{14}$ por cromatografía descendente en papel se perdió aproximadamente el 30% de la radiactividad por barrido uniforme en el papel; y en el llenado de las ampolletas estériles con la solución estéril de melatonina- $3C^{14}$ se perdió 1 μ Ci de melatonina- $3C^{14}$ (1.8%) por el volumen muerto del sistema de filtración.

ADMINISTRACION DE MELATONINA- $3C^{14}$.- A cada uno de tres pacientes voluntarios del servicio de Neurología del Instituto Nacional de Neurología, se les administró una ampolleta de melatonina- $3C^{14}$ por vía intratecal y en condiciones estériles. Los pacientes fueron de sexo masculino de 28, 31 y 38 años de edad respectivamente y fueron seleccionados en base a que sus padecimientos no comprometieran la circulación de líquido cefalorraquídeo. Una vez administrada la hormona, se colectó la orina de cada individuo en frascos estériles sin ningún preservativo, cada 6 horas durante el día siguiente a la administración y cada 12 horas durante el segundo día después de la inyección. Tan pronto se colectaban las muestras se congelaban hasta el momento de procesarlas.

PROCESO DE LAS MUESTRAS DE ORINA.- Inicialmente, se cuantificó la radiactividad excretada por cada sujeto durante las 48 horas siguientes a la administración. En un mililitro de orina

de cada una de las muestras, se determinó la cantidad de radiactividad agregándole 13 mililitros de solución de centelleo de Bray (22). Para medir la radiactividad se empleó un contador de centelleo líquido Nuclear Chicago Mark II. El apagamiento de cada muestra se corrigió con un estándar interno de tolueno- C^{14} (Nuclear Chicago) para poder determinar el patrón de excreción en desintegraciones por minuto/ tiempo (dpm/t).

Inicialmente, se repitieron las técnicas descritas para la identificación de los catabolitos de la melatonina exógena administrada por vía sanguínea (62, 63, 65, 66, 112). Con éste objeto, alícuotas de cada muestra de orina se concentraron por liofilización y se sometieron a cromatografía descendente en papel Whatmann No. 3MM en un sistema de isopropanol- NH_3 5% (2:1). Los resultados se compararon con los descritos en la literatura (63, 112).

Por otra parte, alícuotas de orina de cada muestra se ajustaron a pH 2 y se extrajeron con acetato de etilo para separar la 6OHM libre de los compuestos conjugados, en caso de encontrarse presente en la orina (112). De igual forma, los picos encontrados en los cromatogramas se digirieron individualmente con β -Glucoronidaza o se hidrolizaron en medio ácido con ácido sulfúrico para identificar por cromatografía en papel los compuestos libres que estuvieran conjugados con sulfato o glucuronato (62, 63, 65, 66, 112).

Las técnicas seguidas para la digestión con β -glucoronidaza o solvólisis ácida son las que se describen a continuación.

DIGESTION CON β -GLUCORONIDAZA.- Después de ajustar el pH de la orina a pH 4.5 con ácido acético glacial, se le añade 1/5

del volumen de amortiguador de acetatos 0.1M pH 4.5 y 1000 unidades de la enzima por mililitro de orina (Ketodase. General Diagnosis Division, Warner-Chilcott). Posteriormente, ésta solución se pone a incubar a 37°C por 24 horas, parando la reacción con un volumen de acetato de etilo, el cual a su vez sirve para hacer la primera de dos extracciones de los compuestos hidrolizados (34).

SOLVOLISIS ACIDA.- A la fase acuosa remanente de la digestión con β -glucoronidaza se le agrega 1/5 del volumen de NaCl en peso; ácido sulfúrico al 50% hasta pH 1 y tres volúmenes de acetato de etilo. Esta mezcla se pone a incubar a 37°C por 18 horas. Posteriormente se hace una extracción con el mismo acetato de etilo de la incubación y una segunda extracción con otro volumen de acetato de etilo.

Además de las técnicas descritas anteriormente, se implementaron dos métodos que permitieran purificar parcialmente y caracterizar tentativamente los compuestos radiactivos de las orinas colectadas.

METODO I.- La Fig. 13 presenta un esquema del procedimiento para efectuar éste método. La digestión con β -glucoronidaza o la solvólisis se hicieron con las mismas técnicas descritas. El tratamiento con carbón activado se hizo de la manera siguiente:

CARBON ACTIVADO.- La fase acuosa que quedó de la digestión y la solvólisis se adsorbe en bache con carbón activado hasta que ya no haya radiactividad en la fase acuosa. Se centrifuga ésta suspensión y el sobrenadante se decanta. Posteriormente, se lava el carbón con NaOH 0.1N y se centrifuga y se decanta nueva-

mente el sobrenadante. Esta operación se repite tantas veces como sean necesarias hasta que ya no se liberen pigmentos urinarios del carbón. A continuación, el carbón se lava varias veces con agua. Finalmente, el carbón se eluye con etanol de la misma forma que para los lavados con NaOH y agua.

El acetato de etilo de la digestión, el acetato de etilo de la solvólisis y el etanol de la elusión del carbón activado se concentran al vacío y se someten a cromatografía en papel en diferentes sistemas de disolventes (Fig. 13).

METODO II.- Este método consiste básicamente en la cromatografía de alícuotas de las orinas en columnas de Porapak-Q. El porapak-Q es una resina neutra de poliestireno que se usa ampliamente para extraer sustancias orgánicas no polares o poco polares de soluciones acuosas. Está descrito que también sirve para desalar y fraccionar compuestos hidrofílicos de bajo peso molecular como 5-hidroxiindoless, aminoácidos y péptidos (78, 79, 80).

El desarrollo del método es como se indica a continuación: 10 mililitros de la muestra de orina se ajustan a pH 4.5 con ácido acético glacial y se pasan 10 veces por columnas de tres gramos de porapak-Q previamente hinchado en acetona y activado con agua. Se separa el levigado de la columna después de pasar la muestra. Posteriormente, se hace la elusión de la columna con etanol diluido (desde 5% hasta 50%) hasta que ya no se desprenda radiactividad de la columna y ésta elusión se guarda también por separado. Finalmente, la columna se eluye con acetona diluida hasta que el levigado no tenga radiactividad y se haya recuperado el 100% de la radiactividad aplicada a la columna. Una alícuo-

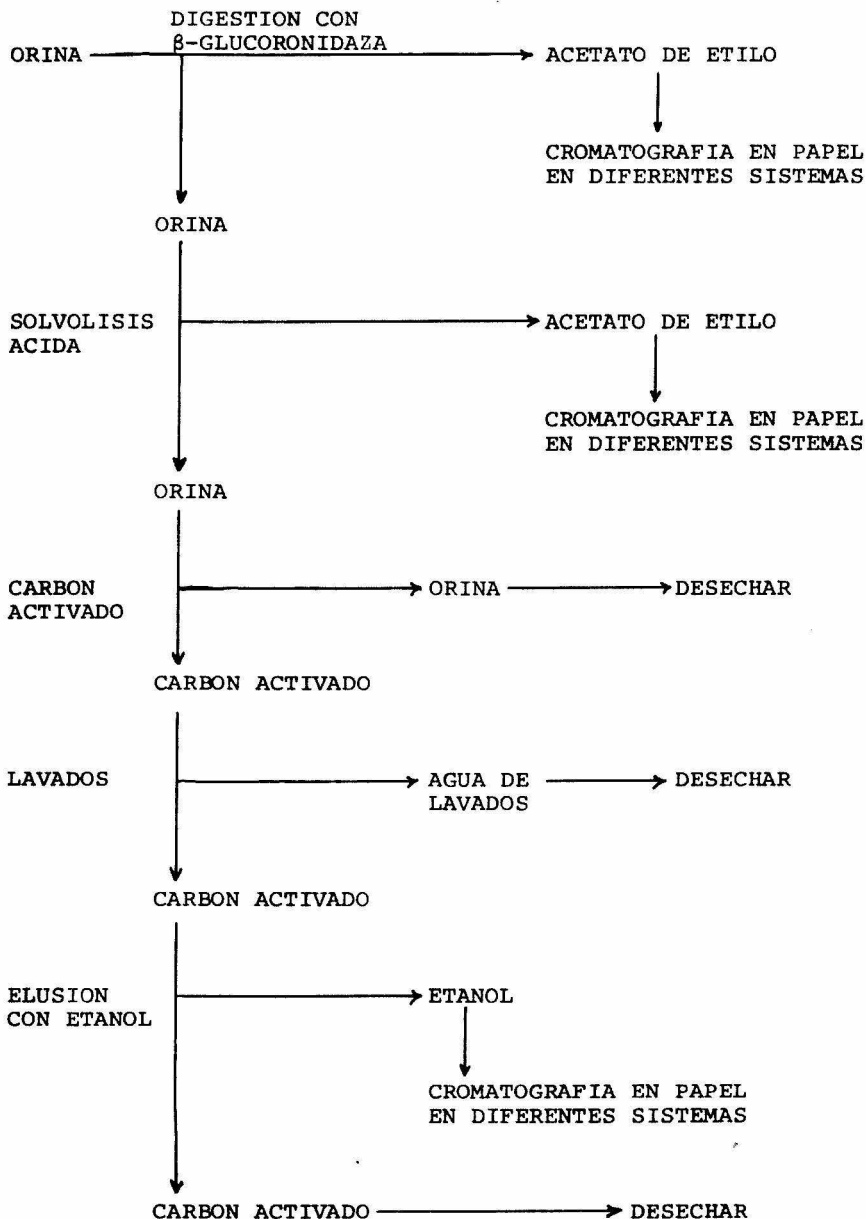


Fig. 13.- Diagrama del proceso a seguir para efectuar el Método I.

ta de cada uno de los levigados se procesó por cromatografía descendente en papel en diferentes sistemas y el resto se sometió al Método I (Fig. 14).

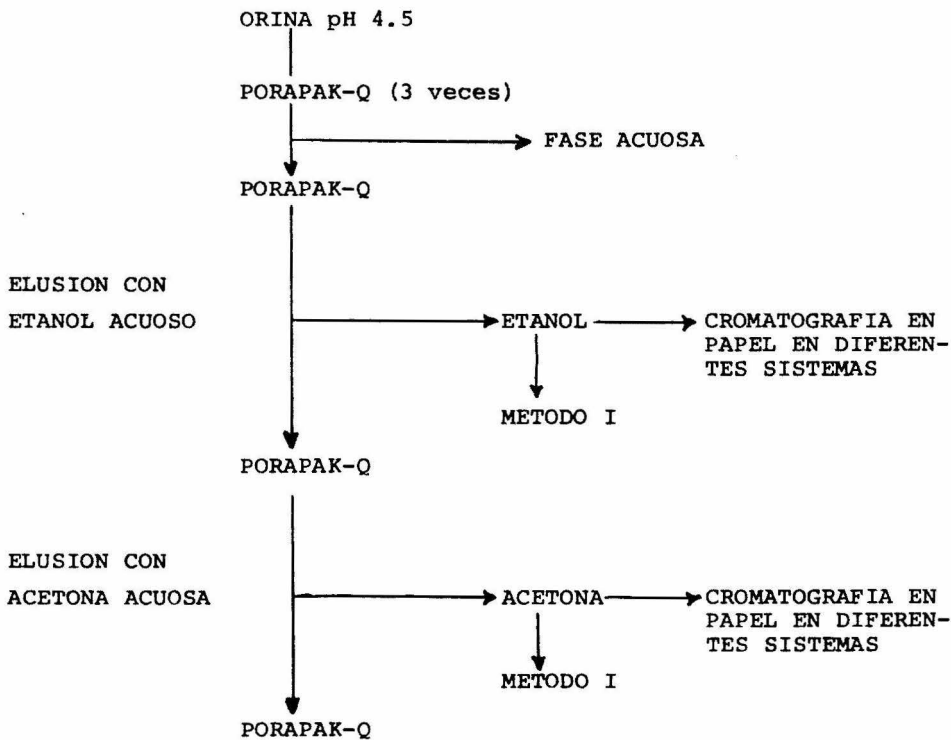


Fig. 14.- Diagrama del proceso a seguir para efectuar el Método II.

R E S U L T A D O S

PATRON DE EXCRECION.- En la Tabla IV se encuentra el patrón de excreción de cada uno de los tres pacientes utilizados para el estudio. Los datos están expresados en por ciento de la radiactividad administrada, excretada en el intervalo de tiempo indicado.

Paciente N°	I	II	III
0 - 6hs.	61.76%	57.21%	29.75%
6 - 12 "	9.97%	6.40%	14.12%
12 - 18 "	4.82%	---- (1)	15.48%
18 - 24 "	0.77%	26.59%	8.19%
24 - 36 "	1.75%	5.96%	3.73%
36 - 48 "	2.78%	4.84%	1.31%
TOTAL	81.85%	101.0%	72.58%

Tabla IV.- Patrón de excreción de cada uno de los pacientes estudiados.

(1) No hubo micción.

En la Fig. 15 está la gráfica de los patrones de excreción acumulativos para cada individuo, expresada también en porcentaje de radiactividad excretada.

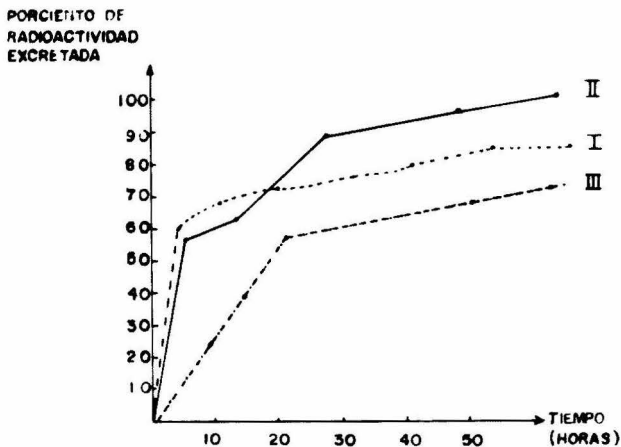


FIG 15-PATRON DE EXCRECIÓN ACUMULATIVO.

CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EN PAPEL.- Alícuotas de orina de cada una de las muestras se ajustaron a pH 2 con HCl 2 N y se extrajeron con dos volúmenes de acetato de etilo por agitación mecánica durante 15'. Después de éste tiempo, se separaron las dos fases y se cuantificó la radiactividad extraída con el acetato de etilo en éstas condiciones; contando alícuotas de la fase orgánica como ya se indicó en Material y Métodos. En éste proceso se encontró que solo el 1.5% de la radiactividad total de la orina se extrajo con el acetato de etilo. Debido a la cantidad tan pequeña de radiactividad en la fase orgánica, ésta se desechó considerando que no hubo extracción real, sino simple-

mente arrastre de los compuestos radiactivos.

Por otra parte, alícuotas de orina de cada una de las muestras se concentraron por liofilización y se aplicaron a hojas de papel Whatmann N°3MM de 38 x 65 cm. El proceso cromatográfico se desarrolló en isopropanol-NH₃ 5% (2:1). En todos los casos se encontró que los cromatogramas presentan dos picos de radiactividad, los cuales no concuerdan con ninguno de los tres picos que se resuelven en éste sistema para los metabolitos de la melatonina exógena administrada por vía endovenosa. El primero de éstos picos se encuentra casi en la línea de aplicación en 0.03 R_f y corresponde al 18.6% de la radiactividad aplicada al papel; y el segundo de 0.73 R_f con el 79.6% de la radiactividad aplicada al papel (Fig. 16).

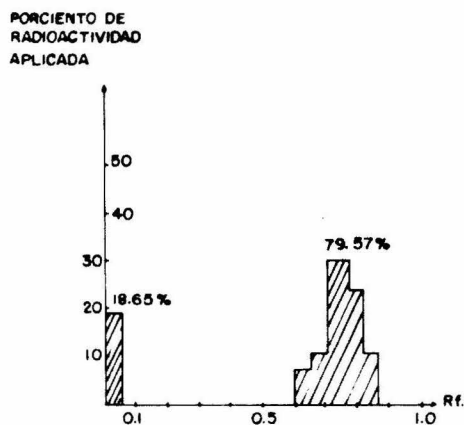


FIG 16-CROMATOGRFÍA DESCENDENTE EN PAPEL
CON ISOPROPANOL - NH₃ 5% (2:1)

Debido a que no se encontró concordancia de los resultados de éstos dos procesos con los resultados descritos para los metabolitos de la melatonina exógena administrada por vía sanguínea, se procedió en el laboratorio a intentar purificar y caracterizar los metabolitos radiactivos desconocidos. Después de múltiples ensayos se llegaron a implementar los dos métodos con los cuales se lograron purificar parcialmente y caracterizar tentativamente los diferentes compuestos radiactivos encontrados en las orinas de los pacientes estudiados.

Los resultados obtenidos al procesar alícuotas de cada una de las muestras de los tres sujetos por el Método I son los siguientes:

Metabolitos conjugados con glucoronato:	35.12%
Metabolitos conjugados con sulfato:	25.74%
Otros metabolitos:	29.36%

En la Tabla V se encuentran los R_f s de los metabolitos separados por el Método I en diferentes sistemas de disolventes.

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
AE - Dig.	0.45 0.85	0.65 0.85	0.80	0.85	0.80
AE - Solv.	----	----	0.65 0.85	0.85	0.70
EtOH	0.35	----	----	0.35	0.30

Tabla V.- Cromatografía en papel de los compuestos separados en el Método I en los sistemas: (1) Propanol-NH₄OH (4:1); (2) Benceno-Acetato de Etilo-Agua (20:1:20); (3) Isopropanol-NH₄ 5% (2:1); (4) Butanol-Acido acético-Agua (12:3:5); (5) Butanol-Acido acético-Agua (4:1:5).

Al tratar con el Porapak-Q alícuotas de orina de cada una de las muestras de los tres individuos del experimento se obtiene que:

el 13.49% de la radiactividad total pasada por la resina no es adsorbida por ella;

el 65.51% se eluye con etanol; y

el 20.7% se eluye con acetona.

Las características cromatográficas de las tres fracciones resultantes con el Método II se encuentran descritas en dos sistemas cromatográficos en la Tabla VI.

	(1)	(2)
No Porapak-Q "II"	R _f 0.78	R _f 0.09
Etanol "II"	R _f 0.85	R _f 0.15
Acetona "II"	R _f 0.95	R _f 0.20

(1) Isopropanol-NH₃ 5% (2:1); (2) Butanol-Ac. Acético-Agua (4:1:5).

TABLA VI

Por otra parte, al someter individualmente éstas tres fracciones al Método I se obtienen los resultados esquematizados en la Tabla VII.

	No-Porapak-Q "II"	R _f * [*]	Etanol "II"	R _f * [*]	Acetona "II"	R _f * [*]
Conjugados con Glucoronato	35.0%	0.45 0.85	35.2%	0.75	28.5%	0.85
Conjugados con sulfato	28.6%	0.80	25.2%	0.75	23.6%	0.85
No conjugados	29.3%	0.85	30.0%	0.25	38.0%	0.30

* Butanol-Ac. Acético-Agua (4:1:5)

T A B L A VII

C O M E N T A R I O S

Actualmente no hay duda acerca de la actividad biosintética de metoxiindoles en el órgano pineal, ni tampoco de los efectos que éste tiene sobre las hormonas hipofisarias, los ritmos reproductivos de estación y la actividad eléctrica y bioquímica del cerebro. Se sabe ya que el contenido de 5HT, 5-metoxitriptamina, N-acetilserotonina y melatonina en la pineal de la rata, en condiciones fisiológicas, es de 307, 22, 96 y 16.8 nM por gramo de tejido respectivamente (64).

Además, se ha identificado al órgano pineal como un "Transductor Neuroendócrino", el cual en respuesta a una señal luminosa que llega hasta sus terminaciones nerviosas simpáticas y que ocasiona la liberación de NE de las mismas terminaciones hacia las células parenquimatosas del pineal, produce mayor o menor síntesis de una familia de hormonas, los metoxiindoles.

Estos compuestos, una vez elaborados se secretan y transportan por una vía humoral (sangre ó LCR) hasta sus sitios de acción (principalmente el cerebro) (120, 123, 126).

Como evidencia del transporte de éstos compuestos pineales, está el hecho de que el hipotálamo contiene 5HT, 5-metoxitriptamina y melatonina en condiciones fisiológicas (3.96, 0.62 y 1.5 nM/ g de tejido respectivamente) (64). a pesar de que hasta la fecha no se ha encontrado en éste órgano la herramienta bioquímica necesaria para sintetizar metoxiindoles (13).

En su carácter de "Transductor Neuroendócrino" el órgano pineal tiene una gran influencia en ejes neuroendócrinos como Hipotálamo-Hipófisis y en el SNC. En el primer caso, los efectos observados de la melatonina, una de las sustancias pineales efectoras, sobre glándulas "blanco" como gónadas y testículos, no son más que una manifestación de las características de un transductor neuroendócrino. Por otra parte, sus efectos sobre SNC se manifiestan produciendo cambios en los trazos EEG y en las concentraciones de algunos neurotransmisores después de la pinealectomía o de la administración de melatonina.

La relación entre la pineal y las gonadotrofinas está bien definida y, en general, parece ser de naturaleza inhibidora. Sin embargo, hay muchos reportes en la literatura sobre fra casos al tratar de reproducir éstos efectos inhibidores (54); lo cuál se debe al uso de horarios inapropiados de luz:oscuridad utilizados en dichos experimentos. Es bien conocido el efecto inhibidor de la luz sobre la actividad biosintética en la pi pineal y al mantener a animales de hábitos nocturnos en "días lar gos" (12 a 16 horas de luz por cada 24 horas), no se puede es-

perar algún cambio sobre gónadas o testículos al pinealectomizarlos, ya que en dichas condiciones experimentales el animal ya ha sido efectivamente "pinealectomizado" (93).

De entre los diferentes productos de la pineal, la melatonina es la mejor identificada y la más estudiada. El mecanismo de su biosíntesis es bien conocido incluyendo los diferentes factores que la regulan. Sin embargo, su metabolismo se ha estudiado poco y tal vez de manera incorrecta. Los datos que se tienen acerca de esto están basados en los resultados obtenidos de experimentos en los cuales se han administrado dosis entre 20 y 5000 veces la cantidad de melatonina presente en la rata bajo condiciones fisiológicas; y en lo que respecta a la vía de administración, casi siempre ha sido sistémica u oral.

La distribución tisular de la melatonina así como su distribución regional en el cerebro son distintas y según la vía de administración, intravenosa o intracisternal, la concentración en el cerebro es menor o mayor según el caso. Esta característica de tener diferentes distribuciones tisulares sugiere que haya diferentes catabolitos para cada tejido; y si la concentración en el cerebro es 100 veces más grande con la administración intracisternal también puede indicar que se formen diferentes catabolitos principales en función de la vía de administración.

En la rata, el metabolismo de melatonina administrada por vía intracisternal es diferente al descrito por vía sanguínea (37, 38). Los catabolitos de la melatonina administrada por vía intravenosa e intraperitoneal a ratas y humanos son principalmente 6OHM conjugada con sulfato, 6OHM conjugada con glucoronato y

6OHM libre, además de un porcentaje bajo de compuesto(s) desconocido(s) (44, 62, 63, 65, 66, 112). En cambio, la administración intracisternal de melatonina- C^{14} o melatonina- acetilo C^{14} al cerebro de la rata produce, en el cerebro mismo, un metabolito idéntico a la N^Y -acetil-5 metoxikinurenamina además de melatonina. La relación entre éstos dos compuestos va disminuyendo con el transcurso del tiempo y a los 45 minutos después de la administración casi la mitad de la radiactividad se transformó a N^Y -acetil-5 metoxikinurenamina (37). En éste caso no se detectaron ni 6OHM ni sus conjugados en cantidades significativas (38). Estos resultados se obtuvieron también "in vitro" al incubar melatonina C^{14} con una preparación enzimática parcialmente purificada de cerebro de conejo. En presencia de azul de metileno y ácido ascórbico, el principal producto de la reacción es N^Y -acetil- N^2 -formil-5 metoxikinurenamina y en menor proporción N^Y -acetil-5 metoxikinurenamina (Fig. 17). Si en la mezcla de reacción se incluye la formamidaza, el producto principal de la reacción es N^Y -acetil-5 metoxikinurenamina (37).

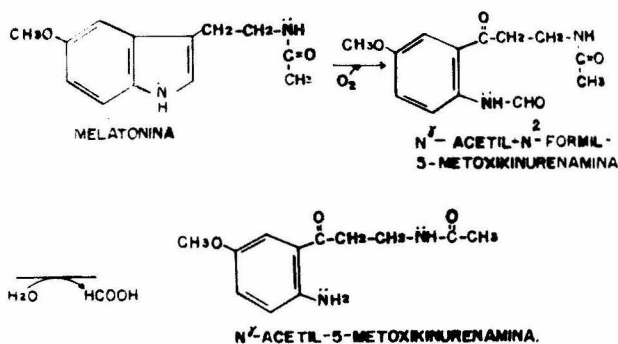


FIG 17-CATABOLISMO DE LA MELATONINA EN CEREBRO DE RATA DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN INTRACISTERNAL.

Después de inyectar melatonina-C¹⁴ intracisternalmente a ratas, el 65% de la radiactividad total administrada se excreta en la orina de 24 horas posteriores a la inyección y el 35% de ésta radiactividad (23% de la administrada) corresponde a N^Y-acetil-5-metoxikinurenamina. En el caso de la administración intravenosa, solo el 15% de la radiactividad total excretada en la orina corresponde a N^Y-acetil-5-metoxikinurenamina. Parece ser que éste compuesto es idéntico cromatográficamente al compuesto desconocido excretado en la orina de la rata después de la administración intravenosa o intraperitoneal de melatonina (37).

A pesar de que ya se conoce con exactitud qué es y qué hace la pineal, aún no se sabe para qué sirve. Se ha propuesto que funciona como un "Reloj Biológico" el cuál envía señales de tiempo generadas por la luz y la obscuridad a los centros del cerebro que regulan y sincronizan otros ritmos biológicos (123). Hay algunas evidencias de que la pineal participa en el engranaje de los ritmos relacionados con el ambiente luminoso en la rata, sin embargo, la hipótesis de que sea "El Reloj" o la única fuente de señales rítmicas dependientes de la luz, no ha sido comprobada en los mamíferos (120).

El estudio del catabolismo de la melatonina administrada intratecalmente a humanos es importante "per se", ya que comprende un aspecto del metabolismo de la melatonina que nunca antes se había estudiado. Además, permitió estudiar la posibilidad de que la melatonina sufra un catabolismo diferente por la distinta vía de administración; posibilidad que se sugiere por el importante hecho de que en otros mamíferos éste compuesto presenta las ya mencionadas diferentes distribuciones tisulares y

diferentes efectos cualitativos y cuantitativos al cambiar la vía de administración sistémica por intracisternal.

De los resultados obtenidos se puede comprobar ésta posibilidad y como originalmente se esperaba, parece ser que entre los metabolitos producidos con la administración intratecal se encuentra la 6OHM, aunque en forma libre solamente. En lo que respecta a la dosis administrada, 17.5 nM de melatonina, pudiera ser lo suficientemente pequeña como para evitar alterar de manera importante las concentraciones fisiológicas de la hormona indólica en el humano; ya que la dosis aplicada es del orden de la cantidad de melatonina detectada en el cerebro de la rata en condiciones fisiológicas (64). De aquí surge otro aspecto importante de éste estudio catabólico; si después se logran identificar los compuestos producidos en el humano por ésta vía de administración, posteriormente se tratarán de encontrar y cuantificar fisiológicamente, lo cuál a su vez, podrá servir para cuantificar la producción endógena de melatonina en el humano y correlacionarla clínicamente con padecimientos neurológicos como epilepsia y la enfermedad de Parkinson. Igualmente, se correlacionarían con los niveles de las hormonas hipofisarias en condiciones fisiológicas y después de administrar melatonina por diferentes vías; con lo cual se tendrían mejores armas para determinar para que sirve la pineal.

El patrón de excreción de la melatonina en éste experimento es semejante al descrito cuando se administra por vía sanguínea. En 48 horas se excretó casi la totalidad o la totalidad del indol, siendo la eliminación más intensa en las primeras 24 horas. Esto pudiera reflejar que la dosis administrada sigue siendo

muy alta y obliga al organismo a una rápida eliminación; o bien, que la melatonina biosintetizada fisiológicamente tan pronto se secreta de la pineal es rápidamente metabolizada.

Al extraer la orina a pH 2 con acetato de etilo se extrae solamente el 1.5% de la radiactividad en la orina; y debido al gran volumen de disolvente con grandes cantidades de pigmentos y sales urinarias y con tan pequeñas cantidades de radiactividad no se pudo identificar a la 6OHM en ésta fracción. La cromatografía en papel con isopropanol-NH₃ 5% (2:1) no presentó radiactividad en los R_fs correspondientes a los conjugados con glucoronato o sulfato de la 6OHM; sino que la quinta parte de la radiactividad aplicada al papel se retiene casi en la línea de aplicación y el resto recorre tres cuartas partes del recorrido del disolvente. Por la posición de los dos picos encontrados se deduce que la tercera parte de los compuestos excretados son compuestos ácidos y las otras dos terceras partes son compuestos más básicos que los conjugados de 6OHM.

De los compuestos excretados, la tercera parte está conjugada con glucoronato, una cuarta parte con sulfato y otra tercera parte se encuentra en forma libre. Estos tres grupos de compuestos se analizaron cromatográficamente en papel con sistemas usados para compuestos indólicos y se encontró que los R_f que presentan en éstas condiciones no concuerdan con los reportados para melatonina, N-acetilserotonina, ácido 5-hidroxiindol acético, 5-metoxitriptamina, ácido 5-metoxiindol acético y 6-hidroxi-melatonina (32, 63, 65, 112).

Por otra parte, por el comportamiento de los metabolitos en la resina de porapak-Q se puede deducir que hay un grupo de

compuestos que tiene un grupo muy polar que le impide adsorberse en el porapak-Q en las condiciones descritas; otro grupo un poco menos polar que se adsorbe bien en la resina en esas condiciones pero que se desprende fácilmente de ellas con soluciones acuosas de etanol y un tercer grupo que es el menos polar por lo que se adsorbe fuertemente al porapak-Q y que solo se eluye con soluciones acuosas de acetona.

Cada uno de éstos grupos se sometió a cromatografía en papel y a digestiones con β -glucoronidasa y solvólisis con ácido sulfúrico. Los resultados obtenidos al efectuar la cromatografía en papel de éstas tres fracciones comprueban las deducciones de polaridad hechas con el porapak-Q y además sugiere que son todos compuestos con grupos de carácter básico debido a que presentan R_f s altos en un medio básico (isopropanol - NH_3 5%; 2:1) y R_f s bajos en un medio ácido (butanol - ácido acético - agua; 4:1:5).

A su vez, cada uno de éstos tres grupos de compuestos separados por la cromatografía en porapak-Q está formado de compuestos conjugados y libres en las proporciones que están indicadas en la Tabla VII. En la misma tabla se encuentran los R_f s de cada una de las tres fracciones en el sistema de cromatografía descrito ahí mismo. Como puede verse, se encuentran 6 compuestos diferentes, producto de la transformación catabólica de la melatonina-3C¹⁴ administrada a los sujetos voluntarios. Por la cromatografía en éste sistema se puede especular que uno de los compuestos, la fracción no conjugada de la elusión con etanol del porapak-Q pudiera ser 6OHM; que el conjugado con glucoronato y el libre de la fracción no adsorbida en porapak-Q así como los conjugados de la fracción eluida con acetona del porapak-Q pu-

diera ser 10-metoxiharmalano; ya que su comportamiento cromatográfico es parecido a éstos compuestos en el mismo sistema (R_f 0.87 en butanol-ácido acético-agua; 4:1:5) (65). De la misma forma, el conjugado con sulfato de la fracción no adsorbida en porapak-Q y los conjugados de la elusión con etanol se comportan de manera semejante a la harmina y al harmol (R_f 0.78 en butanol-ácido acético-agua; 4:1:5) (105) (Fig. 18).

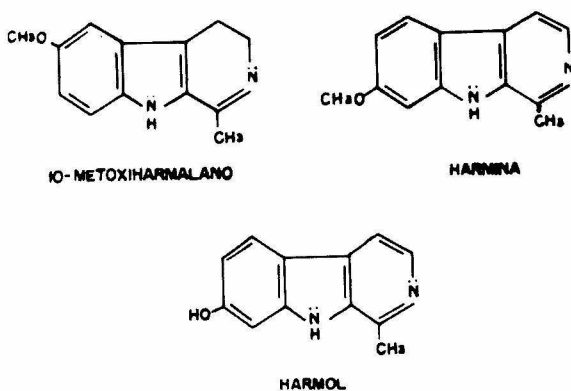


FIG 18- 10-METOXIHARMALANO, HARMINA Y HARMOL.

Como ya se dijo, éstas no son más que especulaciones, ya que es imposible identificar ningún compuesto por su comportamiento cromatográfico en un solo sistema; y aún menos en forma contaminada con otros compuestos de la orina arrastrados durante todo el proceso. Sin embargo, éstas sugerencias apoyan la hipótesis de que uno de los metabolitos de la melatonina sea un compuesto tricíclico (32, 65). De hecho, ya se ha reportado la formación en

el cerebro de uno de ellos, el 1-metil-6-metoxi-1,2,3,4-tetrahidro-2-carbolina a partir de 5-metoxitriptamina, uno de los indoles producidos en la pineal, y en las condiciones fisiológicas adecuadas (69).

La posible presencia de éste tipo de compuestos resulta ser muy interesante debido a que la mayoría de ellos son halucinógenos (83); casi tan activos como la dietilamina del ácido lisérgico (LSD) y antagonistas de la serotonina (70), además de inhibidores de la monoamino oxidasa tanto "in vivo" como "in vitro" (86).

El hecho de que la melatonina en éste experimento presente diferente catabolismo que cuando se administra por vía sistémica refuerza también la interesante hipótesis de que la ruta fisiológica de secreción de la melatonina es por el líquido cefalorraquídeo; y aunque ésta hipótesis ya se ha sugerido por varios investigadores (8, 29), aún no se ha demostrado experimentalmente; además de que va en contra de las evidencias anatómicas presentadas por Kappers (50) acerca de que la ruta fisiológica de secreción de la melatonina por la pineal es al torrente circulatorio.

El estudio del catabolismo de la melatonina- ^{14}C administrada intratecalmente a seres humanos no termina en ésta etapa, sino que se ha seguido trabajando en el mismo laboratorio del Dr. Fernando Antón Tay utilizando técnicas de análisis más modernas y de mejor resolución, como la cromatografía líquido-líquido a alta presión, la cual permite una mejor separación y purificación de los metabolitos de la orina. De ésta forma, es probable que dentro de poco tiempo se logre identificar con certeza los compuestos aquí descritos.

C O N C L U S I O N E S

- 1.- La glándula pineal es un "Transductor Neuroendócrino" que transforma una señal nerviosa en una señal hormonal.
- 2.- Como transductor neuroendócrino, la glándula pineal tiene una influencia inhibidora en las gonadotropinas hipofisarias, además de ejercer algún control en la actividad biosintética y electroencefalográfica del cerebro.
- 3.- La glándula pineal forma parte del engranaje que controla los ritmos generados por la luz y la obscuridad.
- 4.- Está demostrado que la melatonina es una de las sustancias efectoras de la glándula pineal y su biosíntesis en mamíferos como la rata se conoce muy bien.
- 5.- El catabolismo de la melatonina- $3C^{14}$ administrada por vía intratecal en humanos es diferente al descrito cuando se administra el compuesto por vía oral o endovenosa.
- 6.- El catabolismo descrito para la melatonina administrada por vía intraperitoneal o intravenosa no parece ser el catabolismo fisiológico en los mamíferos.
- 7.- Cabe la posibilidad de que la melatonina sufra una ciclización en la cadena lateral y como consecuencia se produzca algún compuesto tricíclico de tipo harman.
- 8.- Aún no se comprueba la hipótesis de que la ruta fisiológica de secreción de la melatonina es a través del LCR, aunque hay evidencias experimentales que tampoco permiten descartarla.

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

- 1.- Adams, J.C., Wan, L., Sohler A.J. *Endocrinol.* 31: 295 (1955).
- 2.- Anderson, E. *J.Ultrastructure Research. Supplement* 8 (1965).
- 3.- Antón-Tay, F. *The Pineal Gland.* G.E.W. Wolstenholme and J. Knight Eds., 213-227. London:Churchil (1971).
- 4.- Antón-Tay, F., Chou, C., Antón, S. and Wurtman, R.J. *Science* 162: 277 (1968).
- 5.- Antón-Tay, F., Díaz, J.L. y Fernández-Guardiola, A. *Life Sci. (Part I)* 10: 841 (1971).
- 6.- Antón-Tay, F. and Fernández-Guardiola, A. *Pineal Gland:Biochemistry and Physiology*, D.C. Klein, Ed. New York:Raven (1973).
- 7.- Antón-Tay, F., Sepúlveda, J. and González, S. *Life Sci. (Part II)* 9: 1283 (1970).
- 8.- Antón-Tay, F. and Wurtman, R.J. *Nature*, 221: 474 (1969).
- 9.- Axelrod, J. *J.Biol. Chem.* 214:753 (1955).
- 10.- Axelrod, J. *J.Pharmacol. Exptl. Therap.* 114: 430 (1955).
- 11.- Axelrod, J. *J.Pharmacol. Exptl. Therap.* 115: 259 (1955).
- 12.- Axelrod, J. and Lauber, J.K. *Biochem. Pharmacol.* 17: 828 (1968).
- 13.- Axelrod, J., MacLean, P.D., Albers, R.W. and Weissbach, H.W. *Regional Neurochemistry*, S.S. Kety and J. Elkes, Eds. 307-311, Oxford, Pergamon Press (1961).
- 14.- Axelrod, J. and Weissbach, H.J. *Biol. Chem.* 236: 211 (1961).
- 15.- Axelrod, J., Wurtman, R.J. and Snyder, S.H. *J.Biol. Chem.* 240: 949 (1965).

- 16.- Barchas, J.D., DaCosta, F. and Spector, S. *Nature* 214: 919 (1967).
- 17.- Barchas, J.D. and Lerner, A.B. *J.Neurochem.* 11: 489 (1964).
- 18.- Baschieri, L. deLuca, F., Cramarossa, L., de Martino, C., Oliverto, A. and Negri, M. *Experientia (Basel)* 29: 15 (1963).
- 19.- Benson, B., Matthews, M.J., Rodin, A.E. *Life Sci. (Part I)* 10: 607 (1971).
- 20.- Benson, B., Matthews, M.J., Rodin, A.E. *Acta Endocrinol.* 69:257 (1972).
- 21.- Bindoni, M. and Rizzo, R. *Arch. Sci. Biol.* 49:223 (1965).
- 22.- Bray, G. A. *Anal. Chem.* 35: 1029 (1963).
- 23.- Broenstein, M. and Axelrod, J. *Science* 183: 163 (1974).
- 24.- Cardinali, D.P. and Rosner J.M. *Endocrinol.* 89, (1), 301 (1971).
- 25.- Cabassa, N. and Sciascia, R. *Radioterap., Radiobiol., Fis., Med.* 20, (3), 17 (1965).
- 26.- Cooper, R.J. and Brodie, B.B. *J.Pharmacol. Exptl. Therap.* 114: 409 (1955).
- 27.- Cohen, S.L. *J.Biol. Chem.* 192:147 (1951).
- 28.- Cole, E.R. and Crank, G. *J.Chromatog.* 61: 225 (1971).
- 29.- Collu, R., Frascini, F. and Martini, L. *Experientia* 27: 844 (1971).
- 30.- Degen, P. H. and Barchas, J.D. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 13: 34 (1970).
- 31.- DeProsopo, N.D., DeMartino, L.J. and McGuinness, E.T. *Life Sci.* 7: 183 (1968).
- 32.- Farrell, G. and McIsaac, W.M. *Arch. Biochem. and Biophys.* 94, (3), 543 (1961).

- 33.- Frascini, F. and Martini, L. The Hypothalamus, L. Martini, M. Matta and F. Frascini, Eds. 529, New York: Academic (1970).
- 34.- Glenn, E.M. and Nelson, D.H. J. Clin. Endocrinol. 13: 911 (1953).
- 35.- Greer, M. and Williams, C.M. Clin. Chem. Acta 15: 165 (1967).
- 36.- Hertz-Eschel, M. and Rahaminoff, R. Life Sci. 4: 1367 (1965).
- 37.- Hirata, F., Hayaishi, O., Tokuyama, T. and Senoh, S. J. Biol. Chem. 249, (4), 1311 (1974).
- 38.- Hirata, F. Observaciones no publicadas.
- 39.- Hishikawa, Y., Cramer, H. and Kuhlo, W. Exp. Brain Pres. 7: 84 (1969).
- 40.- Hoffman, R.A. and Reiter, R.J. Science 148: 1609 (1965).
- 41.- Houssay, A.B., Pazo, J.H. and Epper, C.E. Acta Physiol. Latinoamer. 16: 202 (1966).
- 42.- Ishibashi, T. and Hahn, D.W., Srivatsva, L., Kumaresan, P. and Turner, C.W. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 122: 644 (1966).
- 43.- Jepson, J.B., Udenfriend, S.Y. and Zalsmann, P. Fed. Proc. 18: 254 (1959).
- 44.- Jones, R.L.; Mc Greer, P.L. and Greiner, A.C. Clin. Chim. Acta 26: 281 (1969).
- 45.- Kamberi, I.A., Mical, R.S. and Porter, J.C. Endocrinol. 87: 1 (1970).
- 46.- Kamberi, I.A., Mical, R.S. and Porter, J.C. Endocrinol. 88: 1288 (1971).
- 47.- Kappers, J.A. Gen. Comp. Endocrinol. 2: Abstract 16 (1962).
- 48.- Kappers, J.A. J. Neuro-Visc. Rel. Suppl. 9: 140 (1969).
- 49.- Kappers, J.A. J. Neuro-Visc. Rel. Suppl. 10 141 (1971).

- 50.- Kappers, J.A. The Pineal Gland. Wolstenholme, G.E.W. and Knight, J. Eds. London:Churchill (1964).
- 51.- Kappers, J.A. Z.Zelforch. Mikroskop. Anat. 52: 163 (1960).
- 52.- Kastin, A.J., Redding, F.W. and Schelly, A. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 124: 1275 (1967).
- 53.- Katin, A.J. and Schally, A.V. Nature, 213: 1238 (1967).
- 54.- Kincl, F.A. and Benagiano, G. Acta Endocrinol 54: 189 (1967).
- 55.- Klein, D.C. Fed. Proc. 25: 734 (1969).
- 56.- Klein, D.C., Berg, G.R. and Weller, J. Science 168: 979 (1970).
- 57.- Klein, D.C., Berg, G.R., Weller, J. and Glinssman, W. Science 167: 1738 (1970).
- 58.- Klein, D.C., Reiter, R.J. and Weller, J.L. Endocrinol. 89: 1020 (1971).
- 59.- Klein, D.C. and Rowe, J. Mol. Pharmacol. 6: 164 (1970).
- 60.- Klein, D.C. and Weller, J.L. Science 169: 1093 (1970).
- 61.- Klein D.C., Weller, J.L. and Moore, R.Y. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68: 3107 (1971).
- 62.- Kopin, I.J., Pare, C.M.B., Axelrod, J. and Weissbach, W. B.B. Acta 40: 377 (1960).
- 63.- Kopin, I.J., Pare, C.M.B., Axelrod, J. and Weissbach, W. J.Biol. Chem. 236, (11), 3072 (1961).
- 64.- Koslow, S.H., Green, A.R., Spano, P.F. and Costa, E. Advan. Biochem. Pscopharmacol. 7; 33 (1973).
- 66.- Kveder, S., McIsaac, W.M. and Page, I.H. Proceedings of the Biochemical Society. Biochem. J. 76: 28P (1960).
- 65.- Kveder, S. and McIsaac, W.M. J.Biol. Chem. 236, (12), 3214 (1961).

- 67.- Lovenberg, W., Jequire, E. and Sjoerdsma, A. Science 155:
217 (1967).
- 68.- Lynch, H.J. Life Sci. 10: 791 (1971).
- 69.- McIsaac, W.M. B.B. Acta 52: 607 (1961).
- 70.- McIsaac, W.M., Khrairallah, P.A. and Page, I.H. Science 134:
674 (1961).
- 71.- McIsaac, W.M., Taborsky, R.G. and Farrell, G. Science 145:
63 (1964).
- 72.- Milcu, S.T.M. and Demetrescu, M. Electroencephalogr. Clin.
Neurophysiol. 15: 535 (1963).
- 73.- Mitoma, C., Posner, H.S., Reitz, H.C. and Udenfriend, S.
Arch. Biochem. Biophys. 61: 431 (1956).
- 74.- Moore, R.Y., Heller, A., Bhatuagar, R.K., Wurtman, R.J. and
Axelrod, J. Arch. Neurol. 18: 208 (1968).
- 75.- Moszkowska, A. Rev. Suisse Zool. 72: 145 (1965).
- 76.- Moszkowska, A. and Ebels, I. Neuroendocrinologie; J. Bencit
and C. Kordon, Eds. Centre National de la Recherche Scien-
tific. P. 235 Paris (1970).
- 77.- Narang, G.D., Singh, D.V. and Turner, C.W. Proc. Soc.
Exptl. Biol. Med. 125: 134 (1967).
- 78.- Niederwieser, A.J. Chromatography 54: 215 (1971).
- 79.- Niederwieser, A.J. Chromatography 61: 81 (1971).
- 80.- Niederwieser, A.J. Chromatography 61: 95 (1971).
- 81.- Nir, I., Behroozi, K., Assael, M., Ivriani, J. and Sulman,
F.G. Neuroendocrinology 4: 122 (1969).
- 82.- Pelham, R.W., Ralph. Ch.L. and Campbell, I.M. Biochem. Bio-
phys. Res. Comm. 46, (3), 1236 (1972).

- 83.- Pennes, H.H. and Hoch, P.H. Amer. J. Psychiat. 113: 887 (1957).
- 84.- Pennington, S.N. J.Chromatog. 32: 406 (1968).
- 85.- Petrova, M.F., Kaverina, N.L. and Men'Shikov, G.P. J.Gen. Chem. (USSSR): 1303 (1963).
- 86.- Plestcher, A., Besendorf, H., Bactold, H.P. and Gey, K.F. Helv. Physiol. Pharmacol Acta 17: 202 (1959).
- 87.- Practical Organic Chemistry, VII, 20: 967 (1965).
- 88.- Quastel, M.R., Rahaminoff, R. Brit. J.Pharmacol. 24: 455 (1965).
- 89.- Quay, W.B. and Halevy, A. Physiol. Zool.35: 1 (1962).
- 90.- Rahaminoff, R. and Bruderman, J. Life Sci. 4: 1383 (1965).
- 91.- Rahaminoff, R., Bruderman, J. and Greshani, G. Life Sci. 4: 2781(1965).
- 92.- Reiter, R.J. Fert. Steril. 19: 1009 (1968).
- 93.- Reiter, R.J. Ann. Rev. Physiol. 35: 305 (1973).
- 94.- Reiter, R.J. and Hester, R.J. Endocrinol. 79: 1168 (1966).
- 95.- Reiter, R.J. and Sorrentino, S. Jr. Am. Zool 10: 247 (1970).
- 96.- Reiter, R.J. and Sorrentino, S. Jr. Contraception4: 385 (1971).
- 97.- Reiter, R.J., Vaughan, M.K. and Vaughan, G.M. Int. J. Fert. 17: 59 (1972).
- 98.- Richter, C.P. Biological Clock in Medicine and Biology (C.C. Thomas, Springfield Ill., 1965).
- 99.- Robinson, G.A., Butcher, R.W. and Sutherland, E.W. Annu. Rev. Biochem. 37: 149 (1968).
- 100.- Roldán, E. y Antón-Tay, F. Brain Res. 11: 238 (1968).

- 101.- Roldán, E., Antón-Tay, F. y Escobar, A. Bol. Inst. Estud. Méd. Biol. 22: 145 (1964).
- 102.- Romero, J.A. and Axelrod, J. Science 184: 1091 (1974).
- 103.- Saylor, A. and Walfson, A. Science 158: 1478 (1967).
- 104.- Shein, H.M. and Wurtman, R.J. Science 166 : 519 (1969).
- 105.- Slotkin, T.A., DiStefano, V. and Au W.Y.W. J.Pharmacol. Exptl. Ther. 173: 26 (1970).
- 106.- Snyder, S.N. and Axelrod, J. Science 149, (3683), 542 (1965).
- 107.- Snyder, S.N., Axelrod, J., Wurtman, R.J. and Fischer, J.E. J.Pharmacol. Exptl. Therap. 147: 371 (1965).
- 108.- Snyder, S.N., Sweig, M., Axelrod, J. and Fischer, J.E. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S. 53: 301 (1965).
- 109.- Sorrentino, S. Jr. Anat. Rec. 160: 432 (1968).
- 110.- Sorrentino, S. Jr., Reiter, R.J., Schalck, D.S. J.Endocrinology 51: 213 (1971).
- 111.- Szara, S. and Axelrod, J. Experientia 15: 216 (1959).
- 112.- Taborsky. R.G., Delvigs, P. and Page, I.H. J.Med. Chem. 8: 855 (1965).
- 113.- Vaughan, M.K., Reiter, R.J., Vaughan, G.M., Bigelow, L. and Altschule, M.D. Gen. Comp. Endocrinol. 18: 372 (1972).
- 114.- Vaughan, M.K., Benson, B., Noris, J.T. J.Endocrinol. 47: 397 (1970).
- 115.- Weiss, B. and Costa, E. J.Pharmacol. Exp. Ther. 161: 310 (1968).
- 116.- Weiss, B. and Costa, E. Science 156: 1750 (1967).
- 117.- Weiss. B. and Kidman, A.D. Advan. Biochem. Psychopharmacol. 1: 131 (1969).
- 118.- Weissbach, H., Redfield, B.G. and Axelrod, J. Biochem. Biophys. Acta 43: 352 (1960).

- 119.- Wurtman, R.J. Hospital Practice 4. (1), 32 (1969).
- 120.- Wurtman, R.J. and Ant6n-Tay, F. Recent Progress in Hormone Researche 25: 493 (1969).
- 121.- Wurtman, R.J. and Axelrod, J. Nature 204, (4965), 1323 (1964).
- 122.- Wurtman, R.J. and Axelrod, J. Progress in Brain Res. J.A. Kappers and J.P. Schade, Eds. Vol. 10, 520. Amsterdam, Else-nica (1965).
- 123.- Wurtman, R.J. and Axelrod, J. Sci. Am. 213: 50 (1965).
- 124.- Wurtman, R.J., Axelrod, J. and Barchas, J.D. J.Clin. En-docrinol. Metab. 24, (3) 299 (1964).
- 125.- Wurtman, R.J., Axelrod, J. and Chu, E.W. Science 141: 277 (1963).
- 126.- Wurtman, R.J., Axelrod, J. and Kelly, D.C. The Pineal. New York:Academic Press (1968).
- 127.- Wurtman, R.J., Axelrod, J. and Moore, R.Y. J.Pharmacol. Exptl. Therap. 157: 487 (1967).
- 128.- Wurtman, R.J., Axelrod, J. and Portter, S.F. J.Pharmacol. Exptl. Ther. 143: 3 (1964).
- 129.- Wurtman, R.J. and Huldriek, K. New England Journal of Medi-cine 274: 1233 (1966).
- 130.- Wurtman, R.J., Shein, H., Axelrod, J. and Larin, F. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 62: 749 (1969).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fué realizado en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Fernando Antón-Tay, a quien le agradezco su ayuda y colaboración. A su vez, quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Enrique Tovar Zamora por quién fué posible la terminación de ésta tesis.

De igual forma deseo expresar mi gratitud al Dr. Augusto Fernández Guardiola por su estímulo y cariño durante mi formación profesional.