



11261

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS POSGRADO**

**“EFECTO DE LOS 5-METOXI-INDOLES DE LA
GLANDULA PINEAL SOBRE LA EXCITABILIDAD DE
LAS NEURONAS PIRAMIDALES EN REBANADAS DE
HIPOCAMPO DE RATA”**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOMEDICAS
AREA FISILOGIA
PRESENTA:
MA. TERESA HERNANDEZ GUTIERREZ**



**ASESOR:
DR. CRUZ REYES VAZQUEZ**

MEXICO, D.F.

1997

**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.

INDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
PROLOGO	5
INTRODUCCION	8
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
OBJETIVOS	20
HIPOTESIS	21
MATERIALES Y METODO	22
RESULTADOS	31
DISCUSION	49
BIBLIOGRAFIA	55

RESUMEN

Los 5 metoxi-indoles de la glándula pineal ejercen efectos a lo largo de todo el eje hipotálamo-pituitaria-órgano-blanco de casi todos los sistemas hormonales. Los efectos endócrinos de estos compuestos que han sido mejor descritos, son aquellos que se ejercen sobre la reproducción. Estas acciones consisten en un efecto inhibitor tanto de la endocrinología como de la conducta reproductora. Sin embargo, las acciones de estos compuestos no se restringen sólo al área endocrínica. La aplicación de vanos de estos compuestos induce efectos conductuales marcados en todas las especies estudiadas, incluyendo al hombre. El perfil de estos efectos, ansiolisis, sedación, hipnosis, estupor, sugieren una acción inhibitoria de la actividad cerebral. En este contexto, la administración de melatonina, el principal 5-metoxi-indol de la pineal, reduce la excitabilidad de muchas estructuras cerebrales; lo cual conductualmente se traduce como una reducción de fenómenos de hiperexcitabilidad. Esta hormona induce efectos anticonvulsivos, prácticamente en todas las especies de animales analizadas, incluyendo al hombre, y en todos los modelos experimentales utilizados. Sin embargo, se desconoce el sitio de estas acciones anticonvulsivas y el mecanismo de acción empleado por el indol. El presente estudio analiza los efectos que esta hormona y el 5-metoxi-indol-ácido-acético inducen sobre la frecuencia de descarga basal, un parámetro de la excitabilidad celular, de las neuronas piramidales del hipocampo. Esta estructura, debido a su citoarquitectura, sus conexiones anatómicas y organización funcional, participa en la génesis de muchos fenómenos plásticos cerebrales, cuya alteración puede provocar y generalizar una actividad convulsiva. Además, se analizó el efecto de la melatonina sobre un modelo experimental de rebanadas de hipocampo-parahipocampo, el cual es utilizado para determinar el mecanismo de acción de muchos fármacos anticonvulsivos. En esta preparación se determinó el efecto del indol sobre la actividad convulsiva generada por la estimulación, con trenes eléctricos aplicados repetitivamente, a las fibras colaterales de Schaeffer. Comparándose sus efectos con aquellos obtenidos por la aplicación de GABA, clonazepam y sus respectivos bloqueadores, picrotoxina, bicuculina y flumazenil. También se determinó el efecto de esta hormona sobre el potencial postsináptico excitador provocado por la estimulación de las mismas colaterales y registrado en la neurona piramidal de la región CA₃ del hipocampo. En esta misma neurona se analizó también el efecto de estos mismos fármacos sobre el valor del potencial de membrana. Los resultados muestran que la aplicación sistémica de los dos indoles de la pineal empleados, genera un patrón de respuesta característico para cada uno de ellos. En este contexto, las neuronas hipocámpales son más sensibles al 5-metoxi-indol-ácido-acético (70%), y menos para la melatonina (50%). Los efectos del primer indol fueron particularmente inhibitorios, sobre todo con las dosis mayores; mientras que los efectos de la melatonina fueron mucho más variables. Las dosis de 0.5 y 1.0 mg/Kg provocaron una excitación de larga duración, mientras que las dosis mayores mostraron un efecto depresor fundamentalmente. La aplicación tanto de melatonina, GABA y Clonazepam en rebanadas de hipocampo reducen en forma significativa la actividad epileptogénica provocada. Aunque los efectos, cualitativa y cuantitativamente son diferentes entre los 3 compuestos, el resultado es una depresión significativa de las espigas poblacionales desencadenadas por la estimulación eléctrica. Tanto la picrotoxina como la bicuculina redujeron en su totalidad estos efectos depresores del GABA; mientras que el flumazenil hizo lo propio con los efectos del clonazepam. Ninguno de estas 3 sustancias bloqueadoras, modificó en forma alguna los efectos provocados por la melatonina. Adicionalmente en los registros intracelulares, la melatonina no modificó a los potenciales postsinápticos excitadores provocados, ni el valor del potencial de membrana de las neuronas piramidales. Ambos resultados sugieren un efecto presináptico no mediado por los mecanismos GABAérgicos de estas neuronas. Estos datos indican que las acciones anticonvulsivas de la melatonina ejercidas en el hipocampo de ratas, son mediadas a través de sistemas no GABAérgicos, probablemente por sistemas glutamatérgicos.

ABSTRACT

Besides its endocrinological effects, melatonin, the main hormone of the pineal gland, exerts a wide variety of neurological effects. These actions like anxiolysis, hypnosis and anticonvulsive effects had been described following melatonin systemic administration. However, neither the mechanisms of action nor the cerebral site of action of these anticonvulsive effects, had been ascertained until now. The present study analyzed the effect of melatonin and 5-methoxy-indole acetic acid, applied systemically on the electrical activity from pyramidal hippocampal cells. The aim of this study intends to characterize the pattern of response of these cells to these indole hormones. Furthermore, the anticonvulsive actions of melatonin were studied in an *in vitro* epilepsy model, the hippocampal-parahippocampal slices, and its effects were compared with those induced by the application of several GABA (10^{-9} to 10^{-6}) and clonazepam (10^{-7} to 10^{-4}) concentrations. The specificity of these effects was tested with the use of several pharmacological blocking agents, such as picrotoxin and bicuculline for GABA and flumazenil for clonazepam. These drugs were used also in the presence of melatonin. Additionally, in the same preparation the postsynaptic excitatory potentials induced by the electrical stimulation of Schaeffer collaterals, were recorded intracellularly, and the effects of all these drugs were tested repeatedly. Finally, the actions of these compounds on the membrane potential level of the pyramidal hippocampal cells was analyzed using an intracellular recording. Both indoles elicited significant effects on the frequency of discharge of these neurons; however, the actions induced by the 5-methoxy-indole acetic acid were more pronounced than those provoked by melatonin. The former hormone affected 70% of all the cells in dose-effect fashion, about 90% of these effects were inhibitory. Contrarily, melatonin modified the activity in only 50% of the neurons and the effects showed more variety. In the hippocampal-parahippocampal slice preparation, melatonin, GABA and clonazepam, reduced the epileptogenic activity induced by the electrical stimulation of Schaeffer collaterals. Although the effects were similar, there were differences in the intensity and latency among the three drugs. The effects induced by GABA were blocked by the addition of picrotoxin and bicuculline, whilst the actions provoked by clonazepam were totally reduced by flumazenil. None of these blocking drugs affected in some way the inhibitory actions induced by melatonin. Furthermore, in the intracellular recordings GABA and clonazepam provoked a dose-response inhibition of the excitatory postsynaptic potentials, that was also blocked by picrotoxin, bicuculline and flumazenil, respectively. In this recordings melatonin administration even in high concentrations (10^{-4} M) had no effects on this potential, although reduced the fiber volley recorded before the postsynaptic potential. Additionally melatonin induced no effect on the membrane potential level of these recorded cells, which suggest a presynaptic effect not mediated through GABA mechanisms. The results of the present studies indicate that the hippocampus is a target site for the anticonvulsive effects induced by melatonin, and the mechanism of action seems to be independent of the GABAergic synaptic hippocampal systems. A glutamatergic mediation is suggested.

PROLOGO

La pineal constituye la glándula más incomprendida de toda la naturaleza. Con esta oración se inicia el libro de Kitay y Altschule (56), el cual recopila la información más sobresaliente que existía sobre la pineal, hasta la primera mitad de este siglo. La publicación de este libro constituyó un punto de partida para el inicio de la investigación sistematizada de esta glándula.

La primera descripción documentada de la pineal se realizó en Grecia hace aproximadamente unos 3000 años A.C. Esta descripción la realizaron Torcuato y Herófilo de Alejandria, dos anatomistas de renombre, quienes además de establecer las relaciones anatómicas de esta estructura en los humanos, sugirieron una función de válvula para esta glándula (53). De acuerdo a estos autores, la pineal regula el flujo de los diferentes humores que gobiernan la naturaleza humana. Gracias a estas funciones atribuidas a la pineal, se le confirió a la glándula una participación mística y un lugar privilegiado dentro del pensamiento religioso y mágico a través de las diferentes civilizaciones (139). Por ejemplo, para la civilización hindú, la pineal constituyó el órgano de la clarividencia y premonición; mientras que para los romanos, la glándula fue considerada como un tercer ojo, capaz de vislumbrar auras divinas (115).

La pineal también fue objeto de estudio de varios filósofos y científicos. Así, Anatóteles desarrolló aún más la teoría valvular de Herófilo y Torcuato y la utilizó para explicar su concepto de los cuatro elementos que conforman el universo y los 4 humores que son la base de la naturaleza humana (91). Galeno, considerado como el padre de la medicina, también realizó aportes importantes tanto a la anatomía como a la fisiología de la glándula pineal. Inicialmente, describió la inervación de la glándula y le asignó el nombre de pineal a la región parenquimatosa y conaró al nervio adrenérgico que la inerva. Este autor también le adjudicó una función reguladora del flujo humoral a la glándula (19).

Una de las aportaciones más decisivas en el estudio de la pineal la realizó el filósofo y matemático René Descartes. Este personaje, creador de la teoría mecanicista de la conducta, asignó a la pineal el papel de fungir como el centro cerebral donde se reflejaban todos aquellos neumas y espíritus provenientes de la interacción con el medio ambiente. La pineal entonces seleccionaba el tipo de información que llegaría a estructuras superiores para conformar la conciencia (53). Aunque este autor no lo mencionó abiertamente, sus trabajos sugieren que es en esta estructura donde se asienta el alma (96).

La siguiente etapa más importante en la historia de la pineal fue resultado de los estudios de anatomía comparativa. Estas investigaciones establecieron una relación inequívoca entre la pineal y las estructuras visuales (77). La conclusión principal de muchos de estos estudios fue

que ningún otro órgano de la economía ha sufrido una transformación tan profunda como la que ha padecido la pineal a lo largo de la evolución (92). Esta estructura se transformó desde ser un órgano completamente neural en animales inferiores, filogenéticamente hablando, hasta ser un órgano completamente glandular en los mamíferos (28). Como resultado de estos estudios, realizados a fines del siglo pasado, se generó el concepto de un "tercer ojo" en los reptiles, el cual se refiere al órgano parapineal (45).

La asociación entre la pineal y la endocrinología, particularmente de la reproducción, se presentó a principios de este siglo cuando Heubner, un médico alemán, reporta un caso clínico en el que asocia la presencia de un tumor de la pineal con la presencia de pubertad precoz. Este médico sugiere la presencia de una sustancia en la pineal con actividad antigonaotrópica, y cuya ausencia, ya sea en condiciones patológicas, como era el caso del tumor, o fisiológicas, inducía la pubertad (40).

A pesar de que han transcurrido más de 90 años desde la publicación de este estudio aún desconocemos si la pineal realmente participa en el inicio de la pubertad y en la regulación de la sexualidad en los humanos (41). Sin embargo su papel en la modulación de la reproducción en otro tipo de animales, particularmente los roedores, ha resultado ser de una importancia fundamental. Así, en los años 60's se mostró que la pinealectomía inhibe completamente el efecto antigonaotrópico de mantener al hámster dorado en oscuridad continua (97); mientras que la aplicación de extractos de la pineal modifica considerablemente el patrón de reproducción estacional que estos animales poseen. Los efectos de estos extractos dependen de la temporada del año en que se apliquen y los efectos ejercidos pueden ser, ya sea anti o progonadotrópicos (22). Estos estudios señalaron la importancia de esta glándula en la coordinación de la reproducción estacional y sugirieron la relación entre la actividad de la glándula y los ritmos biológicos (106).

Posteriormente se mostró que la pineal forma parte de un sistema de regulación neuroendócrino encargado de ajustar las conductas de los animales a las condiciones tan cambiantes del medio ambiente. Por tal razón se le consideró como el prototipo de "regulador de reguladores" (8).

Actualmente se han descrito una gran cantidad de efectos ejercidos por los productos de secreción de la glándula pineal. En este sentido, quizá la melatonina sea la hormona de la pineal más refrendada, ya que sus efectos no son exclusivamente endocrinológicos, sino que inducen acciones en prácticamente cada órgano y sistema de la economía (62).

Dentro del sistema nervioso central sus efectos conductuales son generalmente de índole depresor, por lo que se sospecha que reduce la excitabilidad neuronal (71). Sin embargo,

aunque se han descrito receptores específicos a la melatonina (132) aún se desconoce la naturaleza y el mecanismo de acción de estos efectos; debido principalmente a la falta de correlación entre los sitios afectados por el indol y las regiones cerebrales que presentan tales sitios de unión (32).

El presente trabajo intenta determinar electrofisiológicamente, el mecanismo de acción de los efectos que esta hormona, y otro indol de la pineal (5-metoxi-indol-ácido-acético), provocan sobre un parámetro fundamental de la actividad nerviosa, la excitabilidad. Estos estudios se realizaron en el hipocampo dorsal, una estructura sensible a los efectos de los indoles y cuya importancia en la génesis, mantenimiento y generalización de las crisis convulsivas, consecuencia de un estado de hiperexcitabilidad, ha sido repetidamente demostrada (18).

INTRODUCCION

Son dos las características que hacen única a la glándula pineal (GP), una de ellas se relaciona con los profundos cambios que ha sufrido a lo largo de la filogenia y la segunda con la asociación que existe entre su función y la cantidad de luz ambiental.

Aunque la GP es privativa de los vertebrados, en todos los animales, incluyendo los unicelulares, es posible encontrar hormonas que en animales superiores estarán confinadas a la GP (11). Lo que sugiere que esta glándula y/o sus productos de secreción, han sido un mecanismo adaptativo muy eficaz que la naturaleza ha mantenido por millones de años.

Por otro lado, en los vertebrados existe una gran variabilidad en cuanto a la forma, localización, conexiones y morfología que presenta esta glándula. En los animales considerados inferiores filogenéticamente, más que hablar de una glándula pineal es necesario considerar todo un complejo pineal. En estos sujetos además de la glándula existe el órgano parapineal, la paráfisis y la epifisis (Fig. 1); mientras que en los vertebrados superiores, como los mamíferos, la glándula es única. Otra diferencia entre la glándula de los vertebrados inferiores y los superiores, es la forma sacular que presenta la glándula primitiva. Esto implica que el interior de la glándula sacular esta siendo bañado constantemente por el líquido cefalorraquídeo proveniente del tercer ventrículo. En el caso de los vertebrados superiores la glándula es parenquimatosa y pierde casi completamente su relación anatómica con el tercer ventrículo (Fig. 1).

Esta variabilidad filogenética aparentemente también se manifiesta desde un punto de vista funcional. Por ejemplo, en los peces y reptiles generalmente su acción se relaciona con la pigmentación cutánea y la termorregulación (9, 37); mientras que en la aves su acción se establece sobre la ritmicidad ciclica de la mayoría de ritmos (121). En los roedores sus efectos se manifiestan particularmente en el campo de la reproducción, sobre todo en aquellos animales, que poseen una reproducción estacional (78). Por otra parte, en el caso de los mamíferos, incluyendo al hombre, a pesar de que sus productos de secreción ejercen una variedad considerable de efectos, no se ha descrito una participación integrativa dentro de alguna función específica (113).

La segunda característica única de la pineal es su relación con el fotoperiodo; esto es, con la ciclicidad en la alternancia del día con la noche. En este sentido la luz ejerce una acción inhibitoria de la secreción de esta glándula; por lo que su actividad es elevada en los momentos de ausencia de luz, es decir durante la escotofase. Tal propiedad implica que las variaciones en la secreción de productos de la pineal serán idénticas a las variaciones fotoperiódicas, por lo

que estos productos vanarán no sólo en una forma circadiana, sino también circanual (123).

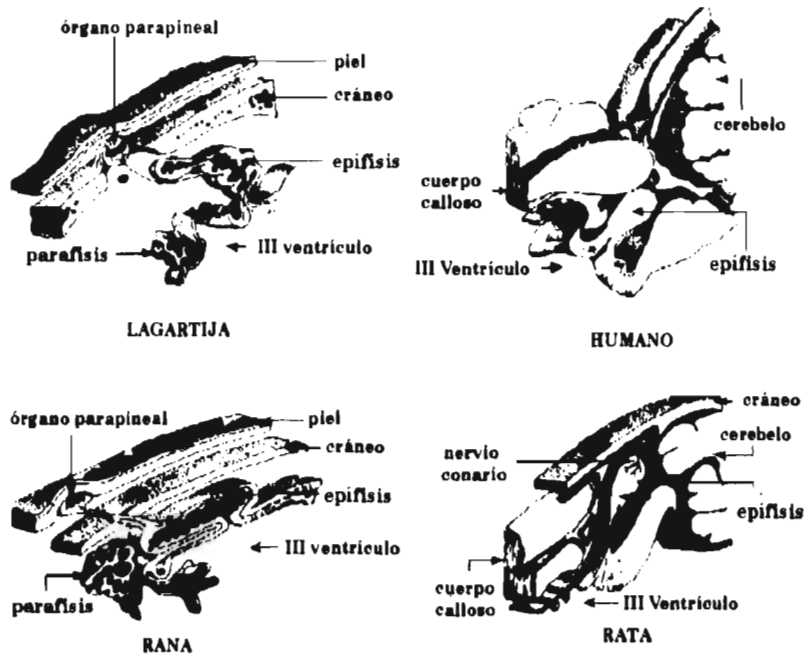


Fig. 1 La pineal ha sufrido una transformación evolutiva única. De ser un complejo de estructuras saculares en animales inferiores, se transformó en una glándula parenquimatosa exclusiva.

Las variaciones circadianas de la melatonina, el principal producto de secreción de la pineal, se muestran en la figura 2. Se observa que la concentración máxima de esta hormona se alcanza en la rata alrededor de las 2 de la mañana y persiste hasta el momento de iniciarse la fotofase (Fig. 2).

La dependencia de las concentraciones de la hormona con la cantidad de luz se manifiesta en experimentos que muestran que la aplicación de un pulso de luz de intensidad suficiente (2.000 luxes) inhibe en forma sostenida esta secreción de melatonina (30). Un patrón circadiano con estas características proveyería de información sobre la longitud de la noche; de esta manera el ciclo de secreción de la melatonina puede ser considerado no sólo como un reloj

biológico que proporciona la hora del día, sino también como un calendario que informa la época del año (98). Es obvio que tal información es muy útil para sincronizar a los ritmos circadianos con las condiciones ambientales de luz y oscuridad. Por esta razón la pineal es considerada como un regulador de reguladores (8). Estos patrones de secreción parecen ser la regla para todos los productos de la pineal.

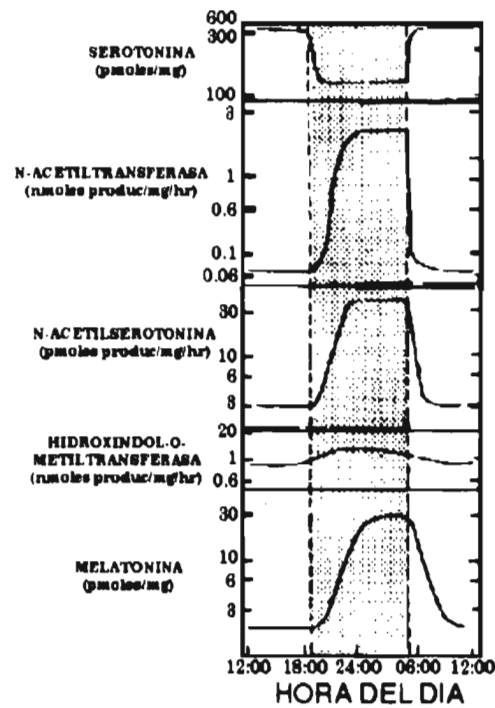


Fig. 2. Tanto las concentraciones de Melatonina, como de sus precursores, la N-acetilserotonina y la serotonina, se modifican sustancialmente de acuerdo al fotoperiodo ambiental. Estos cambios son consecuencia de modificaciones en la actividad de dos de las enzimas más importantes de esta vía enzimática, la N-acetiltransferasa y la enzima Hidroxi-indol-O-metil-transferasa. La parte sombreada de la gráfica corresponde a la escotofase.

En términos generales la pineal secreta dos tipos de compuestos los cuales por su estructura corresponden a indoles y péptidos (25). Estos últimos han sido poco estudiados, por lo que se desconoce aún el total de este tipo de sustancias que es secretado por la pineal, así como su importancia fisiológica (67). Quizá el péptido más importante secretado por la pineal es el péptido vasoactivo intestinal y la arginina vasotocina (110).

En el caso de los indoles, la pineal secreta una amplia cantidad de ellos. En términos generales éstos pueden agruparse en tres tipos los 5-metoxi-N-acetilados, de entre los cuales el más importante es la melatonina (5-metoxi-N-acetil-triptamina), los 5-metoxi-triptofoles y los 5-metoxi-indoles conjugados con ácido acético (66). Todos ellos son compuestos derivados del triptófano, un aminoácido esencial, a través de cadenas enzimáticas que incluyen a varios compuestos intermedios, como la serotonina, y a varias etapas enzimáticas reguladoras. En la figura 3, se muestra la vía enzimática mejor descrita en la síntesis de la melatonina (15), aunque existen vías alternativas, ya sea dentro de la pineal o en otros órganos de la economía (10).

Tres son las enzimas más significativas dentro de estas vías enzimáticas. Una de ellas es la hidroxilasa del triptófano, la cual es la enzima limitante y la que resulta regulada por el producto final, i.e., la melatonina (122). La otra enzima clave es la N-acetiltransferasa, la cual está bajo el control de la noradrenalina, a través de la inervación adrenérgica que alcanza a la glándula (100). La ciclicidad en la actividad de esta enzima es la responsable de las oscilaciones circadianas en la secreción de la melatonina (105); a su vez, es la actividad adrenérgica la que induce este tipo de ritmo a la enzima (101). Aunque finalmente es el núcleo supraquiasmático quien provoca tal ciclicidad adrenérgica. La acción de este núcleo hipotalámico se ejerce a través de un circuito neuronal que se origina en la retina de los ojos frontales, e involucra al hipotálamo medio y lateral, a la formación reticular, la médula espinal, al ganglio cervical superior y finalmente a los nervios conanos, tal como se observa en la figura 4 (68). Sin embargo no se descarta la posibilidad de una conexión central, a través del tallo de la pineal (12).

La tercer enzima relevante en la síntesis de la melatonina es la Hidroxi-O-metil-transferasa (HIOMT). Esta enzima es única en la formación de los tres tipos de indoles de la pineal ya mencionados, por lo que su localización en un tejido es un indicio casi inequívoco de la presencia de alguno de estos indoles (85). Debido a que la cantidad secretada de las hormonas de la pineal oscila en el rango de los picomoles, es difícil cuantificar su concentración (15), por tal razón, la forma de determinar si alguna estructura sintetiza este tipo de compuestos es determinar la presencia de la HIOMT. De esta forma se ha localizado la presencia de melatonina en la retina (54), donde incrementa la sensibilidad de las células horizontales (133); en el

intestino (90), donde modifica tanto la respuesta colinérgica neuroentérica (13), como la actividad basal de la fibra muscular lisa por un mecanismo que involucra al transporte transmembranal de calcio (102). En los roedores la glándula Harderiana también muestra toda la maquinaria enzimática necesaria para sintetizar a la melatonina (21).

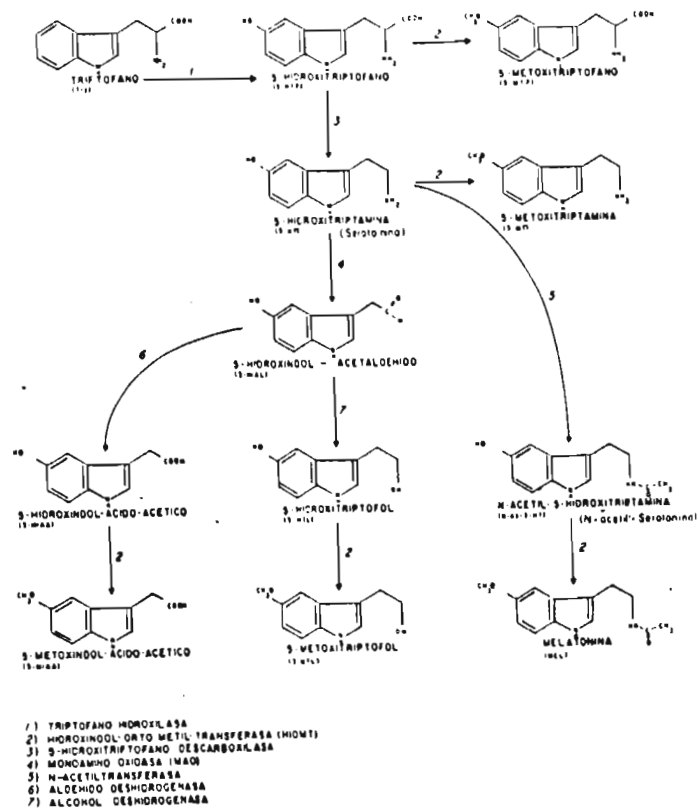


Fig. 3. La vía enzimática utilizada por la pineal para sintetizar melatonina involucra la actividad de 4 enzimas, de las cuales la que está bajo control simpático y como consecuencia, la responsable de las oscilaciones circadianas del indol es la N-acetil-transferasa.

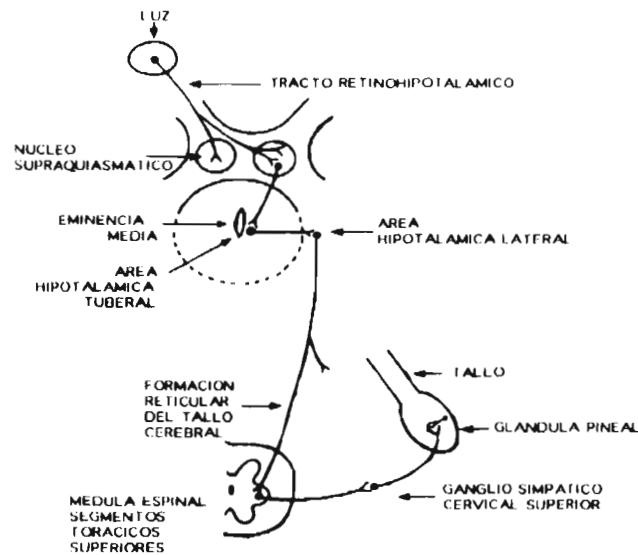


Fig. 4. La información concierne a la cantidad de luz ambiental existente alcanza a la pineal a través de un circuito neuronal en el que participan el hipotálamo, la formación reticular, la médula espinal y el ganglio cervical superior, tal como se muestra en esta figura.

Sin embargo, desde un punto de vista funcional, el principal órgano blanco de los productos de la pineal es el cerebro. La gran mayoría de los efectos de la pineal pueden explicarse por un mecanismo a nivel del sistema nervioso central (57). Por ejemplo sus acciones antigonadotrópicas son resultado de un efecto a nivel del hipotálamo, probablemente sobre aquellas neuronas secretoras de los factores liberadores de gonadotrofinas (125). En estas regiones hipotalámicas se ha descrito la presencia de receptores específicos para este indol (76), los cuales sustentan esta función.

Sin embargo, la aplicación de muchos de los indoles de la pineal inducen una gran cantidad de efectos neurológicos y electrofisiológicos, los cuales no necesariamente se correlacionan con la distribución o presencia de estos receptores a la melatonina (32). Además, estas acciones sólo se observan después de la aplicación de dosis suprafiológicas de estos

indoles, por lo que genéricamente se describen como efectos farmacológicos de la melatonina (66)

Así la aplicación de dosis de melatonina que oscilan entre 0.5 y 5 mg/Kg, inducen sueño en diferentes modelos experimentales (49, 81, 16), incluyendo al hombre (138). La mayor parte de estudios señalan que el sueño así inducido muestra características muy similares a las que se observan durante el sueño fisiológico, sin decrementar en forma significativa algunas de las etapas de sueño como la fase MOR, la cual es seriamente reducida con la administración de los hipnóticos clásicos (79).

La aplicación de melatonina ejerce además efectos sedativos (108) y ansiolíticos (70) en dosis que oscilan entre 0.1 y 2.0 mg/Kg. Estos efectos aunque han sido descritos en animales parecen presentarse además en humanos y anteceden a los efectos hipnóticos que posee este indol de la pineal (7)

Uno de los efectos más interesantes descritos en la farmacología de la melatonina son sus acciones anticonvulsivas. Estos efectos fueron descritos desde hace más de 25 años en humanos (5), aunque previamente se había sugerido esta acción a través de estudios que utilizaron a la pinealectomía como un mecanismo para reducir considerablemente los niveles cerebrales de melatonina. Por ejemplo Bindonni en 1965 (18), mostró que la lesión electrolítica de la glándula pineal de conejos, induce una actividad convulsiva típica, la cual se acompañaba de datos electroencefalográficos característicos de la epilepsia. Además, esta maniobra experimental también reducía significativamente la latencia e incrementaba el voltaje de los potenciales provocados registrados en el hipocampo de estos animales lesionados.

Posteriormente se mostró que los extractos de la pineal incrementan significativamente el umbral convulsivo y electroencefalográfico en gatos (104). Además en el gerbo, un animal extremadamente sensible a la pinealectomía, la sola extirpación de la pineal es suficiente para desencadenar un estado convulsivo constante; en estos animales este estado convulsivo se asocia con un significativo descenso en los niveles de noradrenalina cerebral (88).

Las acciones anticonvulsivas de la melatonina en particular y de los extractos de la pineal en general, se manifiestan no sólo en el caso de la epilepsia, sino también en modelos experimentales inductores de convulsiones, como es el caso del "Kindling" o encendido cerebral (75), en las convulsiones inducidas por pentazol (47), por oubaina (51), por el ácido 3-mercaptopropiónico (42), por la aplicación intracerebroventricular de anticuerpos contra la melatonina (34) ó incluso en convulsiones de tipo audiogénico (39,29) y lumínico (20).

Recientemente se mostró además que ciertas maniobras experimentales, las cuales modifican la función de la pineal, también influyen sobre la presencia de las crisis convulsivas.

tal es el caso de la exposición a campos magnéticos de determinada frecuencia e intensidad (3). Por ejemplo, existen observaciones clínicas y experimentales las cuales muestran que tanto la frecuencia de convulsiones como las alteraciones asociadas a ellas, son más frecuentes cuando los campos magnéticos de la tierra son más intensos (84). Así, la aplicación de actividad geomagnética que exceda los 50 nT (nanoTeslas), provoca un incremento estadísticamente significativo en la frecuencia de convulsiones y de muerte súbita de ratas epilépticas, datos similares a los encontrados en humanos que padecen de epilepsia (84). La presencia de campos electromagnéticos de tal intensidad, reduce la actividad de la pineal y por ende la secreción de la melatonina (109).

Adicionalmente estos efectos anticonvulsivos se han mostrado en diferentes especies de animales desde el ratón (47), la rata (75), el gerbo (89), el hámster (43), el gato (111), conejos (18), el mono (20) y los humanos (33). Lo que lo convierte en un efecto consistente y reproducible. Sin embargo, y a manera de controversia, recientemente se mostró que esta hormona puede también ejercer efectos proconvulsivos en humanos (107).

Los mecanismos y los sitios de acción por los cuales la melatonina podría ejercer estos efectos anticonvulsivos no han sido del todo esclarecidos. Existen varios datos en la literatura, muchos de ellos controversiales, los cuales proponen varios mecanismos y sitios de acción. Por ejemplo varios estudios coinciden en señalar que la melatonina actúa principalmente sobre la propagación de la crisis convulsiva más que sobre su génesis (29), lo que sugiere una acción generalizada sobre las estructuras cerebrales que poseen amplias conexiones que permitan la generalización de las crisis convulsivas, tal como la formación reticular, la corteza cerebral o el hipocampo.

También se ha señalado que en estos efectos anticonvulsivos de la melatonina, intervienen las monoaminas cerebrales, particularmente la noradrenalina (23). Por ejemplo, en animales pretratados con 6-hidroxidopamina, una neurotoxina que induce una simpatectomía química cuando se aplica en animales recién nacidos, los efectos anticonvulsivos de la melatonina no se manifiestan con las mismas características que en los animales controles (119).

La participación de los sistemas GABAérgicos cerebrales también ha sido involucrada en estas acciones de la melatonina. Así, Niles y cols. (74), mostraron que la melatonina incrementa la unión-independiente de sodio de $[^3\text{H}]\text{GABA}$ y de $[^3\text{H}]\text{muscimol}$, un agonista GABA_A , en la corteza cerebral de la rata *in vitro*. Este efecto de la melatonina parece ser debido a un incremento en la afinidad de los receptores GABA_A de baja afinidad (26). Lo cual sugiere una acción moduladora de la actividad de estos sistemas GABAérgicos cerebrales; aunque se

mostró que la melatonina no se une directamente a los sitios de unión de GABA o benzodiazepinas ya que los estudios que analizan la unión a receptores, muestran que la melatonina es un competidor sumamente pobre de las benzodiazepinas y del GABA aún en concentraciones mayores a 10^{-5} M (1).

Los efectos moduladores de la actividad GABAérgica por parte de la melatonina, también se manifiestan *in vivo*, ya que la administración diaria, durante tres semanas, en dosis crecientes, provoca un incremento en la capacidad de fijación de [3 H]-GABA y [3 H]-diazepam. De acuerdo a estos resultados se propone que muchos de los efectos psicofarmacológicos de la melatonina, tales como la hipnosis, sedación, ansiolisis y sus acciones anticonvulsivas, son debidos, al menos en parte, a su capacidad para incrementar la actividad de la transmisión GABAérgica al modular a los receptores GABA_A (74).

Otro mecanismo que se ha invocado para explicar muchas de las acciones anticonvulsivas de la melatonina reside en su capacidad para neutralizar los radicales libres y con esto reducir la citotoxicidad neuronal, la cual puede dar origen a focos epileptogénicos típicos (72). En este sentido se ha descrito la presencia de receptores tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), receptores que se unen a glutamato y kainato, en el hipocampo. Estos receptores juegan un papel central en fenómenos de plasticidad neuronal y en varias situaciones patológicas. La activación no sostenida e interrumpida de estos receptores da origen a fenómenos del tipo de la potenciación de corto y largo plazo; sin embargo, su activación sostenida y exagerada induce una actividad citotóxica la cual inicialmente incrementa la excitabilidad celular y finalmente puede provocar la muerte celular (72). La actividad de estos receptores es modulada por un sitio redox a nivel de la membrana celular el cual detecta niveles elevados de radicales libres e incrementa, como consecuencia, la actividad de los receptores NMDA (72).

La relación entre estos efectos y la melatonina, se describió hace poco cuando se mostró que esta hormona indólica es el mejor aceptor de radicales libres que existe en los organismos, con una actividad aún superior a la de la vitamina E o C (86). Gracias a esta propiedad, la melatonina podría ejercer un efecto protector de la actividad citotóxica mediada por los receptores NMDA y por el estrés oxidativo, los cuales inducen alteraciones del ADN y consecuentemente la apoptosis. Estos efectos protectores se manifiestan también en experimentos realizados *in vivo*. Por ejemplo, la aplicación intraperitoneal de kainato en animales experimentales inicia alteraciones irreversibles y letales sobre el ADN de varias áreas cerebrales, principalmente en el hipocampo; sin embargo, la aplicación conjunta de kainato y melatonina bloquean significativamente estas alteraciones hipocámpales (124).

Por otra parte, los sitios de acción implicados en los efectos anticonvulsivos de la melatonina no se han descrito con precisión. La aplicación intraperitoneal de melatonina induce cambios en la actividad eléctrica de varias regiones cerebrales. De entre ellas, destacan la formación reticular (83) y algunas estructuras del sistema límbico, entre ellas el hipocampo (71), aunque en ambos artículos se carece de evidencias que sugieren una acción directa de la hormona sobre estas estructuras. Otros estudios realizados *in vitro*, muestran que la melatonina modifica en forma directa a varias regiones cerebrales, entre ellas se encuentra el hipotálamo (116), la corteza cerebral (35) y el hipocampo (137). Estas dos últimas estructuras han sido implicadas en los procesos de generalización de la actividad epileptiforme.

Recientemente, estudios realizados en rebanadas de neocorteza cerebral de humanos detectaron por la técnica autorradiográfica con 2-[1-¹²⁵I]iodomelatonina los sitios de unión a este indol en las capas II-V de la corteza temporal. En estas mismas rebanadas se indujeron los potenciales de campo epileptiformes por la sola omisión de agregar Mg^{2+} al líquido de superfusión. La frecuencia de aparición de estos potenciales registrados en las capas II-V se redujo al 50% de su valor inicial después de la aplicación de una concentración de 10-100 nM de melatonina, efecto que fue reversible después de lavar a la rebanada y con ello eliminar a la hormona (35).

En el caso del hipocampo se mostró que en el cobayo, la aplicación de melatonina en concentraciones de 1-10 μ M, reduce la excitabilidad de las neuronas de la región CA₃, determinada por la frecuencia de descarga registrada extracelularmente, e intracelularmente, por el valor del potencial de membrana (137). Esta misma hormona, provoca además, una reducción de la respuesta a la estimulación sináptica repetitiva y a la facilitación provocada por la aplicación de un doble estímulo con intervalos de 20 mseg. Finalmente la duración del potencial de acción se incrementó significativamente y el umbral se desvió hacia valores más positivos (137). Aunque estos efectos se obtuvieron con dosis suprafisiológicas del indol, es posible que representen una acción mediada por receptores a la melatonina, los cuales fueron recientemente descritos en esta región (14). Incidentalmente, este receptor posee la masa molecular más pequeña (365 kDa) de todos los receptores a la melatonina hasta ahora descritos (14).

Estos datos indican que ambas estructuras pueden ser fundamentales para la mediación de los efectos anticonvulsivos que ejercen los productos de la pineal, aunque el mecanismo de acción utilizado por la melatonina en cada una de ellas, puede ser diferente.

La organización morfológica y funcional del hipocampo, así como los resultados de los estudios que analizan los efectos anticonvulsivos de los productos de la pineal sugieren la posibilidad de que el mecanismo de acción utilizado por la melatonina para reducir la excitabilidad

neural, sean consecuencia de una acción neuromoduladora sobre algunos de los dos sistemas principales de neurotransmisores hipocampales. Uno de ellos se relaciona con los sistemas de aminas biogénicas de esta región. La participación de estas sustancias en las crisis convulsivas se manifiesta en varios modelos experimentales; así, por ejemplo se mostró que la aplicación de choques electroconvulsivos en la rata se asocian con un decremento en las concentraciones de norepinefrina hipocampales (118), las cuales se correlacionan significativamente con los estados ictales e interictales inducidos experimentalmente.

Por otra parte, la liberación de esta catecolamina está siendo modulada por dos sistemas de neurotransmisores bien definidos, por neuronas serotoninérgicas (2) y por los sistemas dirigidos hacia receptores NMDA, como los de glutamato, kainato y aspartato (120). A su vez, estos últimos están siendo regulados por las concentraciones de óxido nítrico, a través de un sitio redox, el cual puede ser modificado por sustancias aceptoras de radicales libres (120).

El segundo posible sistema modificado por la melatonina, esta constituido por las neuronas GABAérgicas, las cuales forman parte de un sistema de modulación que mantiene un tono inhibitorio sobre las células piramidales del hipocampo (93), de tal manera que cualquier fármaco capaz de incrementar la actividad GABAérgica hipocampal ejerce efectos anticonvulsivos. Las células GABAérgicas hipocampales, también están bajo control de un mecanismo serotoninérgico presináptico (114). Estos antecedentes sugieren que los efectos anticonvulsivos ejercidos por la melatonina podrían ser consecuencia de un incremento en la actividad de los sistemas GABAérgicos hipocampales o de una disminución en la actividad de las neuronas adrenérgicas, ya sea por un efecto directo sobre estas células; o bien, a través de una acción inhibitoria sobre los sistemas que utilizan receptores tipo NMDA, lo cual finalmente reduciría la actividad adrenérgica hipocampal. Es necesario mencionar que a pesar de que la serotonina es un precursor de la melatonina, no existen interacciones entre estos indoles y sus receptores; esto es, la afinidad de todos los receptores serotoninérgicos, hasta ahora descritos, es, muy pobre para la melatonina; además los receptores a esta hormona no muestran afinidad alguna para la serotonina. Lo cual descarta una acción de la melatonina sobre los receptores serotoninérgicos hipocampales (136, 130). Sin embargo, tanto en el intestino (46), como en el sistema nervioso central (129), se han mostrado algunos efectos antagónicos entre la melatonina y la serotonina a nivel de estructuras postsinápticas; por lo que también es posible la existencia de un mecanismo de acción que sea consecuencia de la interacción entre la melatonina y las neuronas serotoninérgicas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

De acuerdo a los antecedentes, el describir el mecanismo de acción de la melatonina en estos efectos anticonvulsivos requiere de un análisis diferencial entre las acciones de esta hormona y aquellas ejercidas por los sistemas GABAérgicos hipocampales. Una forma de hacerlo es estudiar comparativamente los efectos electrofisiológicos inducidos por ambas sustancias y las modificaciones de los mismos por fármacos con acciones antagónicas de los mismos; lo cual constituye el objetivo del presente estudio. Sin embargo, cualquier intento para discernir entre estas posibilidades, implicaría primero, el determinar el patrón de respuesta de las células piramidales hipocampales a la aplicación sistémica de melatonina. El empleo de esta vía de administración, mostraría un patrón de descarga celular, lo más cercano a una situación fisiológica, ya que la vía parenteral constituye la vía de entrada natural a esta estructura. Posteriormente, y tomando en cuenta esta información, un modelo electrofisiológico de epilepsia de origen hipocampal *in vitro*, sería ideal para realizar un análisis farmacológico empleando agonistas y antagonistas GABAérgicos, con lo cual se determinaría la etapa sináptica en la que interviene la melatonina para inducir esta reducción en la excitabilidad de las neuronas hipocampales, lo que conductualmente se traduce como un efecto anticonvulsivo.

OBJETIVOS

- 1.- Determinar el patrón de respuesta electrofisiológica a la aplicación sistémica de varias dosis de melatonina y 5-metoxi-indol ácido acético de las neuronas del hipocampo dorsal en animales íntegros. La respuesta electrofisiológica a determinar, consistirá en la frecuencia de descarga unitaria registrada extracelularmente.
- 2.- Describir el efecto de la adición de varias dosis de melatonina a la solución de perfusión de rebanadas de hipocampo-parahipocampo de rata, sobre la presencia de espigas poblaciones desencadenadas por la estimulación de las colaterales de Schaeffer. Las espigas registradas en esta población son muy similares a las observadas durante las crisis convulsivas de animales íntegros, por lo que se consideran como el fenómeno subyacente a tal fenómeno conductual.
- 3.- Mostrar los efectos electrofisiológicos, registrados extracelularmente e intracelularmente, que la melatonina induce sobre las neuronas hipocampales, antes, durante y posterior a la estimulación de las colaterales de Schaeffer
- 4.- Determinar los efectos que antagonistas y agonistas GABAérgicos, provocan sobre los cambios electrofisiológicos inducidos por la melatonina en las neuronas que muestran una actividad tipo epileptogénica, consecuencia de una estimulación repetida de las colaterales de Schaeffer, en las preparaciones de rebanadas de hipocampo-parahipocampo de rata, analizando una posible interacción sináptica con los efectos provocados por la melatonina.

HIPOTESIS

- Si los efectos anticonvulsivos inducidos por la aplicación sistémica de productos de secreción de la pineal son consecuencia de un efecto a nivel hipocampal; entonces estos productos deben provocar una reducción en la excitabilidad neuronal de las células hipocampales y reducir significativamente la actividad eléctrica subyacente a la génesis de las crisis convulsivas.
- Si la melatonina provoca una reducción de la excitabilidad celular; entonces deberá reflejarse en reducciones significativas en la frecuencia de descarga celular, registrada extracelularmente y en hiperpolarizaciones del potencial de membrana, registradas intracelularmente.
- Si el mecanismo de acción inducido por estos indoles es consecuencia de una interacción con los sistemas GABAérgicos existentes en esta región cerebral; entonces la aplicación conjunta de fármacos antagonistas o agonistas a este neurotransmisor, modificará significativamente los efectos provocados por estos productos de secreción de la pineal.

MATERIAL Y METODOS

Para todos los experimentos se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con pesos que oscilaron entre 180 y 220 g. Los animales provenían del bioterio de la Facultad de Medicina y fueron trasladados y mantenidos en condiciones del laboratorio durante al menos 15 días antes de su empleo experimental. Las condiciones de alternancia de luz y obscuridad, así como de temperatura fueron rigurosamente mantenidas. El fotoperíodo artificial fue de 14 horas de luz por 10 de obscuridad. La luz se iniciaba a las 6:00 am y finalizaba a las 20:00, gracias al empleo de un medidor del tiempo eléctrico que automáticamente iniciaba la iluminación. Por otra parte la temperatura se mantuvo a 25 ± 1 °C.

Todos los animales se mantuvieron en cajas de acrílico individual con acceso libre al alimento (Purina Rat Chow) y al agua en bebederos metálicos. Todos los días a las 8:00 am se determinó el peso corporal y las condiciones generales de los animales y se cambiaba el aserrín de las cajas. Únicamente aquellos animales que se encontraban en óptimas condiciones fueron empleados en cualquiera de las dos fases experimentales.

1. REGISTROS EXTRACELULARES EN ANIMALES INTEGROS.

Inicialmente se anestesió al animal con uretano (1.25 g/Kg) por vía intraperitoneal. Una vez en el plano quirúrgico se colocaba al sujeto en una tabla de disección en decúbito dorsal y después de rasurar la región anterior del cuello se realizaba una incisión en la piel anterior del cuello y una disección de los músculos anteriores para visualizar la tráquea. A través de un corte entre los anillos traqueales se introducía una cánula de plástico del número 8, la cual se fijaba con hilo seda al resto de la tráquea. Gracias a esta traqueostomía fue posible mantener las vías aéreas permeables independientemente de la postura del animal. Posteriormente se realizaba una disección para localizar y referir a la vena yugular de lado derecho; realizado esto, a través de una pequeña flebotomía se introdujo un catéter de sylastic no. 25, hasta alcanzar la cavidad de la aurícula derecha. Este catéter, unido a una jeringa de 1 ml, fue empleado para la administración de fármacos.

Una vez concluidos ambos procedimientos, se montó la rata en un aparato esterotáxico (David Koff), localizado dentro de una cámara de Faraday. Ya fija la cabeza, se realizó una incisión media en la superficie del cráneo, la cual expuso las estructuras óseas, refinándose entonces los puntos bregma y lambda. Empleando el atlas esterotáxico de Koning y Klippel (58), se localizó las coordenadas correspondientes al hipocampo dorsal y se procedió a efectuar un

trépano de 3 mm de diámetro, en las siguientes coordenadas: AP = 3.45 mm, Lat = 1.0 mm. A través de este trépano se introdujo una micropipeta y una vez alcanzada una profundidad de 2.3 mm se buscaron células con actividad eléctrica espontánea hasta una altura de 3.8 mm.

Las micropipetas de registros, se obtuvieron de capilares de borosilicato sódico (WPI 170F), con diámetro interno de 1.7 mm y con filamento interno. Estos capilares se estiraron con un estirador vertical de pipetas (David Koff P125), el cual estuvo calibrado para dar la fuerza y temperaturas necesarias para obtener puntas de 0.8 a 1.4 μm , verificadas en un microscopio con planimetro. Este tipo de micropipetas poseen resistencias óhmicas, medidas *in situ* que oscilaban entre 23 y 34 $\text{M}\Omega$, lo cual a una frecuencia de 1 KHz, corresponde a una impedancia de 9 a 14 $\text{M}\Omega$. La micropipeta se llenó con una solución de NaCl 4M, en una solución de verde rápido saturada, lo cual le dió una coloración verde oscura a la pipeta.

Además del trépano para la introducción de la micropipeta, también se realizó otro en la región más lateral y medial del cráneo de 2 mm de diámetro, a través del cual se introdujo un tornillo de acero inoxidable de 2 mm de diámetro y 7 mm de alto, el cual funcionaba como electrodo indiferente. Por otra parte una pinza caiman atraumática colocada sobre uno de los bordes de la incisión en la piel fue utilizado como electrodo de tierra. Los tres electrodos, es decir el cable de plata clorurado introducido hasta el fondo de la micropipeta, el tornillo y la pinza caimán, fueron conectados a las entradas G2, G1 y Ground; respectivamente, de una sonda Grass de alta impedancia (HIP 517P). La salida de la misma, alimentó a un preamplificador de AC Grass modelo P511J, la cual era alimentada por una fuente de poder Grass modelo RPS 509 K. La ganancia en este amplificador era tal que 50 μV correspondían a un desplazamiento de 1 V en el osciloscopio. Además este preamplificador filtraba las señales de entrada empleando un ancho de banda de 300 Hz a 3 KHz, con un filtro de 60 Hz, en actividad todo el tiempo.

La salida del amplificador se derivó a otros tres dispositivos, primero a un osciloscopio Tektronix (2250) de doble rayo, el cual monitorizó en forma continua la salida del amplificador, hacia un audiomonitor Grass (AU 228), el cual repetió en audio la señal de salida del amplificador y hacia una tarjeta convertidora analógico-digital, ensamblada dentro de una computadora pc compatible. Esta tarjeta se encargó de capturar a una velocidad de 5 KHz la señal de entrada y empleando un dispositivo de ventana y un software diseñado por RC-electronics, llamado EGAA, analizó el número de espigas por una determinada unidad de tiempo. Una vez terminado el análisis, la computadora elaboró los histogramas de frecuencia, los histogramas acumulativos y los resultados comparativos correspondientes.

Una vez localizada una célula hipocámpal con actividad espontánea, se determinó su estabilidad y regulandad al monitorizar su actividad durante 15 minutos, sin realizar maniobra

experimental alguna. Al final de este tiempo, si la actividad de la célula no varió más allá del 20%, entonces se iniciaba la fase de registro. La duración total del registro fue de 75 minutos, divididos en 5 periodos de 15 minutos cada uno. El primer periodo correspondió al control y en él se determinó la frecuencia de descarga basal que sirvió de referencia para el resto de los periodos. Al final de este periodo se procedió a realizar la administración parenteral de alguna dosis de melatonina (0.5, 1.0 y 2.0mg/Kg) o de 5-metoxi-indol-ácido-acético (0.5, 1.0 y 2.0 mg/Kg) o en el caso de los animales controles la aplicación de un volumen de 500 μ l de solución vehiculo (Alcohol etílico 1%, polietilenglicol 20% y agua bidestilada 79%). Una vez administrado el fármaco, se procedió a registrar los 4 restantes periodos de actividad en forma continua hasta completar 60 minutos más de registro.

Tanto la melatonina (Sigma Chemicals, USA) como el 5-metoxi-indol-ácido-acético (Sigma Chemicals, USA), se prepararon inmediatamente antes de su aplicación. Para ello se pesó 2 mg de alguna de ambas sustancias y se diluyó inicialmente en 10 μ l de alcohol etílico absoluto (J.T. Baker, Méx), posteriormente se agregó 200 μ l de polietilenglicol (Sigma Chemicals, USA) y 790 μ l de agua bidestilada. De esta solución se tomó la dosis necesaria y se aforó con más agua bidestilada hasta completar 500 μ l. La administración de este volumen siempre se realizó en un tiempo de al menos 120 segundos y al final se infundía un volumen de 200 μ l, para tener la certeza de una aplicación total a través del catéter.

Una vez finalizado el registro extracelular, se aplicó una corriente catódica a través de la micropipeta con la finalidad de expulsar el colorante verde rápido de la micropipeta y depositarlo en la zona de registro, para su posterior localización. La aplicación de esta corriente se realizó con una fuente de poder Grass (Lesion Maker LM45) empleando el máximo amperaje que brindaba el dispositivo y aplicándolo por un periodo no menor a 10 minutos. Tales precauciones fueron necesarias debido a la alta resistencia de la punta de la micropipeta.

A continuación, se sacrificó al animal con una sobredosis de pentobarbital y una vez sin vida se extrajo su cerebro completo y se depositó en una frasco que contenía al menos 10 veces su volumen de una solución de formaldehído al 10%. En estas condiciones el cerebro permaneció durante al menos 5 días antes de realizar un análisis histológico lo que permitió la localización de la zona de registro. Este análisis consistió en preparar rebanadas (60-100 μ m) de tejido cerebral empleando un microtomo de congelación de todo el hipocampo, buscando la mancha verde resultado de la expulsión del colorante por la corriente catódica de expulsión. Una vez localizado este punto se cotejó la rebanada con las figuras del atlas esterotáxico y con las coordenadas utilizadas durante el registro, con ello se determinó la localización exacta de la zona registrada.

trépano de 3 mm de diámetro, en las siguientes coordenadas: AP = 3.45 mm; Lat = 1.0 mm. A través de este trépano se introdujo una micropipeta y una vez alcanzada una profundidad de 2.3 mm se buscaron células con actividad eléctrica espontánea hasta una altura de 3.8 mm.

Las micropipetas de registros se obtuvieron de capilares de borosilicato sódico (WPI 170F), con diámetro interno de 1.7 mm y con filamento interno. Estos capilares se estiraron con un estirador vertical de pipetas (David Koff P125), el cual estuvo calibrado para dar la fuerza y temperaturas necesarias para obtener puntas de 0.8 a 1.4 μm , verificadas en un microscopio con planimetro. Este tipo de micropipetas poseen resistencias óhmicas, medidas *in situ* que oscilaban entre 23 y 34 $\text{M}\Omega$, lo cual a una frecuencia de 1 KHz, corresponde a una impedancia de 9 a 14 $\text{M}\Omega$. La micropipeta se llenó con una solución de NaCl 4M, en una solución de verde rápido saturada, lo cual le dió una coloración verde oscura a la pipeta.

Además del trépano para la introducción de la micropipeta, también se realizó otro en la región más lateral y medial del cráneo de 2 mm de diámetro, a través del cual se introdujo un tornillo de acero inoxidable de 2 mm de diámetro y 7 mm de alto, el cual funcionaba como electrodo indiferente. Por otra parte una pinza caimán atraumática colocada sobre uno de los bordes de la incisión en la piel fue utilizado como electrodo de tierra. Los tres electrodos, es decir el cable de plata clorurado introducido hasta el fondo de la micropipeta, el tornillo y la pinza caimán, fueron conectados a las entradas G2, G1 y Ground; respectivamente, de una sonda Grass de alta impedancia (HIP 517P). La salida de la misma, alimentó a un preamplificador de AC Grass modelo P511J, la cual era alimentada por una fuente de poder Grass modelo RPS 509 K. La ganancia en este amplificador era tal que 50 μV correspondían a un desplazamiento de 1 V en el osciloscopio. Además este preamplificador filtraba las señales de entrada empleando un ancho de banda de 300 Hz a 3 KHz, con un filtro de 60 Hz, en actividad todo el tiempo.

La salida del amplificador se derivó a otros tres dispositivos, primero a un osciloscopio Tektronix (2250) de doble rayo, el cual monitorizó en forma continua la salida del amplificador, hacia un audiomonitor Grass (AU 228), el cual repitió en audio la señal de salida del amplificador y hacia una tarjeta convertidora analógico-digital, ensamblada dentro de una computadora pc compatible. Esta tarjeta se encargó de capturar a una velocidad de 5 KHz la señal de entrada y empleando un dispositivo de ventana y un software diseñado por RC-electronics, llamado EGAA, analizó el número de espigas por una determinada unidad de tiempo. Una vez terminado el análisis, la computadora elaboró los histogramas de frecuencia, los histogramas acumulativos y los resultados comparativos correspondientes.

Una vez localizada una célula hipocámpal con actividad espontánea, se determinó su estabilidad y regularidad al monitorizar su actividad durante 15 minutos, sin realizar maniobra

El análisis de los resultados consistió inicialmente en comparar los histogramas acumulativos de cada periodo con el histograma de la fase control. Esta comparación se realizó con la prueba de la proporción crítica de McNemar (38), la cual considera el valor promedio de ambas situaciones y establece un límite proporcional el cual, al ser rebasado, genera una diferencia estadística significativa de acuerdo a la tabla de distribución normal Z. En estas circunstancias, un valor de la prueba ± 1.96 , indica una diferencia de $p < 0.05$. Con esta información se realizó tablas en las que se resumen los incrementos o decrementos encontrados después de la aplicación de alguno de los indoles. Posteriormente, el número de periodos con incrementos o decrementos de la frecuencia de descarga para cada grupo de animales tratado con alguna de las dosis de los indoles fue comparado con el grupo de sujetos controles que recibió una aplicación parenteral de 500 μ l de la solución vehículo. Esta comparación se realizó con la prueba de X^2 .

2. REGISTROS EXTRACELULARES EN REBANADAS DE HIPOCAMPO-PARAHIPOCAMPO.

Al inicio de la sesión experimental los animales fueron anestesiados con halotano 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. Inmediatamente se removía el cerebro completo y se colocaba en una solución de sacarosa con composición similar al líquido cefalorraquídeo, la cual contiene en mM: Sacarosa 200; KCl 3; Na_2PO_4 1.25; $NaHCO_3$ 26; glucosa 10; $MgCl_2$ 0.5-0.9 y $CaCl_2$ 2. Esta solución se encontraba a 4 °C y estaba aerada 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 fue mayor a 60 segundos. Una vez inmerso el cerebro en esta solución se permitía un tiempo de 120 segundos de incubación en esta solución fría; transcurridos éstos, los dos hemisferios se separaban por un corte mediosagital y se retornaban a la solución fría hasta el momento de obtener las rebanadas, lo cual ocurría de 10 a 15 minutos después.

Antes de rebanar, cada hemisferio fue cortado individualmente en bloques y seccionado en un plano transversal de acuerdo a la técnica utilizada por Jones y Heineman (52). Este corte transversal se realizó utilizando un ángulo de 12 ° en la platina del vibrotomo (Camden, Engl.) para lo cual se preparaba una rampa de agar que daba tal inclinación y se colocaba la porción anterior del bloque de cerebro hacia la cuchilla del vibrotomo. Una vez colocado el bloque de tejido en este ángulo, se obtenían cortes de 450 μ m de grueso, con lo cual se obtenían de 4 a 6 rebanadas de hipocampo-parahipocampo bien conectadas por animal; esto es de 2 a 3

rebanadas por hemisferio. El nivel de estos cortes correspondía aproximadamente a las coordenadas AP de 6.6 a 4.6 mm posteriores al punto bregma de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (82).

Después de cortarse, cada rebanada se transfirió a una caja de petri de 5 cms de diámetro que contenía solución similar al líquido cefalorraquídeo a 4°C y sometida a una posterior disección, donde con un bisturí se aislaba el hipocampo junto con las regiones parahipocámpales adyacentes, tales como el subiculum, presubiculum, parasubiculum y la corteza entorhinal y temporal. Después de esta disección y con base en su apariencia, se seleccionaron aquellas rebanadas que serían utilizadas para el registro. Las rebanadas escogidas, se transfirieron a una cámara de equilibrio de 25 ml, la cual contuvo una solución con la siguiente composición en mM: NaCl 130; KCl 3; Na_2PO_4 1.25; NaHCO_3 26; glucosa 10; MgCl_2 0.5-0.9; CaCl_2 2. Esta solución se encontró en un baño maría que la mantuvo en una temperatura de $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y siendo areada continuamente con una mezcla de O_2 , al 95% y CO_2 al 5%. El tiempo de equilibrio en que permanecieron estas rebanadas fue de 90 a 120 minutos, para ser transferidas posteriormente a la cámara de registro.

Se utilizó una cámara de registro para rebanadas de cerebro de rata, fabricada en el laboratorio. Esta consistió de una base de acrílico (10.0 X 7.0 cm), en cuya parte central se encontró la cámara del baño de registro en donde se colocó la rebanada (3.5 cm de diámetro y 1.0 cm de altura), con una capacidad de 6 ml. Esta cámara tuvo un sistema de entrada y salida de solución, el cual suministró a la rebanada de cerebro la solución antes referida, ya burbujeada con una mezcla de O_2 al 95% y CO_2 al 5%. La cámara del baño estuvo unida por medio de un canal capilar (0.3 mm) a un pozo el cual sostuvo al tubo de succión. La cámara de registro se encontró sobre la platina de un microscopio fótico.

La solución de infusión llegó a la cámara de registro a una temperatura de $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ gracias a un sistema de contracorriente. Este sistema, empleó una bomba que hizo circular agua caliente ($40.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) por un tubo de mayor calibre (2.40 X 3.8 mm; diámetros interno y externo, respectivamente), mientras que la solución de infusión circuló, gracias a la acción de la gravedad, por un tubo de menor calibre (1.19 X 1.70 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 la solución de infusión alcanzó la cámara de baño donde se encontraba la rebanada de cerebro, su temperatura fue de $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. La velocidad de flujo de la solución de perfusión en el sistema de baño, fue de 1.5 a 2.0 ml/min, velocidad óptima para registros extracelulares (55). En estos experimentos nunca se emplearon temperaturas menores a 35°C durante el registro, porque esto tendía a decrementar

la duración de la viabilidad de las rebanadas, lo cual se detectaba por incremento substancial en la actividad unitaria de fondo y la presencia de descargas en ráfagas de aparición azarosa en la región CA₃.

El registro extracelular unitario se realizó empleando un amplificador (Grass RPS 107), conectado a un preamplificador (Grass P5 AC) y a un osciloscopio (Tektronix 2225), al que se conectó un audiomonitor (Grass AM8). Del preamplificador se conectó una sonda de alta impedancia (Grass) y de ésta se conectaron los electrodos de registro de la rebanada, y los de tierra hacia el baño y a la mesa de registro. Los microelectrodos de registro fueron fabricados con alambre de tungsteno aislado con teflon a excepción de la punta. Estos electrodos poseían un diámetro de 30 μm y su punta se colocó en la capa de los cuerpos celulares de las células piramidales de las áreas CA₁, CA₃ y giro dentado. Los microelectrodos fueron colocados dentro de la cámara de registro y colocados en los sitios elegidos de la rebanada mediante un micromanipulador (Newport MX300R), con la ayuda de un microscopio fótico (Carl Zeiss).

Las señales registradas fueron procesadas primero por el preamplificador. Siendo filtradas con filtros de baja frecuencia (300 Hz) y de alta frecuencia (1 KHz), usando siempre una amplificación de 50 X 100 y el filtro de 60 Hz. En el osciloscopio la señal amplificada fue capturada y mediante el uso de un discriminador de ventana sólo se registraron aquellas espigas que se mantenían constantes por un tiempo de 60 min. La amplitud de la ventana la cual se pudo definir fijando un valor de voltaje mínimo y máximo, fue determinada automáticamente por el programa de captura con base en el nivel de la señal registrada. La velocidad de captura utilizada siempre fue de 8 KHz por canal. Estas señales fueron enviadas a una computadora PC (Relisys), a la cual se le instaló previamente una tarjeta convertidora analógica-digital, para la captura y análisis de datos (Computerscope, R.C. Electronics). Así, las gráficas del análisis de la frecuencia de eventos contra tiempo fueron muestreadas cada 4 seg durante periodos de 15 min, grabadas y almacenadas en discos flexibles de 3.5" (2HD Verbatim), para su posterior interpretación. Algunas de estas señales también fueron reproducidas en papel empleando un polígrafo Grass modelo P7, con una frecuencia de respuesta de DC hasta 25KHz.

Para inducir la actividad epileptogénica, se aplicaron trenes de estimulación eléctrica (60 Hz, 2 seg, con duración del pulso de 100 μseg) los cuales fueron proporcionados por un estimulador Grass S88, a través de electrodos bipolares de tungsteno (A-M Systems, Everett, USA) colocados en las colaterales de Schaeffer en el stratum radiatum de la zona CA₁. (Fig. 5). El nivel de estimulación fue ajustado a cuatro veces el voltaje mínimo necesario requerido para obtener espigas poblacionales en la región hipocámpal CA₁, de 0.5 mV en amplitud. Para obtener

tal tipo de espigas poblacionales usualmente se requirieron trenes de estímulos de 8 a 10 V, 60 Hz y 2 seg de duración. Estos trenes de estimulación fueron administrados en intervalos de 10 a 30 min para asegurar una expresión completa de postdescargas sin que el tejido se encontrara en un periodo refractario postictal.

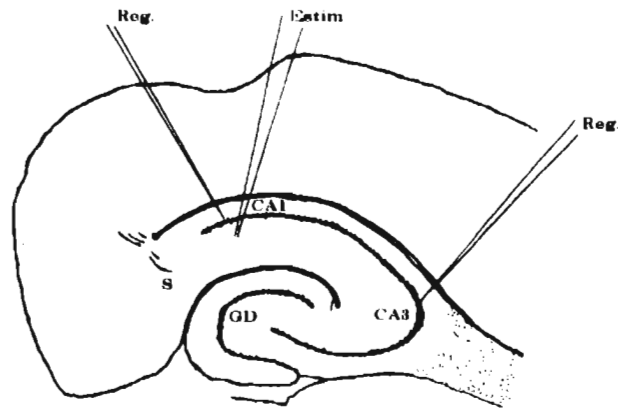


Fig. 5. Diagrama de una rebanada de la región hipocampal-parahipocampal, donde se representa la zonas de estimulación y registro empleadas en el presente estudio. Se observa la región CA1 y CA3 hipocámpicas, así como el giro dentado (GD) y el subículo (S).

3.- REGISTROS INTRACELULARES EN CELULAS PIRAMIDALES DE LA REGION CA₁

Registros convencionales intracelulares fueron realizados utilizando microelectrodos de vidrio llenos con acetato de potasio 3 M. Estos electrodos provenían de micropipetas de borosilicato potásico, estiradas en un flamómetro (Sutter A8), hasta obtener puntas con impedancias de 70 a 100 MΩ. A estos microelectrodos se les introdujo totalmente dentro de un alambre de plata clorurada, el cual estuvo conectado a la sonda de super alta impedancia (> 1 GΩ, Headstage 1A, Axon Instruments, USA). Para fines de colocación esta sonda se fijó sobre un micromanipulador (Newport MX300R) que permitió desplazamientos hasta de 0.1 μm.

Una vez colocado el microelectrodo se desplazó sobre la capa de células piramidales, monitorizando constantemente la diferencia de potencial entre este microelectrodo y el indiferente (un cable de plata clorurada, inmerso en la solución del baño). Cuando el microelectrodo se localizó en el espacio extracelular esa diferencia de potencial fue igual a 0; sin

embargo, una vez que el microelectrodo se localizó en el interior de alguna célula se detectó una caída en el potencial, la cual fue proporcional al potencial de membrana de la célula que fue penetrada. En este estudio se analizaron sólo aquellas neuronas que mostraron un potencial de membrana mayor a -65 mV y que poseían una resistencia de entrada de la membrana mayor a 40 M Ω . Valores inferiores a los mencionados, sugirieron que las condiciones generales de estas células estaban decayendo.

La resistencia de entrada de estas células se calculó mediante la deflexión de voltaje producida por pulsos de corriente hiperpolarizante (0.1-0.3 nA), de 50 msec. de duración. Aunque en muchos de los casos el potencial de reposo no cambió a través del experimento, oscilaciones pequeñas y aleatorias durante el período de lavado fueron compensadas manualmente cuando así se requería.

Los efectos de los fármacos en los registros intracelulares, se midieron sobre las respuestas sinápticas provocadas en el área CA₁. Para ello, las fibras de las colaterales de Schaeffer y comisurales fueron estimuladas con pulsos eléctricos (0.1-0.3 mA, 20-40 msec, 0.05-0.066 Hz), aplicados a través de microelectrodos bipolares, conectados a una unidad de aislamiento y corriente constante fotoeléctrica (Grass PES40) localizados en el stratum radiatum. Los potenciales postsinápticos excitadores y los inhibidores fueron registrados en células piramidales de la región CA₁ utilizando un amplificador Axoclamp-2B (Axon Instruments, USA). Las respuestas evocadas fueron digitalizadas a 25 o 100 KHz con una interfase TL1 (Axon Instruments, USA), dependiendo de si se estudiaban potenciales postsinápticos o potenciales de acción, respectivamente. Estos datos fueron entonces analizados en una computadora 486 PC compatible (Digital, USA) usando el software de PClamp (Axon Instruments, USA).

Se determinó la máxima amplitud del potencial postsináptico con respecto a la línea basal. Esta línea basal se consideraba como el valor medio de la señal, tomada a través de una ventana de 2-5 msec, precediendo al artefacto de estimulación. Los datos fueron normalizados con respecto a los valores medios de las respuestas en un período control de 20 min, antes de la aplicación de los fármacos. Los resultados se expresaron como medias \pm error estándar de la media. Las diferencias estadísticas entre los efectos provocados por los fármacos empleados se analizaron a través del empleo de la prueba de ANOVA de uno o dos factores de repetición y a través de la prueba t de Student de dos colas.

Los fármacos que se emplearon fueron: melatonina, 5-metoxi-indol-ácido-acético, bicuculina, picrotoxina, clonazepam, flumazenil y GABA; todos ellos obtenidos a través de Sigma Chemicals (USA).

Estos fármacos se disolvían en sus respectivos solventes en concentraciones que

oscilaron entre 10^{-9} y 10^{-4} , se depositaron en un sistema de jeringas cuya salida, realizada por un tubo de silastic del no. 27, se controló a través de una pinza manual. Todos los tubos de silastic se conectaron a un sistema de capilares de vidrio, incluidos dentro de un tubo de plástico el cual les proporcionó el baño maría, que calentó hasta 35°C la solución que contenía a los fármacos y que estuvo montado sobre un micromanipulador (Narishige 432R), permitiéndole desplazamientos de hasta $1\ \mu\text{m}$. La punta de los capilares de este sistema se visualizó a través del microscopio por lo cual fue factible colocar esta punta en las inmediaciones de la célula que se estuvo registrando. Al quitar la pinza manual, la solución que contenía el fármaco a una temperatura de 35°C , fluía hacia la célula que se estuvo registrando a una velocidad de $100\ \mu\text{l}$ por minuto.

RESULTADOS

1. REGISTROS EXTRACELULARES EN ANIMALES INTEGROS

Para esta fase experimental se utilizaron 81 ratas. Catorce de estos animales recibieron una aplicación de vehículo y por lo tanto constituyen el grupo control. Por otro lado, 34 de estos sujetos recibieron la aplicación de ya sea 0.5 (n = 9), 1.0 (n = 9) ó 2.0 mg/Kg (n = 16) de melatonina por vía intravenosa, con lo cual se generan los grupos 2, 3 y 4, respectivamente. Finalmente los restantes 33 sujetos recibieron una aplicación de ya sea 0.5 (n = 10), 1.0 (n = 12) ó 2.0 mg/Kg (n = 11) de 5-metoxi-indol-ácido-acético también por vía endovenosa.

El promedio de descarga de todas las células registradas en el hipocampo fue de 2.39 ± 0.63 espigas/seg. con un rango entre 0.058 y 13.89 espigas/seg. El 88% de estas neuronas mostraron descargas unitarias únicas, es decir, potenciales de acción trifásicos con un patrón negativo-positivo-negativo y un voltaje que osciló entre 1.8 a 8 mV, lo cual proporcionó una proporción espiga-ruido cercana a 6:1. Proporción suficiente para realizar un buen nivel de discriminación a través de la ventana. El 12% de las espigas registradas mostraron descargas tipo ráfagas, caracterizadas por la presencia de 3 a 4 espigas, con la peculiaridad de que la primer espiga siempre fue la de mayor tamaño y las subsecuentes mostraron una reducción hasta que la última poseía aproximadamente el 60% del tamaño de la primer espiga. (Fig 6) La duración de las tres ondas que conformaban las espigas registradas, siempre oscilaron entre 2.5 y 3 mseg. y esta no presentó variaciones por modificaciones de la frecuencia de descarga. La aplicación de alguno de los fármacos utilizados en el presente estudio, sólo modificó la frecuencia de descarga, ni la duración, ni el patrón de las espigas observado se modificó por maniobra experimental alguna.

Las neuronas del hipocampo registradas mostraron una alta sensibilidad a los efectos de la melatonina. La aplicación de esta hormona indujo efectos que fueron dependientes de la dosis y del tiempo transcurrido entre la administración del fármaco y la realización del registro. Esto es, los cambios observados en el último periodo de 15 minutos fueron diferentes a los encontrados en el primero. Una dosis de 0.5 mg/Kg de melatonina modificó la actividad del 23.5% de las espigas registradas, de este porcentaje el principal efecto fue un incremento en la frecuencia de descarga, el cual se presentó en el 21% de las unidades. Mientras que sólo el 2.5% restante mostró un decremento en este parámetro celular. Por otro lado, la aplicación de una dosis de 1.0 mg/Kg, provocó una situación muy diferente. Primero, en este caso el 84.4% de las neuronas mostró algún efecto en su frecuencia; de este total, el 80.5% redujo tal actividad, mientras que

solo el 2.9% la incrementó. Esto es, la situación fue opuesta a la encontrada con la dosis menor

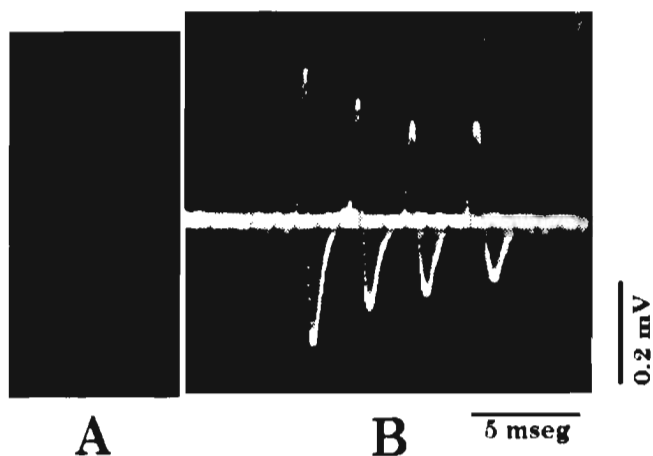


Fig. 6. Los registros extracelulares del hipocampo mostraron la presencia de dos tipos de descarga neuronal. A descargas únicas trifásicas con duración de 3 a 4 mseg y voltaje cercano a 1 mV. B descargas en ráfagas de 4 a 6 espigas con una reducción paulatina en el voltaje. Este tipo de descarga fue el menos frecuentemente observado.

En el caso de las unidades registradas después de la infusión de 2.0 mg/Kg, éstas mostraron efectos en el 45.8% de las unidades analizadas. El 18.2% de estas neuronas incrementaron su actividad y el 27.6% la decrementó (Fig. 7 y Cuadro 1).

La intensidad de los incrementos y los decrementos provocados por la melatonina fueron proporcionales a la dosis empleada, esto es, mientras mayor la dosis, la intensidad y duración del efecto fue más importante. Estos efectos se iniciaron aproximadamente entre 1 y 3 minutos después de la aplicación de la hormona y perduraron un mínimo de 30 minutos (Figs. 8 y 9).

En términos generales sin embargo, los efectos depresores tendían a persistir durante más tiempo que los excitadores. Las respuestas inducidas por la melatonina siempre fueron monofásicas, es decir, una vez que la neurona mostraba un efecto depresor o excitador, este efecto se mantenía durante todo el experimento (Cuadro 1), sin cambiar su dirección. Considerando toda la población de neuronas registradas bajo los efectos de la melatonina ($n = 34$) y los 4 periodos de 15 minutos de registro, encontramos que el 50.97% de toda la población

fue sensible a los efectos de la hormona, por lo que el 49.03% no fue afectada en algún momento por este indol. Del total de neuronas afectadas, apenas un 13.98% respondió con un incremento de su actividad, mientras que el 36.99% lo hizo a través de un decremento en su frecuencia de descarga.

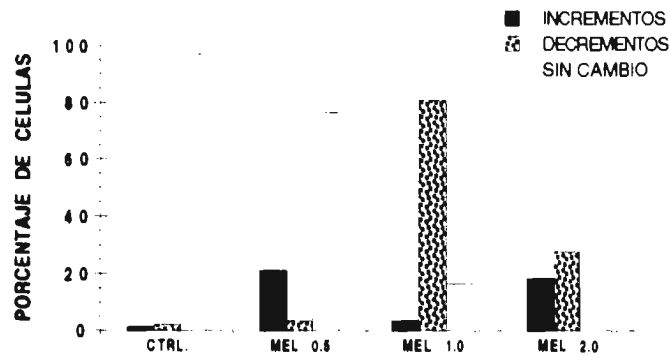


Fig. 7. Histograma de frecuencias que relaciona el porcentaje de células afectadas por alguna de las dosis utilizadas de melatonina. Se observa que la dosis menor provoca principalmente un incremento, mientras que las dos mayores inducen decrementos de la frecuencia de descarga.

Cuadro 1. Porcentaje de células tratadas con alguna de las dosis de melatonina empleadas y que mostraron cambios significativos en su frecuencia de descarga según la prueba de McNemar

n	15'			30'			45'			60'			
	↑	↓	↔	↑	↓	↔	↑	↓	↔	↑	↓	↔	
Control	14	11	23	96.6	14	13	97.3	13	23	96.4	14	21	96.5
*MEL 0.5	9	11	11	77.8	22	0	77.8	22	0	77.8	28	0	71.4
**MEL 1.0	9	0	55	68.8	0	88	111	0	100	0	111	77	111
**MEL 2.0	16	18	12	68.8	25	25	50	12	31	4	56	3	41

↑ = Incremento ↓ = Decremento ↔ = Sin cambio MEL = Melatonina
* p < 0.05, ** p < 0.01, al compararlos con el control, de acuerdo con la prueba de X²

La aplicación del otro indol de la pineal, el 5-metoxi-indol-ácido-acético, provocó efectos similares a los inducidos por la melatonina. Este indol fue aplicado en 33 ratas, lo que corresponde a 33 unidades. La sensibilidad de las neuronas hipocampales a este indol fue

mayor que la observada con respecto a la melatonina (Cuadro 2 y Fig 10).

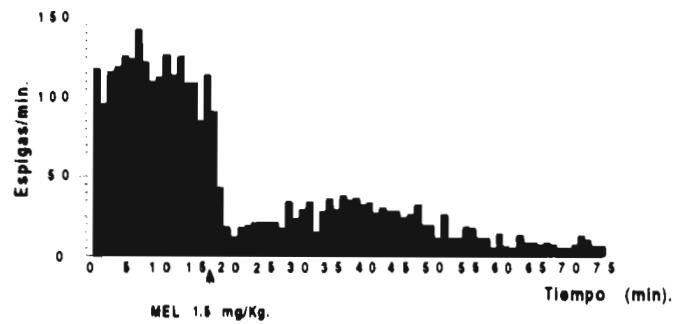


Fig. 8. El efecto más frecuentemente observado después de la aplicación endovenosa de melatonina fue un decremento en la frecuencia de descarga. Este efecto presentó una latencia de entre 1 y 3 minutos y usualmente persistía durante todo el tiempo que se mantenía el registro.

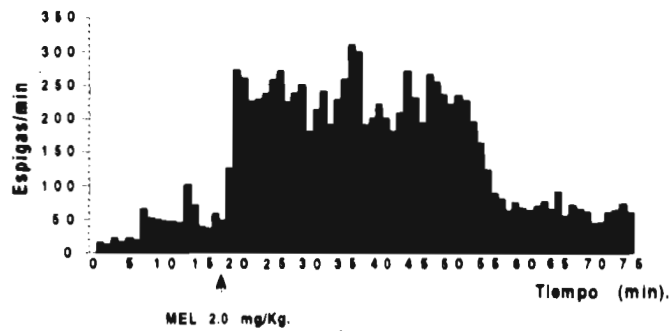


Fig. 9. También la aplicación endovenosa de melatonina provocó incrementos en la frecuencia de descarga, sin embargo, este efecto sólo se observó en el 13.98% de las unidades registradas. Además este incremento mostró una duración menor a los efectos depresores del indol.

Cuadro 2 La administración endovenosa de 5-metoxi-indol-3-ácido-acético modificó en mayor intensidad la frecuencia de descarga de las 33 neuronas hipocampales registradas. En esta tabla se resumen el porcentaje de células afectadas de acuerdo a la prueba estadística de McNemar, con respecto a los 4 periodos de registro y la dirección de tal efecto

	n	15'			30'			45'			60'		
		↑	↓	↔	↑	↓	↔	↑	↓	↔	↑	↓	↔
Control	14	1.1	2.3	96.6	1.4	1.3	97.3	1.3	2.3	96.4	1.4	2.1	96.5
**5-MT 0.5	10	22.2	35	42.8	0	71.4	28.6	0	42.9	57.1	14.3	28.6	57.1
***5-MT 1.0	11	7.15	59.5	33.3	11.1	55.6	33.3	22.2	55.6	22.2	22.2	33.3	44.5
***5-MT 2.0	12	0	82.1	17.8	0	85.7	14.3	0	100	0	0	100	0

↑ = Incremento ↓ = Decremento ↔ = Sin Cambio 5-MT = 5-metoxi-indol-3-ácido-acético

** p < 0.05, cuando se compara con el grupo control empleando la prueba de X²

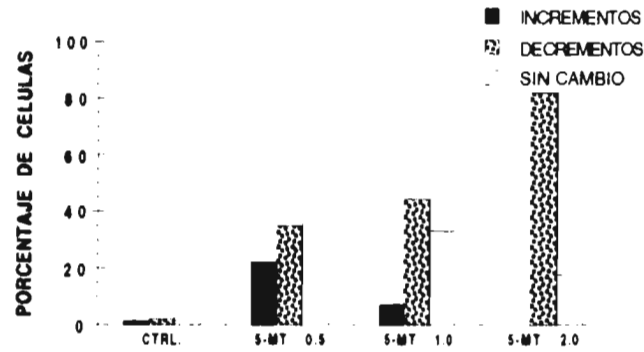


Fig. 10. Los efectos desencadenados por el 5-metoxi-indol-3-ácido-acético (5-MT) fueron dependientes de la dosis. Así, conforme la dosis se incrementó se observó un incremento en el número de células que mostraron una reducción en su frecuencia de descarga, pero una disminución en aquellas que la incrementaron o que no respondieron a la hormona.

En este caso en particular, se observa que esta hormona indujo algún tipo de efecto en el 70.76% de las neuronas registradas; mientras que sólo el 29.24% de las mismas no presentó cambio alguno, del total de células que respondieron el 8.27% lo hizo a través de un incremento de su frecuencia de descarga, mientras que el 62.49% lo hizo por una reducción del mismo parámetro. Estos datos contrastan con los encontrados por melatonina, en los cuales el 50.97%

de las neuronas responden y el 49.03% no mostró cambio alguno. Otra diferencia en cuanto a los efectos provocados por estos dos indoles, es que los efectos provocados por el 5-metoxi-indol-ácido-acético, fue la dependencia con respecto a la dosis que mostraron las células que respondieron a esta última hormona. Esto es, los efectos depresores se incrementaron conforme se incrementó la dosis del fármaco, mientras que las células que respondieron con una excitación se redujeron considerablemente con el aumento de la dosis, correspondientemente el número de neuronas que no responde se reduce al incrementar la dosis (Fig. 10). Al igual que la melatonina, la aplicación endovenosa de esta hormona no provocó cambios en parámetros diferentes a la frecuencia de descarga, entonces, ni la morfología, la duración o el tamaño del potencial de acción se modificó en presencia del 5-metoxi-indol-ácido-acético. También la dinámica de los incrementos o decrementos de la frecuencia de descarga, fueron muy similares a los observados con la aplicación de melatonina (Figs. 8 y 9)

2. REGISTROS EXTRACELULARES EN REBANADAS DE HIPOCAMPO-PARAHIPOCAMPO DE RATA

Se analizó el efecto de la melatonina, GABA, bicuculina, picrotoxina, clonazepam, y flumazenil en 58 rebanadas de hipocampo-parahipocampo provenientes de 58 cerebros de rata.

La aplicación de trenes de estimulación a las colaterales de Schaeffer, primero indujo postdescargas primarias, las cuales progresaron en duración y complejidad con cada tren de estimulación sucesivo, hasta que alcanzaban un máximo en amplitud y duración, lo cual ocurrió en la mayoría de los casos entre el quinto y el séptimo tren de estimulación aplicado (Fig. 11). Estas postdescargas primarias, fueron registradas en las tres zonas elegidas para registro, por lo que es posible que puedan encontrarse en todo el hipocampo. Estas postdescargas primarias continuaron desarrollándose dentro de un evento que consistió de una fase de descarga inicial tónica seguida por un periodo de quiescencia, lo cual nuevamente fue seguido por una fase de descargas en ráfaga o de potenciales simples fásicos, a la cual se le refiere como la postdescarga secundaria. Algo importante de mencionar es que cada una de las regiones registradas dentro de la rebanada mostró una sincronía casi total con las otras regiones, durante cada una de estas fases.

El origen de este periodo silente entre la postdescarga primaria y la secundana, podría ser una reducción en la excitabilidad de la neurona piramidal; sin embargo, esta podría también ser consecuencia de una despolarización sostenida en un nivel tal que podría bloquear la

génesis de potenciales de acción. Para resolver esta cuestión decidimos registrar intracelularmente a neuronas piramidales de la región CA₃, en forma simultánea a la estimulación de estas colaterales de Schaeffer. Los resultados nos mostraron que la fase quiescente en realidad es una fase de fuerte despolarización sostenida de estas neuronas hipocampales resultado de la estimulación repetida de estas colaterales (Fig 12).

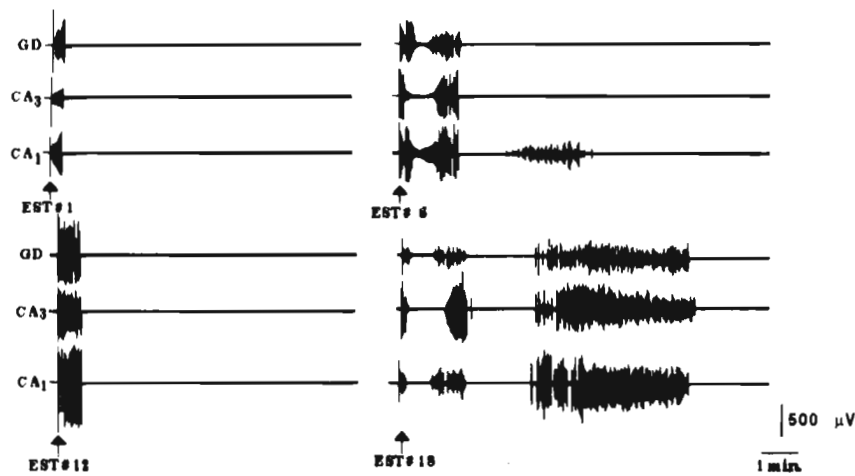


Fig. 11. Se muestra el desarrollo de postdescargas primarias y secundarias en las rebanadas de hipocampo-parahipocampo con la aplicación repetida de trenes de estimulación en las colaterales de Schaeffer, se muestra la respuesta de los estímulos 1, 6, 12 y 18 y los registros extracelulares en las regiones del giro dentado (GD), en la capa de células piramidales de la región CA₃ y CA₁. En cada caso la flecha está señalando el artefacto de estimulación correspondiente. Se observa como la postdescarga primaria incrementa su complejidad conforme se repiten los trenes de estimulación y el desarrollo de un evento espontáneo secundario, el cual se presenta tiempo después de terminada la postdescarga primaria.

Las postdescargas secundarias frecuentemente se transformaron en dos variedades distintas de actividad epileptiforme auto-sostenida, convirtiéndose ya sea en series de actividad espontánea cíclica, muy similar a la observada en los registros de actividad convulsiva ictal de intervalos cortos (cada 10-15 min), lo cual ocurrió en el 45.6% de las rebanadas estimuladas, o bien hacia una actividad con descargas epileptiformes continuas, las cuales podían durar más

de 60 minutos (Fig 14). Esto último se presentó en el 54.4% de las mismas.

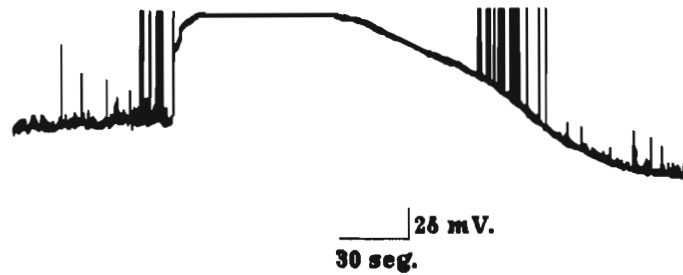


Fig. 12. Registros intracelulares de una neurona piramidal de la región CA₃ durante un periodo silente, también conocido como periodo interictal, donde se observa una importante despolarización de esta célula, lo cual incluso reduce en su totalidad la probabilidad de generar potenciales de acción.

Como se observa en la figura 11, después del desarrollo de la postdescarga primaria, una postdescarga secundaria empieza a aparecer, usualmente entre el 6o y el 9o estímulo. Esta postdescarga secundaria aparece entre 2 a 5 minutos después de la aplicación de tres estímulos y aunque inicialmente no posee mucha duración ni intensidad, ésta empieza a progresar en forma muy significativa tanto en amplitud como en duración con la estimulación repetida (Fig. 13).



Fig. 13. En el estímulo 24, cuyo artefacto de estimulación se encuentra señalado por una flecha, tanto la postdescarga primaria como la secundaria se han incrementado significativamente. La secundaria se presenta en forma alterna con periodos de quiescencia, con una relación temporal muy similar a los periodos interictales de las crisis convulsivas. El 45.6% de las neuronas presentó tal actividad.

El desarrollo de la epileptogénesis progresó en forma constante y continua en medios que tuvieron concentraciones de Mg^{2+} de entre 0.9 y 0.5 mM, sin embargo con concentraciones de 0.5 mM, la actividad epileptogénica se indujo mucho más rápidamente, en estas condiciones esta actividad pudo observarse incluso después del 40. estímulo y la actividad fue considerablemente más intensa y de mayor duración. El disminuir la concentración de Mg^{2+} , no modificó sin embargo, el porcentaje de rebanadas que mostraron el tipo de descarga ictal o el patrón de actividad continuo.

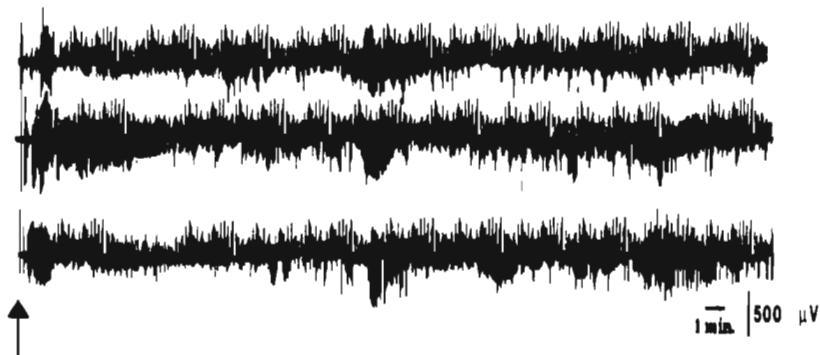


Fig. 14. El 54.6% de las rebanadas registradas desarrolló como postdescarga secundaria, después del 26avo estímulo, cuyo artefacto de estimulación se señala con la flecha, una actividad auto-sostenida la cual era continua y constante durante más de 80 minutos, con pequeñas oscilaciones que no mostraron un patrón en especial.

La aplicación de melatonina al baño de tejido en concentraciones que oscilaron entre 10^{-8} y 10^{-6} , redujo en forma considerable la presencia de ambos tipos de actividad epileptogénica, tal como se muestra en la figura 15. En particular en esta rebanada, la aplicación de una dosis de 10^{-6} de melatonina, aplicada después del estímulo 24 y después de 8 minutos de iniciada la postdescarga secundaria, provocó a partir de aproximadamente 6 minutos una reducción de esta actividad epileptogénica. Tales efectos se iniciaron en la región CA_3 , posteriormente en la región del giro dentado y finalmente en la zona de CA_1 . Una vez que el efecto de la melatonina se manifestó, sólo espigas de esporádica aparición se observaron. Sin embargo, una vez que se retiró a la melatonina del baño, por el cambio de solución, esta actividad epileptogénica

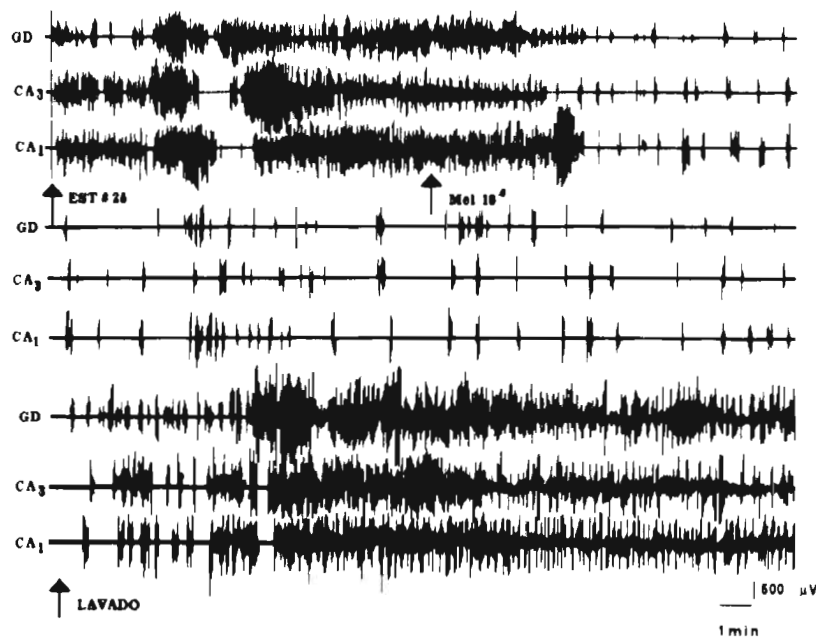


Fig. 15. La adición de melatonina al baño de la rebanada en concentraciones que oscilaron entre 10^{-9} y 10^{-6} , redujeron en forma significativa la presencia de esta actividad epileptogénica. Los efectos mostraron una latencia de entre 6 y 8 min, siendo la región CA₃ la primera en mostrarla. Estos efectos son transitorios y dependen de la presencia de la melatonina en el baño; ya que la eliminación de la misma, al cambiar la solución de perfusión, induce nuevamente la aparición de tal actividad

Por otra parte la adición de GABA en concentraciones que oscilaron entre 10^{-9} y 10^{-7} , también provocaron efectos similares, aunque con una cinética diferente. Inicialmente, la latencia de estos efectos fue mucho menor que con la melatonina. La administración de GABA en concentración de 10^{-7} reduce casi en su totalidad la actividad epileptogénica a partir de 1 a 2 minutos después de su aplicación (Fig 16).

Tanto cualitativamente como cuantitativamente el efecto del GABA sobre las espigas poblacionales fue mayor que el mostrado por la melatonina. Además, la adición de la bicuculina en concentraciones desde 10^{-9} hasta 10^{-6} (Fig. 16) o de picrotoxina (de 10^{-7} hasta 10^{-4}), ambos bloqueadores de receptores GABA_A, revirtieron totalmente la inhibición provocada por la

administración del neurotransmisor. De igual forma, la eliminación del GABA de la solución de perfusión, provocó que la actividad epileptogénica de la rebanada regrese a las condiciones basales que poseía antes de la administración

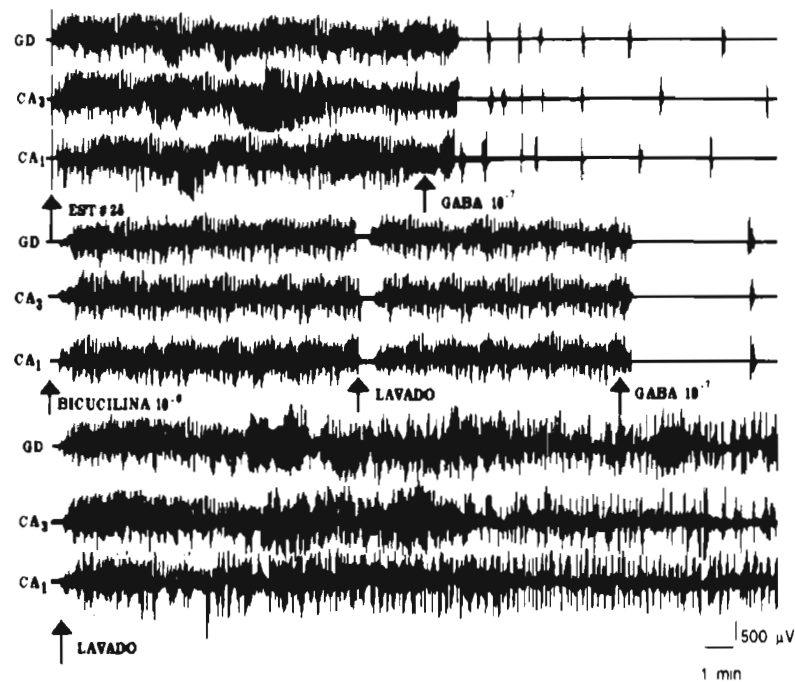


Fig. 16. En una situación experimental similar, la administración de GABA en una concentración de 10⁻⁷ después de la aplicación del estímulo 25, provocó una reducción de la actividad epileptogénica, con una latencia menor al efecto provocado por la melatonina. Esta inhibición, se reduce considerablemente cuando se añade al baño una concentración del 10⁻⁶ de bicuculina. Después del lavado, una nueva adición de GABA, provó el mismo tipo de inhibición el cual finalizó al eliminar al fármaco de la solución a través del lavado.

En 8 rebanadas se analizó también el efecto del clonazepam, una benzodiazepina con propiedades anticonvulsivas clínicas y experimentales bien documentadas, sobre este tipo de actividad epileptogénica generada por la estimulación repetida de las colaterales de Schaeffer.

Los resultados de esta maniobra experimental se muestran en la figura 17

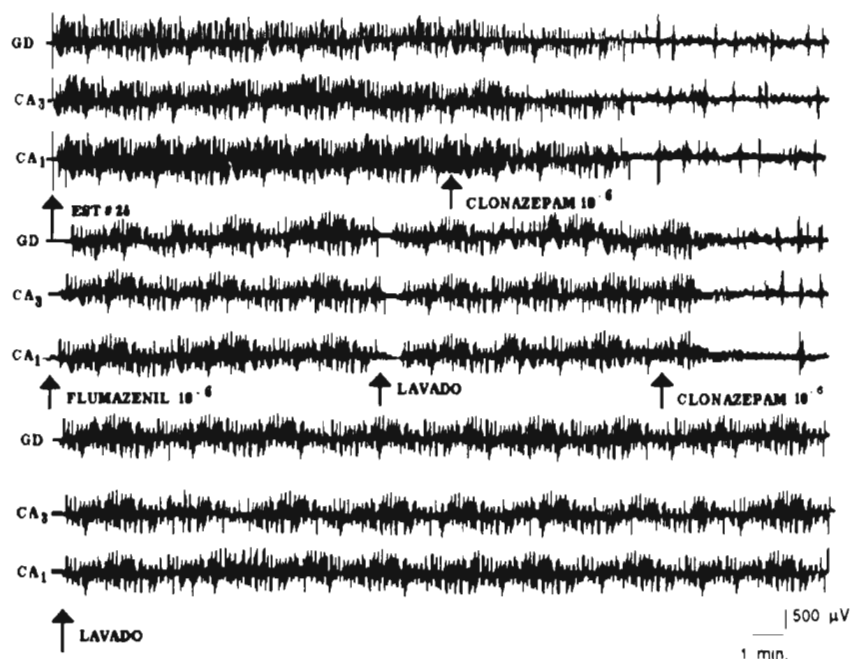


Fig. 17. En esta rebanada se muestra que después del estímulo no. 25 se desencadenó un tipo de actividad auto-sostenida, característica de un estado convulsivo continuo. En estas condiciones la adición de clonazepam reduce considerablemente tal actividad. Este efecto es bloqueado por el flumazenil un antagonista de receptores benzodiazepínicos. Una vez retirado el antagonista, los efectos del clonazepam volvieron a manifestarse. Calibración, la barra horizontal equivale a 1 min, mientras que la barra vertical equivale a 500 μ V.

Aunque la inhibición de este tipo de descarga por parte del clonazepam no fue total, los efectos se muestran significativos y son revertidos por el flumazenil o por el lavado de la preparación. Finalmente con este paradigma experimental se analizó el efecto de los dos bloqueadores de receptores GABA_A, picrotoxina y bicuculina utilizados en el presente estudio, y del bloqueador de receptores a benzodiazepinas empleado, flumazenil, sobre la respuesta inducida por la aplicación de la melatonina. Los resultados de tal interacción se muestran en la figura 18.

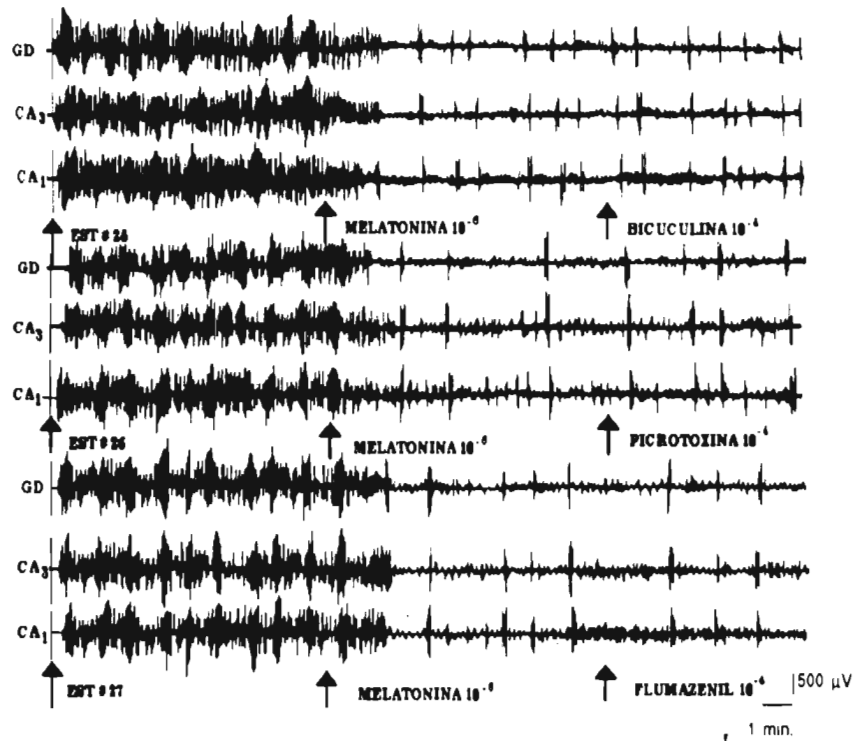


Fig. 18. Registros representativos que muestran la ausencia de efecto de la bicuculina, la picrotoxina y el flumazenil, sobre la respuesta inhibitoria de las espigas poblaciones provocada por la adición de una solución con una concentración de 10^{-6} de melatonina. Los efectos de esta hormona se indujeron sobre la actividad, autosostenida y de gran intensidad, provocada por el tren de estímulos 25, 26 y 27. Las flechas indican el cambio de la solución con el fármaco respectivo. La calibración horizontal corresponde a 1 min, mientras que la vertical a $500 \mu\text{V}$.

En esta circunstancia, aunque la picrotoxina y la bicuculina antagonizan en forma muy significativa el efecto depresor de la administración de GABA, ambos fármacos no inducen efecto alguno sobre las acciones depresoras de la melatonina. Similarmente, aunque el flumazenil, también revierte los efectos depresores del clonazepam, su administración en

rebanadas de hipocampo-parahipocampo que muestran el efecto inhibitor de la melatonina, no modifica en forma significativa esta respuesta. Estos resultados sugieren un efecto de la melatonina independiente de las acciones GABAérgicas descintas.

La figura 19 resume los resultados encontrados con los experimentos de registros extracelulares en rebanadas de hipocampo-parahipocampo. En ella se observa que ni los bloqueadores de receptores GABA_A, ni el bloqueador de receptores a las benzodiazepinas modificaron la respuesta provocado por esta la hormona indólica de la pineal.

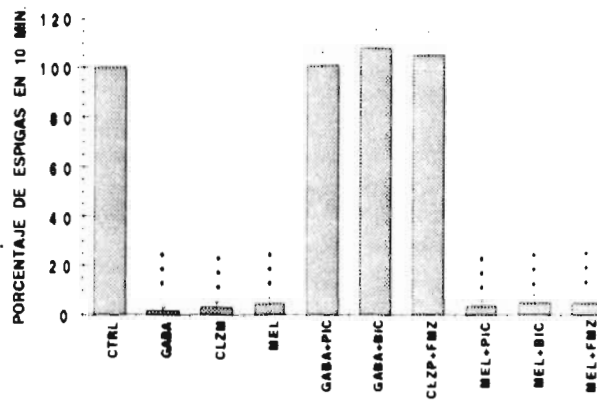


Fig. 19. Histograma que resume los efectos de los diferentes fármacos empleados, sobre el número de espigas poblacionales inducidas por la estimulación eléctrica de las colaterales de Schaeffer. El número total de espigas obtenido durante 15 minutos en la situación control (CTRL), fue considerado como el 100% y fue el punto de referencia para comparar el número de espigas, también durante 15 minutos, bajo los diferentes tratamientos. Se muestra que la aplicación de GABA, clonazepam (CLZM) y melatonina (MEL) provocaron una reducción significativa ($p < 0.01$) de este parámetro. Sin embargo, la aplicación de picrotoxina (PIC) y bicuculina (BIC) bloquearon los efectos de GABA, mientras que el flumazenil (FMZ) hizo lo correspondiente con los efectos del clonazepam. En el caso de la melatonina ninguno de los tres fármacos bloqueadores, provocaron algún efecto significativo sobre sus acciones. *** = $p < 0.01$.

REGISTROS INTRACELULARES EN CELULAS PIRAMIDALES DE LA REGION CA₁

Se realizó el registro intracelular de 34 neuronas piramidales de la región CA₁, hipocampal.

En promedio estas células manifestaron un potencial de membrana de -69.8 ± 9.4 mV, con una resistencia de entrada de 58.9 ± 12.4 M Ω , los cuales se mantuvieron fijos por al menos un periodo de 90 minutos. En estos registros se analizó el efecto de los fármacos sobre los potenciales postsinápticos excitadores provocados por la estimulación de las fibras colaterales-comisurales de Schaeffer y los cambios en el nivel del potencial de membrana inducidos por la aplicación de pulsos de solución conteniendo los diferentes fármacos.

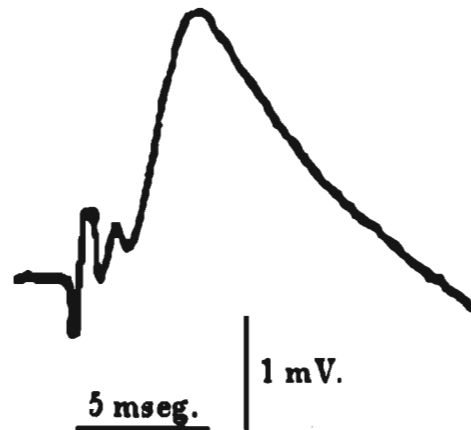


Fig. 20. La estimulación con pulsos únicos de las colaterales de Schaeffer provocó potenciales excitadores postsinápticos en la neuronas piramidales como el que aquí se muestra.

La estimulación eléctrica con pulsos únicos (0.1 mA, 30 msec) aplicados cada 30 seg, induce respuestas eléctricas intracelulares como las que se observan en la figura 20, en el 74.3 % de las neuronas piramidales registradas. En estos registros se observaron dos componentes bien diferenciados, uno de corta latencia, 1.2 ± 0.04 msec, de poca amplitud, 0.32 ± 0.02 mV y el otro de mayor latencia 5.9 ± 0.9 msec y amplitud de 2.84 ± 0.8 mV. El primero de ellos corresponde a la descarga de fibras aferentes, mientras que el segundo corresponde propiamente al potencial postsináptico excitador.

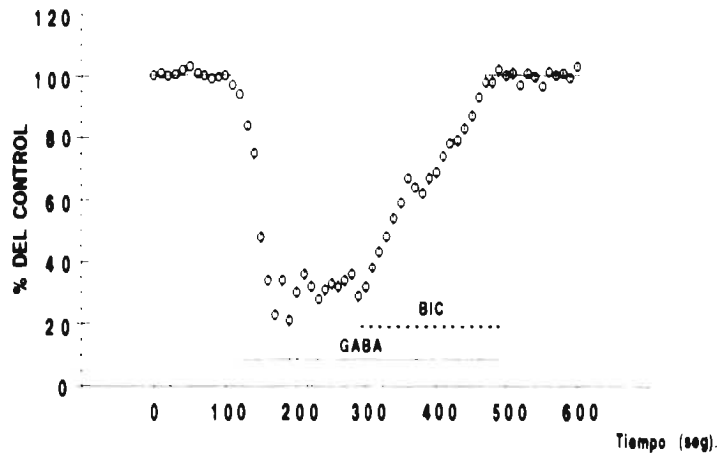


Fig. 21. La adición del ácido gama amino butírico (GABA) en una concentración de 10^{-6} , reduce el tamaño del potencial excitador postsináptico, sin modificar la descarga de las fibras aferentes. La acción de este neurotransmisor redujo el pico máximo hasta un valor del 24.5% del valor observado durante la situación control. Este efecto fue bloqueado enteramente por la adición de bicuculina 10^{-4} a la solución del baño. Se muestra el promedio de 8 registros \pm el error estándar.

La adición de concentraciones crecientes de GABA (10^{-9} a 10^{-4} M) a la solución del baño redujo en forma muy significativa el tamaño del potencial postsináptico excitador. La concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) del GABA en este efecto fue de 1.352×10^{-6} M. Por otra parte, aunque la adición de GABA no modificó la latencia de la respuesta, la duración de la misma sí se encontró reducida, entre un 18 a un 63%, después de la administración de este neurotransmisor. Una vez que los efectos del GABA se mostraron en toda su intensidad se procedió a la adición de bicuculina en varias concentraciones (10^{-7} a 10^{-4} M) al baño; la realización de esta maniobra experimental bloqueó consistentemente el efecto provocado por el GABA, dosis de 10^{-4} M el bloqueo observado fue total, con lo cual la intensidad del potencial retomó a su condición original (Fig. 21). Ni la latencia, ni la amplitud o la duración de la onda de descarga aferente se vio modificada en alguna forma por la adición ya sea de GABA o

bicuculina. Cuando este mismo procedimiento experimental se repitió pero ahora con la aplicación de Clonazepam en dosis de 10^{-7} a 10^{-4} M, y utilizando flumazenil (10^{-6} a 10^{-4} M) como agente bloqueador se observó lo que se muestra en la figura 22

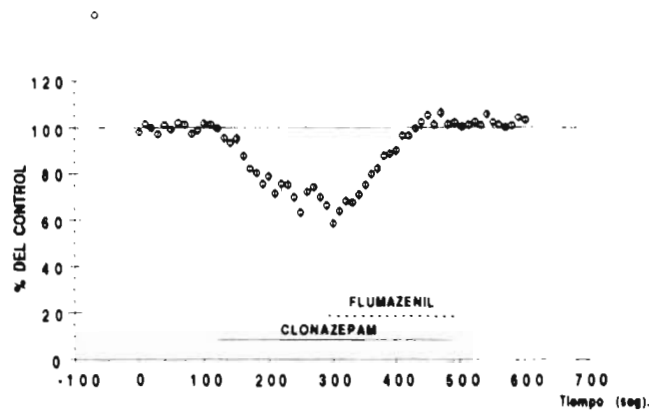


Fig. 22. Se representa el efecto del Clonazepam sobre la amplitud del potencial postsináptico excitador registrado intracelularmente en las neuronas piramidales de la región CA₁ hipocámpal y provocado por la estimulación de las fibras colaterales de Schaeffer. Esta benzodiazepina provocó una reducción importante de este parámetro, el cual fue bloqueado por la administración conjunta de flumazenil. Se muestra el promedio de 8 registros \pm el error estándar.

También el clonazepam redujo en forma significativa el tamaño de este potencial, aunque con menos intensidad que el efecto provocado por el GABA. En el caso de la benzodiazepina, el efecto máximo observado con la concentración más elevada (10^{-4} M) fue una reducción del $43 \pm 4.8\%$ y la Cl_{50} calculada de la curva dosis respuesta realizada fue de $5.7 \pm 2.6 \times 10^{-5}$ M. Este efecto es bloqueado también en forma consistente por el flumazenil (10^{-6} a 10^{-4} M), lo que sugiere una acción mediada a través de receptores benzodiazepínicos. Al igual con lo que ocurrió con la adición de GABA, la aplicación de clonazepam al baño de la rebanada no modificó en forma alguna, la latencia, duración o amplitud del primer componente del registro es decir, de la descarga aferente.

En el caso de la aplicación de melatonina (10^{-8} a 10^{-4} M), el resultado fue muy diferente. Con las dosis estudiadas no se modificó la amplitud, duración o latencia del potencial postsináptico excitador, aunque con la concentración más alta de melatonina

empleada (10^{-4} M), se observó una reducción del 29 % del potencial de las fibras aferentes. Este efecto no fue modificado de alguna forma por la administración de flumazenil o de picrotoxina o bicuculina.

Finalmente en 12 neuronas, analizamos el efecto de la aplicación, empleando una bomba de micropresión, de diferentes concentraciones (10^{-9} a 10^{-6} M) de GABA y melatonina (10^{-7} a 10^{-3} M) sobre el nivel del potencial de membrana de las células piramidales de la región CA₁. La figura 23, muestra un resultado representativo de la aplicación de GABA en estas condiciones

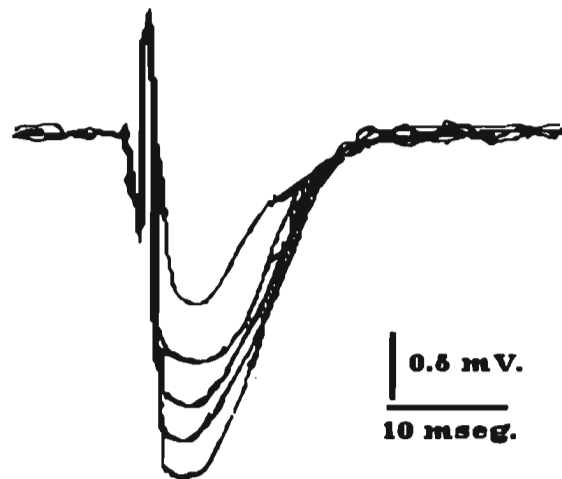


Fig. 23. Cinco registros representativos del efecto de la aplicación de un pulso de $0.1 \mu\text{L}$ de 5 diferentes concentraciones de GABA (10^{-9} a 10^{-4} M) sobre el potencial de membrana de las células piramidales de la región CA₁ hipocámpal. Cada aplicación provocó una hiperpolarización, la cual es directamente proporcional a la concentración empleada. La onda positiva inicial, es consecuencia del artefacto provocado por el movimiento de la micropipeta al aplicar la micropresión. El pulso de expulsión tuvo una duración de 2 msec.

Por otra parte, la aplicación de melatonina no indujo cambio alguno significativo sobre el nivel del potencial de membrana de estas neuronas, incluso en concentraciones tan elevadas como 10^{-3} M. Las oscilaciones del potencial observadas durante la administración de melatonina, fueron muy similares a las observadas con la administración de solución vehículo.

DISCUSION

Los resultados del presente estudio muestran que el hipocampo es una estructura sensible a los indoles de la glándula pineal. Además que en preparaciones de hipocampo aislado es posible generar, gracias a procedimientos de estimulación eléctrica, un tipo de actividad similar al observado en individuos que conductualmente muestran una convulsión. Esta actividad se reduce considerable y significativamente por la aplicación de melatonina, de GABA o de clonazepam. Adicionalmente, estos efectos depresores pueden ser revertidos ya sea por picrotoxina o bicuculina, para el caso del GABA o por flumazenil para el caso del clonazepam. Sin embargo, estos tres fármacos carecen de un efecto que revierta la actividad depresora de la melatonina, lo cual sugiere una acción en la que no intervienen mecanismos GABAérgicos.

La sensibilidad a la melatonina ha sido referida por varios estudios, los cuales muestran que estos indoles de la pineal provocan cambios ya sea de índole bioquímico (123) o electrofisiológico (137) en el hipocampo. Además muchos estudios recientes muestran que el hipocampo posee una distribución importante de receptores a la melatonina (132). Aunque se desconoce el grupo celular hipocampal que posee tal receptor y la posible función en la que se encuentren involucrados (136).

La aplicación sistémica de melatonina o de 5-metoxi-indol-ácido-acético produjo todo un patrón de respuesta en la actividad unitaria de las neuronas del hipocampo de rata. Para empezar, las neuronas hipocampales mostraron una mayor sensibilidad a los efectos del 5-metoxi-indol-ácido-acético que a la melatonina (70.76 contra 50.97%, respectivamente). Después, aunque los efectos fueron más claros después de administrar el 5-metoxi-indol-ácido-acético, en ambos casos los efectos excitadores se observaron con dosis pequeñas; mientras que la dosis más alta invariablemente se asoció con efectos depresores (Fig. 7 y 10). Finalmente la dosis que provocó un mayor efecto en ambos casos fue la de 1.0 mg/Kg de peso. Debemos mencionar que la aplicación de los indoles de la pineal se realizó por vía endovenosa, por lo que desconocemos si estos efectos son consecuencia de una acción directa sobre las neuronas que registramos o bien son resultado de un efecto en una estructura intermedia que muestre eferencias hacia el hipocampo. Esta estructura recibe aferencias de varias modalidades sensoriales como visuales, auditivas, somáticas y sobre todo olfatorias en animales inferiores como la rata (50). Estas conexiones sugieren su participación en funciones de índole asociativo como el control endógeno, la expresión de estados emocionales y en los procesos de aprendizaje y memoria (103).

Algunos estudios electrofisiológicos muestran que la aplicación sistémica de melatonina

induce efectos en muchas estructuras las cuales poseen conexiones con una amplia gama de estructuras, tal es el caso de la formación reticular (83) y de algunas estructuras del sistema límbico (71), por lo tanto es muy posible que los efectos registrados en el hipocampo sean una combinación de acciones en varios sitios cerebrales. Tanto la presencia de efectos en ambos sentidos, excitación y depresión, como la falta de una linealidad en la relación dosis-efecto en el caso de la melatonina, apoyan tal sugerencia. Los estudios electrofisiológicos realizados en rebanadas de hipocampo-parahipocampo en el presente estudio, mostraron que el único efecto observado por la administración de la melatonina, fue una acción inhibitoria. Entonces es posible que los efectos excitadores, observados con dosis bajas de melatonina puedan corresponder a una acción inhibitoria sobre la influencia depresora que ejercen algunos grupos neuronales del hipocampo (112). En otras palabras se trataría de una acción de desinhibición; de ser este el caso, las células inhibitorias que responden a las dosis menores de melatonina, serían más sensibles a estos indoles, que las células registradas, las cuales sólo responderán a las dosis más altas y lo harán con una inhibición.

Los efectos provocados por el 5-hidroxi-indol-ácido-acético fueron aún más intensos que los provocados por la melatonina. Este indol se localiza casi en todas las estructuras que contienen melatonina (17) y ejerce muchos de los efectos fisiológicos que provoca esta hormona (73), y en algunos casos sus acciones son más intensas (128). Por lo cual no es sorprendente tal hallazgo, aunque estos datos no han sido descritos a nivel de la actividad eléctrica del hipocampo.

Tanto la latencia como la duración de los efectos de la melatonina y el 5-metoxi-indol-ácido-acético, son consistentes con los reportes que indican la vida media plasmática y la latencia de los indoles para alcanzar estructuras cerebrales (64, 4). Los análisis computacionales de la cinética de la melatonina, han mostrado que este indol se distribuye en un sistema de tres compartimentos con vidas medias de 0.21 ± 0.05 , 5.97 ± 1.11 y 47.52 ± 8.86 min. Por otra parte el volumen de distribución y su depuración renal reportados para la melatonina son del orden de 1.736 ± 349 ml.kg⁻¹ y 25.1 ± 1.7 ml.min⁻¹.kg⁻¹, respectivamente. Además la entrada de melatonina dentro del líquido cefalorraquídeo es muy rápida y alcanza un máximo a los 5 minutos, mientras que su remoción sigue un patrón de dos compartimentos con vidas medias de 16.5 ± 2.9 y 47.3 ± 8.6 min. La tasa de concentración líquido cefalorraquídeo/plasma fue de 0.38 en el estado estable (30 min). Además, después de 2 min de su administración, el nivel de melatonina en el cerebro fue de 3.8 veces mayor que en el líquido cefalorraquídeo. Treinta minutos después de su aplicación, la concentración de melatonina es aún elevada. Estos datos muestran que la melatonina posee una poca pero rápida penetración

de la sangre hacia el sistema nervioso central (63, 127). En el presente trabajo, los efectos de estos indoles sobre la actividad eléctrica del hipocampo se iniciaron entre 2 a 4 minutos después de su aplicación (Figs. 8 y 9) y dependiendo de la dosis, los efectos se mantuvieron en ocasiones después de 60 minutos de registro. Estudios recientes muestran que la melatonina marcada puede permanecer en estructuras cerebrales hasta después de 48 horas de su administración (6). Estos datos farmacocinéticos son indicativos de que los efectos observados en el presente trabajo representan realmente una acción de los indoles de la pineal sobre el hipocampo dorsal y también sugieren que los efectos anticonvulsivos observados después de la aplicación intraperitoneal o intravenosa de melatonina, pueden resultar como consecuencia de un efecto en esta estructura cerebral.

Los efectos electrofisiológicos observados al administrar melatonina sobre las células del hipocampo, también fueron analizados en una forma directa por el empleo de rebanadas de hipocampo-parahipocampo. Esta preparación ha sido ampliamente estudiada en el cementio de varias sustancias y fármacos anticonvulsivos (59, 95). La peculiaridad de la misma consiste en su capacidad para generar una actividad eléctrica auto-sostenida por efecto de estimular repetidamente las fibras colaterales de Schaeffer. Estas colaterales constituyen una ramificación axonal del axón de las neuronas piramidales, a través del cual estas neuronas influyen sobre la actividad de otras neuronas piramidales, es decir, estas colaterales proporcionan una retroalimentación excitadora de algunas neuronas piramidales sobre otras neuronas piramidales (44).

Para realizar un análisis experimental de los mecanismos involucrados en la génesis de las crisis convulsivas, se ha desarrollado varios modelos experimentales que involucran la participación del hipocampo; entre ellos se encuentran modelos farmacológicos (69, 72) y los modelos basados en la estimulación eléctrica (61, 126). En estos modelos las descargas electrofisiológicas registradas son muy similares a la progresión electrográfica clínica vista en pacientes epilépticos (134).

El modelo de crisis convulsivas utilizado en el presente estudio fue desarrollado por Heinemann y cols. (31). Esta preparación mantiene las conexiones entre el hipocampo y las áreas adyacentes parahipocampales y corticales. Cuando esta preparación es perfundida con una solución que no contiene Mg^{2+} , se desarrollan descargas epileptogénicas espontáneas, auto-sostenidas y de larga duración (52). La actividad generada de esta manera, parece tener su origen en áreas corticales con una participación pasiva y limitada de estructuras hipocampales, debido a que esta actividad persiste en la corteza entorrinal si se efectúa una transección de las fibras presinápticas hipocampales (52). Sin embargo, cuando en lugar de

generar esta actividad epileptogénica por reducir las concentraciones extracelulares de Mg^{2+} , se lleva a cabo por la estimulación eléctrica de las fibras colaterales de Schaeffer en un medio que contiene las concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} , entonces se genera una actividad epileptogénica de origen hipocámpal, la cual es sensible a los efectos de bloqueadores GABAérgicos (94). En este modelo la actividad epileptiforme, consecuencia de la aplicación de trenes de estimulación en colaterales de Schaeffer, se genera primero con una descarga primaria seguida por una secundaria después de un periodo silente registrado extracelularmente (Fig. 11). Inicialmente la latencia entre ambas descargas son largas, entre 10 y 30 minutos, aunque posteriormente este tiempo se reduce considerablemente hasta fundirse ambas postdescargas. Después de 7 a 9 estímulos en el 65-70% de las rebanadas esta actividad progresa hasta una actividad sostenida de larga duración (usualmente más de 3 horas). La principal ventaja de esta preparación consiste en la ubicación de los fenómenos plásticos que ocurren durante la génesis de esta actividad. Estos es, la estimulación de las colaterales de Schaeffer induce cambios plásticos en las sinápsis que estas neuronas realizan con otras neuronas piramidales, lo cual vuelve a activar estas colateral para afectar a otras neuronas piramidales, las cuales a su vez estimulan nuevamente a las iniciales, con lo que se establece un ciclo que culmina con la génesis de esta actividad auto-sostenida (94).

Este modelo, el cual implica directamente a las neuronas piramidales como los sistemas que generan esta actividad epileptiforme, resulta implícitamente de enorme utilidad para el análisis de los mecanismos y de los sistemas de neurotransmisores que en condiciones fisiológicas modulan la excitabilidad de estas células. Por ejemplo los sistemas GABAérgicos son fundamentales en esta actividad (131). Por lo que decidimos utilizar este modelo en la búsqueda de un mecanismo de acción de la melatonina para sus efectos anticonvulsivos.

Algunos estudios muestran que las microinyecciones de melatonina dentro de la corteza temporal del conejo inhibe la actividad eléctrica espontánea, induciendo además un efecto agonista sobre la acción depresora del GABA, lo cual indicaba un sinergismo de los efectos inducidos por ambas sustancias (117). Estos resultados fueron la base para sugerir, que la melatonina podría tener un sitio de unión dentro del complejo GABA-receptor, el cual se sabe que expresa varios sitios hacia diversas sustancias, como los barbitúricos o las benzodiazepinas (133). Esta posible interacción, de la cual no se tienen aún evidencias definitivas experimentales, ha dado origen a varios estudios especulativos sobre los efectos de esta hormona (36).

En el presente estudio se mostró que la adición de GABA a la solución de perfusión reduce en forma consistente y efectiva tanto las descargas primarias como las secundarias originadas como consecuencia de la estimulación eléctrica de las colaterales de Schaeffer (Fig.

16) Este efecto el cual se inicia dentro de los 15 segundos después de iniciada la perfusión del neurotransmisor, es bloqueado por la administración de picrotoxina o bicuculina, ambos bloqueadores de receptores GABA_A (27), lo cual es sugerente de una acción mediada por este tipo de receptor. Después de la aplicación de GABA la actividad se redujo casi en su totalidad y después del lavado ésta retornó en una forma muy similar de como ocurría antes de la aplicación.

También la aplicación de melatonina provocó una reducción de la actividad epileptogénica, con varias diferencias con respecto a las acciones de GABA. Primero su efecto se presentó con una latencia de entre 6 a 9 minutos después de la aplicación (Fig. 15); segundo, su acción inhibitoria no fue total como en el caso del GABA, ya que siempre se mostró una actividad basal de fondo y tercero, ni la bicuculina, ni la picrotoxina modificaron de alguna forma esta respuesta. Estos datos son indicativos de que los efectos mediados por la melatonina son independientes de los mecanismos GABAérgico celulares de las neuronas piramidales. Si la melatonina actuara sobre un componente del complejo GABA-receptor, sería de esperarse una reducción del efecto de esta hormona, por una acción de los bloqueadores de receptores GABAérgicos. Adicionalmente, se mostró que la aplicación de clonazepam, la benzodiazepina más utilizada en el tratamiento de padecimientos convulsivos en humanos, y la cual actúa a través del complejo GABA-receptor (27), también deprime, aunque sólo parcialmente, esta actividad epileptogénica. Estos efectos fueron bloqueados por el flumazenil, un antagonista de este tipo de receptores benzodiazepínicos encontrados en el complejo GABA-receptor (27). En el presente trabajo, la aplicación del flumazenil no provocó cambio alguno sobre la inhibición de la actividad epileptogénica inducida por la melatonina. En su conjunto estos resultados son indicativos de un efecto de la melatonina no mediado ya sea por receptores GABAérgicos o a través del complejo GABA-receptor.

Los resultados obtenidos de los estudios de registros intracelular en células piramidales de rebanadas de hipocampo, también sugieren dos mecanismos de acción independientes. La administración de GABA reduce en forma muy significativa el potencial postsináptico excitador, provocado por la estimulación de las colaterales de Schaeffer (Fig. 21). El valor de este potencial registrado cuando se perfunde una solución que contiene 10^{-6} M de GABA se reduce hasta en un 80%. Este efecto es claramente bloqueado por la adición de bicuculina o picrotoxina al baño, o por la remoción del GABA de la solución de perfusión. Por el contrario la adición de melatonina, en concentraciones de hasta 10^{-4} M, no induce un cambio significativo en este potencial excitador postsináptico, lo cual sugeriría una acción presináptica, no directa sobre la membrana de las células piramidales. Además, cuando se registró el efecto de estos fármacos

sobre el nivel del potencial de membrana de estas células, se mostró que en todas ellas el GABA provocó un incremento del valor negativo del potencial de membrana con lo cual hiperpolarizaba a la neurona, reduciendo con ello su excitabilidad. En las mismas condiciones, la administración de pulsos de solución que contenían soluciones con diversas concentraciones de melatonina, no provocó efecto alguno sobre este potencial de membrana. Estos resultados sugieren la carencia de un efecto de la melatonina sobre las células piramidales en el hipocampo, y probablemente le adjudiquen una acción presináptica sobre otros componentes celulares, aunque estos resultados no descartan del todo una acción postsináptica. La carencia de un efecto de la melatonina sobre las células piramidales es un hallazgo importante si se considera que esta hipótesis es utilizada frecuentemente para explicar muchos de los efectos inducidos por la melatonina (87).

Excluyendo estas posibilidades, es probable que la melatonina actúe en sistemas de neurotransmisores excitadores modulando su actividad. Por ejemplo, la participación de los sistemas que utilizan glutamato en la génesis y propagación de esta actividad ha sido sugerido consistentemente (65, 80). Además, en el presente estudio el único parámetro afectado en el registro de los potenciales excitadores postsinápticos registrados fue la onda inicial del registro, la cual corresponde a las descargas de fibras aferentes, las cuales parecen tener su origen en los sistemas glutamatérgicos del hipocampo (24). La posible interacción entre los sistemas que utilizan glutamato como neurotransmisor, mediada a través de receptores NMDA y la melatonina, aún no es clara. Sin embargo, se sabe que estos receptores son modulados a través de la concentración de radicales libres por un sitio redox (48), y que la melatonina es un excelente fijador de radicales libres (99), con lo cual podría complementarse tal acción. Esta es una posibilidad que debe de analizarse como continuación de los presentes estudios.

BIBLIOGRAFIA

1. Acuña-Castroviejo, D.; Escames, G.; Macias, M.; Muñoz Hoyos, A.; Molina Carballo, A.; Arauzo, M.; Montes, R. Cell protective role of melatonin in the brain. *J. Pineal. Res.* 19:57-63; 1995.
2. Allgaier, C.; Warnke, P.; Stangl, A. P.; Feuerstein, T. J. Effects of 5-HT receptor agonists on depolarization-induced [³H]-noradrenaline release in rabbit hippocampus and human neocortex. *Br. J. Pharmacol.* 116:1769-1774; 1995.
3. Anninos, P. A.; Tsagas, N.; Sandyk, R.; Derpapas, K. Magnetic stimulation in the treatment of partial seizures. *Int. J. Neurosci.* 60:141-171; 1991.
4. Anton Tay, F.; Wurtman, R. J. Regional uptake of ³H-melatonin from blood or cerebrospinal fluid by rat brain. *Nature.* 221: 474-475, 1969.
5. Anton Tay, F.; Díaz, J. L.; Fernández Guardiola, A. On the effect of melatonin upon human brain. Its possible therapeutic implications. *Life. Sci.* 10:841-850; 1971.
6. Anton Tay, F.; Forray, C.; Ortega Corona, B. G. Subneuronal fate of intracerebroventricular injected ³H-melatonin. *J. Pineal. Res.* 5: 125-133, 1988.
7. Attenburrow, M. E. J.; Cowen, P. J.; Sharpley, A. L. Low dose melatonin improves sleep in healthy middle-aged subjects. *Psychopharmacology.* 126. (2). p179-181. 1996.
8. Axelrod, J.; Wurtman, R. J. The pineal gland: a biological clock. *Probl. Act. Endocrinol. Nutr.* 10:201-212; 1966.
9. Bagnara, J. T.; Hadley, M. E. The control of bright colored pigment cells of fishes and amphibians. *Am. Zool.* 9:465-478; 1969.
10. Balemans, M. G.; Pevet, P.; Van Benthem, J.; Haldar Misra, C.; Smith, I.; Hendriks, H. Day/night rhythmicity in the methylating capacities for different 5-hydroxyindoles in the pineal, the retina and the Harderian gland of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) during the annual seasons. *J. Neural. Transm.* 56:53-72; 1983.
11. Balzer, I.; Hardeland, R. Photoperiodism and effects of indoleamines in a unicellular alga, *Gonyaulax polyedra*. *Science* 253:795-797; 1991.
12. Barajas-López, C., Barrientos-Martínez, M. and Reyes-Vázquez, C.: Persistence of photic evoked responses in pineal gland after its pedunculotomy and cervical sympathetic ganglionectomy. *J. Pineal Res.* 1: 45-57, 1987.
13. Barajas-López, C., Pereso, A., Espinosa-Luna, R., Reyes-Vázquez, C. and Prieto-Gómez, B. Melatonin modulates cholinergic transmission-blocking nicotinic channels in the guinea-pig submucous-plexus. *Eur. J. Pharmacol.* 312: 319-325, 1996.
14. Barrett, P.; MacLean, A.; Morgan, P. J. Evidence for multiple forms of melatonin receptor-G-protein complexes by solubilization and gel electrophoresis. *J. Neuroendocrinol.* 6:509-515; 1994.
15. Beck, O.; Borg, S.; Lundman, A. Concentration of 5-methoxyindoles in the human pineal gland.

J. Neural. Transm. 54:111-116; 1982

16. Bermudez, F. F.; Forbes, J. M.; Injdi, M. H. Involvement of melatonin and thyroid hormones in the control of sleep, food intake and energy metabolism in the domestic fowl. *J. Physiol. (Lond)*. 337:19-27; 1983.
17. Best, S.A.; Midgley, J.M.; Huang, W.; Watson, D.G. The determination of 5-hydroxytryptamine, related indolealkylamines and 5-hydroxyindoleacetic acid in the bovine eye by gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 11: 323-333; 1993.
18. Bindoni, M.; Rizzo, R. Hippocampal evoked potentials and convulsive activity after electrolytic lesions of the pineal body, in chronic experiments on rabbits. *Arch. Sci. Biol. (Bologna)*. 49:223-233; 1965.
19. Borit, A. History of tumors of the pineal region. *Am. J. Surg. Pathol.* 5:613-620; 1981.
20. Brailowsky, S. Effects of melatonin on the photosensitive epilepsy of the baboon. *Papio papio. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 41:314-319; 1976.
21. Buzzell, G. R.; Pangerl, A.; Pangerl, B.; Menendez Pelaez, A.; Vaughan, M. K.; Little, J. C.; Hill, S. M.; Vaughan, G. M.; Reiter, R. J. Melatonin and porphyrin in the harderian glands of the Syrian hamster: circadian patterns and response to autumnal conditions. *Int. J. Biochem.* 22:1465-1469; 1990.
22. Cardinali, D. P.; Vacas, M. I. Mechanisms underlying hormone effects on pineal function: a model for the study of integrative neuroendocrine processes. *J. Endocrinol. Invest.* 1:89-96; 1978.
23. Champney, T. H. Noradrenergic involvement in pinealectomy induced convulsions in gerbils. *Neurosci. Lett.* 120:245-248; 1990.
24. Chineastra, P.; Diabira, D.; Urban, N.N.; Barrionuevo, G.; Ben-Ari, Y. Major differences between long-term potentiation and ACPD-induced slow onset potentiation in hippocampus. *Neurosci. Lett.* 182: 177-180, 1994.
25. Collin, J. P. Recent advances in pineal cytochemistry. Evidence of the production of indoleamines and proteinaceous substances by rudimentary photoreceptor cells and pinealocytes of Amniota. *Prog. Brain Res.* 52:271-296; 1979.
26. Coloma, F. M.; Niles, L. P. Melatonin enhancement of [³H]-gamma-aminobutyric acid and [³H]muscimol binding in rat brain. *Biochem. Pharmacol.* 37:1271-1274; 1988.
27. Cooper, J.R., Bloom, F.E., Roth,R.H. The biochemical basis of neuropharmacology. Sixth Edition. Oxford University press. 4th edition. New York. p.p. 454. 1992.
28. Csaba, G. Hormonal regulation: morphogenetic and adaptive systems. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 52:295-303; 1977.
29. De Azevedo, B. A.; Fontana Junior, P. Audiogenic seizures and the pineal gland. *Biol. Psychiatry* 23:734-740; 1988.

30. Depres-Brummer, P.; Levi, F.; Metzger, G.; Touitou, Y. Light-induced suppression of the rat circadian system. *Am. J. Physiol.* 268:R1111-R1116; 1995.
31. Dreier, J.P.; Heinemann, U. Regional and time dependent variations of low Mg^{2+} induced epileptiform activity in rat temporal cortex slices. *Exp. Brain Res.* 87: 581-596, 1991.
32. Dubocovich, M.L. Pharmacology and function of melatonin receptors. *FASEB J.* 2:2765-2773, 1988.
33. Engbreton, G. A.; Brecha, N.; Reiner, A. Substance P-like immunoreactivity in the parietal eye visual system of the lizard *Uta stansburiana*. *Cell Tissue Res.* 227:543-554; 1982.
34. Fariello, R. G.; Bubenik, G. A.; Brown, G. M.; Grotz, L. J. Epileptogenic action of intraventricularly injected antimelatonin antibody. *Neurology.* 27:567-570; 1977.
35. Fauteck, J. D.; Bockmann, J.; Bockers, T. M.; Wittkowski, W.; Kohling, R.; Straub, H.; Speckmann, E. J.; Tuxhorn, I.; Wolf, P.; Pannek, H. Melatonin reduces low- Mg^{2+} epileptiform activity in human temporal slices. *Experimental Brain Research.* 107. (2). p321-325. 1995.
36. Ferini-Strambi, L.; Zucconi, M.; Biella, G.; Stankov, B.; Fraschini, F.; Oldani, A.; Smirne, S. Effect of melatonin on sleep microstructure: preliminary results in healthy subjects. *Sleep.* 16: 744-747, 1993.
37. Firth, B. T.; Thompson, M. B.; Kennaway, D. J.; Belan, I. Thermal sensitivity of reptilian melatonin rhythms: "cold" tuatara vs. "warm" skink. *Am. J. Physiol.* 256:R1160-R1163; 1989.
38. Fischer, F.E. *Fundamental statistical concepts.* Canfield Press, San Francisco, Harper and Row Publ. 1973.
39. Fontana, P., Jr.; de Azevedo, B. A. Effect of sound stimulation on pineal glands of female albino rats. *An. Acad. Bras. Cienc.* 50:116; 1978.
40. Giovannelli, G. Pineal region tumors: endocrinological aspects. *Childs. Brain* 9:267-273; 1982.
41. Goldfarb, A. F. Puberty and menarche. *Clin. Obstet. Gynecol.* 20:625-631; 1977.
42. Golombek, D. A.; Escobar, E.; Burin, L. J.; De Brito Sanchez, M. G.; Fernandez Duque, D.; Cardinali, D. P. Chronopharmacology of melatonin: inhibition by benzodiazepine antagonism. *Chronobiol. Int.* 9:124-131; 1992.
43. Golombek, D. A.; Fernandez Duque, D.; De Brito Sanchez, M. G.; Burin, L.; Cardinali, D. P. Time-dependent anticonvulsant activity of melatonin in hamsters. *Eur. J. Pharmacol.* 210:253-258; 1992.
44. Gulyas, A.I.; Hajos, N.; Freund, T.F. Interneurons containing c-*fos* are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 16: 3397-3411, 1996.
45. Gundy, G. C.; Wurst, G. Z. Parietal eye-pineal morphology in lizards and its physiological implications. *Anat. Rec.* 185:419-431; 1976.

46. Harlow, H.J.; Weekley, B.L. Effect of melatonin on the force of spontaneous contractions of in vitro rat small and large intestine. *J. Pineal Res.* 3:277-284; 1986.
47. Hata, T.; Kita, T. A newly designed method for removal of the pineal body, and depression of convulsions and enhancement of exploratory movements by pinealectomy in mice. *Endocrinol. Jpn.* 25:407-413; 1978.
48. Hiramatsu, M.; Oikawa, K.; Noda, H.; Mori, A.; Ogata, T.; Kamada, H. Free radical imaging by electron spin resonance computed tomography in rat brain. *Brain Res.* 697: 44-47, 1995.
49. Holmes, S. W.; Sugden, D. Effects of melatonin on sleep and neurochemistry in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 76:95-101; 1982.
50. Issacson, R.L.; Probram, K.H. (eds). *The Hippocampus*, Vol. 3. Plenum Press, New York and London, 1986.
51. Izumi, K.; Donaldson, J.; Minnich, J.; Barbeau, A. Ouabain-induced seizures in rats: modification by melatonin and melanocyte-stimulating hormone. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 51:572-578; 1973.
52. Jones, R.S.G.; Heinemann, U. Synaptic and intrinsic responses of medial entorhinal cortical cells in normal and magnesium-free medium in vitro. *J. Neurophysiol.* 59:1476-1496, 1988.
53. Kappers, J.A. Short history of pineal discovery and research. *Prog. Brain Res.* 52: 3-22, 1979.
54. Karten, H. J.; Brecha, N. Localization of neuroactive substances in the vertebrate retina: evidence for lamination in the inner plexiform layer. *Vision. Res.* 23:1197-1205; 1983.
55. Kerkut, G.A. and Wheel, H.V. Electrophysiology of isolated mammalian CNS preparations. Kerkut G.A. and Wheel H.V. (eds). Academic press, New York. pp. 1-153. 1981.
56. Kitay, J.I. y Altschule, M.D. *The pineal Gland*. Harvard University Press, Cambridge 1954.
57. Klein, D. C.; Berg, G. R.; Weiler, J.; Glinsmann, W. Pineal gland: dibutyryl cyclic adenosine monophosphate stimulation of labeled melatonin production. *Science* 167:1738-1740; 1970
58. König, J.F.R.; Klippel, R.A. *The rat brain. A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem*. The Williams and Wilkins (eds.), Waverly press, Baltimore. pp.162. 1963.
59. Lothman, E.W., Bertram, E.H.; Bekenstein, J.W.; Perlin, J.B.; Self-sustained limbic status epilepticus induced by "continuous" hippocampal stimulation: electrographic and behavioral characteristics. *Epilepsy Res.* 3: 107-119, 1989.
60. McDonald, R.L.; Kelly, K.M. Mechanisms of action of currently prescribed and newly developed antiepileptic drugs. *Epilepsia.* 35: 41-50, 1994.
61. McIntyre, D.C.; Stokes, K.A.; Edson, N. Status epilepticus following stimulation of a kindled hippocampal focus in intact and commissurectomized rat. *Exp. Neurol.* 94: 554-570, 1986.
62. Maestroni, G. J. The immunoneuroendocrine role of melatonin. *J. Pineal. Res.* 14:1-10; 1993.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

63. Mallo,C.; Zaidan,R.; Galy,G.; Vermeulen,E.; Brun,J.; Chazot,G.; Claustrat,B. Pharmacokinetics of melatonin in man after intravenous infusion and bolus injection. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 38: 297-301, 1990.
64. Menendez-Pelaez, A.; Poeggeler, B.; Reiter, R. J.; Barlow-Walden, L.; Pablos, M. I.; Tan, D. X. Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J. Cell Biochem.* 53: 373-382, 1993.
65. Mennerick,S.; Benz,A.; Zorumski,C.F. Components of glial responses to exogenous and synaptic glutamate in rat hippocampal microcultures. *J.Neurosci.* 16: 55-64, 1996.
66. Minneman, K. P.; Wurtman, R. J. The pharmacology of the pineal gland. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 16:33-51; 1976.
67. Moller, M.; Ravault, J. P.; Cozzi, B. The chemical neuroanatomy of the mammalian pineal gland: Neuropeptides. *Neurochemistry International.* 28 (1): p23-33, 1996.
68. Moore, R. Y. Neural control of pineal function in mammals and birds. *J. Neural. Transm. Suppl.* 47-58; 1978.
69. Morrisett R.A., Status epilepticus produced by cholinergic agonists *Exp. Neurol.* 98: 594-605, 1987.
70. Naranjo-Rodriguez, E. and Reyes-Vázquez, C. Anxiolytic-like actions of melatonin on a conflict procedure. *Soc. Neurosciences* 18:1318, 1988.
71. Naranjo Rodriguez, E. B.; Prieto Gomez, B.; Reyes Vazquez, C. Melatonin modifies the spontaneous multiunit activity recorded in several brain nuclei of freely behaving rats. *Brain Res. Bull.* 27: 595-600; 1991.
72. Nevader, G. Status epilepticus in wael-oxygenated rats casue neuronal necrosis *Ann. Neurol.* 18: 282-290, 1985.
73. Ng,T.B.; Chan,W.Y. Action of pineal indoleamines on the reproductive systems of the male C57 mouse and golden hamster. *J. Neural. Transm. Gen. Sect.* 93: 87-98, 1993.
74. Niles, L. P.; Pickering, D. S.; Arciszewski, M. A. Effects of chronic melatonin administration on GABA and diazepam binding in rat brain. *J. Neural. Transm.* 70:117-124; 1987.
75. Ninchoji, T.; Uemura, K.; Shimoyama, I. Effect of pinealectomy on cortically kindled rats. *Epilepsy. Res.* 7:240-244; 1990.
76. Nonno, R.; Capsoni, S.; Lucini, V.; Moller, M.; Fraschini, F.; Stankov, B. Distribution and characterization of the melatonin receptors in the hypothalamus and pituitary gland of three domestic ungulates. *J. Pineal. Res.* 18:207-216; 1995.
77. Oksche, A. Evolution of the pineal complex: correlation of structure and function. *Ophthalmic. Res.* 16:88-95; 1984.
78. Olcese, J. The mammalian pineal gland and reproduction. *Controversies and strategies for*

- future research. *Adv. Exp. Med. Biol.* 377:1-14; 1995.
79. Oldani, A.; Ferini-Strambi, L.; Zucconi, M.; Stankov, B.; Fraschini, F.; Smirne, S. Melatonin and delayed sleep phase syndrome: ambulatory polygraphic evaluation. *Neuroreport* 6:132-134; 1994.
 80. O'Mara, S.M.; Rowan, M.J.; Anwyl, R. Metabotropic glutamate receptor-induced homosynaptic long-term depression and depotentiation in the dentate gyrus of the rat hippocampus in vitro. *Neuropharmacol.* 34: 983-989; 1995.
 81. Pavel, S.; Psatta, D.; Goldstein, R. Slow-wave sleep induced in cats by extremely small amounts of synthetic and pineal vasotocin injected into the third ventricle of the brain. *Brain Res. Bull.* 2:251-254; 1977.
 82. Paxinos, G.; Watson, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press; 1986.
 83. Pazo, J. H. Effects of melatonin on spontaneous and evoked neuronal activity in the mesencephalic reticular formation. *Brain Res. Bull.* 4:725-730; 1979.
 84. Persinger, M. A.; Psych, C. Sudden unexpected death in epileptics following sudden, intense, increases in geomagnetic activity: prevalence of effect and potential mechanisms. *Int. J. Biometeorol.* 38:180-187; 1995.
 85. Pévet, P.; Balemans, M. G.; Legerstee, W. C.; Vivien Roels, B. Circadian rhythmicity of the activity of hydroxyindole-O-methyl transferase (HIOMT) in the formation of melatonin and 5-methoxytryptophol in the pineal, retina, and Harderian gland of the golden hamster. *J. Neural. Transm.* 49:229-245; 1980.
 86. Pieri, C.; Marra, M.; Moroni, F.; Recchioni, R.; Marcheselli, F. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life. Sci.* 55:PL271-PL276; 1994.
 87. Pierrefiche, G.; Zerbib, R.; Laborit, H. Anxiolytic activity of melatonin in mice: involvement of benzodiazepine receptors. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 82: 131-142; 1993.
 88. Philo, R.; Reiter, R. J.; McGill, J. R. Changes in brain dopamine, norepinephrine and serotonin associated with convulsions induced by pinealectomy in the gerbil. *J. Neural. Transm.* 46:239-252; 1979.
 89. Philo, R.; Reiter, R. J. The involvement of brain amines in pinealectomy-induced convulsions in the gerbil: I. Serotonin. *Behav. Brain Res.* 3:71-82; 1981.
 90. Pontoire, C.; Bernard, M.; Silvain, C.; Collin, J. P.; Voisin, P. Characterization of melatonin binding sites in chicken and human intestines. *Eur. J. Pharmacol.* 247:111-118; 1993.
 91. Pitis, M. Pioneers of world and Romanian endocrinology. *Endocrinologie.* 25:227-231; 1987.
 92. Poeggeler, B. Phylogeny and function of the pineal. *Experientia.* 45:903-972; 1989.
 93. Rabow, L. E.; Russek, S. J.; Farb, D. H. From ion currents to genomic analysis: recent advances in GABA_A receptor research. *Synapse.* 21:189-274; 1995.

94. Rafiq, A.; DeLorenzo, R.J.; Coulter, D.A. Generation and propagation of epileptiform discharges in a combined entorhinal cortex/hippocampal slices. *J Neurophysiol.* 70: 1962-1974, 1993
95. Rafiq, A.; Zhang, Y.; DeLorenzo, R.J.; Coulter, D.A. Long-duration self-sustained epileptiform activity in the hippocampal-parahippocampal slice: A model of status epilepticus. *J Neurophysiol.* 74: 2028-2042, 1995.
96. Reiter, R. J. Remembrance: growing up with the pineal gland: early recollections. *Endocrinology* 131:2039-2041; 1992.
97. Reiter, R. J.; Klein, D. C.; Donofrio, R. J. Preliminary observations on the reproductive effects of the pineal gland in blinded, anosmic male rats. *J. Reprod. Fertil.* 19:563-565; 1969.
98. Reiter, R. J. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 49:654-664, 1993.
99. Reiter, R.J. Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals. *Eur. J. Endocrinol.* 134: 412-420, 1996.
100. Reyes-Vázquez, C. and Dafny, N.: Interaction of norepinephrine and superior cervical ganglion input in the rat pineal body. *Exp. Neurol.* 90:522-528, 1985.
101. Reyes-Vázquez, C., Prieto-Gómez, B., Aldes, L. and Dafny, N.: The rat pineal exhibits two patterns of response to microiontophoretical norepinephrine application. *J. Pineal Res.* 3: 213-222, 1986.
102. Reyes-Vázquez, C., Naranjo-Rodríguez, E.B., Trujillo-Santana, J. and Prieto-Gómez, B. Apamin blocks the direct relaxant effect of melatonin on rat ileal smooth muscle. *J. Pineal Res.* 20:151-158, 1996. 1996.
103. Risold, P.Y.; Swanson, L.W. Structural evidence for functional domains in the rat hippocampus. *Science* 272: 1484-1486, 1996.
104. Roldan, E.; Anton Tay, F. EEG and convulsive threshold changes produced by pineal extract administration. *Brain Res.* 11:238-245; 1968.
105. Rubio, A.; Guerrero, J. M.; Reiter, R. J.; Osuna, C. Involvement of alpha-Adrenergic Receptor and beta-Adrenergic Receptor in the Regulation of Rat Pineal N-Acetyltransferase Activity During Development. *Endocrinol.* 132:393-398; 1993.
106. Rusak, B.; Zucker, I. Neural regulation of circadian rhythms. *Physiol. Rev.* 59:449-526; 1979.
107. Sandýk, R.; Tsagas, N.; Anninos, P. A. Melatonin as a proconvulsive hormone in humans. *Int. J. Neurosci.* 63:125-135; 1992.
108. Satake, N. Melatonin mediation in sedative effect of serotonin in goldfish. *Physiol. Behav.* 22:817-819; 1979.
109. Selmaoui, B.; Touitou, Y. Sinusoidal 50-Hz magnetic fields depress rat pineal NAT activity and serum melatonin. Role of duration and intensity of exposure. *Life. Sci.* 57:1351-1358; 1995.

110. Shacoori, V.; Khan, N. A.; Saig, B.; Rault, B. Rat pineal cell aggregates: ultrastructural and functional characteristics. *Brain Res. Bull.* 38:215-220; 1995.
111. Shaw, K. M. The pineal gland: a review of the biochemistry, physiology and pharmacological potential of melatonin and other pineal substances. *Adv. Drug. Res.* 11:75-96; 1977.
112. Shepherd, G.M. *The synaptic organization of the brain. An introduction.* Oxford University Press, 1974. First Ed. pp. 273-285.
113. Shedpure, M.; Pati, A. K. The pineal gland: structural and functional diversity. *Indian J. Exp. Biol.* 33:625-640; 1995.
114. Siarey, R. J.; Andreasen, M.; Lambert, J. D. Serotonergic modulation of excitability in area CA1 of the in vitro rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 199:211-214; 1995.
115. Sivak, J. G. Historical note: the vertebrate median eye. *Vision. Res.* 14:137-140; 1974.
116. Slama Scemama, A.; L'Heritier, A.; Moszkowska, A.; van der Horst, C. J.; Noteborn, H. P.; de Moree, A.; Ebels, I. Effects of sheep pineal fractions on the activity of male rat hypothalami in vitro. *J. Neural. Transm.* 46:47-58; 1979.
117. Stankov, B.; Cozzi, B.; Lucini, V.; Capsoni, S.; Fauteck, J-D.; Fumagalli, P.; Fraschini, F. Localisation and characterisation of melatonin binding sites in the brain of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) by autoradiography and in vitro ligand-receptor binding. *Neurosci. Lett.* 133: 68-77, 1991.
118. Stenfors, C.; Bjellerup, P.; Mathe, A. A.; Theodorsson, E. Concurrent analysis of neuropeptides and biogenic amines in brain tissue of rats treated with electroconvulsive stimuli. *Brain Res.* 698:39-45, 1995.
119. Stockmeier, C. A.; Larsen, B. R.; Blask, D. E. Alteration of seizures resulting from pinealectomy in the rat after neonatal treatment with 6-hydroxydopamine. *J. Neurosci. Res.* 14:279-284; 1985.
120. Stout, A. K.; Woodward, J. J. Mechanism for nitric oxide's enhancement of NMDA-stimulated [3H]norepinephrine release from rat hippocampal slices. *Neuropharmacol.* 34:723-729; 1995.
121. Takahashi, J. S.; Menaker, M. Physiology of avian circadian pacemakers. *Fed. Proc.* 38:2583-2588; 1979.
122. Thomas, K. B.; Tigges, M.; IUVone, P. M. Melatonin synthesis and circadian tryptophan hydroxylase activity in chicken retina following destruction of serotonin immunoreactive amacrine and bipolar cells by kainic acid. *Brain Res.* 601: 303-307 1993.
123. Thrun, L. A.; Moenter, S. M.; O'Callaghan, D.; Woodfill, C. J.; Karsch, F. J. Circannual alterations in the circadian rhythm of melatonin secretion. *J. Biol. Rhythms.* 10:42-54; 1995.
124. Uz, T.; Giusti, P.; Franceschini, D.; Kharlamov, A.; Manev, H. Protective effect of melatonin against hippocampal DNA damage induced by intraperitoneal administration of kainate to rats. *Neuroscience.* 73: 631-636. 1996.

125. Vanecek, J.; Klein, D. C. Melatonin inhibition of GnRH-induced LH release from neonatal rat gonadotroph: involvement of Ca^{2+} not cAMP. *Am. J. Physiol.* 269:E85-E90; 1995.
126. Vicedomini, J.P.; Nadler, J.V.A. A model of status epilepticus based on electrical stimulation of hippocampal afferent pathways. *Exp. Neurol.* 96: 681-691, 1987.
127. Vitte, P.A.; Harthe, C.; Lestage, P.; Claustrat, B.; Bobillier, P. Plasma, cerebrospinal fluid, and brain distribution of ^{14}C -melatonin in rat: a biochemical and autoradiographic study. *J. Pineal. Res.* 5: 437-453, 1988.
128. Wajs, E.; Lewinski, A. Inhibitory influence of late afternoon melatonin injections and the counter-inhibitory action of melatonin-containing pellets on thyroid growth process in male wistar rats - comparison with effects of other indole substances. *J. Pineal. Res.* 13:158-166, 1992.
129. Walker, R.F. Melatonin:serotonin interaction during termination of the LH surge in rats. *Prog. Clin Biol. Res.* 92:167-172; 1982.
130. Walker, R.J.; Woodruff, G.N. Structure-activity studies on a 5-hydroxytryptamine receptor of *Helix aspersa* neurones. *Br. J. Pharmacol.* 43: 415-416, 1971.
131. Wan, F.J.; Berton, F.; Madamba, S.G.; Francesconi, W.; Siggins, G.R. Low ethanol concentrations enhance GABAergic inhibitory postsynaptic potentials in hippocampal pyramidal neurons only after block of GABA_A receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93: 5049-5054, 1996.
132. Wiechmann, A. F.; Wirsig-Wiechmann, C. R. Melatonin receptor distribution in the brain and retina of a lizard, *Anolis carolinensis*. *Brain Behav. Evol.* 43:26-33; 1994.
133. Wiechmann, A. F.; Yang, X. L.; Wu, S. M.; Hollyfield, J. G. Melatonin enhances horizontal cell sensitivity in salamander retina. *Brain Res.* 453:377-380; 1988.
134. Williamson, P.D.; Spencer, D.D.; Spencer, S.S.; Novelly, R.A.; Mattson, R.H. Complex partial status epilepticus: a depth-electrode study. *Ann. Neurol.* 18: 647-654, 1985.
135. Young, S. N.; Anderson, G. M. Factors influencing melatonin, 5-hydroxytryptophol, 5-hydroxyindoleacetic acid, 5-hydroxytryptamine and tryptophan in rat pineal glands. *Neuroendocrinol.* 35:464-468; 1982.
136. Yuan, H.; Lu, Y.; Pang, S.F. Binding characteristics and regional distribution of [^{125}I]iodomelatonin binding sites in the brain of the human fetus. *Neurosci. Lett.* 130:229-232, 1991.
137. Zeise, M. L.; Semm, P. Melatonin lowers excitability of guinea pig hippocampal neurons in vitro. *J. Comp. Physiol.* 157:23-29; 1985.
138. Zhdanova, I. V.; Wurtman, R. J.; Lynch, H. J.; Ives, J. R.; Dollins, A. B.; Morabito, C.; Matheson, J. K.; Schomer, D. L. Sleep-inducing effects of low doses of melatonin ingested in the evening. *Clin. Pharmacol. Ther.* 57:552-558; 1995.
139. Zulch, K. J. Reflections on the surgery of the pineal gland (a glimpse into the past). Gleanings from medical history. *Neurosurg. Rev.* 4:159-163; 1981.