

00346

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

23

"MODULACION DE LA EXCITABILIDAD DEL HIPOTALAMO  
ANTERIOR POR LA ADMINISTRACION DE MELATONINA  
EN LA RATA.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)**

P R E S E N T A :

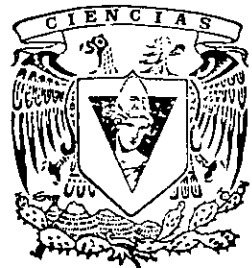
**MIREYA VELAZQUEZ PANIAGUA**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. BERTHA PRIETO GOMEZ

MEXICO, D.F.

294288

2001





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## AGRADECIMIENTOS

*La educación formativa es fundamental en el camino del quehacer científico y nos responsabiliza de los futuros manejos de la humanidad.*

Karl T.

*A la Dra. Bertha y al Dr. Cruz les agradezco la dedicación que tuvieron en este trabajo, sus observaciones académicas han sido de gran importancia para mi formación profesional a futuro.*

*A la Dra Fanjul por su tolerancia durante todo el proceso de mi proyecto de maestría.*

*A la Maestra Teresa Benitez por su gran calidad humana y sus valiosas aportaciones en este trabajo de tesis.*

*A mis compañeros de laboratorio les agradezco sus acertadas aportaciones en este proceso de elaboración de tesis; Ana Vázquez, Luis Charles y Jose Luis Martínez.*

*A mi jurado por el tiempo brindado y sus valiosas aportaciones:*

*Dr. Ismael Jiménez Estrada.*

*Dra. Rosalinda Guevara Guzmán*

*Dra. Margarita Victoria García Garduño.*

## Dedicatorias

*No son los hombres quienes gobiernan la vida, sino sus aspiraciones.*

*J.L. Tilghman*

*Este trabajo de tesis dedicado en memoria de mi padre Filiberto Velázquez.*

*Quiero hacer un especial reconocimiento a mi madre Eulalia Paniagua, la mujer que sembró en mi la voluntad y fortaleza en el camino de mi vida profesional.*

*Con mucho cariño dedico esta tesis a todos mis sobrinos y hermanos: Alejandro, Claudia, Verónica, Marcela, Ricardo, Filiberto y Patricia, los cuales son parte importante de mi historia de vida.*

*Agradezco todo el apoyo profesional de mi compañero Samuel Hernández en la realización de mi tesis, así como también le dedico este trabajo en especial y con mucho aprecio por todo el tiempo compartido.*

*A todos mis amigos que de una u otra forma han sido participes en este camino sinuoso, especialmente a Noemi Ortuño y Jorge López.*

Este proyecto titulado *“MODULACION DE LA EXCITABILIDAD DEL HIPOTÁLAMO ANTERIOR POR LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA EN LA RATA”* fue realizado en el Departamento de fisiología de la Facultad de Medicina, bajo el asesoramiento de la Dra. Bertha Prieto G y el Dr. Cruz Reyes V.

# ÍNDICE

## RESUMÉN

### CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN .....	1
OBJETIVO GENERAL .....	26
OBJETIVOS PARTICULARES .....	26
HIPÓTESIS .....	27

### CAPÍTULO II

#### METODOLOGÍA

REGISTROS EXTRACELULARES EN ANIMALES ÍNTEGROS. ....	28
REGISTROS CON TÉCNICA DE PATCH-CLAMP EN MODALIDAD DE CÉLULA ÍNTEGRA DE REBANADAS DE CEREBRO. ....	33

### CAPÍTULO III

RESULTADOS DE REGISTROS EXTRACELULARES .....	39
EFFECTOS DE MELATONINA .....	40
EFFECTOS DE SEROTONINA .....	45
EFFECTOS DE DOPAMINA .....	47
EFFECTOS DE NORADRENALINA .....	49
RESULTADOS DE REBANADAS DE HIPOTÁLAMO .....	56
CORRIENTES REGISTRADAS EN EL HIPOTÁLAMO ANTERIOR. ....	59
EN PRESENCIA DE { MELATONINA. ....	69
{ DOPAMINA. ....	71
{ NORADRENALINA. ....	74

### CAPITULO IV

DISCUSIÓN .....	77
CONCLUSIONES .....	86
BIBLIOGRAFIA .....	87
ABREVIATURAS .....	100

## RESUMÉN

La melatonina es un indol de la pineal, que ha sido involucrado en la modulación de los procesos reproductivos. En la mayoría de especies de roedores estudiadas, los efectos antigonadotrópicos causados por melatonina, han despertado un gran interés, sobre el mecanismo de acción celular, que esta hormona utiliza para tal efecto. En la rata, la melatonina parece ejercer su acción en los tres niveles del eje reproductivo, hipotálamo-hipófisis-gónadas, estructuras en las cuales se han localizado receptores a melatonina MT1 y el MT2. De estos sitios el más interesante, es el hipotálamo anterior. Tal interés deriva, de la disminución que provoca melatonina en la producción y liberación de la GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas), la cual se produce en células secretoras de GnRH, localizadas de manera dispersa en el área preóptica y el hipotálamo medio basal. Se ha sugerido que estas células carecen de receptores a la melatonina, por lo que los efectos ejercidos por este indol, pudiesen ser mediados por algún otro sistema neuronal, localizado en las regiones del hipotálamo anterior. El objetivo del presente estudio fue describir la influencia de la melatonina sobre la excitabilidad de las neuronas del hipotálamo anterior, así como también, caracterizar el efecto de otros fármacos, como las catecolaminas sobre estas mismas neuronas, además de analizar, si esta influencia de melatonina se ejerce a través de la conductancia de un canal rectificador entrante (kir). Para llevar a cabo este objetivo se utilizaron ratas Wistar de 180-200gr y se emplearon 2 técnicas electrofisiológicas: Registros extracelulares en animales íntegros y patch clamp en rebanadas de cerebro. En los registros extracelulares las ratas fueron anestesiadas y se montaron en un aparato estereotáxico, se realizaron dos trépanos, uno para introducir el electrodo de referencia, y otro para introducir el ensamble de pipetas, unida a este ensamble estaba la pipeta de registro. Los fármacos (melatonina, serotonina, noradrenalina y dopamina) fueron aplicados por micropresión (10, 35, 45, 50 y 60 psi). En la técnica de patch clamp, los animales eran decapitados, se les extraía el cerebro, el cual inmediatamente se procedía a cortar en rebanadas de  $400\mu$  de grosor, las cuales después de estabilizarse, eran montadas en la cámara de baño de patch, para posteriormente registrar las corrientes, los fármacos fueron aplicados en el baño de la rebanada de cerebro. Los parámetros que se analizaron, fue la frecuencia de descarga neuronal, la cual se considero como un índice de su grado de excitabilidad y el cambio de conductancia de un canal de K rectificador entrante (kir), el cual esta involucrado en el potencial de membrana y por ende del control de la excitabilidad. Los resultados obtenidos en los registros extracelulares, mostraron que melatonina reduce la frecuencia de descarga de las neuronas localizadas fuera del área preóptica. Las neuronas del área preóptica que respondieron a noradrenalina y cuyo efecto fue bloqueado por prazocina, les confiere la posibilidad de ser neuronas productoras de GnRH, estas neuronas no fueron afectadas por melatonina. La serotonina y dopamina ejercieron efectos depresores de la excitabilidad neuronal, aunque la mayoría de estos fueron encontrados en regiones diferentes a las afectadas por melatonina. Los resultados de patch clamp mostraron que la melatonina provoca un incremento de la conductancia del canal de  $K^+$  (kir) y que esto es dependiente de la concentración. Cualitativamente se encontraron efectos agonistas de la melatonina y las catecolaminas empleadas. Finalmente este trabajo concluye; que la melatonina ejerce sus efectos de manera indirecta sobre las neuronas productoras de GnRH, posiblemente sobre neuronas noradrenérgicas, inhibiendo sus procesos de secreción y de esta manera afectando la síntesis y liberación de la GnRH y que este indol induce la disminución de la excitabilidad de las neuronas del hipotálamo anterior, a través de modular la conductancia de un canal de  $K^+$  (Kir).

## CAPITULO I

### INTRODUCCIÓN.

La reproducción es un proceso fisiológico gracias al cual se asegura la perpetuidad de la especie. Sin embargo, para que ésta se lleve a cabo se requieren de múltiples condiciones y situaciones especiales. Algunas condiciones, surgen de los propios individuos, pero otras son consecuencia de las condiciones externas. Así, para que la reproducción se lleve a cabo, debe reunirse un perfil hormonal integral, que se manifieste en un estado gonadal y fisiológico adecuado; además de que se requieren ciertas condiciones ambientales. Tanto el perfil hormonal como el estado fisiológico de los individuos generan un patrón conductual propio de cada especie, la conducta de apareamiento, que asegura la realización de este fenómeno biológico <sup>(Crews, 1992)</sup>.

En los mamíferos, son muchas las estructuras que participan en este proceso, algunas de ellas interactúan mediante información hormonal y nerviosa para ejecutar determinada acción, pero otras son estructuras integradoras que recibiendo información del exterior, de órganos sexuales y de componentes emocionales de los individuos, para generar un patrón de secreción hormonal adecuado para el proceso de la reproducción. Dentro de estos órganos integradores, quizá el que muestre la mayor jerarquía sea el hipotálamo anterior. Esta estructura diencefálica, se caracteriza por poseer una gran cantidad de aferencias provenientes de muchos centros cerebrales y órganos periféricos. Esto implica que en estas células hipotalámicas se dan fenómenos de convergencia, que modulan la respuesta de las neuronas hipotalámicas. Las salidas de esta estructura también son de dos tipos. Existen salidas de tipo neural hacia otras



estructuras nerviosas y salidas de tipo hormonal, cuyo principal blanco es la hipófisis anterior. Ambas estructuras se encuentran conectadas vascularmente a través del sistema porta hipotálamo-hipofisiario (Pelletier, 1991).

Además de participar en la fisiología de la reproducción, las neuronas del hipotálamo anterior participan en la regulación de otros sistemas de secreción hormonal. Así, la secreción de hormonas tiroideas, suprarrenales y de crecimiento, entre otras, se modulan a través de neuronas hipotalámicas (Flament, 1980).

En el caso de la reproducción, las neuronas secretoras localizadas en el área preóptica, la cual constituye la región más anterior del hipotálamo, secretan factores o sustancias peptídicas que estimulan la liberación de gonadotrofinas (Flament, 1980). Entre éstas sustancias secretadas, la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), ha sido la más ampliamente estudiada (Brann y Mahesh, 1994). La GnRH es un péptido constituido por 10 aminoácidos (Leung, 1996), su blanco, son células acidófilas localizadas en la hipófisis anterior que han sido denominadas gonadotropos (Jeniorowski, et al, 1997). Las células productoras de GnRH son neuronas secretoras que poseen axones que terminan en las inmediaciones de la eminencia media. Esta estructura, incluida dentro del conjunto de órganos circumventriculares está altamente vascularizada y carece de barrera hemato-encefálica (Lightman, 1988). Los capilares que se localizan en esta región, dan origen al sistema porta hipotálamo-hipofisiario, así, en la región hipofisiaria se origina una nueva red capilar que recibe la sangre del sistema hipotalámico (Lightman, 1988).

De esta forma, la GnRH alcanza a los gonadotropos de la hipófisis anterior y los estimula para secretar tanto a la hormona luteinizante (LH) como a la hormona foliculo estimulante (FSH) (Zarate, et al, 1993). Esta

secreción, es mediada a través de receptores a GnRH localizados en la membrana celular del gonadotropo. Este receptor, conformado por siete dominios transmembranales, está acoplado a proteínas G; por lo que la unión de la hormona a su receptor, activa una proteína Gq, cuya subunidad  $\alpha$  se une y activa a una fosfolipasa C. Posteriormente, tal activación promueve la hidrólisis de Fosfatidil inositol difosfato (PIP2), desdoblándolo en Inositol trifosfato (InsP3) y diacilglicerol (DAG) <sup>(Naor, et al, 1998)</sup>.

Como parte del mecanismo de señalización intracelular, el InsP3 se une a su receptor localizado en el retículo endoplásmico para provocar la liberación de  $Ca^{2+}$ ; este ion en conjunto con el DAG activan a una PKC, que fosforila canales de calcio localizados en la membrana celular. Como resultado de esta acción se genera una corriente entrante de calcio reflejo del influjo de este ion a la célula. Finalmente, el incremento en los niveles de calcio intracelular, estimula tanto la síntesis como la secreción de LH y FSH (Fig.1) <sup>(Vanecek, et al, 1992)</sup>. Mediante este proceso de secreción de las hormonas LH y FSH, se regula la función gonadal.

En un gran número de especies de mamíferos, la hormona GnRH se secreta y libera de dos maneras; una de ellas es manera tónica, esto es una secreción continua con cambios muy lentos y de baja intensidad. Mientras que la otra es de tipo pulsátil misma que corresponde a una descarga sincronizada y fásica, de corta duración y mayor amplitud <sup>(Nishihara, et al, 1999)</sup>. Se desconocen los mecanismos fisiológicos que regulan estos tipos de oscilaciones en la secreción; sin embargo, tales patrones permiten explicar una de las características fundamentales de la fisiología de la reproducción: su ciclicidad <sup>(Thimonier, 1981)</sup>.

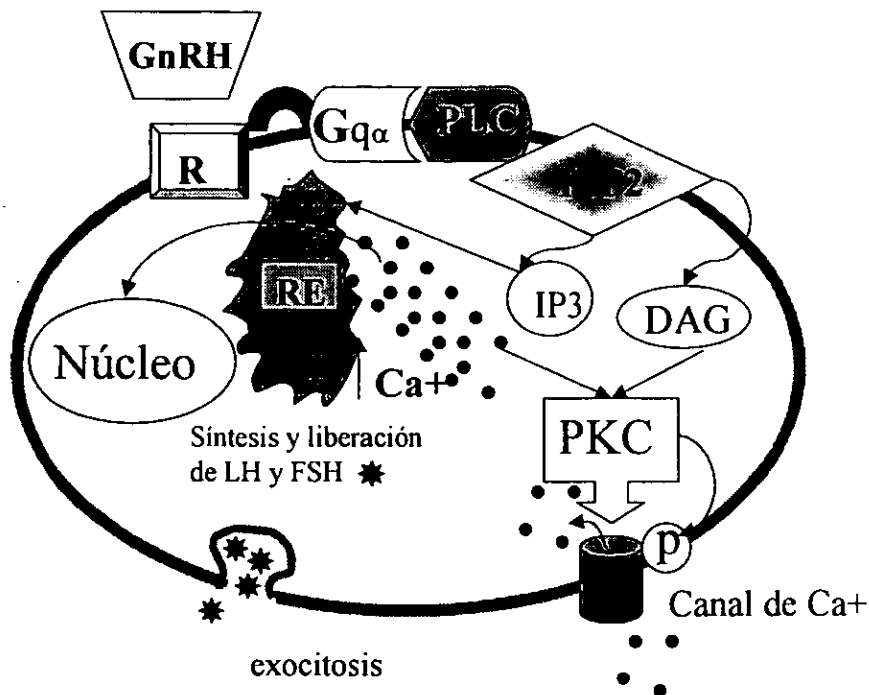


Fig.1. Esquema representativo de la cascada de señalización activada por la unión de GnRH a su receptor localizado en el gonadotropo de la adenohipófisis. La unión receptor-GnRH, induce un aumento de calcio intracelular, modulado a través de la activación de una fosfolipasa C. Este aumento de calcio promueve la activación enzimática para inducir la síntesis de las gonadotropinas.

Como consecuencia de estas oscilaciones en la secreción de esta hormona, tanto los niveles de gonadotropinas, como de las hormonas sexuales, muestran patrones de secreción que se repiten con cierta ciclicidad y que varían a lo largo de la edad de los individuos. Los niveles de las

gonadotropinas aumentan en el recién nacido durante los cuatro primeros meses de vida; posteriormente disminuyen hasta niveles muy bajos, los cuales se mantienen hasta antes de la pubertad <sup>(Styne, 1994)</sup>. Es decir, durante toda la etapa previa a la pubertad, la frecuencia del patrón pulsátil de la GnRH, se mantiene disminuida. Sin embargo, una vez que el organismo alcanza la pubertad (inicio de la madurez sexual), se presentan ciclos con de incrementos en la secreción de GnRH, lo que da origen al incremento de las hormonas hipofisarias y por ende a la activación gonadal <sup>(Zarate, et al, 1993)</sup>.

Las gonadotropinas hipofisarias, las cuales son liberadas en forma cíclica ejercen diversos efectos fundamentales necesarios para la reproducción. Por ejemplo, su acción directa sobre las gónadas provoca la secreción de las hormonas consideradas sexuales. Entre ellas se encuentran los estrógenos, la progesterona y la testosterona. El incremento de las hormonas sexuales promueve el crecimiento de los órganos genitales, la manifestación de las características sexuales secundarias dependientes de género; tales como el crecimiento del vello púbico, axilar y torácico, la barba, el aumento de la actividad de glándulas sebáceas, el agrandamiento de la laringe que induce un cambio en el tono de voz en el hombre, y el desarrollo de las mamas, y agrandamiento de las caderas en la mujer. Además del inicio de la espermatogénesis y la ovulación <sup>(Styne, 1994)</sup>.

En el humano, se presentan cambios cíclicos hormonales regulares, que dan origen al ciclo menstrual. Al igual que el resto de la actividad reproductora, esta ciclicidad, está subordinada a la secreción periódica de las hormonas gonadotróficas y ováricas <sup>(Franz, 1988)</sup>.

resulta extraño el hecho de que muchas especies utilicen este factor, para determinar la estación del año con base en la duración del día (Lincoln y Richardson, 1998)

La reproducción estacional es producto de la liberación periódica de las hormonas reguladoras y en su ausencia se induce naturalmente una contracepción; fisiológicamente el individuo presenta un hipogonadismo durante la época de anestro, lo que evita un nacimiento en una época inadecuada del año, lo cual depende de la especie. De acuerdo al estímulo fotoperiódico requerido, para la activación del ciclo reproductivo, existen especies de reproducción estacional de días cortos, como las cabras y las ovejas, y también especies de reproducción estacional de días largos, entre las que se encuentran el hámster y el caballo (Yokoyama, 1992)

Como se hace evidente, la secreción de GnRH constituye el punto de partida para el proceso de la reproducción. Es esta secreción la que debe ser modulada en una forma integral y constante para determinar el momento y la cantidad de esta hormona que debe ser liberada, ya que cualquier reducción o incremento en su producción se reflejará en un cambio significativo en la reproducción de las especies (Parvizi, 1988). Uno de los primeros mecanismos de control de secreción de la GnRH descritos, fue el efecto de las hormonas sexuales mismas. Así estas hormonas sexuales, por mecanismos de retroalimentación, ejercen una influencia moduladora sobre todo el eje hipotálamo-hipófisis (Horvath, 1997)

Las hormonas sexuales son esteroides altamente liposolubles gracias a su naturaleza química, proveniente del colesterol; es decir poseen un núcleo químico derivado del ciclo pentanoperhidrofenantreno (Fig.2.) (Kawata, 1995)

Las concentraciones de esteroides en las inmediaciones de las células hipotalámicas e hipofisarias actúan para controlar, a través de un mecanismo de retroinformación negativa, la secreción de gonadotropinas. Así que un incremento en la concentración plasmática de esteroides sexuales invariablemente se acompaña de una disminución en la secreción de GnRH, lo cual en cierto plazo reducirá las concentraciones de estos estrógenos. Por el contrario, si las concentraciones de estrógenos están reducidas en el plasma los niveles de GnRH al carecer del efecto inhibitor de los mismos incrementará su secreción y con ello estimulará a las gónadas para incrementar la secreción de este mismo tipo de esteroides. Como resultado de este mecanismo, las concentraciones de GnRH y de esteroides se mantendrán siempre en un rango específico <sup>(Marshall, et al, 1991)</sup>. Aunque el mecanismo celular de este control recíproco no es completamente conocido, probablemente éste sea resultado de una acción genómica.

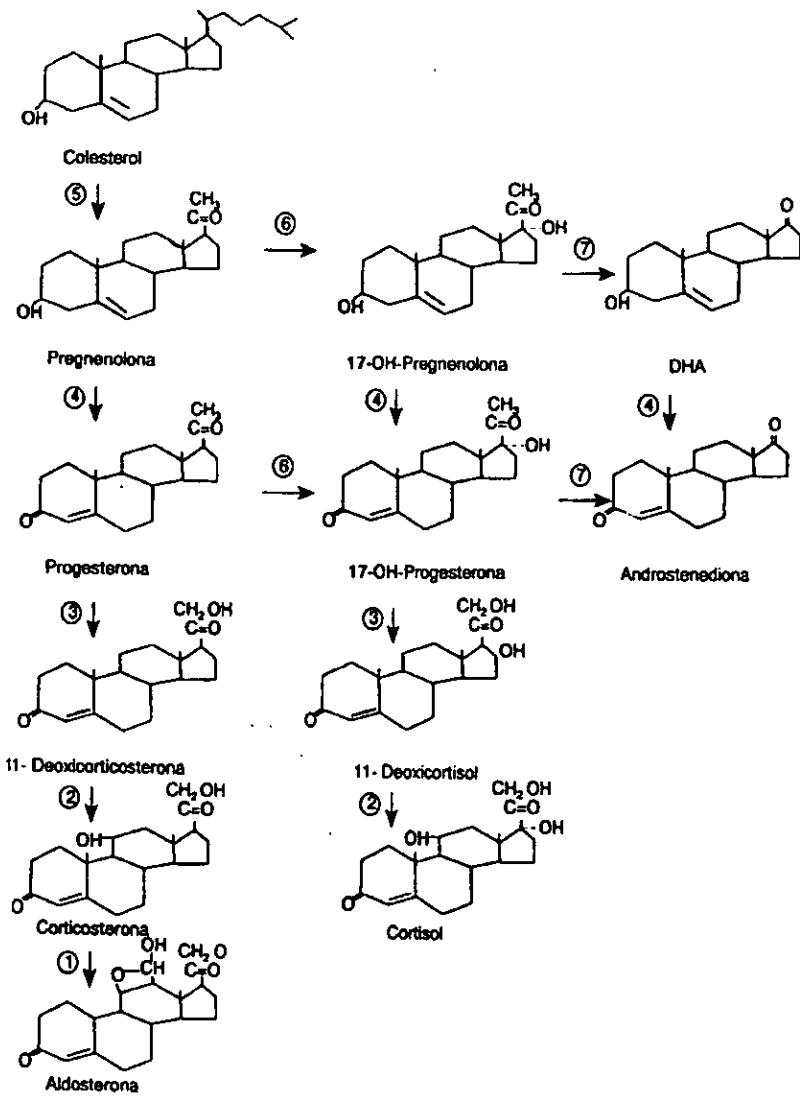


Fig.2. Biosíntesis de las hormonas esteroideas. Tomado de Zarate, 1993

Después de ser liberados por las respectivas gónadas, la mayoría de esteroides se unen a proteínas transportadoras, las cuales liberan estos esteroides a nivel de tejidos periféricos. Los esteroides libres, pueden fácilmente penetrar las membranas de sus células blanco, y dentro del citoplasma sufrir algunas modificaciones como es el caso de la testosterona, la cual se transforma en la dihidrotestosterona (DHT) un andrógeno más potente. También dentro del citoplasma, los esteroides se asocian a proteínas que los dirigen hacia el núcleo, para su unión con los receptores nucleares. Finalmente, el complejo esteroide-receptor ejercerá un efecto genómico, a través de modular la transcripción de una serie de genes, para su posterior síntesis a proteínas <sup>(Klein, 1998)</sup>.

Algunas estructuras del sistema neuroendocrino fijan esteroides. Como es el caso del estradiol, el cual es captado en la hipófisis y el hipotálamo, este último incluye a la [región preóptica, y el área hipofisiotrópica (eminencia media, hipotálamo medial y anterior basal)], la amígdala y el cerebro medio. Los andrógenos como la testosterona y la 5-DHT son captados por la hipófisis y el hipotálamo, prácticamente en las mismas regiones que el estradiol. Por su parte, la progesterona es fijada por la corteza cerebral, el cerebelo, el mesencéfalo y el hipotálamo. Los glucocorticoides (cortisona y desoxicortisona) se fijan en mayor concentración en el hipocampo, la amígdala, el septum y el hipotálamo. Los mineralocorticoides se asocian en la mayoría de los órganos circumventriculares <sup>(Stomati, et al, 1998)</sup>.

La mayor parte de las influencias intrínsecas no hormonales a que están sometidas las células productoras de GnRH se ejercen a través de toda una red de sistemas neurales, que incluyen al neuropéptido Y, galanina,



sistemas adrenérgicos, dopaminérgicos, opiopeptidérgicos, serotoninérgico, así como por aminoácidos como el GABA y el glutamato (Stomati, et al, 1998)

Fig.3. Toda esta gama de influencias ejercidas por estas sustancias, implica que las células productoras de GnRH poseen en sus membranas una cantidad importante de diversos receptores (Fig.3), así como también los mecanismos de señalización intracelular capaces de mediar tales respuestas (Scott, et al, 1988)

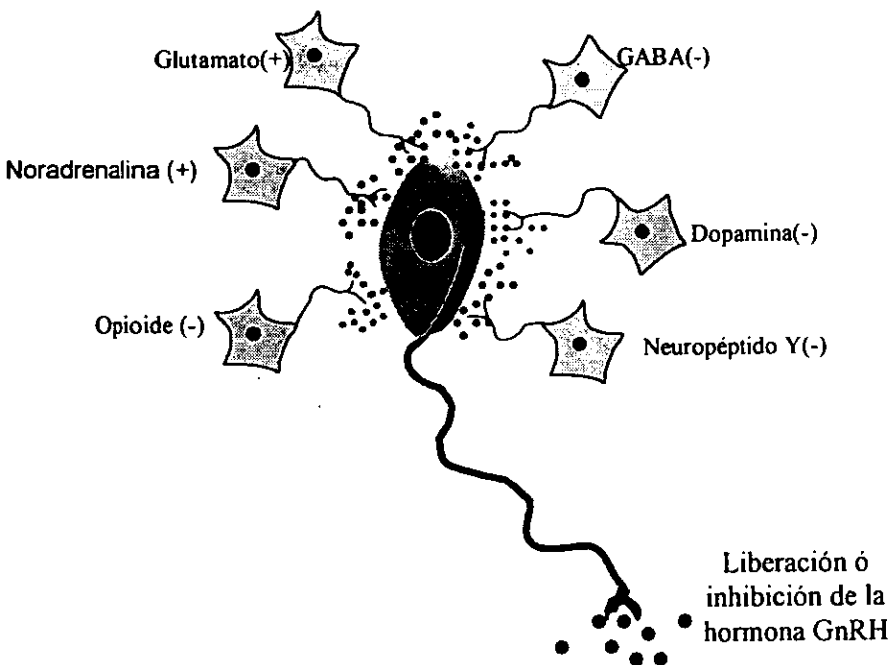


Fig.3. Esquema que muestra las influencias moduladoras a la que están expuestas las células productoras de GnRH. La noradrenalina, el glutamato y el neuropeptido Y, influyen de manera positiva sobre la liberación de la GnRH, mientras la dopamina, GABA y los opioides ejercen una acción contraria. Estas influencias moduladoras dependen del estado fisiológico del animal.

Por otro parte, de los factores externos que modulan la reproducción, quizá la influencia más puntual y fácil de mostrar es el efecto del fotoperíodo ambiental. Varios resultados muestran que la sola alteración del fotoperíodo retarda, adelanta, bloquea o induce la reproducción<sup>(Goldman, 1999)</sup>. Este efecto se manifiesta sobre todo en especies con reproducción estacional; entre las cuales el hámster dorado ha mostrado ser muy sensible a dicho efecto<sup>(Gertanach y Aurich, 1988)</sup>.

El mantener al hámster dorado en oscuridad continua o en días cortos, similares a los del invierno, provoca una atrofia gonadal severa, la cual es incompatible con la reproducción. Este efecto puede ser bloqueado por la pinealectomía, lo cual sugiere la presencia de un factor hormonal producto de la glándula pineal (Fig.4.) que ejerce efectos antigonadotrópicos y que puede modular la reproducción estacional<sup>(Pevet, 1988)</sup>. Se ha mostrado que este compuesto es la melatonina y su administración en cualquier condición fotoperiódica o época del año, induce una atrofia gonadal en el hámster dorado<sup>(Pevet, 1998)</sup>.

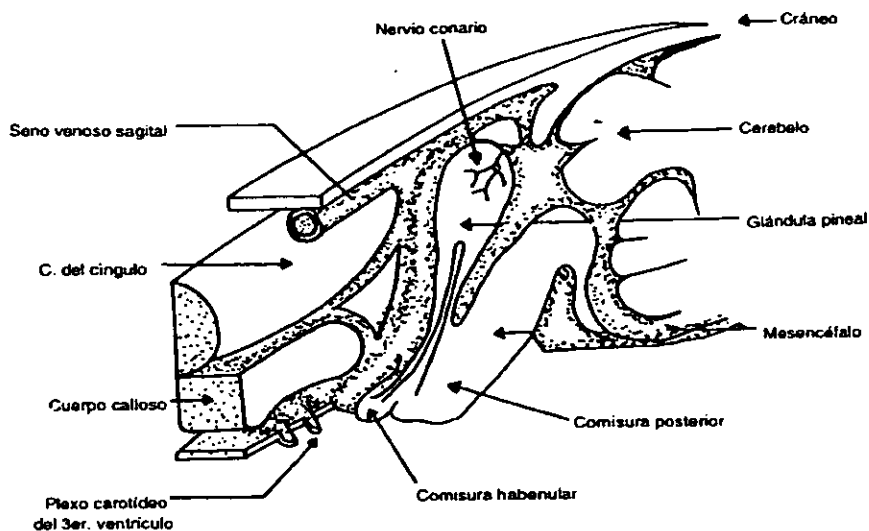


Fig.4. El esquema representa la disposición anatómica de la glándula pineal y estructuras relacionadas en la rata. La glándula pineal es una estructura diencefálica, está inervada por fibras catecolaminérgicas y péptidérgicas, esta inmediatamente debajo del hueso craneal, se encuentra rodeada por estructuras vasculares en los mamíferos. Tomado de Zarate, et al, 1993

La melatonina es un indol producido en la glándula pineal exclusivamente durante la escotofase; es decir muestra un ritmo fotoperiódico de secreción. Este patrón de secreción es consecuencia de la relación de la pineal con vías y estructuras nerviosas que participan en la regulación del ritmo circadiano (Fig.5). Los osciladores rítmicos utilizan la información fótica como sincronizador. (Cassonove, 1998)

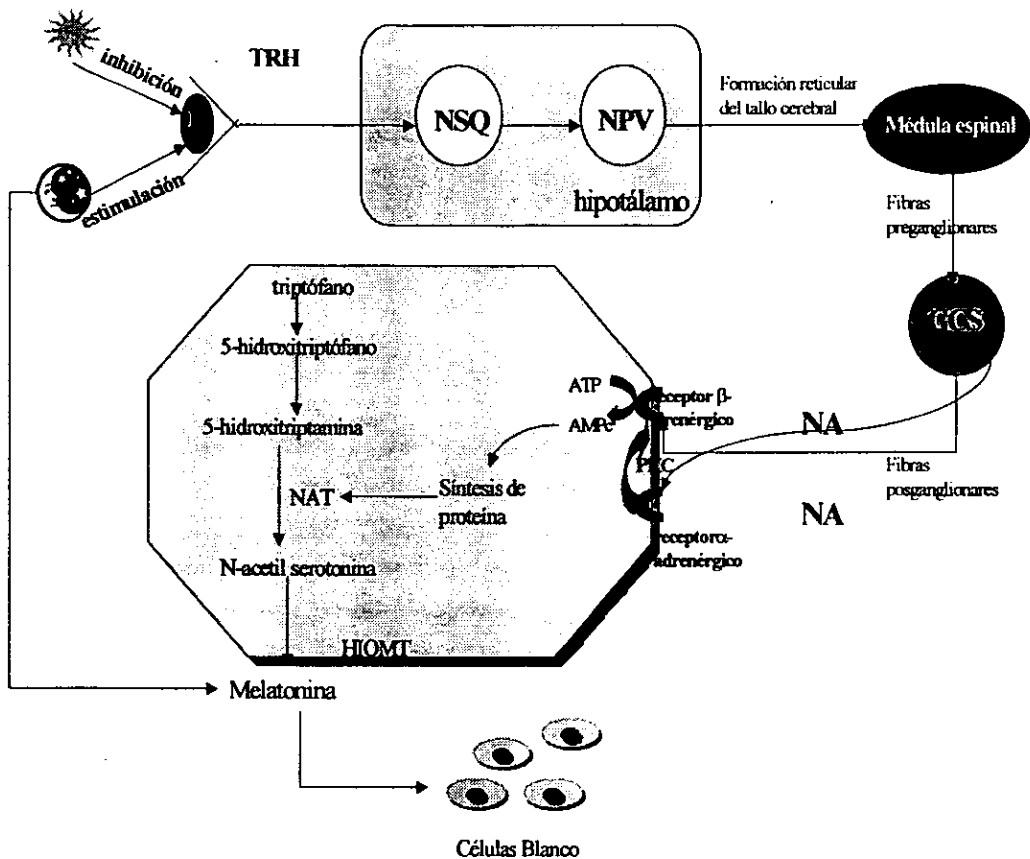


Fig.5. Esquema de los mecanismos principales que controlan la síntesis de melatonina. Se muestra la vía neural implicada en transmitir la información fótica del medio externo a la glándula pineal. Esta información fótica se inicia en las fibras de la retina del ojo, de ahí pasa al tracto retino hipotálamico (TRH)→ Núcleo supraquiasmático(NSQ)→ Núcleo paraventricular (NPV)→Médula espinal→ Ganglio cervical superior. Finalmente las fibras posganglionares alcanzan a la glándula pineal y es ahí donde se secreta la noradrenalina (NA), la cual se une a los receptores adrenérgicos para inducir la síntesis de melatonina durante la escotofase. Modificado de Arent, 1998.

Durante la escotofase, las fibras simpáticas que inervan a los pinealocitos, liberan noradrenalina, el cual a través de receptores  $\beta$ -adrenérgicos provoca la activación de una adenilato ciclasa dependiente de proteínas G, incrementando los niveles de AMPc intracelular, recientemente se ha mostrado que los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos mejoran la acción inducida por los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, manteniendo los niveles de AMPc elevados <sup>(Arendt, 1998)</sup>. Esta elevación de AMPc estimula la expresión del gen CREB el cual codifica a la enzima N-acetil-transferasa (NAT), cuya presencia induce la síntesis de melatonina <sup>(Sassone, 1998)</sup> (Fig.5).

Una vez activada la cascada de señalización, la melatonina se sintetizará a partir del triptófano, el cual es el sustrato para la hidroxilasa del triptofano, por acción de esta enzima se obtiene el 5-hidroxi-triptofano (5-HTP). La etapa enzimática siguiente es una descarboxilación ejercida por una enzima inespecífica, la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos, la cual transforma el 5-HTP en serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) <sup>(Bernard, et al, 1999)</sup>

La conversión de serotonina a melatonina está bajo el control de la enzima N-acetiltransferasa cuyo producto es la N-acetilserotonina, la cual es transformado en melatonina por la acción de la enzima Hidroxi-indol-O-metiltransferasa. Existe también la producción alterna de otros compuestos indólicos, los metoxitriptoles y los metoxiindoles conjugados con ácido acético (Fig.6.). Estos compuestos pueden ejercer efectos similares a los provocados por la melatonina; aunque su importancia biológica aún no ha sido descrita completamente <sup>(Foulkes, 1997)</sup>.

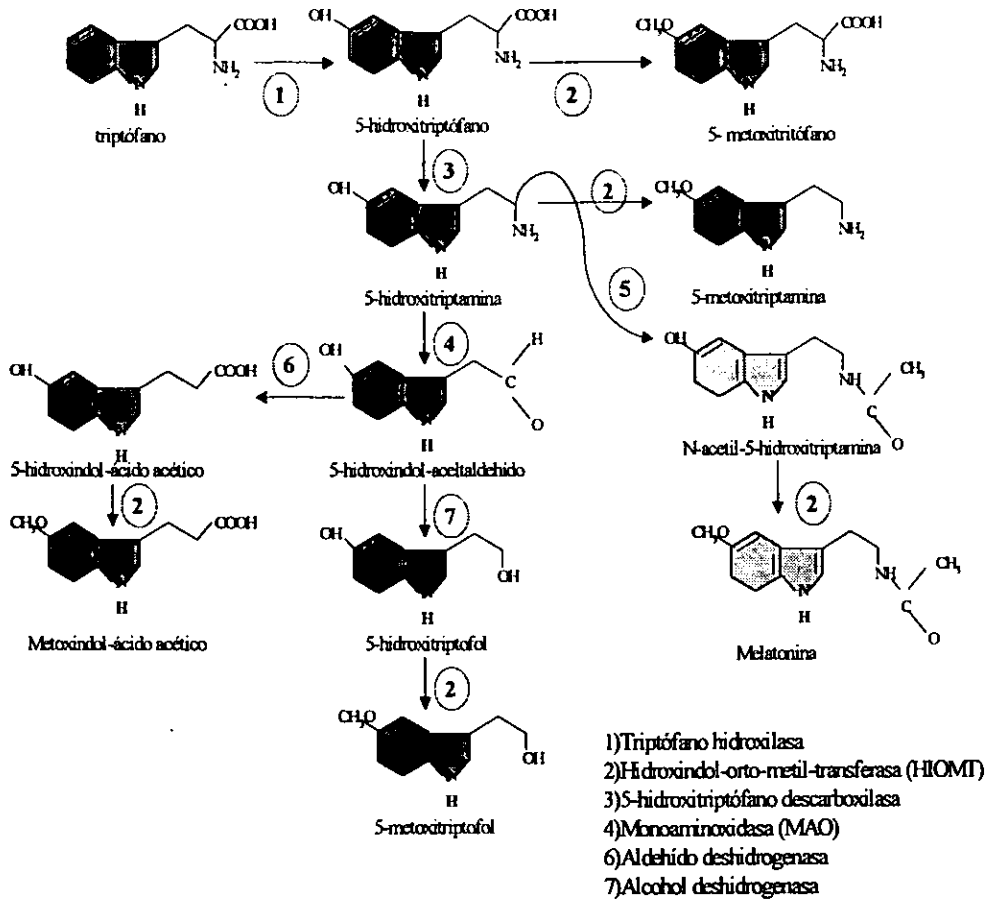


Fig.6. El esquema ilustra la vía biosintética de los indoles de la pinesal, así como de las enzimas que participan en la misma. Tomado de Zarate, et al ,1993.

La producción de las enzimas y que participan en la síntesis de los precursores y la melatonina mantiene un ritmo de secreción asociado al fotoperiodo (Fig.7.) (Zarate, et al. 1993), de tal manera que su producción y

secreción se reduce de una manera drástica por efecto de estímulos luminosos con una intensidad de al menos 2000 luxes (Zalwiska, 1993)

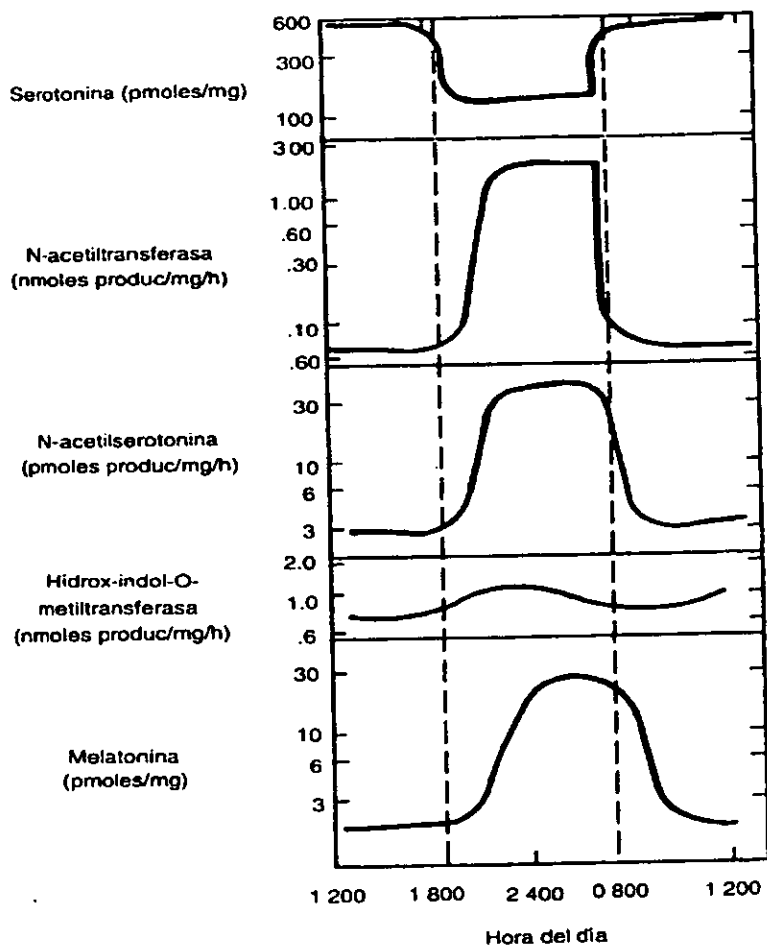


Fig.7. Esquema que muestra las oscilaciones circadianas, de los indoles y enzimas que participan en la síntesis de melatonina en la glándula pineal de la rata. Tomado de Zarate, et al, 1993.

La estructura del gen de la melatonina está altamente conservada en las diferentes especies donde ha sido clonado, la región codificante esta compuesta de dos exones y un largo intrón<sup>(Kokkola and Laitinen, 1998)</sup>. En los mamíferos se ha descrito la presencia de 3 tipos diferentes de receptores a la melatonina los MT1, MT2 y MT3, los dos primeros están acoplados a sistemas de proteínas G. Estos receptores consisten de una simple cadena polipeptídica de 39 a 47 KDa y de 346 a 420 aminoácidos, están constituidos por siete dominios transmembranales (TM I, II, III, IV, V, VI, y VII ) conectados por asas intra y extracelulares, el amino N-terminal está del lado extracelular y presenta uno o dos sitios de glicosilación, mientras que el carboxilo terminal es intracelular<sup>(Reppert, 1997)</sup> (Fig.8.). Los efectos desencadenados por la melatonina son consecuencia de una acción mediada a través de receptores específicos localizados en la membrana de las células blanco.

Estos receptores se localizan en el sistema nervioso central de diferentes especies de vertebrados<sup>(Foulkes, et al, 1997)</sup>. En la rata, su localización es preferencialmente en el hipotálamo anterior, el núcleo supraquiasmático, y el hipocampo<sup>(Morgan, et al, 1994)</sup>.

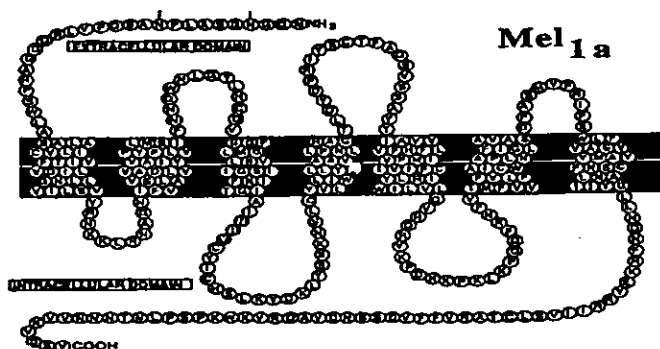


Fig.8. Esquema del receptor de melatonina 1ª (MT1), estructuralmente en forma de serpiente, con 7 dominios transmembranales. Tomado de Reppert, 1997.



Cuando se administran concentraciones fisiológicas de melatonina se observa una reducción en los niveles séricos de hormonas sexuales y de sus respectivas gonadotropinas <sup>(Olcese, 1995)</sup>. Estos efectos parecen ser consecuencia de una acción directa de la melatonina sobre todo el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. Entonces, los factores hipotalámicos de liberación de gonadotropinas se reducen por efecto de esta hormona, lo que sugiere una acción directa sobre el hipotálamo y quizá sobre las células productoras de estos factores de liberación o sobre algún componente aferente de estas células. Además, estudios in vitro realizados en gonadotropos de ratas recién nacidas, muestran que la melatonina disminuye la síntesis y liberación de las gonadotropinas de la adenohipófisis <sup>(Vanecek, 1998)</sup>.

Estos efectos implican una acción antigonadotrópica, la cual se manifiesta ampliamente en los roedores con reproducción estacional del tipo del *hámster dorado*, *hámster djugariant* y el *hámster syrian*, en quienes la infusión diaria de melatonina provoca una regresión gonadal muy similar a la observada cuando estos animales se mantienen en oscuridad continua <sup>(Pevet, 1988)</sup>. Sin embargo, esta actividad antigonadotrópica también se manifiesta en el desarrollo gonadal de especies de reproducción no estacional como la rata, en la cual la administración diaria en la etapa de maduración sexual, induce un retardo en la tasa de incremento de peso de los ovarios en la hembra y de testículos en el macho <sup>(Olcese, 1995)</sup> Fig.9.

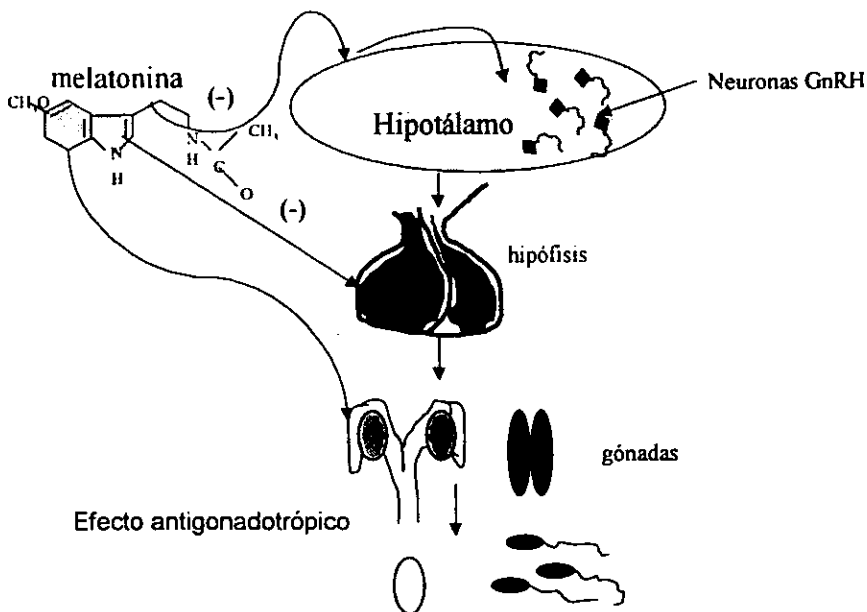


Fig.9. Esquema que muestra la influencia que ejerce la melatonina sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, causando una atrofia gonadal en hámster y rata.

El hipotálamo, centro integrador de señales hormonales en relación con la reproducción, posee receptores a melatonina en regiones cercanas a las células productoras de GnRH. Estas células GnRH son neuronas pequeñas (12-18  $\mu\text{m}$ ) localizadas en el hipotálamo medio basal y el área preóptica. En los núcleos del hipotálamo de la rata se encuentran entre 800 a 1500 de estas neuronas <sup>(López, et al, 1998)</sup>. La liberación de GnRH ocurre de manera tónica y pulsátil.

Los sistemas catecolaminérgicos implicados en la modulación de la liberación de GnRH comprenden, al sistema noradrenérgico y dopaminérgico. El primero modula la liberación pulsátil de GnRH, a través de receptores  $\alpha_{1b}$ -adrenérgicos <sup>(Yokoyama, 1992)</sup>, estos receptores están acoplados a

proteínas G. Cuando la noradrenalina se une a su receptor  $\alpha_{1b}$ -adrenérgico, se activa la disociación de las subunidades de la proteína Gq, lo cual induce la activación de la fosfolipasa C (PLC) y la activación de canales de  $Ca^{++}$  sensibles a voltaje. Este ion es un importante mensajero intracelular implicado en la liberación de GnRH (Negro-Vilar, et al, 1987). La noradrenalina induce una despolarización de las neuronas productoras de GnRH, lo que provoca la activación de señales transmembranales, que inducen la secreción y síntesis de la GnRH Fig.10. En presencia de prazocina (bloqueador específico de los receptores  $\alpha_{1b}$ -adrenérgicos) la secreción pulsátil de GnRH no ocurre (Rettoni, (a) 1997).

Ha sido sugerido que el sistema dopaminérgico ejerce una acción moduladora de la liberación de GnRH. Recientes estudios apoyan que la dopamina tiene un papel permisivo sobre la liberación de la GnRH a través de regular neuronas gabaérgicas. Aunque también se ha propuesto una posible acción directa de dopamina sobre las neuronas secretoras de GnRH, a través del receptor dopaminérgico D2, el cual es capaz de activar canales  $K^+$  acoplados a una Gi (proteína G inhibidora de la enzima adenilato ciclasa), la disociación de las subunidades de la proteína Gi, promueve la activación de el canal Kir, lo que produce una hiperpolarización de la membrana de las neuronas GnRH, inhibiéndose de esta manera los procesos de secreción de la GnRH Fig.10 (Belousov y Van Del Pol, 1997).

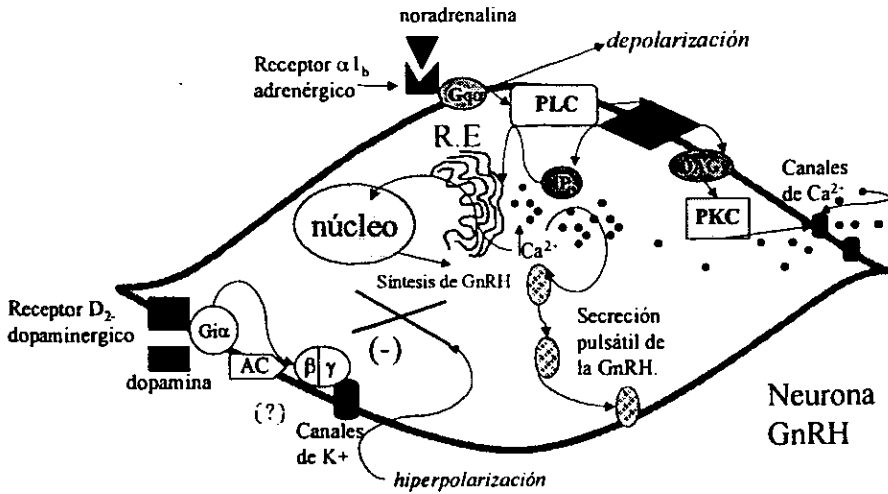


Fig.10. El esquema muestra la modulación que ejercen la noradrenalina y la posible modulación directa de dopamina sobre las neuronas secretoras de la GnRH.

Los efectos de los neurotransmisores y hormonas sobre la liberación de GnRH son precedidos por cambios en el nivel de excitabilidad de las neuronas que secretan tal producto; ya que tal liberación es dependiente de calcio y además la penetración de este ion al interior de la célula es a través de canales de calcio dependientes de voltaje. La activación de tales canales requiere una despolarización de la membrana celular en niveles cercanos a los  $-30$  mV (Nishihara, et al, 1999). Por esta razón los productos que incrementan la secreción de este factor deben despolarizar a la célula; mientras que los que la inhiben deben hiperpolarizarla o bloquear cualquier despolarización (Hiruma, et al, 1992).

Por ejemplo, en estudios realizados con electrodos de registro en el hipotálamo medio basal y en el área preóptica en rata se encontró que cuando se incrementa la actividad eléctrica multiunitaria en alguna de las

áreas mencionadas, se obtiene un pico de LH, lo que sugiere que el incremento en la excitabilidad de estas neuronas induce la secreción de GnRH y por ende la de LH (Yokoyama, 1992). Las células productoras de GnRH además de ser moduladas por catecolaminas, son influenciadas por serotonina, opioides y aminoácidos como el glutamato y GABA, entre otros (Solis, et al, 1995), y cada vez que uno de estos ligandos se une a su receptor respectivo, se ejerce una influencia ya sea excitadora (noradrenalina y glutamato) o bien inhibitoria (serotonina, dopamina, opioides y GABA) sobre la excitabilidad neuronal y por ende sobre la secreción de esta hormona (Wuttke, et al, 1996).

En el caso de la melatonina el esquema no es muy claro; algunos autores muestran que las neuronas productoras de GnRH no poseen receptores a la melatonina, lo que sugiere una acción indirecta a través de otras aferencias, por ejemplo a través del sistema GABAérgico, peptidérgico, serotoninérgico o catecolaminérgico entre otros (Malpoux, et al, 1999). Sin embargo, existe estudios que sugieren que estas células poseen receptores a melatonina y responden en forma directa a las concentraciones de este indol (Negro-Vilar, 1987). La controversia no ha sido aún resuelta.

Los estudios electrofisiológicos realizados en el hipotálamo de la rata, han mostrado que la aplicación sistémica y local de melatonina, produce una disminución en el disparo del potencial de acción en estas neuronas (Prieto, 1989); esto mismo ha sido señalado en neuronas del núcleo supraquísmico e hipocampo (Nelson, 1996). Como consecuencia de la disminución de la excitabilidad provocada por melatonina, seguramente los procesos de secreción de estas células se reducen.

La excitabilidad celular, es función del potencial de membrana de cada célula y la génesis y mantenimiento del mismo es consecuencia directa de la actividad de múltiples canales iónicos de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{K}^+$ . De estos, los de  $\text{K}^+$  son en gran parte los responsables del potencial de membrana y por ende del control de la excitabilidad. Este canal es el utilizado por aquellos compuestos, neurotransmisores y fármacos dirigidos a modificar la frecuencia de descarga de las neuronas.

Recientemente se ha mostrado en ovocitos de *Xenopus*, que la melatonina es capaz de inducir la activación de una corriente entrante de  $\text{K}^+$  a través de un canal de potasio rectificador entrante (kir) (North, 1989 y Nelson, et al, 1996). Los canales tipo Kir 3.1, 3.2 y 3.3 son canales activados por las subunidades  $\beta\gamma$  de la proteína  $G_i$ , presentan una conductancia unitaria de 4 a 40 pS (Doupnik, et al, 1995). El Kir 3.1 ha sido localizado por hibridación in situ en cerebro de rata, con distribución moderada en hipotálamo (Karsching, et al, 1994). Aún no ha sido demostrado en hipotálamo de rata, si melatonina es capaz de modular la activación de este canal para ejercer su efecto depresor sobre la excitabilidad neuronal, descrita anteriormente.

## Planteamiento del problema-\_\_

Aunque en algunas especies la melatonina parece ejercer efectos progonadotrópicos <sup>(Malpoux, et al, 1999)</sup>, en la mayoría de ellas su acción es básicamente antigonadotrópica <sup>(Olcese, 1995)</sup>. Este último efecto es consecuencia de una acción inhibitoria en la secreción de la GnRH y por ende de LH y FSH. Se ha descrito, aunque de manera controversial, un mecanismo de acción de la melatonina en los gonadotropos de rata, que implica el bloqueo del transporte membranal de calcio <sup>(Vanecek, 1998)</sup>, sin embargo en las células hipotalámicas productoras de GnRH, el mecanismo de acción no está claro. La controversia se inicia desde la localización de los receptores a melatonina en estas células. Algunos autores mencionan que las células hipotalámicas productoras de GnRH no poseen receptores a la melatonina <sup>(Malpoux, et al, 1997)</sup>. De ser este el caso, en una situación in situ, los efectos de la melatonina serían indirectos y mediados a través de algunos de los sistemas de neurotransmisores para los que estas células si poseen receptores, tales como las catecolaminas.

Para otros autores estas células si expresan, receptores a melatonina, aunque sus resultados son de estudios in vitro, como es el caso de las células inmortalizadas productoras de GnRH y que se conocen como GT1 y GT3 <sup>(Alonso, 1996)</sup>. Además debido al efecto inhibitorio sobre la secreción hormonal, el cual se correlaciona con una acción inhibitoria de la actividad eléctrica neuronal, es de suponerse que el mecanismo celular implicado en este efecto consista en una reducción de la excitabilidad. A nivel de mecanismos iónicos, esta acción debe asociarse a cambios en la conductancia de los canales implicados en el mantenimiento del potencial de

membrana, particularmente del potasio. En el caso de este tipo celular hipotalámico es necesario considerar a un canal rectificador entrante de potasio el cual es fundamental en el mantenimiento de la excitabilidad celular (Nelson, 1996). Esto permite suponer la relación entre la melatonina y la excitabilidad de las neuronas hipotálamicas en función de la conductancia del canal Kir.

## **Objetivo General**

El objetivo general del presente trabajo es el describir, la posible influencia que ejerce la melatonina sobre la excitabilidad de las neuronas del hipotálamo anterior, incluyendo a las células productoras de GnRH. Así como también el describir las características de este efecto y el mecanismo de acción utilizado por este indol.

## **OBJETIVOS particulares:**

- 1) Describir el efecto de la melatonina sobre el patrón de la actividad espontánea de las neuronas del hipotálamo anterior en animales íntegros.
- 2) Analizar comparativamente el efecto de la serotonina, dopamina y noradrenalina sobre la excitabilidad de las neuronas hipotálamicas.
- 3) Determinar posibles interacciones entre la melatonina y alguno de estos neurotransmisores, empleando herramientas farmacológicas.
- 4) Describir el efecto de la melatonina sobre el potencial de membrana de células hipotálamicas anteriores en rebanadas de cerebro.



5) Analizar el efecto de la melatonina sobre la conductancia de un canal rectificador entrante de potasio en las neuronas del hipotálamo anterior empleando la técnica de patch-clamp.

6) Comparar los efectos de la dopamina y noradrenalina con los de la melatonina sobre las corrientes de este canal rectificador entrante de potasio.

## **HIPOTESIS:**

1) Si hay modificación de la actividad espontánea de las neuronas hipotálamicas al aplicar melatonina, es posible que el indol module a esos sistemas neuronales para inducir su efecto a nivel hipotalámico.

2) Si los efectos provocados por la melatonina sobre la excitabilidad y la secreción de GnRH son mediados por algún sistema de neurotransmisor hipotalámico, entonces sus efectos serán modificados por la aplicación de tal neurotransmisor.

3) Si el efecto de melatonina reduce la excitabilidad celular, es posible que esto sea consecuencia de una acción sobre un canal rectificador entrante de potasio, entonces la aplicación de este indol debe incrementar la conductancia de este canal.

## **CAPÍTULO II**

### **Metodología**

Para alcanzar los objetivos plantados utilizamos dos metodologías experimentales. La primera consistió en el registro extracelular de la actividad unitaria de neuronas del hipotálamo anterior en ratas íntegras, anestesiadas y fijadas en un aparato esterotáxico. La segunda metodología consistió en el registro de las corrientes transmembranales de potasio en parche de membrana con fijación de voltaje (patch-clamp). Esta técnica se realizó también en neuronas del hipotálamo anterior en rebanadas de cerebro de 450  $\mu\text{m}$  de grosor.

#### **-Metodología para registros extracelulares.**

Se emplearon 62 ratas macho de la cepa Wistar sexualmente íntegros, con pesos que oscilaron entre 180-200 g, aproximadamente de 3 meses de edad, en el momento del experimento. Los animales se mantuvieron previamente en jaulas individuales de 10 a 15 días antes de la sesión de registro. Tanto el fotoperíodo, 14 hrs luz 10 hrs oscuridad (6:00-20:00), como la temperatura (25 °C) fueron rigurosamente controlados durante al menos 15 días previos al experimento. Los animales tenían acceso libre al agua y alimento (Purina Rat Chow) las 24 horas del día.

#### **-Sesión de registro.**

Para la sesión de registro, se privaba a los animales de comida y agua 12 horas antes. Posteriormente se anestesiaban con uretano (1.25 g /Kg. i.p.), cuando alcanzaban el plano quirúrgico se les rasuraba el cuero

cabelludo de la piel que cubre la región anterior del cuello y dorsal al cráneo. Inicialmente en una posición de decúbito dorsal, se realizaba una traqueostomía colocándose un catéter intratraqueal del No. 8; además se disecaba la vena cava inferior para colocar un catéter intravenoso para la aplicación de anestésico de una concentración del 15 % del mismo aplicado por vía intraperitoneal, con el fin de mantener un estado analgésico continuo. Además durante el registro fue colocado un colchón térmico por encima del animal para mantener su temperatura corporal tan constante (36° C) como fuera posible. Una vez realizado esto, la rata se colocaba en un aparato estereotáxico (David Kopf), y se realizaba una incisión longitudinal de 2.5 cm en la parte superior del cráneo. Entonces se procedía a marcar la región del cráneo que correspondía al área del hipotálamo anterior, de acuerdo a las coordenadas que indica el atlas estereotáxico de Pellegrino y cols (1986).

Se realizaban dos trépanos en el cráneo; uno de ellos de 6 mm de diámetro de acuerdo a las coordenadas anteroposterior de 0.8 mm posterior al bregma, lateral de 0.4 mm y con una altura que oscilaba desde 6.2 a 8 mm a partir de la superficie del cerebro. Estas coordenadas corresponden a la región del hipotálamo anterior preóptico sitio que muestra la mayor concentración de células productoras de GnRH (López, et al, 1998).

Se colocó un tornillo de acero inoxidable de 3mm en el trépano realizado en la región más lateral y posterior, éste hacía las veces de electrodo indiferente. Para la aplicación local de fármacos y registro de actividad extracelular, se utilizó la técnica de inyección por presión (micropresión). Para ello, se fabricaron ensambles de 5 micropipetas (WPI 150 FI), las pipetas después de ser pegadas con cianocrilato se estiraban conjuntamente en un estirador vertical (Narishige PE-2), quedando una punta

común para las 5 micropipetas. La primer micropipeta se utilizaba como electrodo de registro, para ello se llenaba con una solución de NaCl 4 M en verde rápido saturado (Prieto, 1989).

Un alambre de plata clorado conectado a una derivación de una sonda de alta impedancia (Grass HIP 511E), se introducía hasta el fondo de la micropipeta, usualmente la impedancia óhmica de este electrodo oscilaba entre 15 y 25 MΩ. La sonda de alta impedancia se conectó a un amplificador de AC (Grass J510), cuya salida se conectaba a un osciloscopio (Tektronix 55526) a un audiomonitor (Grass AM8) y a un sistema de captura y análisis computarizado (Computerscope, RC electronics) el cual determinaba un nivel de ventana, contaba el número de espigas y realizaba los histogramas correspondientes. De esta manera se obtenían los respectivos histogramas de frecuencias e histogramas acumulativos; antes, durante y después de la aplicación de cualquiera de los fármacos empleados en este estudio ( Fig.11.).

Tres de las micropipetas restantes se llenaban con alguna de las siguientes soluciones:

- 1) Melatonina 1 mM disuelta en una solución que contenía 20% de polietilenglicol, 1% de etanol y aforada con agua destilada.
- 2) Dopamina 100 mM disuelta en agua destilada
- 3) Noradrenalina 10 mM y 100 mM disueltas en agua destilada
- 4) Prazocina (Bloqueador de receptores adrenérgicos  $\alpha_{1b}$ ) 1 mM disuelto en agua destilada.
- 5) Serotonina 10 mM disuelta en una solución al 2% de ácido ascórbico y agua destilada.

La quinta micropipeta se llenaba las más de la veces con una solución de NaCl fisiológica y en pocas ocasiones con vehículo de la dilución de melatonina. Esta micropipeta se utilizó para balancear la presión en la punta del ensamble, y como control de los efectos inducidos por las soluciones que se usaron como vehículos.

Este ensamble de micropipetas se montaba en una torre del esterotáxico y se descendía a través del trépano hasta las regiones del hipotálamo anterior.

El ensamble de micropipetas se descendía a una velocidad de 1 mm/seg para localizar células con actividad espontánea. Cuando se visualizaban espigas (potenciales de acción) se procedía a registrar una actividad basal durante al menos 15 minutos. Si la actividad continuaba constante entonces se procedía a la aplicación de los fármacos. Para ello se utilizó un equipo de micropresión constituido por una picobomba (WPI, PV800), la cual utiliza nitrógeno gaseoso para empujar al fármaco fuera de la micropipeta.

La fase experimental consistía de un registro continuo durante 15 minutos de actividad basal seguido de la aplicación por pulsos del fármaco en cuestión. Estos pulsos oscilaron entre 3 a 100 psi aplicados durante 15 a 60 segundos. Con la finalidad de evitar efectos aditivos, entre cada aplicación transcurría al menos un periodo de 60 segundos. En ocasiones se aplicó mas de un fármaco simultáneamente, aunque la administración de uno de ellos se iniciaba un poco antes que la de los otros. Durante todo el tiempo que duró la aplicación de fármacos el registro de la actividad extracelular continuaba.

Una vez finalizado el registro extracelular se administraba una corriente catódica (1.5 mA durante 20 minutos) que expulsaba al colorante de la pipeta de registro. Gracias a esta estrategia fue posible marcar los sitios de registro y determinar la regionalidad de algún tipo de registro o efecto farmacológico. Terminado el experimento, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital, perfundidos primero con solución salina a 35 °C y posteriormente con una solución de formaldehído al 10%. Se extraían los cerebros y se almacenaban durante al menos 10 días en una solución de formaldehído al 10%. Después de este tiempo se lavaban con agua destilada y se realizaban cortes de 100  $\mu$ M donde se buscaban las marcas de colorantes para determinar el sitio exacto de registro.

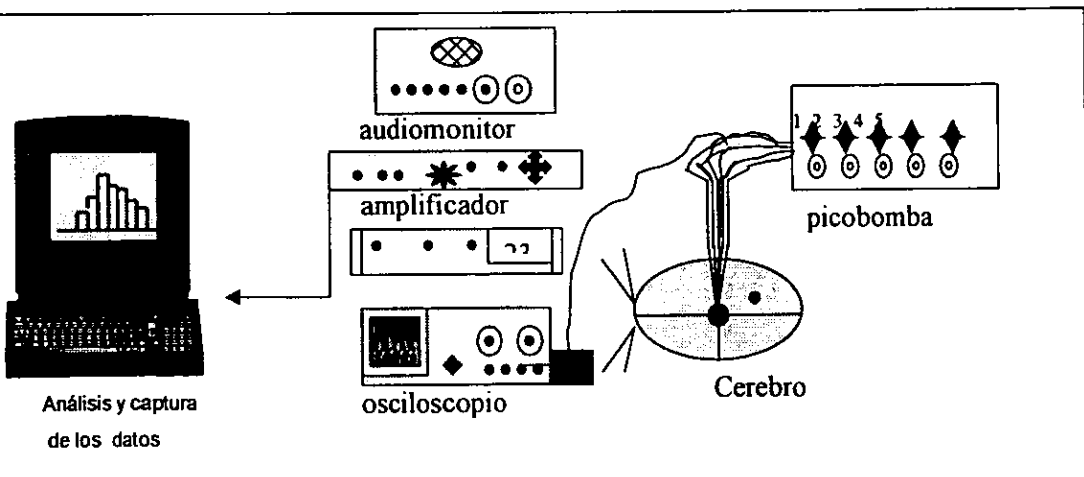


Fig.11. Esquema que ilustra el equipo para el registro extracelular

Una vez capturados los datos se procedió hacer histogramas de frecuencia. Se consideró un cambio significativo a cualquier incremento o decremento de al menos el 40% de cambio en la frecuencia de descarga con

respecto al control (proporción crítica). Se empleó este criterio basándose en las observaciones obtenidas del registro continuo sin ningún tipo de manipulación farmacológica, observamos que la actividad espontánea nunca osciló más allá de un 20 % en un período de hasta 3 horas.

- Metodología para registros en parches de membrana (Patch clamp).

Estos registros se realizaron en cerebros de ratas machos de la cepa Wistar con pesos que oscilaron entre 190 y 200 g, y que fueron mantenidos en condiciones similares a los descritos en el experimento previo.

Para la sesión experimental se sedaba al animal con éter y se procedía a decapitarlo con una guillotina hecha en el laboratorio. Inmediatamente se procedía a extirpar el cerebro en un lapso menor a 60 segundos. El cerebro extirpado se colocaba en una solución a 4°C, que contenía: (en mM) 124.0 de NaCl, 5.0 de KCl, 2.6 de  $\text{Na}_2\text{P}_0_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 26 de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3 de  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 26.0 de  $\text{NaHCO}_3$ , 10 de HEPES y 10 de dextrosa. Esta solución tenía una osmolaridad de 300 mOsm y un pH de 7.4. Después de 1 a 2 minutos en esta solución se seccionaba el cerebro dejando un bloque que contenía el hipotálamo anterior, posteriormente se montaba el bloque de cerebro en la platina de un vibratomo (Pelco, Vibroslice 1000) fijándose con cianocriolato y cuyo contenedor estaba lleno de una solución de composición similar a la anterior y a una temperatura de 2 a 4 °C. En estas condiciones se obtenían rebanadas de 400 a 450  $\mu\text{m}$  que eran transferidas a una cámara de incubación por un período no menor a 90 minutos. Durante todo este tiempo, la solución estuvo aireada con una mezcla de  $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$  al 95 y 5%, respectivamente.

Después del periodo de incubación, las rebanadas eran transferidas a una cámara de registro, la cual consiste de una poza de 5 ml en cuya superficie se fija una red de nylon donde se colocaba la rebanada. Esta poza de 3.6 cm de diámetro está conectada a un sistema de perfusión que le brinda un flujo constante de solución aireada con la mezcla de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, a 35 °C y a una velocidad de 1.5 a 1.8 ml por minuto. La rebanada se localizaba en la interfase solución-aire y así era protegida de la desecación. Todo el sistema de perfusión fue mantenido a 35 °C, gracias a la acción de un baño de tejidos y una bomba de recirculación (HAAKE DC10). La rebanada se visualizaba desde la parte superior con una iluminación de fibra óptica y un microscopio estereoscópico (Olympus) que mostraba una amplificación de 60X, suficiente para localizar las diferentes estructuras que comprenden al hipotálamo anterior. Esta cámara estaba fija sobre la superficie de una mesa vibroaislante (Newport) la cual impedía la transmisión de cualquier vibración hacia la preparación facilitando con ello la estabilidad de los sellos.

Para registrar las corrientes de potasio empleamos electrodos de vidrio estirados de micropipetas de borosilicato de sodio (WPI 150FI). Estas pipetas fueron estiradas con un estirador de dos etapas (Narishige pp83) con el que se obtenían puntas de aproximadamente 2 µm de diámetro. Una vez colocada la micropipeta en la solución, estos electrodos mostraban una resistencia óhmica de 4 a 6 MΩ. Los electrodos se llenaban con una solución intracelular específica para registrar corrientes de potasio, la cual tenía la siguiente composición en mM: 1.2 de Gluconato de K, 10 de NaCl, 2.1 de MgCl<sub>2</sub>, 12.5 de HEPES, 11 de EGTA, 1 de ATP, y 5.7 de GTP, con pH de 7.3 y una osmolaridad de 300 a 320 mOsm (Sundgren y Johansson., 1998)



Los electrodos de registro se colocaban en un sujetador que formaba parte del cabezal de un amplificador para patch clamp (Axoclamp 2B), el cual se montaba sobre un micromanipulador mecánico (Newport MX300R) que permite un desplazamiento en fracciones de micra en los 3 ejes. Una vez colocado el microelectrodo se le aplicaba una presión positiva de casi 16 mm de agua, que se mantenía durante todo el tiempo que el microelectrodo atravesaba la rebanada hasta localizar una posible célula para su registro. Con la ayuda del estereoscopio y el micromanipulador, la punta del microelectrodo se colocaba en la superficie correspondiente al hipotálamo anterior, para después descenderlo poco a poco sobre las 400-450  $\mu\text{m}$  del grosor de la rebanada. Durante todo este trayecto se aplicaba un pulso comando, 4.0 mV y 10 mseg de duración, que era visualizado en un osciloscopio (Tektronix 2225), la disminución en el tamaño de este pulso es indicativo de una aproximación a lo que podría ser una célula. Cuando el pulso se reducía en aproximadamente 80 %, la presión positiva dentro del electrodo se eliminaba y en su lugar se aplicaba una presión negativa de la misma intensidad en forma inmediata. Usualmente con este procedimiento se obtenía un sello que oscilaba entre 5 a 10  $\text{G}\Omega$  . Un incremento en la presión dentro del electrodo frecuentemente se asociaba con el rompimiento de la membrana celular del interior del sello, permitiendo con ello el acceso al interior de la célula (Fig.12). Tal maniobra fue confirmada con el cambio en las corrientes transientes capacitivas registradas por efecto de la aplicación del pulso comando.

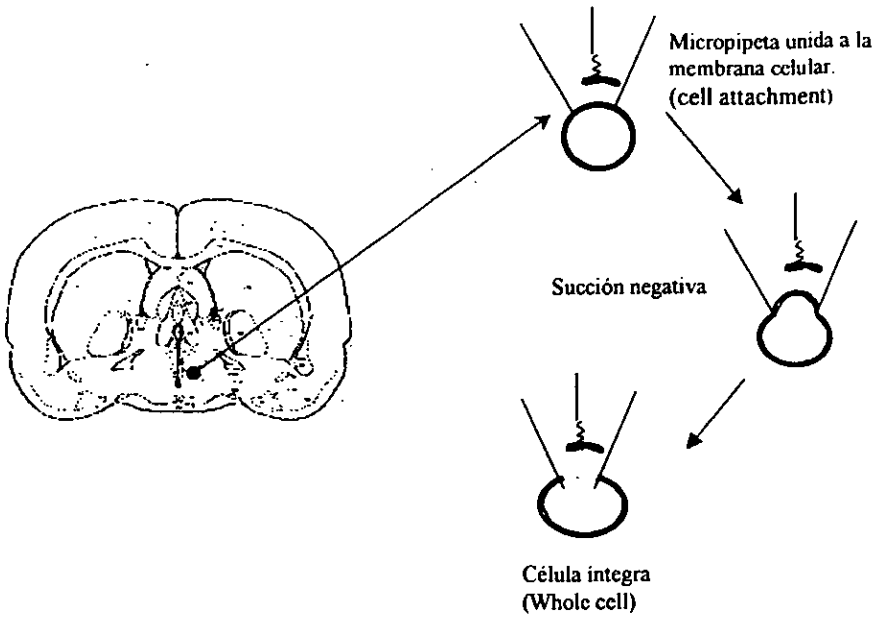


Fig. 12. Diagrama de los pasos a seguir para obtener la configuración de célula íntegra (whole cell).  
 Tomado de Liem, 1995.

Antes de obtener el sello se compensaron hasta donde fue posible la capacitancia del electrodo y el potencial de la punta del mismo. Una vez realizado el sello también se compensó la resistencia en serie y se midió la resistencia de acceso para cada célula registrada. En general esta resistencia de acceso nunca fue mayor a 40 MΩ. Tanto la inducción de las corrientes como su captura y análisis, se realizaron en forma computarizada empleando una tarjeta convertidora analógico digital (Digidata 1200) y el software de Axoclamp 6.4. Estos sistemas estaban conectados con una computadora PC IBM compatible.

Una vez realizado el sello se procedía a determinar el potencial de membrana utilizando la modalidad de current clamp con  $I=0$ . Para inducir las corrientes de potasio se elaboró un protocolo que consistía en fijar el voltaje en  $-60$  mV y aplicar pulsos comandos de 5 seg de duración que variaban el potencial de membrana en etapas de  $-5$  mV desde  $-60$  hasta  $-135$  mV. Estas corrientes se filtraron con un filtro de bajas en  $2$  kHz y se digitalizaron a una frecuencia de  $5$  kHz (Liem, 1995).

Una vez registradas las corrientes control en la célula íntegra, se procedió a la aplicación de fármacos, para ello se utilizó un sistema alineado de jeringas, en las cuales se agregaba el fármaco disuelto en solución LCRA (20ml) y por gravedad llegaba hasta la cámara de baño perfundiendo a la rebanada cada  $1.8$  ml/min. Cada  $5$  min se registraban las corrientes y se hacía la captura de las corrientes generadas. Los fármacos y concentraciones utilizadas fueron las siguientes;

- a) Melatonina a las concentraciones de:  $0.5$ ,  $5$  y  $10$   $\mu$ M
- b) Dopamina a una concentración de  $5$   $\mu$ M
- c) Noradrenalina a una concentración de  $5$   $\mu$ M

Interacciones:

Melatonina  $5$   $\mu$ M y Dopamina  $5$   $\mu$ M

Melatonina  $5$   $\mu$ M y Adrenalina  $5$   $\mu$ M

Una vez capturados los datos, se procedió a realizar su respectivo análisis, para ello se empleó el programa de clampfit, el cual determina los valores de corriente, realiza las respectivas curvas I-V, determina los promedios y los valores máximos y mínimos y nos permitió detectar la presencia de los diversos componentes de las corrientes registradas. Para el análisis estadístico de los resultados empleamos el programa de SigmaPlot y Origin y aplicamos la prueba estadística  $X^2$ .

### CAPITULO III.

#### RESULTADOS DE REGISTROS EXTRACELULARES:

Se emplearon 62 ratas macho con pesos de  $198.65 \pm 12.34$  g con buen estado de salud aparente. Del total de animales, en 37 sujetos el sitio de registro quedó en el hipotálamo anterior. Los 25 animales restantes mostraron registros localizados fuera del área de estudio así que estos datos se descartaron.

En términos generales, la frecuencia de descarga registrada correspondió a potenciales de acción únicos, de patrón aislado sin intervalos fijos. Se trató de espigas trifásicas que en promedio mostraron un patrón negativo-positivo-negativo con una amplitud de 1.5 mV (Fig.13.), y una frecuencia que osciló entre 0.7 hasta 1.2 espigas/seg con una media de  $0.87 \pm 0.6$  espigas/seg. Estas espigas fueron muy estables y podían mantenerse en las mismas condiciones por varias horas. Todos los fármacos fueron aplicados utilizando micropresión positiva con valores que oscilaron entre 5 y 100 psi. Durante los momentos que no se aplicaba fármaco se mantenía una presión negativa de 5 psi en cada uno de los electrodos llenos de fármaco con la finalidad de retenerlo. Para mantener un equilibrio de presión y fuga de líquidos, al microelectrodo de balance se le aplicaba una presión sobre una solución neutra o un vehículo, ya sea negativa o positiva que correspondía al inverso de la suma de las presiones de todos los electrodos restantes.

## Efectos de Melatonina

La aplicación de una solución 1mM de melatonina por micropresión en las células del hipotálamo anterior mostró una acción en el 49% (n=18) de las 37 células registradas con aplicación de este indol y el 51% restante (n=19) no respondió con cambio alguno a la aplicación de esta hormona. El efecto preponderante fue una reducción en la frecuencia de descarga la cual se observó en 17 neuronas, y sólo una de ellas mostró un efecto excitador. Tanto los efectos depresores como el excitador, en términos generales dependió de la intensidad de la presión aplicada (Cuadro.1.). En nuestros registros presiones de 10 psi durante 15 segundos, mostraron ya un efecto depresor, mientras que presiones de 60 o mayores provocaron casi una total inhibición de la frecuencia de descarga (Gráfica.1.). Este efecto se iniciaba casi instantáneamente después de aplicar el pulso de presión y se manifestaba en su totalidad de 3 a 5 seg de iniciado éste. Además, la interrupción del pulso de presión provocaba una completa recuperación de la frecuencia de descarga sin que pudiese observarse algún efecto posterior a la aplicación.

Las 12 neuronas localizadas fuera del área preóptica respondieron a la melatonina con un decremento de su frecuencia de descarga, mientras que sólo 6 de las 25 neuronas del área preóptica fueron afectadas por el indol. De estas, 5 respondieron con un decremento y una de ellas lo hizo con un incremento en su frecuencia de descarga (Cuadro.1.).

El parámetro celular más afectado por la melatonina fue la frecuencia de descarga, sin embargo, con el empleo de presiones mayores a

60 psi y durante más tiempo fue posible observar cambios en la duración y el patrón del mismo (Fig .14.)

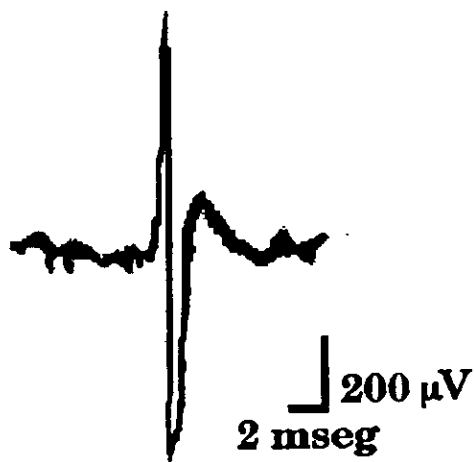


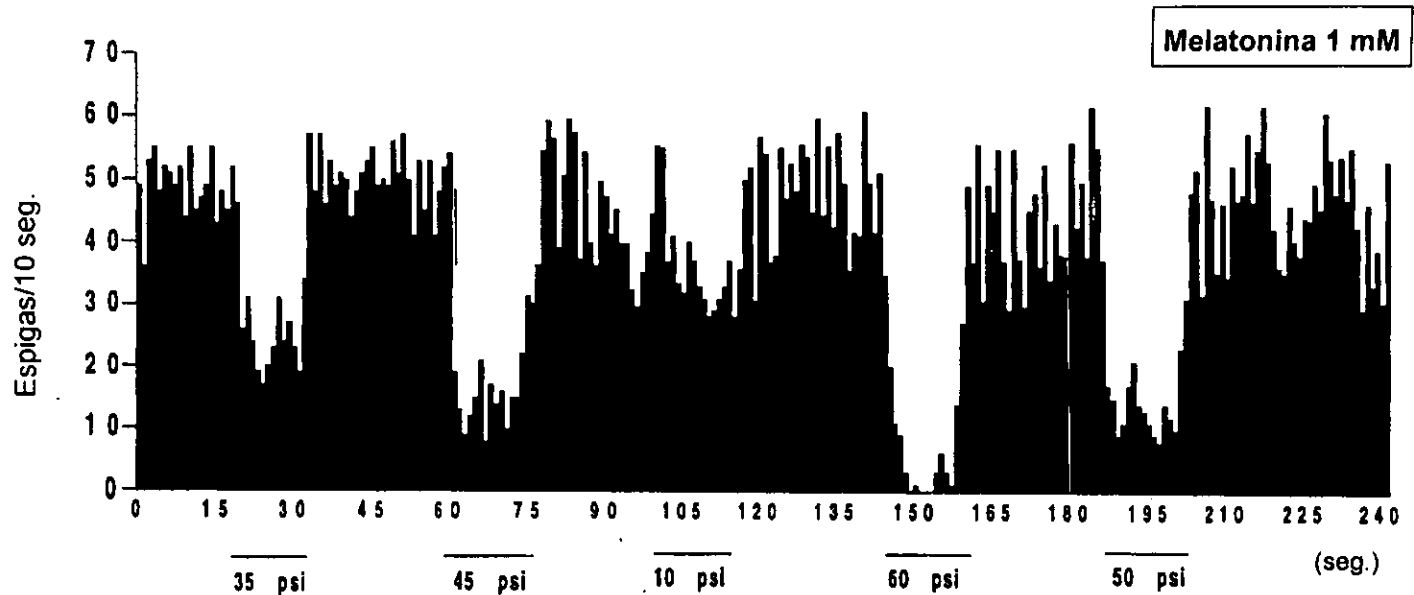
Fig.13. El esquema muestra la espiga trifásicas registrada en neuronas del hipotálamo anterior, en promedio estas espigas mostraron un patrón negativo-positivo-negativo con una amplitud de 1.5 mV y una frecuencia que osciló entre 0.7 hasta 1.2 espigas/seg con una media de  $0.87 \pm 0.6$  espigas/seg.

**Cuadro.1.** Muestra los efectos provocados por melatonina, serotonina, dopamina noradrenalina y prazocina, sobre la frecuencia de disparo de neuronas registradas en el área preóptica y el hipotálamo anterior.

**\*ÁREA PREÓPTICA      'HIPOTÁLAMO ANTERIOR**

	TOTAL DE CELULAS (37)	25	12	Células que respondieron a melatonina y algún otro fármaco (18).
<b>MELATONINA</b>	↑ 1 ↓ 17 ↔ 19 TOTAL (19)	1 5 19 9	0 12 0 10	Mel- Ser (8) ↓
<b>SEROTONINA</b>	↑ 2 ↓ 8 ↔ 9 TOTAL (26)	0 4 5 18	2 4 4 8	4* 4' Mel-Dop (4) ↓
<b>DOPAMINA</b>	↑ 0 ↓ 22 ↔ 4 TOTAL (23)	0 18 0 17	0 4 4 6	4* Mel-Nor (6) ↓
<b>NORADRENALINA</b>	↑ 11 ↓ 6 ↔ 6 TOTAL (16)	11 0 6 11	0 6 0 5	6' Mel-Nor-pra(5)
<b>PRAZOCINA</b>	↑ 0 ↓ 4 ↔ 12	0 3 8	0 1 4	1' ↓ 4' ↔





**Grafica.1.** Muestra los efectos de la aplicación de melatonina 1mM a diferentes intensidades de micropresión (10, 35, 45, 50 y 60 psi), sobre la actividad eléctrica unitaria extracelular del hipotálamo anterior. La aplicación de las diferentes presiones se realizó en forma azarosa, para evitar efecto de dosis acumulativa. La melatonina induce una disminución de la frecuencia de descarga, este efecto depresor se va acentuando a medida que aumenta la intensidad de la presión. Prácticamente a una micropresión de 60 psi el efecto de disminución de la frecuencia de descarga es de casi del 100%.

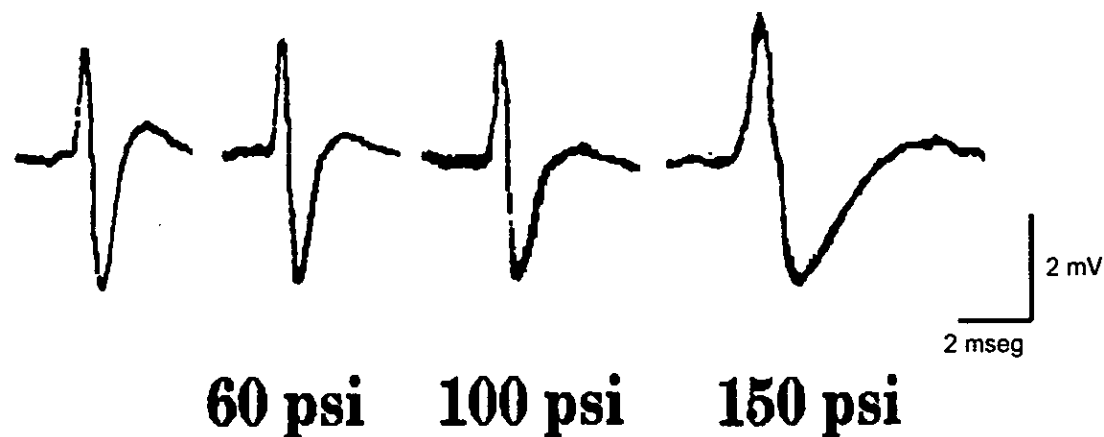
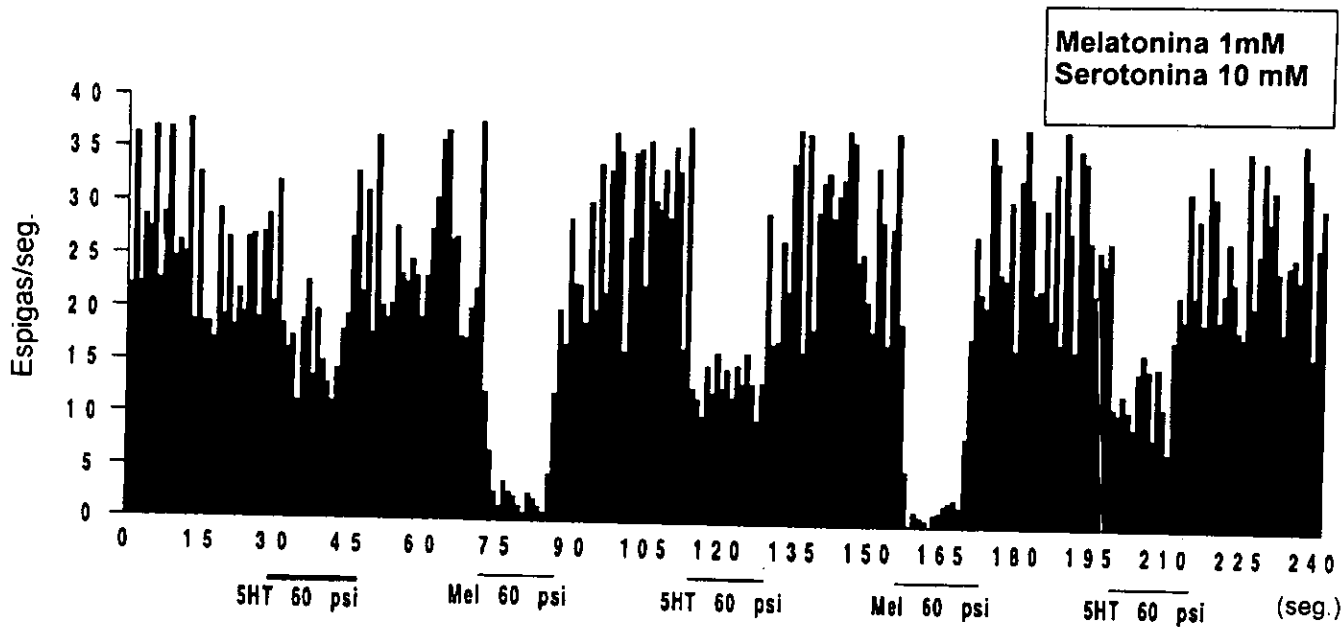


Fig.14. Efecto de la aplicación de melatonina 1mM a presiones de 60, 100 y 150 psi en neuronas del hipotálamo anterior. El potencial de acción muestra que a mayor presión del pulso de melatonina, se induce un retardo en la fase de repolarización del mismo.

## Efectos de serotonina

Se compararon los efectos de la melatonina con otro indol, de estructura química similar, para ello se aplicó también por micropresión 5-hidroxitriptamina (Serotonina, 5-HT). De los 19 registros obtenidos, 9 se localizaron en el área preóptica y 10 de regiones de hipotálamo anterior diferente al área preóptica. Del total de registros, 9 células no mostraron cambio alguno; mientras que 10 respondieron, 8 con decrementos y 2 con incrementos (Cuadro 1). Cuatro de las neuronas inhibidas pertenecían a regiones diferentes al hipotálamo preóptico, mientras que las otras 4 inhibidas y las 2 excitadas formaban parte de esa región. Comparativamente, los efectos de la serotonina fueron menos marcados que los provocados por la melatonina, aunque el patrón de respuesta es similar. En las células en las que se aplicaron ambos indoles (melatonina y serotonina), fue necesario utilizar una concentración mayor de 10 mM de serotonina a presiones de 60 psi para obtener un efecto más notable. Aún en esas condiciones, la aplicación de melatonina a la misma presión que la de serotonina, se caracterizó por ejercer un efecto depresor más intenso (Gráfica.2.).

A diferencia de la melatonina, la expulsión por micropresión de más de 100 psi de serotonina no indujo cambios en el patrón del potencial de acción registrado. Todos los cambios observados fueron sobre la frecuencia de descarga.



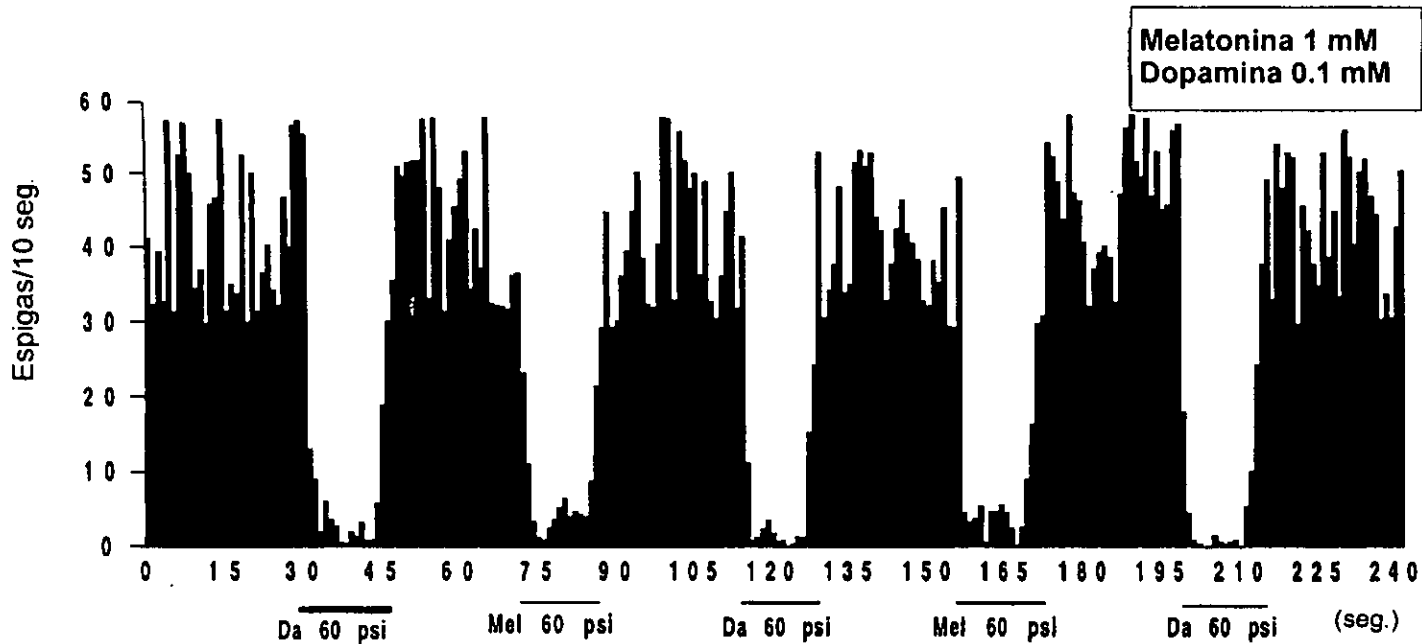
**Grafica.2.** Muestra los efectos de la aplicación de una micropresión a 60 psi de melatonina 1mM y serotonina 10 mM, sobre la actividad eléctrica extracelular del hipotálamo anterior. Los dos fármacos mostraron un efecto depresor de la actividad eléctrica, pero la melatonina a una menor concentración mostró un efecto depresor más potente, con respecto al efecto causado por serotonina.

## Efectos de Dopamina:

El sistema de neurotransmisión más invocado en el control de la secreción de GnRH, son las catecolaminas, particularmente la noradrenalina. Por lo tanto decidimos comparar los efectos de la melatonina con aquellos inducidos tanto por dopamina, como por noradrenalina.

La aplicación por micropresión de una solución de dopamina 100  $\mu\text{M}$ , provocó efectos importantes en casi todas las neuronas probadas (Cuadro 1). Esta catecolamina se probó en 26 neuronas, 22 de las cuales mostraron una importante reducción en su frecuencia de descarga como consecuencia de tal aplicación y cuatro restantes no mostraron cambio alguno (Cuadro 1). Del total de neuronas 18 pertenecían a la región del área preóptica y 8 se localizaron en la región hipotalámica anterior. De estas 8 neuronas, 4 células no fueron afectadas por la dopamina, mientras que las otras 4 de esta área, mostraron una disminución en su frecuencia de descarga al aplicarse dopamina. Por otra parte, todas las neuronas preópticas mostraron una inhibición inducida por la aplicación de dopamina.

Cuando se estudio comparativamente la aplicación de dopamina y melatonina, se observó que la catecolamina tiene una acción más potente. Con concentraciones 10 veces menores y presiones menores a 60 psi, la dopamina es capaz de inhibir completamente la frecuencia de descarga (Gráfica.3.), Sin embargo, el patrón de respuesta, lo que incluye la latencia, la constancia del efecto y el tiempo de recuperación son muy similares. Además, la aplicación de dopamina en estas neuronas no produjo cambios visibles en la duración, amplitud y morfología del potencial de acción registrado. En otras palabras, su acción se restringió a la frecuencia de descarga.

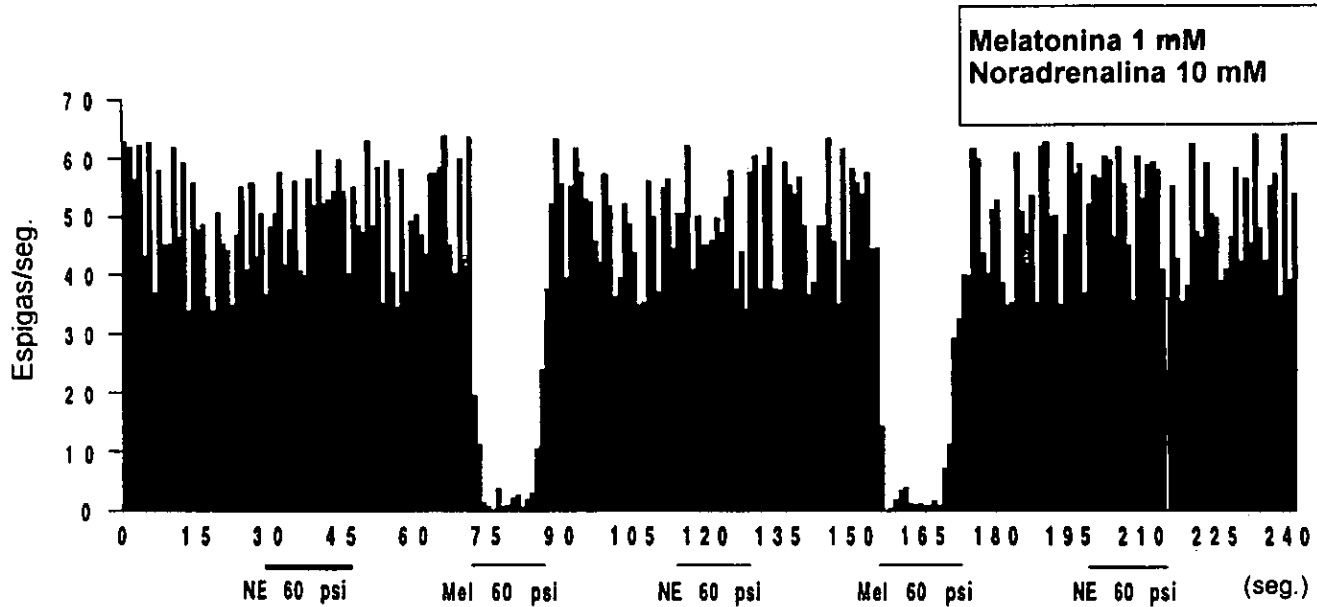


Grafica.3. Muestra los efectos de la melatonina (1 mM) y dopamina (0.1 mM) sobre la actividad eléctrica extracelular del hipotálamo anterior. Los dos fármacos aplicados con una micropresión de 60 psi, mostraron un efecto depresor marcado de la actividad eléctrica. La dopamina muestra a una concentración 10 veces menor a la de melatonina un efecto depresor más potente, con respecto al efecto causado por melatonina.

## Efectos de noradrenalina.

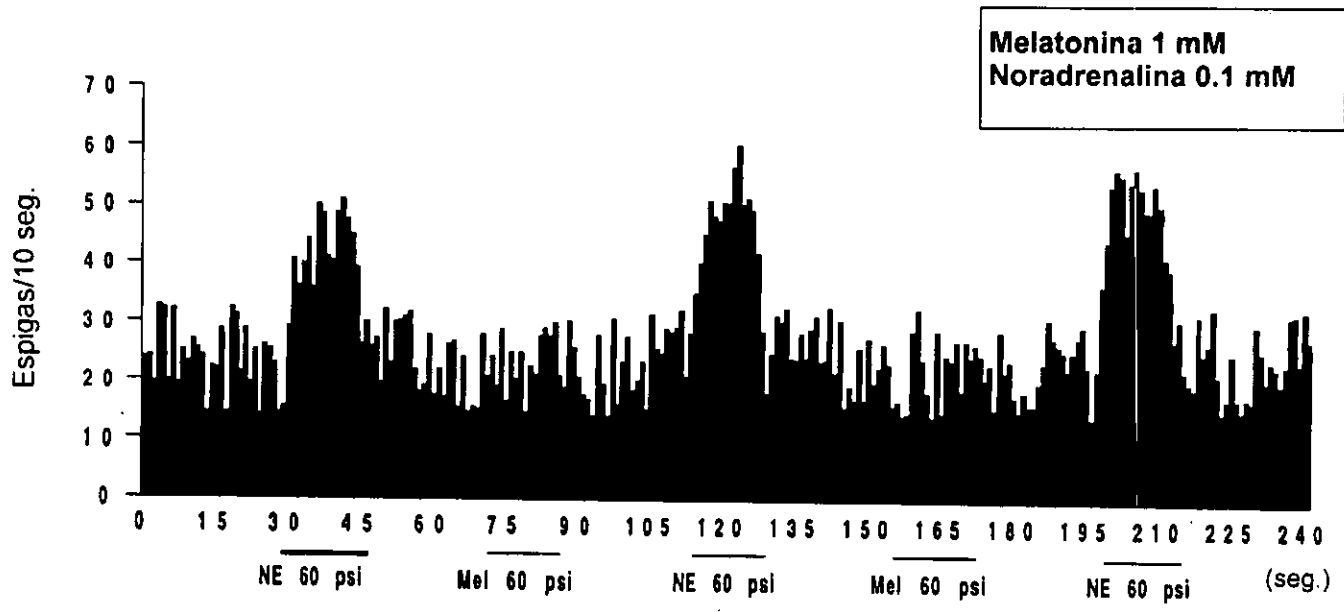
Veintitrés de las neuronas hipotalámicas registradas, se sometieron a la aplicación de noradrenalina por micropresión a varias intensidades. Seis de estas neuronas fueron localizadas en las regiones hipotalámicas diferentes al área preóptica, mientras que 17 de ellas fueron neuronas precisamente de la región preóptica. Todas las neuronas que no pertenecían a la región preóptica mostraron una inhibición en su frecuencia de descarga cuando fueron sometidas a la aplicación de diversas presiones de norepinefrina, mientras que 11 de las células de la región preóptica mostraron un incremento de su frecuencia de descarga por efecto de esta catecolamina. Las 6 neuronas preópticas restantes no mostraron cambio significativo alguno (Cuadro 1).

El análisis comparativo de los efectos inducidos por esta catecolamina muestra que ninguna célula que responde a melatonina, responde a norepinefrina (Gráfica.4.), y que además si la célula responde a norepinefrina, incrementando su frecuencia de descarga, su respuesta a melatonina es nula (Gráfica.5.). Esto significa que las células que muestran sensibilidad a la noradrenalina son diferentes a las que responden a la melatonina. La gráfica 4 describe claramente que la aplicación de 60 psi de una solución de 1 mM de melatonina provoca una reducción muy significativa en la frecuencia de descarga; mientras que la aplicación de la misma presión de noradrenalina en una solución 10 veces más concentrada (10 mM), no provocó efecto alguno detectable. Tampoco se observó ningún cambio en el patrón del potencial de acción registrado.



Grafica.4. Muestra los efectos de melatonina (1mM) y noradrenalina (10 mM) sobre la actividad eléctrica extracelular neuronal del hipotálamo anterior. Los dos fármacos fueron aplicados con una micropresión de 60 psi, la aplicación de melatonina mostró un efecto depresor de la actividad eléctrica. La noradrenalina a una concentración 10 veces mayor a la de melatonina no mostró efecto alguno.



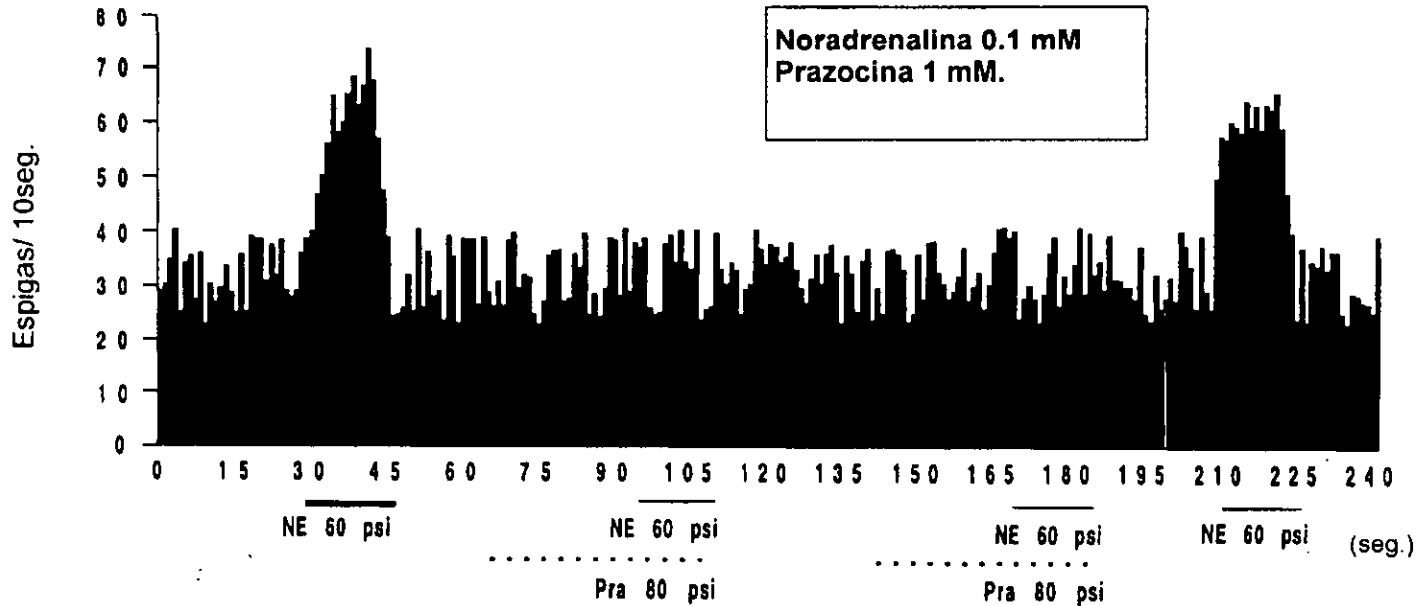


Grafica.5. Muestra los efectos de melatonina (1mM) y noradrenalina (0.1mM) sobre la actividad eléctrica extracelular de una neurona del hipotálamo anterior. Los dos fármacos fueron aplicados con una micropresión de 60 psi. La aplicación de melatonina no tuvo ningún efecto sobre la actividad eléctrica de esta célula, mientras que la aplicación de noradrenalina indujo efecto excitador marcado de la actividad eléctrica. Una vez retirada la aplicación de noradrenalina, la actividad eléctrica inicial se recuperó.

Cuando los efectos de la noradrenalina fueron excitadores, la aplicación de una presión de 60 psi de una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , provocó un incremento de casi el 100 % de la frecuencia de descarga. Al igual que las inhibiciones, la frecuencia de descarga aumentó casi inmediatamente después de iniciar el pulso de presión, se mantuvo a un nivel muy constante durante el pulso y su recuperación también fue casi inmediatamente después de quitar el pulso de presión. El histograma de la gráfica 5 proviene de una célula localizada en la región preóptica, la cual respondió con un incremento de la frecuencia de descarga a la noradrenalina, mientras que la aplicación de una concentración 10 veces mayor de melatonina no indujo efecto apreciable alguno.

Para caracterizar farmacológicamente el efecto de la noradrenalina, se realizó la administración conjunta de una concentración 100  $\mu\text{M}$  de noradrenalina simultáneamente con una de 1 mM de prazocina, un bloqueador de receptores  $\alpha_{1B}$ , el cual ejerce un efecto inhibitor sobre la secreción de GnRH inducida por la noradrenalina (Rettori (b), 1997). Esta aplicación conjunta se realizó en 16 neuronas, el total del cual fueron células que habían respondido a la noradrenalina. La gráfica 6 muestra como las células que responden a la noradrenalina, ante la aplicación de prazocina durante 30 segundos, (quince de los cuales ocurren inmediatamente antes de iniciar la expulsión de noradrenalina), bloquean en forma consistente los efectos inducidos por la noradrenalina. La prazocina fue probada en 5 neuronas localizadas en la región del hipotálamo anterior, las cuales respondieron a la noradrenalina con una inhibición de la frecuencia de descarga. En este caso, 4 neuronas fueron bloqueadas por la prazocina y solo una continuó mostrando el efecto inhibitor de la noradrenalina. Por el

contrario cuando este bloqueador fue analizado en 11 células localizadas en la región preóptica y que habían respondido a la noradrenalina con un aumento de su frecuencia de descarga, la aplicación conjunta y simultánea de noradrenalina y prazocina, bloqueo en 8 de ellas el efecto excitador de la catecolamina (Gráfica.6.).



Grafica.6. Muestra los efectos de noradrenalina 0.1mM y prazocina 1 mM sobre la actividad eléctrica extracelular en neuronas de la región preóptica. Los dos fármacos fueron aplicados con una micropresión de 60 psi, el antagonista se aplico 30 segundos antes de la aplicación de la noradrenalina. Como se muestra en el histograma el efecto de la aplicación sola de norepinefrina es excitador, pero una vez que se aplica con anterioridad prazocina, el efecto excitador provocado por noradrenalina se ve completamente suprimido.

Estos resultados muestran que la melatonina ejerce una influencia inhibitoria sobre la frecuencia de descarga de las neuronas del hipotálamo anterior. Este efecto puede ser consecuencia, tanto de una acción directa del indol en estas neuronas, como de una acción mediada por células que mantienen contactos sinápticos con la neurona que se registra. Además, la posible interacción que esta hormona mantenga con sus sistemas noradrenérgicos de esta región hipotálamica pueden también ser resultado de varios mecanismos, ya sea, a nivel presináptico como postsináptico.

Para determinar el sitio celular y características de los efectos de melatonina y sus interacciones con los sistemas catecolaminérgicos del hipotálamo anterior, fue necesario realizar un análisis farmacológico celular de los efectos de este indol. Por la respuesta electrofisiológica obtenida con melatonina, resulta consecuente suponer que la melatonina actúa sobre una conductancia intrínseca de potasio. Basándonos en el cambio de morfología del potencial de acción que este indol produce (Fig.14.), probablemente se trate de una conductancia de un canal rectificador entrante de este ión. Por lo tanto decidimos analizar a través de la técnica de patch clamp las corrientes entrantes de potasio ( $K_{ir}$ ) en presencia de melatonina, noradrenalina y dopamina, en las neuronas del hipotálamo anterior.

## REGISTROS EN PARCHES DE MEMBRANA (Patch-Clamp).

Mediante esta técnica se registraron 23 células provenientes de 21 rebanadas de hipotálamo anterior, las cuales se obtuvieron de animales mantenidos en las mismas condiciones experimentales que los empleados en registros extracelulares. Todos los experimentos se iniciaron a las 10:00 hrs. La extirpación del cerebro y la obtención del bloque cerebral que contenía el hipotálamo se realizó en aproximadamente 60 segundos; mientras que la obtención de las rebanadas requirió de otros 5 minutos. Una vez colocadas en la cámara de equilibrio se mantenían en una solución con la misma composición de la extracelular, durante al menos 90 minutos.

El registro se inició aproximadamente a las 14:00 hrs en todas las ocasiones. Solo se incluyeron neuronas que mostraron condiciones estables de registro y cuyo potencial de membrana fue mayor de  $-35$  mV y su resistencia de entrada oscilaba entre 10 y  $30 \text{ M}\Omega$  <sup>(Hille, 1992)</sup>. La resistencia de las pipetas utilizadas, se encontró entre 1 y  $8 \text{ M}\Omega$ , y se realizó la corrección en corriente y voltaje debida al potencial de unión líquida, el cual de acuerdo a la concentración de iones, tanto de la solución extracelular como en la intracelular, fue de  $+11$  mV. Cuando el electrodo del patch, se sumergía en el baño, se aplicaba un pulso de 5 mV que permitió observar las corrientes transitorias capacitivas del electrodo para su compensación correspondiente.

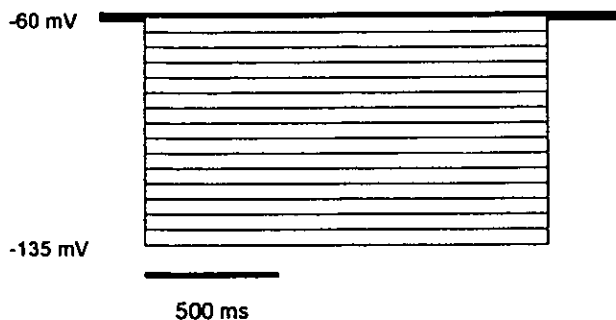
De igual manera, una vez realizado el sello y con el acceso a la célula garantizado, se aplicaba nuevamente el pulso para determinar las

corrientes capacitivas de la membrana celular. Estas corrientes fueron también compensadas, hasta donde fue posible, el límite de tal compensación siempre fue la deformación del pulso y de los transitorios registrados. Finalmente y antes de iniciar el registro se calculó la resistencia de acceso en cada célula.

El potencial de membrana se valoró al inicio del registro, una vez que se alcanzaba la configuración tipo célula íntegra. Para ello, pasamos al modo current clamp con  $I=0$  y se permanecía en tal modo durante al menos 5 minutos para monitorear cualquier cambio en alguna dirección. El promedio del potencial de membrana en el estado de reposo de las 23 células registradas fue de  $-58.78 \pm 11.2$  mV y los rangos fueron -37 a -83 mV, una vez realizada esta medición se entraba a modo de fijación de voltaje con un valor de -60 mV que la computadora mantenía constante durante toda la fase experimental. Se procedía entonces a registrar las corrientes de potasio.

La disociación de las corrientes de potasio con respecto a las de sodio, se realizó por medios farmacológicos y de voltaje. Para ello una vez en modo célula íntegra, se agregó una solución 1 mM de tetrodotoxina y se aplicaron pulsos hiperpolarizantes que evitaban la activación de los canales de sodio. De igual forma para disociar las corrientes entrantes de potasio de las de calcio, recurrimos al empleo de una solución baja en calcio (0.5 mM), utilizamos EGTA 11mM en la solución intracelular y pulsos hiperpolarizantes, lo cual hace sugerir que el mayor componente de la corriente registrada fue de potasio.

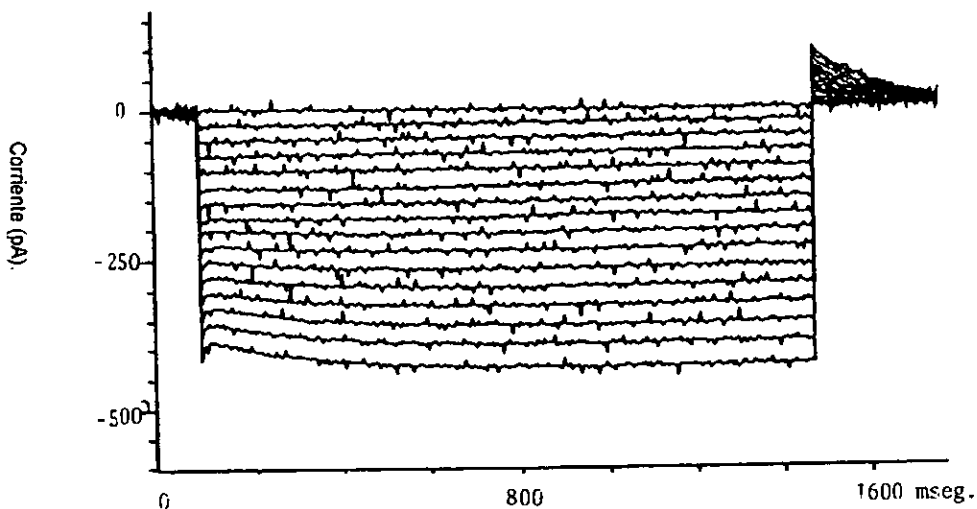
Para inducir en estas células la activación de los canales rectificadores entrantes de potasio, se empleó un protocolo de pulsos, iniciándose desde  $-60$  mV y el cual se llevaba hasta  $-135$  mV del potencial de membrana, en etapas de  $-5$  mV. La duración de cada pulso fue de  $1500$  mseg y la duración del intervalo entre cada pulso fue de  $5$  seg (Fig.15).



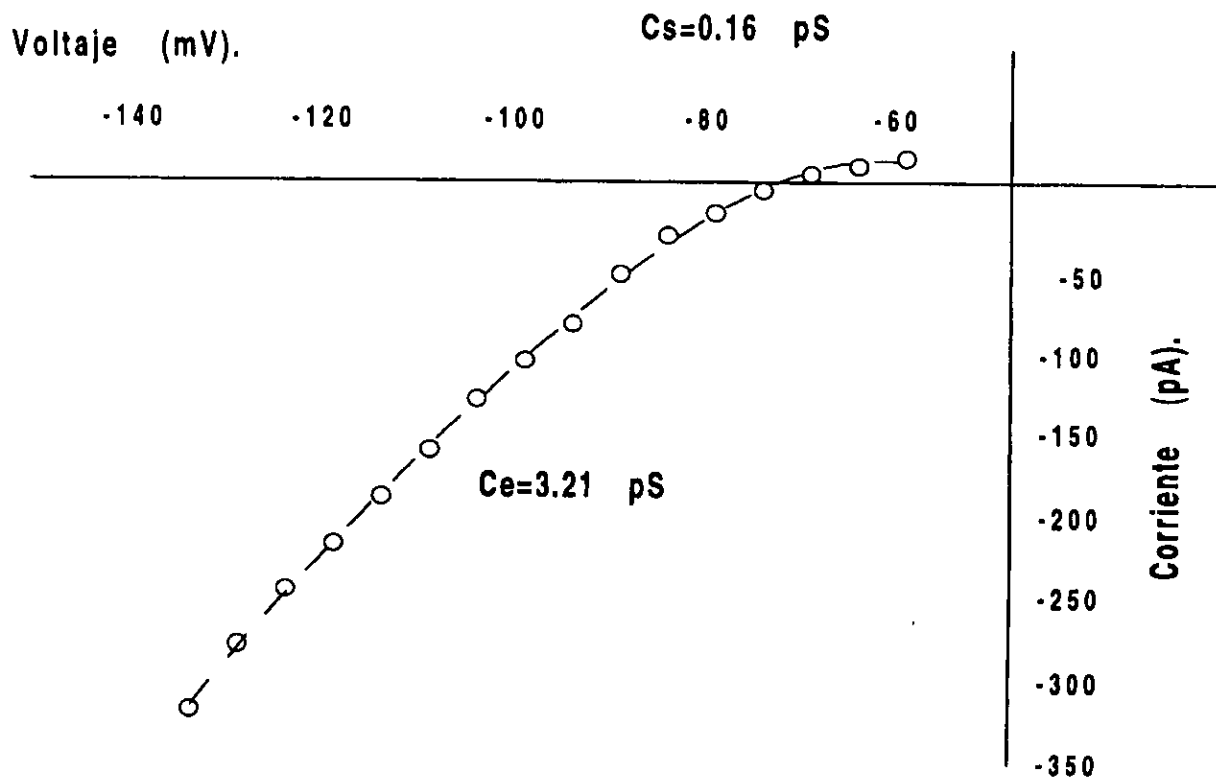
**Fig.15.** Muestra el protocolo de pulsos de voltaje utilizados una vez en la configuración de célula íntegra, llevando el potencial de membrana desde  $-60$  mV hasta  $-135$  mV en etapas de  $5$  mV con una duración de  $1500$  mseg. El intervalo de tiempo entre cada pulso fue de  $5$  mseg.



La aplicación de este protocolo de pulsos generó corrientes características como las que se observan en la figura.16. En este registro realizado en situación control es posible observar al menos tres tipos de conductancias intrínsecas. La más aparente es una corriente macroscópica entrante dependiente del voltaje cuya duración es igual al pulso de voltaje que se aplica. Es una corriente con una activación casi inmediata y que muestra una casi nula inactivación, sobre todo con pulsos de poco voltaje. Puede observarse que la intensidad de la corriente se incrementa exponencialmente a medida que el pulso aplicado es incrementado a valores más negativos. La amplitud de esta corriente macroscópica fue muy variable en todas las células registradas. Particularmente en el ejemplo de la figura.16, esta corriente mostró un valor máximo de -346 pA con el pulso de voltaje de -135 mV. Estas amplitudes y su cinética pueden observarse en la gráfica.7, la cual representa la relación corriente-voltaje (I-V) para esta célula en particular.



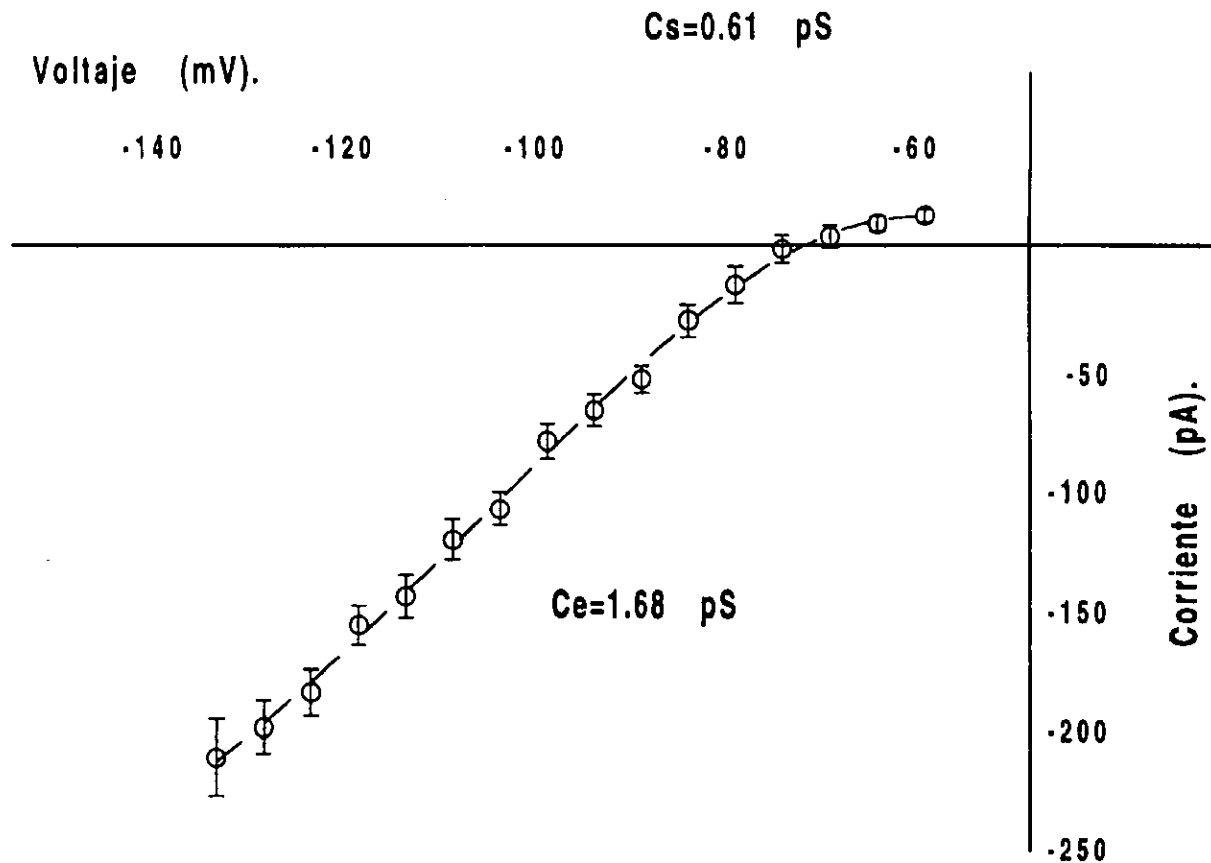
**Fig.16.** Muestra el registro de las corrientes macroscópicas generadas en modo de célula íntegra de una neurona de hipotálamo anterior en situación control. El potencial de membrana fue fijado a  $-60$  mV y posteriormente se aplicó el protocolo de pulsos que fue de  $-60$  a  $-135$  mV. La gráfica muestra al menos tres tipos de conductancias intrínsecas, las cuales corresponden a una corriente entrante rectificante de potasio ( $k_{ir}$ ), una corriente saliente de protones ( $h_s$ ) y una corriente saliente tipo A ( $I_A$ )



Gráfica.7 La curva muestra la relación corriente-voltaje(I-V) del registro de las corrientes representadas en la figura 16, de una sola neurona del hipotálamo anterior. Se muestra la corriente entrante rectificante de  $K^+$  con una conductancia de  $3.21 \text{ pS}$  y una pequeña corriente saliente con una conductancia de  $0.16 \text{ pS}$ . El potencial de inversión es de  $-74.5 \text{ mV}$  el cual corresponde al potencial de equilibrio para el potasio.

La curva I-V establece la génesis en la dependencia de voltaje de la corriente del canal. Para calcular estas curvas obtuvimos el promedio de cada una de las corrientes inducidas por cada pulso registrado, en los últimos 100 mseg del pulso, con la finalidad de registrar la corriente en el estado estacionario. Puede observarse que las primeras corrientes son de tipo saliente con una corriente muy pequeña de +12.97 pA, mientras que las entrantes son de un valor mucho mayor, lo que le da la característica de rectificador entrante al canal que genera tal corriente macroscópica. La conductancia saliente de este canal fue de 0.16 pS; mientras que la conductancia entrante fue de 3.21 pS. Además, el voltaje al cual la corriente es 0, es decir el voltaje de inversión fue de -74.5 mV, el cual en estas condiciones representa el potencial de equilibrio para el potasio.

La gráfica7, mostró la relación I-V representativa encontrada en una sola célula, mientras que la gráfica 8, muestra esta misma relación pero del promedio para las 23 células registradas en el hipotálamo anterior. Esta gráfica 8 muestra también que los pulsos iniciales generan una corriente saliente de poca intensidad (+10.62 pA), mientras que voltajes de -75 mV y más negativos que este, generan una corriente entrante, la cual alcanza una amplitud de -216.16 pA con un pulso de -135 mV. En esta situación, la conductancia saliente promedio para las 23 células fue de 0.61 pS; mientras que la conductancia entrante alcanza un valor de 1.68 pS. Por otro lado, el potencial de inversión fue de -72.5 mV.



Gráfica.8. La curva muestra la relación corriente-voltaje(I-V) del promedio total de 23 neuronas registradas del hipotálamo anterior en situación control. Se muestra el promedio de la corriente entrante rectificante de  $K^+$  con una conductancia de 1.68 ps y una pequeña corriente saliente con una conductancia de 0.61 ps. El potencial de inversión es de  $-72.5 \text{ mV}$  el cual corresponde al potencial de equilibrio para el potasio.

Otra conductancia intrínseca que se observa en la figura.16. corresponde a una corriente saliente que se presenta al final de la aplicación del pulso en rebanadas tratadas con TTX 1mM. Esta corriente macroscópica muestra una activación rápida de 3.3 mseg y una inactivación también rápida de 42.9 mseg, lo cual corresponde con la cinética de una corriente de potasio tipo A ( $I_A$ ). La amplitud de esta corriente fue dependiente del voltaje del pulso condicionante como se muestra en la figura 17, la cual es una amplificación de las corrientes registradas en la figura 16. Esta corriente se observó muy esporádicamente, de tal suerte que solo en una célula pudimos detectar su presencia en forma incuestionable.

Otra de las corrientes intrínsecas observadas en el 78.2% de nuestros registros fue una corriente entrante de rápida activación, la cual fue calculada en 3.3 mseg y una rápida inactivación, que correspondió a 28.2 mseg. Esta corriente se manifestó al inicio de la aplicación de los pulsos comandos hiperpolarizantes y mostró una fuerte dependencia del voltaje (Fig. 18A). El análisis de esta corriente se realizó calculando el valor de la corriente instantánea (CI), la cual constituye el valor máximo alcanzado por esta corriente, comparándolo con el valor de la corriente sostenida (CE), la cual corresponde a los últimos 50 mseg de la aplicación del pulso (Fig.18B). La cinética de esta corriente es muy similar a la reportada para la corriente tipo h ( $I_h$ ), la cual ha sido descrita en varios tipos celulares como en las células cardíacas y musculares (Gasparini y DiFrancesco, 1995) y algunos tipos neuronales, entre ellos del hipotálamo e hipocampo (Zhi-Gen, et al. 1995). Esta corriente constituye un elemento muy

importante para la génesis y mantenimiento de la actividad tipo marcador del paso<sup>(Pape, 1996)</sup>.

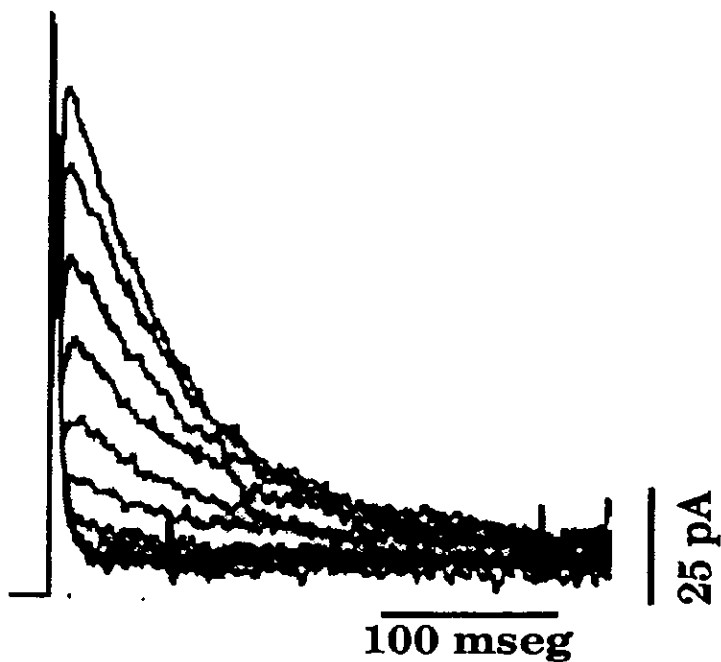


Fig.17. Muestra el registro de una corriente saliente de K<sup>+</sup> tipo A. Esta corriente fue vista solo esporádicamente en las neuronas registradas en el hipotálamo anterior. Es una corriente de activación rápida de 3.3 mseg y una inactivación también rápida de 42.9 mseg.

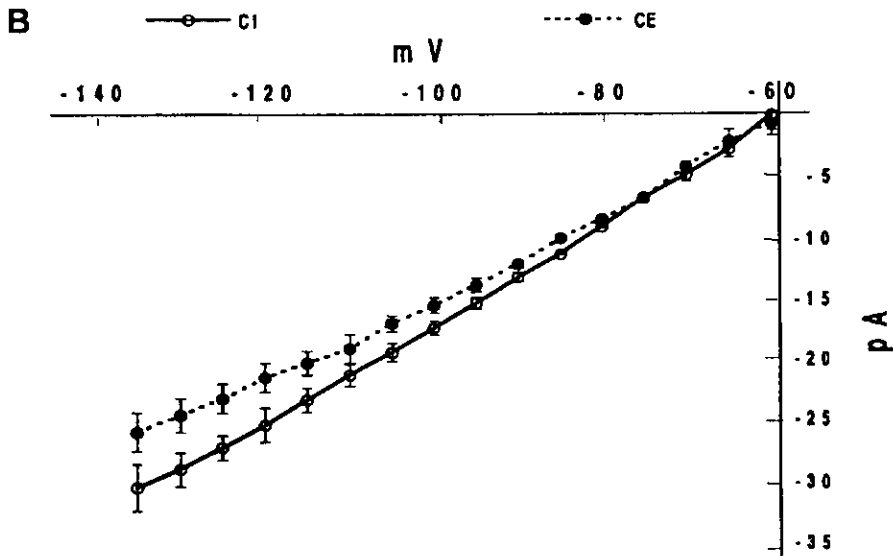
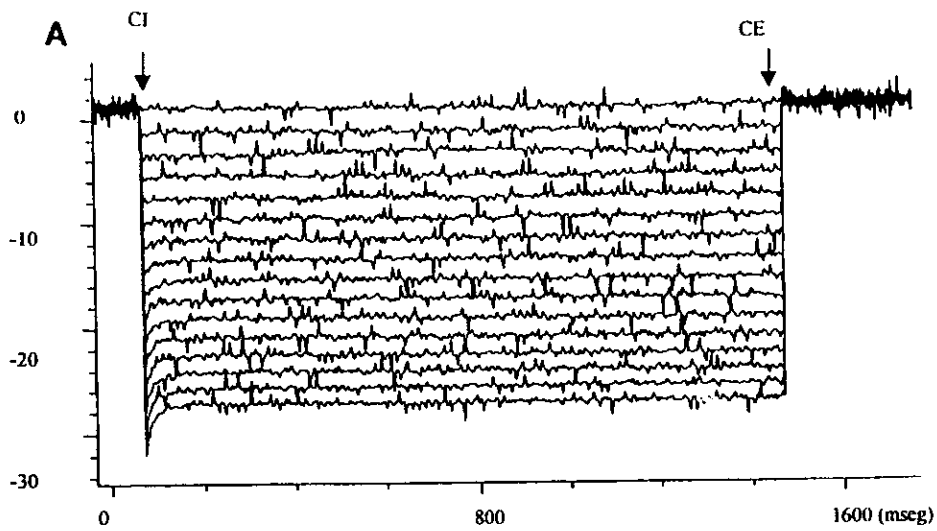


Fig.18. Se muestra una de las corrientes intrínsecas registradas en una neurona del hipotálamo anterior. Esta corriente se manifestó al inicio de la aplicación de los pulsos comandos hiperpolarizantes y mostró una fuerte dependencia del voltaje (A). Esta corriente entrante de rápida activación (3.3 msec.) y una rápida inactivación (28.2 msec), corresponde a una corriente catiónica denominada  $I_h$ . La relación I-V de esta  $I_h$  muestra una fuerte dependencia de voltaje (B).



La aplicación de diferentes concentraciones de melatonina, modificó en forma significativa las amplitudes de las corrientes entrantes de potasio registradas. Este efecto fue observado en 19 (82.6%) de 23 neuronas registradas. Aunque se mostró cierta variabilidad en cuanto a la dirección del efecto, la mayor parte de estas neuronas (n=15) incrementaron el tamaño de las corrientes registradas hasta en un 100% con respecto a los valores controles; mientras que solo 4 de ellas (17.2%) redujeron el tamaño de las mismas.

El efecto de este indol sobre las corrientes entrantes de potasio se ilustra con la Fig.19, la cual corresponde a un registro representativo obtenido en una sola célula. El cambio en la conductancia se hace evidente por el incremento en la intensidad de la corriente. En la gráfica 9, se aprecia el efecto de esta hormona en el total de células registradas. En estos registros el único cambio observable es un incremento tanto de las corrientes entrantes como de las salientes, pero ni el punto de cruzamiento de las corrientes o la dependencia de voltaje se modifica en forma observable. Este efecto es dependiente de la dosis, aunque las dosis más altas no difirieron mucho en la intensidad de este efecto. El incremento de las corrientes por efecto de la melatonina, fue casi el doble del valor observado en los registros controles.

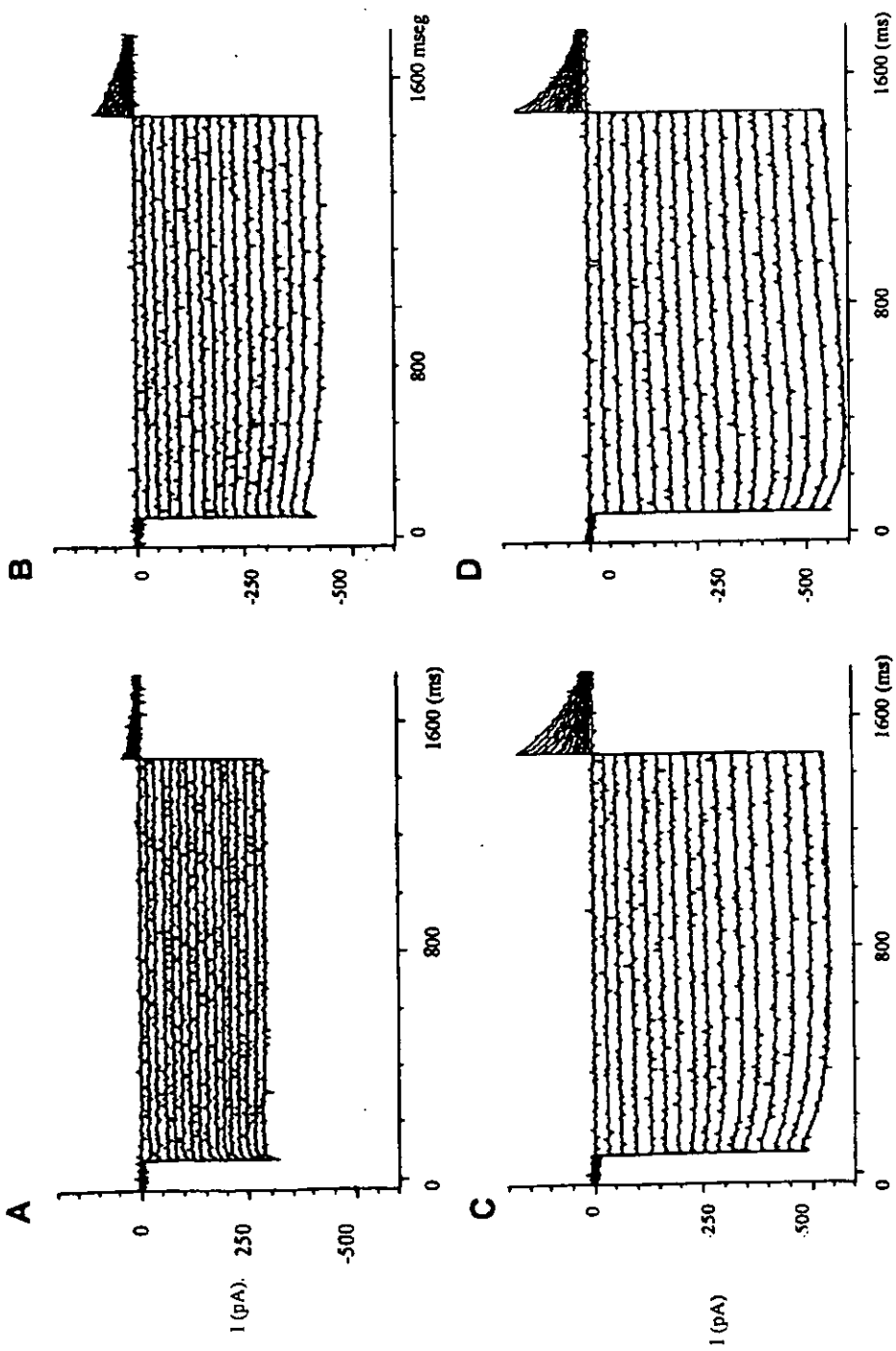
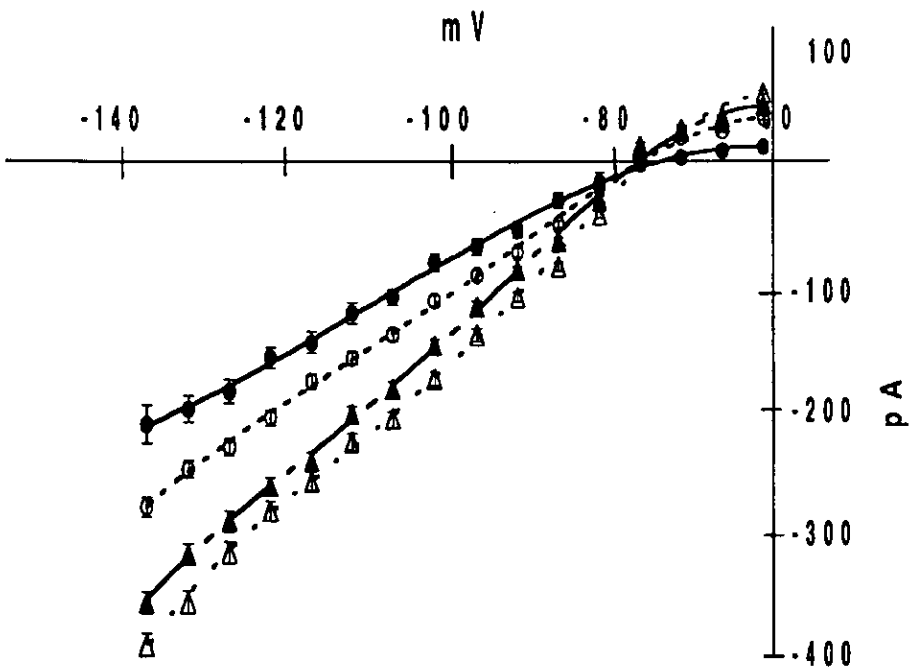


Fig.18. Se muestra el efecto de diferentes concentraciones de melatonina sobre las corrientes entrantes de potasio, registradas en una neurona del hipotálamo anterior. Control (A), melatonina 0.5  $\mu$ M (B), melatonina 5  $\mu$ M (C) y melatonina 10 $\mu$ M (D). Este indol indujo un incremento casi del 100 % de las corrientes entrantes de potasio (Kir), así como de la corriente saliente de potasio tipo A.

--○-- MEL 0.5  $\mu$ M    ● Control    - - Δ - MEL 10  $\mu$ M    —▲— MEL 5  $\mu$ M



Gráfica.9. Se muestra la relación corriente-voltaje (I-V) del promedio de las 23 células registradas, las cuales fueron sometidas al tratamiento de diferentes concentraciones de melatonina (0.5, 5 y 10  $\mu$ M). La melatonina indujo un incremento de la corriente entrante y saliente de este canal de potasio ( $K_{ir}$ ).

En esta misma gráfica 9 se observa el efecto de las diferentes concentraciones de melatonina sobre las correspondientes conductancias; así en condiciones control se muestra que la pendiente la cual representa a la conductancia registrada entre pulsos de voltaje aplicados en el rango de -60 a -80 mV fue de 1.47 pS en situación control, mientras que en valores de voltaje entre -85 y -135 mV este valor se incrementó hasta 3.37 pS, como corresponde a un rectificador entrante. La aplicación de tres concentraciones diferentes de melatonina (0.5, 5 y 10  $\mu$ M) modificó la conductancia saliente (valores de voltaje entre -60 y -80 mV) hasta valores de 2.9, 3.97 y 5.1 pS, respectivamente; mientras que los valores de conductancia entrante se modificaron también hasta 4.26, 5.44 y 5.79 pS, respectivamente; los dos últimos valores son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) al compararlos con la conductancia entrante control. Estos datos muestran que la melatonina modifica en forma significativa la conductancia de este canal.

En lo referente a las otras dos conductancias intrínsecas registradas, la melatonina no mostró efecto significativo sobre la corriente referida como corriente h, en las células que la mostraron. Por otra parte, sí fue posible observar un incremento en el tamaño de la corriente A por efecto de este indol Fig.19. Sin embargo debido a que esta corriente sólo fue registrada en una célula, no podemos concluir una acción significativa del indol sobre esta conductancia.

El experimento también fue diseñado para analizar una posible interacción de los efectos ejercidos por la melatonina y aquellos desencadenados por 2 catecolaminas involucradas en la modulación de la reproducción, estas son la dopamina y la noradrenalina. En este sentido 18 neuronas hipotalámicas anteriores recibieron una aplicación conjunta de melatonina y dopamina en una concentración de 5  $\mu\text{M}$  cada una. Previamente estas neuronas habían sido probadas con la adición ya sea de melatonina o dopamina por separado. En este grupo de neuronas la melatonina ejerció una acción de incrementar la conductancia del canal en 12 células como se muestra en la Fig.20, en 3 se mostró un muy ligero decremento y 3 de ellas no fueron afectadas por el indol. Mientras que la administración únicamente de dopamina no provocó ningún cambio significativo en alguna de estas neuronas.

La administración conjunta de melatonina y dopamina no provocó alguna modificación significativa de los efectos de la melatonina, tal y como se observa en la gráfica 10, la cual corresponde a la curva I-V promedio de las 18 células registradas. Estas neuronas mostraron, en la situación control conductancias salientes que promediaron 0.91 pS y sus conductancias salientes fueron de 4.40 pS en promedio. Por acción de la melatonina estas conductancias se incrementaron hasta 2.43 y 5.60 pS para la saliente y la entrante respectivamente, situación similar a la observada en el experimento previo. Por otro lado la administración conjunta de dopamina y melatonina en 18 neuronas indujo una conductancia saliente de 2.55 pS y una entrante de 6.07 pS, valores muy similares y no estadísticamente diferentes a los provocados por la administración única de melatonina.

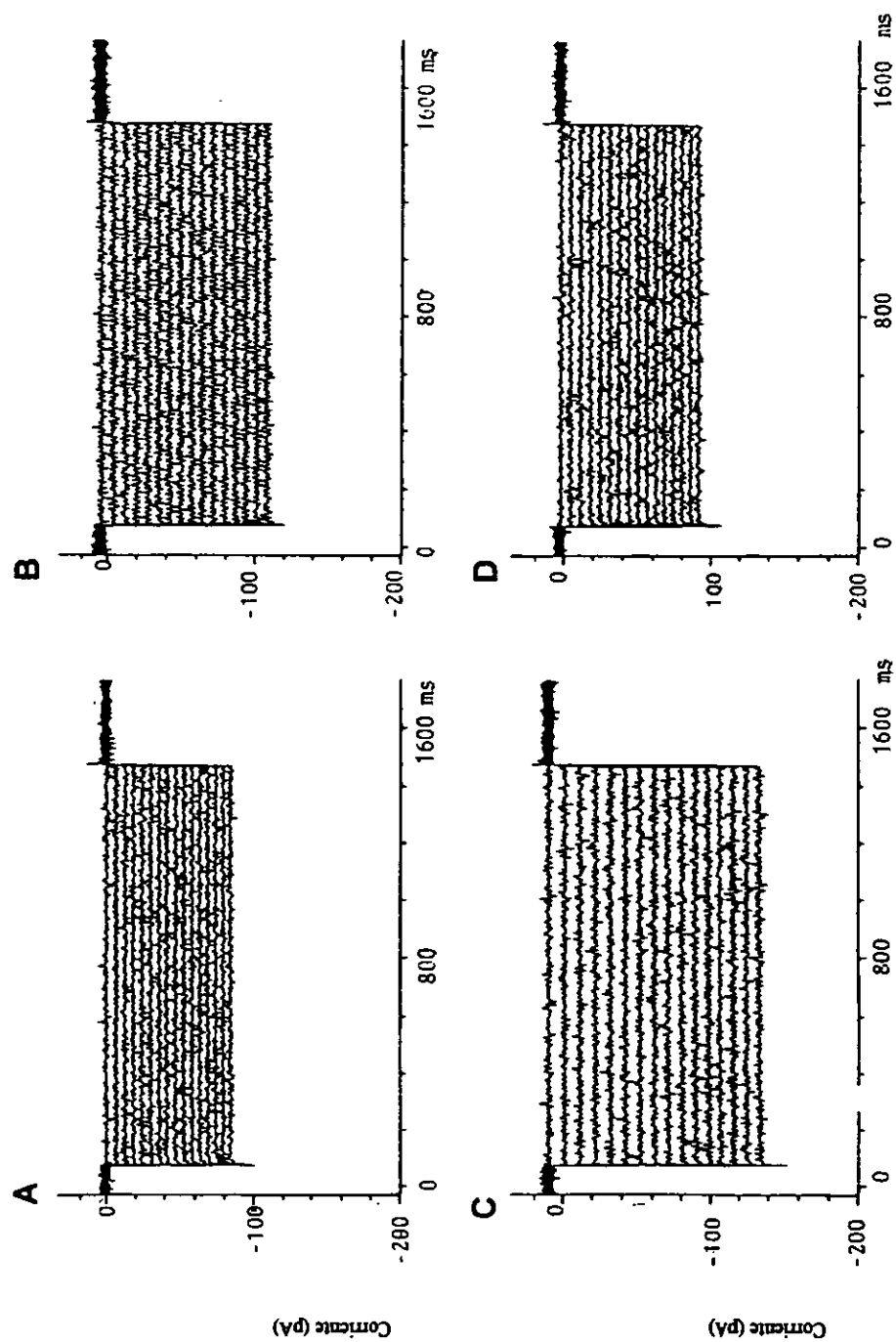
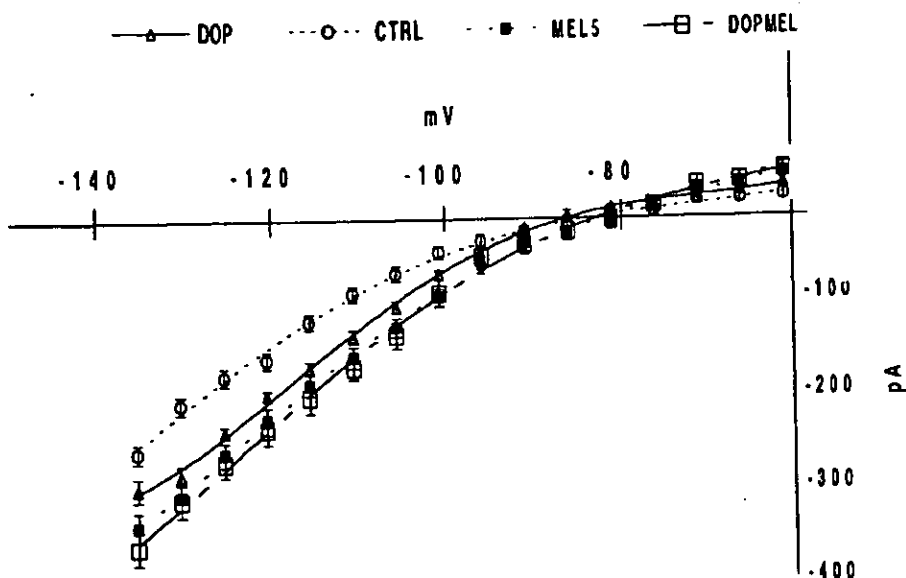


Fig.20. Se muestran los efectos de la aplicación de melatonina y dopamina sobre las corrientes entrantes de potasio en una neurona registrada del hipotálamo anterior. Control (A) melatonina 5  $\mu\text{M}$  (B), dopamina-melatonina 5  $\mu\text{M}$  (C), y el lavado (D). En este registro el tratamiento con melatonina induce un aumento de la corriente con respecto al control, de igual forma cuando ésta es dada en conjunto con la dopamina se observó un ligero aumento de la corriente entrante de  $\text{K}^+$  de 20 pA.



**Gráfica.10.** Muestra la relación I-V del promedio de 18 células las cuales fueron sometidas a concentraciones de  $5 \mu\text{M}$  de melatonina y  $5 \mu\text{M}$  de dopamina. La conductancia obtenida para la corriente saliente y entrante con el tratamiento de melatonina fue de 2,43 y 5,60 pS respectivamente. Mientras que las conductancias obtenidas con la aplicación de melatonina-dopamina fueron para la saliente de 2,55 pS y entrante de 6,07 pS, valores muy similares y no estadísticamente diferentes a los provocados por la administración única de melatonina.

La administración de noradrenalina en concentraciones de 5  $\mu\text{M}$ , produjo efectos significativos en estas neuronas. El efecto de esta catecolamina fue analizado en 8 neuronas, las cuales respondieron con un incremento en su conductancia a la administración de melatonina. Sin embargo cuando este indol fue administrado en presencia de noradrenalina sus efectos se potenciaron en forma marcada (Fig.21). En esta situación no se observó algún cambio significativo en la conductancia registrada, ya que esta pasó de 0.98 pS, para la situación control de -60 a -80 mV, a 1.51 y 1.53 pS, para el mismo rango de voltaje en la situación de aplicación de melatonina y la combinación melatonina-noradrenalina respectivamente. Las conductancias en el rango de -85 a -135 mV cambiaron de 3.41 pS para el control a 5.28 y 5.89 para los grupos de células que recibieron melatonina y la administración conjunta de melatonina-noradrenalina, respectivamente. Aunque se observan diferencias cualitativas en estos valores, la aplicación de la prueba estadística del  $\chi^2$  seleccionada, no mostró diferencias significativas ( $p < 0.068$ ). El promedio de los resultados de 8 células pueden además apreciarse en la gráfica 11, la cual muestra las curvas I-V correspondientes obtenidas de las 8 células analizadas.



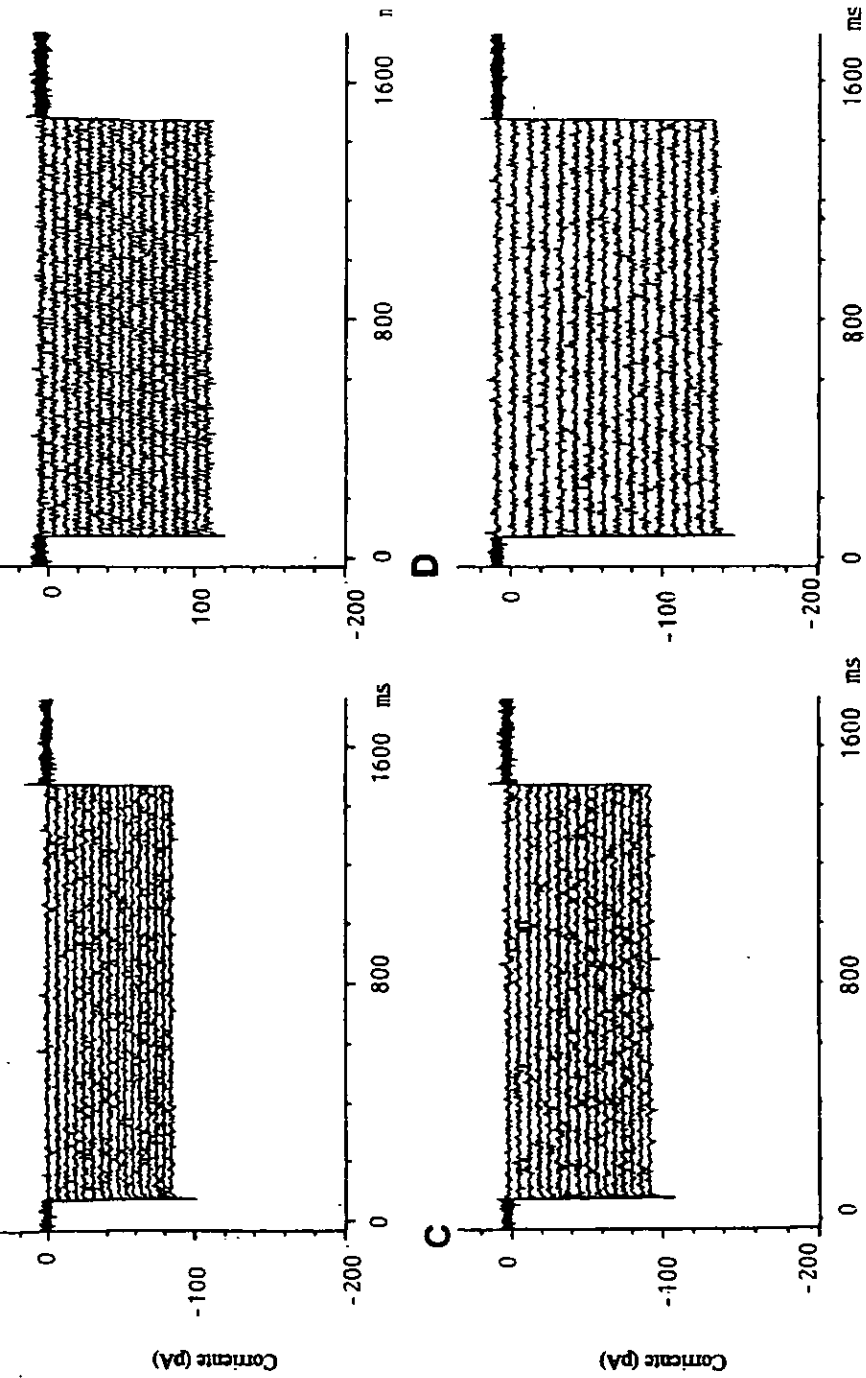
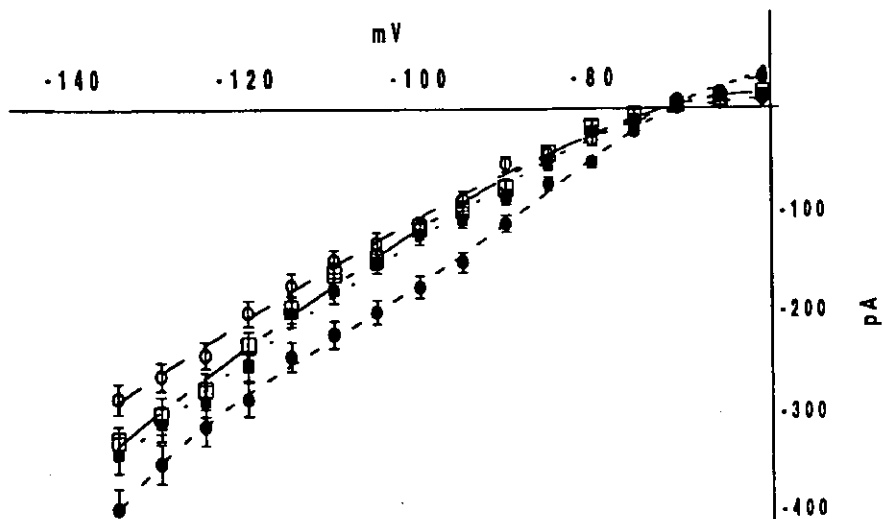


Fig.21. Se muestran los efectos de la aplicación de melatonina y noradrenalina sobre las corrientes entrantes de potasio en una neurona registrada del hipotálamo anterior. Control (A), melatonina 5 $\mu$ M (B), noradrenalina-melatonina [5 $\mu$ M] (D), el lavado (C). En este registro se observa que el tratamiento con melatonina induce un aumento de la corriente con respecto al control de 20 pA, de igual forma cuando esta es aplicada en conjunto con la noradrenalina se observa un ligero aumento de la corriente entrante de K<sup>+</sup> de 20 pA con respecto al tratamiento únicamente con melatonina.

—○— CTRL    -●- MEL 5 $\mu$ M    -■- NORMEL    -□- NOR



Gráfica.11. Muestra la relación I-V del promedio de 8 células las cuales fueron sometidas a concentraciones de 5  $\mu$ M de melatonina y 5  $\mu$ M de noradrenalina. La conductancia obtenida para la corriente saliente y entrante del control fue de 0.98 y 3.41 respectivamente. Con el tratamiento de melatonina fue de 1.51 pS para la saliente y 5.28 pS para la saliente. Mientras que las conductancias obtenidas con la aplicación de melatonina-noradrenalina fueron para la saliente de 1.53 pS y entrante de 5.89 pS, estos últimos valores no fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.068$ ) a los provocados por la administración única de melatonina.

## CAPITULO IV.

### Discusión:

La melatonina es una hormona indólica que ejerce un gran número de efectos en diversas especies tanto de animales como de vegetales (Hardeland, 1997). Se trata de una sustancia de muy temprana aparición en la escala filogenética, por lo que ejerce una gran variedad de actividades, aunque todas ellas se caracterizan por tener una relación directa con la cantidad de luz ambiental (Hardeland, 1997).

A pesar de que esta hormona ejerce efectos en diferentes tejidos periféricos, como el músculo liso intestinal y uterino, los vasos sanguíneos y glándulas de secreción interna (Pang, et al, 1993); su principal sitio de acción lo constituye el sistema nervioso central. Efectos sobre la actividad retiniana, hipotalámica, hipocampal y límbica han sido descritos consistentemente en la literatura (Jockers, et al, 1998). Estos estudios señalan una acción inhibitoria de la actividad secretora y de la excitabilidad en estas neuronas.

Varios estudios electrofisiológicos han mostrado que la melatonina reduce la actividad eléctrica registrada ya sea en forma de electroencefalogramas (Cajochen, et al, 1999), potenciales provocados (Sandyk, 1995) actividad multiunitaria (Sthele, et al, 1990) y unitaria (Shibata, et al, 1989), así como en registros intracelulares. Cuando estos estudios se realizan en células secretoras, tal efecto se asocia invariablemente con un decremento en la liberación hormonal.

En los resultados obtenidos en nuestro estudio, realizados en animales íntegros aplicando la melatonina por micropresión se mostró claramente que el hipotálamo anterior constituye un área blanco en los efectos de esta hormona. La melatonina es capaz de reducir la frecuencia de descarga de las neuronas del hipotálamo anterior. El efecto de melatonina sobre la excitabilidad neuronal, nos sugiere que el mecanismo de acción de este indol esta siendo modulado en un primer nivel, es decir, sobre los receptores membranales de estas neuronas.

El mecanismo de los efectos de esta hormona ha sido motivo de controversias desde hace tiempo. La melatonina es una hormona altamente liposoluble y prácticamente no hidrosoluble (Cupp, 1997), razón por la cual se sugirió que sus efectos se ejercían a través de su asociación con receptores intracelulares (Benítez y Anton, 1993). Esto implica la activación de mecanismos genómicos en las acciones de esta hormona (Sminov, 2001), sin embargo, la latencia y características de los efectos electrofisiológicos hacen poco probable esta afirmación (Mor, et al, 1999).

Parte de esta controversia se generó porque hasta principios de los 80's varios estudios que intentaban localizar receptores a la melatonina en las membranas celulares fracasaron o dieron resultados francamente contradictorios (Anton, 1974). La causa posiblemente residió en el hecho de que estos estudios realizaron pruebas de binding con melatonina tritiada (3H-melatonina), localizándose una densidad de receptores muy pobre, la radioactividad emanada de la melatonina fija a estos receptores resultaba también muy pobre y difícil de detectar (Krause y Duvocovich, 1991). Sin embargo,

en los 80's y gracias al empleo de melatonina marcada con 2 moléculas de  $I^{123}$ , se lograron identificar sitios de unión específica a la melatonina en membranas de células de varias regiones cerebrales (Morgan, 1994)

Actualmente se han descrito tres diferentes tipos de receptores a la melatonina, 2 de ellos (MT1 y MT2) localizados en tejidos cerebrales de mamíferos y otro (MT3) aislado de la retina de pollo, los cuales muestran una cinética y una farmacología propias (Mor, 1999). El receptor más abundante en las regiones del hipotálamo es el MT1 el cual es considerado de alta afinidad (Reppert, 1997). Cuando este receptor es transfectado a ovocitos de *Xenopus*, se observa que su activación por melatonina reduce en forma consistente las corrientes excitadoras inducidas por la aplicación de un activador inespecífico de la adenilato ciclasa (Fraser, et al, 1991)

Es de vital importancia señalar con base en nuestros resultados, que la mayor parte de los efectos ejercidos por melatonina se localizaron fuera del área preóptica, lo cual sugiere una acción indirecta sobre la secreción de gonadotropinas, ya que las neuronas productoras de factores liberadores de gonadotropinas se localizan principalmente en la región preóptica (Malpoux, et al, 1997) y los efectos de melatonina en esta área fueron muy reducidos.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

En nuestro estudio, al igual que lo descrito en otros artículos (Shibata, et al. 1989), el efecto electrofisiológico más frecuentemente observado después de la aplicación de melatonina fue una reducción de la frecuencia de descarga. Aunque este efecto fue similar al desencadenado por otro indol (serotonina), la melatonina mostró una cinética diferente y una intensidad del efecto mucho mayor que el inducido por la serotonina en el hipotálamo anterior.

Comparativamente también, nuestro estudio mostró que la aplicación de dopamina ejerció los efectos depresores más pronunciados que aquellos observados después de administrar la melatonina. Estos efectos fueron sin embargo, más dirigidos hacia las neuronas del área preóptica, aunque algunas de las neuronas del hipotálamo anterior también fueron afectadas por la catecolamina. Este hallazgo no es sorprendente si invocamos los amplios efectos que esta catecolamina ejerce sobre la secreción hormonal en general y sobre hormonas como la prolactina en particular; de hecho, esta catecolamina es considerada como el factor inhibidor de la secreción de prolactina (PIF) debido a sus acciones inhibitoras sobre la secreción de esta hormona (Martínez, et al, 1992).

Además, los efectos de la dopamina se ejercieron sobre células localizadas en regiones diferentes a las afectadas por la melatonina y la intensidad de sus efectos fueron mucho más intensos que los del indol, aunque la dirección del efecto fue la misma. Estos resultados indican que una interacción directa de ambas sustancias, sobre los mismos elementos neuronales, resulta poco probable.

Por otra parte, la noradrenalina constituye un neurotransmisor clave en el proceso de regulación de la liberación de las hormonas estimulantes de gonadotropinas, particularmente de la hormona luteinizante (McCann, et al, 1998). Su liberación ejerce un efecto estimulador sobre las células productoras de gonadotropinas (McCann, et al, 1998), sobre todo de aquellas localizadas en el área preóptica, región que fue poco sensible a los efectos de la melatonina. Los efectos excitadores encontrados después de la aplicación de noradrenalina fueron bloqueados por la administración conjunta de prazocina, un fármaco bloqueador de receptores adrenérgicos tipo  $\alpha_1$ . Tal mecanismo de acción en animales íntegros provoca una reducción en la secreción de gonadotropinas (Rettori, et al, (b) 1997).

Las diferencias entre los sitios de acción, la dirección de la respuesta provocada y la sensibilidad a los efectos de la prazocina, indican que los sitios blancos de la melatonina y los mecanismos de acción que utiliza la melatonina para modular la reproducción, no parecen ser los mismos que utiliza la norepinefrina para estimular la secreción de gonadotropinas. Estos resultados sugieren fuertemente que los efectos sobre la reproducción mediados por la melatonina no son ejercidos directamente sobre las células que producen gonadotropinas, sino que posiblemente sean resultado de un efecto indirecto; es decir en neuronas que no secretan GnRH, pero que ejercen una influencia, posiblemente excitadora, sobre su secreción. En esta perspectiva es posible incluso un efecto directo de la melatonina sobre neuronas adrenérgicas productoras de noradrenalina, posibilidad que hay que analizar.

En relación con el mecanismo de acción que emplea la melatonina para reducir la frecuencia de descarga, se ha mostrado en el laboratorio con estudios de current-clamp, que en situación de reposo la melatonina es capaz de hiperpolarizar la membrana de las células que responden a está (datos no mostrados). Tal efecto obviamente es consecuencia de una acción de los canales transmembranales y particularmente de la conductancia de un ion saliente positivo o entrante negativo (Petit, 1998). Los candidatos obvios a suponer eran los canales de potasio y de cloro, respectivamente; Sin embargo, en función del valor del potencial de membrana de estas neuronas y a los potenciales de equilibrio de los mencionados iones, la corriente responsable de esta hiperpolarización fue una corriente entrante de potasio (Edwards y Weston, 1995) nuestros resultados de voltage-clamp muestran que la melatonina incrementa las corrientes entrantes de  $K^+$ , hasta un 100%.

Esta posibilidad es sugerida además por algunos estudios recientes, realizados en ovocitos de *Xenopus*, los cuales muestran que el receptor transfectado de tipo MT1 posee la capacidad de asociarse a canales rectificadores entrantes de potasio a través de mecanismos mediados por proteínas G del tipo de las  $G_i$  (Nelson, et al, 1996), es decir de aquellas proteínas G que muestran una reducción en la formación del AMPc intracelular (Petit, 1998). Aunque es muy importante el mencionar que tal asociación no ha sido aún mostrada en condiciones fisiológicas en ningún tipo celular in vivo. La activación de este canal, el cual debido a su cinética y relación con el voltaje, está generando una corriente saliente en valores de voltaje



próximos al potencial de membrana y solo hasta que el valor de este potencial de membrana, alcance el valor del potencial de inversión de  $K^+$ , su corriente cambiará de sentido <sup>(Reimann y Ashcroft, 1999)</sup>. De tal suerte entonces, que en el estado de reposo, el incremento en la conductancia de este canal, particularmente en valores depolarizantes, incrementara la corriente saliente de potasio, lo que hiperpolarizará la célula en forma continua <sup>(Isomoto, 1997)</sup>, produciéndose de esta manera la disminución en la frecuencia de descarga neuronal.

Los presentes hallazgos, muestran que la melatonina induce cambios en la conductancia de un canal rectificador entrante, recientemente descrito en las neuronas del hipotálamo anterior <sup>(Karschin, 1994)</sup>, y que es diferente a los descritos en otras regiones cerebrales. Al igual de como ocurre en los ovocitos de *Xenopus* transfectados, este canal responde a un mecanismo de señalamiento intracelular basado en la activación de una proteína  $G_i$ , por lo que reduce los niveles intracelulares de AMPc y por ende disminuye el metabolismo celular <sup>(Nelson, 1993)</sup>. Este canal por otra parte, esta además asociado en esta región cerebral a receptores opioides y GABAérgicos de tipo  $GABA_B$  y a un adrenérgico no bien clasificado todavía. La administración de DAMGO, un opioide específico para receptores  $\mu$  <sup>(Rogalski, et al, 1999)</sup>, y de baclofen un agonista GABA tipo B <sup>(Jarolimek, 1998)</sup>, incrementan la conductancia de este canal (Kir) en forma sinérgica pero no potenciada, lo cual podría implicar que utilicen la misma vía de señalización. Por otro lado la administración de agonistas adrenérgicos disminuye tal conductancia y por lo tanto despolariza la membrana celular ejerciendo efectos excitadores <sup>(Li, 1995)</sup>.

En este estudio encontramos algunos efectos agonistas entre la melatonina y los fármacos adrenérgicos empleados, i.e., dopamina y noradrenalina, sin embargo, solo fueron cualitativos y no encontramos diferencia estadística. Esta interacción solo la realizamos en neuronas que respondieron a melatonina, por lo que desconocemos el efecto de estos fármacos adrenérgicos en neuronas insensibles al indol. Aunque fueron cualitativos los efectos de dopamina-melatonina, recientemente se ha descrito que los receptores de dopamina D2 son capaces de activar corrientes entrantes de  $K^+$  (Kir) a través de modular proteínas  $G_i$  en neuronas del núcleo arqueado <sup>(Belousov, et al, 1997)</sup>, así que existe la posibilidad de que tanto la melatonina como la dopamina estén modulando tales canales en la misma célula. Para la noradrenalina el panorama es aún más desconocido, recientemente se ha propuesto que esta catecolamina es capaz de incrementar la corriente del canal Kir en neuronas de la sustancia nigra compacta de rata <sup>(Cathala, et al, 1999)</sup>, pero en hipotálamo se desconoce una posible modulación de estos canales por noradrenalina.

Estos resultados permite proponer que la melatonina ejerce efectos moduladores de la liberación de neurohormonas y de la excitabilidad celular a través de un mecanismo que modula las corrientes de  $K^+$  de un canal rectificador entrante de este ion.

Como un experimento complementario a este, debemos ahora estudiar el mecanismo de señalización intracelular. Próximamente, realizaremos estudios tendientes a mostrar el involucramiento de una

proteína Gi, para lo cual realizaremos experimentos en presencia de toxina pertusis, inhibidor específico de estas. Por otro lado, debemos también de intentar extrapolar este mecanismo de acción a otras estructuras cerebrales y extracerebrales que muestran una acción depresora de la melatonina en sus funciones; tratando con ello de determinar si existe un mecanismo general de acción o se trata de una particularidad de la melatonina en esta región cerebral. De particular importancia resulta el núcleo supraquiasmático, el cual constituye el sincronizador de ritmos biológicos más importante de toda la economía intrínseca del organismo, y cuya sensibilidad a la melatonina ha sido descrita desde hace mucho tiempo <sup>(Pevet,2001)</sup>.

Desde un punto de vista neuroquímico este centro representa además un buen modelo de interacción entre los efectos provocados por la melatonina y aquellos desencadenados por la noradrenalina, proveniente de las neuronas del locus coeruleus <sup>(Willoughby, et al,1987)</sup>.

Los resultados mostrados en el presente estudio, aportan una importante descripción sobre el mecanismo de acción de esta polifacética hormona, cuya acción ha sido fundamental en los procesos adaptativos de seguramente todas las especies animales y de algunos vegetales; por lo que desde un punto de vista filogenético, será de gran interés estudiar la filogenia de este mecanismo de acción.

## **Conclusiones.**

Con los resultados obtenidos en este estudio concluimos los siguientes puntos:

- a) La melatonina modifica la actividad eléctrica de las neuronas del hipotálamo anterior, induciendo una disminución de la frecuencia de descarga neuronal,
- b) Los efectos de disminución de la excitabilidad provocados por la melatonina fueron encontrados en neuronas localizadas fuera del área preóptica.
- c) Las neuronas del área preóptica que respondieron a noradrenalina, y cuyo efecto fue bloqueado por la prazocina, les confiere la posibilidad de ser neuronas productoras de GnRH; estas neuronas no fueron afectadas por la aplicación de melatonina. Lo que sugiere que el papel antgonadotrópico de este indol, se ejerce de una manera indirecta.
- d) La serotonina y dopamina ejercieron efectos depresores de la excitabilidad neuronal aunque estos se encontraron en regiones diferentes a las afectadas por la melatonina, lo que hace poco probable una interacción directa de estas sustancias sobre las mismas neuronas.
- e) La melatonina induce una hiperpolarización dependiente de la concentración en neuronas del hipotálamo anterior.
- f) El mecanismo de acción que utiliza la melatonina para provocar la hiperpolarización neuronal, puede deberse posiblemente a la modificación que produce sobre la conductancia de canales de  $K^+$  rectificadores entrantes (Kir).
- g) Cualitativamente en los registros de patch clamp, se encontraron efectos agonistas de la melatonina con dopamina y noradrenalina.

## BIBLIOGRAFÍA

Anton-Tay, F., Melatonin: effects on brain function, "Adv. Biochem. Psychopharmacol.", 11 (1974) 315-24.

Arendt J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Reviews of Reproduction* 3(1998) 13-22.

Benitez-King, G. and Anton-Tay, F., Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects, "Experientia", 49 (1993) 635-41.

Bernard, M., Guerlotte, J., Greve, P., Grechez-Cassiau, A., Iuvone, M.P., Zatz, M., Chong, N.W., Klein, D.C. and Voisin, P., Melatonin synthesis pathway: circadian regulation of the genes encoding the key enzymes in the chicken pineal gland and retina, *Reprod. Nutr. Dev.*, 39 (1999) 325-334.

Belousov B.A. and Van Del Pol N. A. Dopamine Inhibition: Enhanced of GABA activity and potassium channel activation in hypothalamic and arcuate nucleus neurons. *J Neurophysiol.* 78 (1997) 674-688.

Brann, D.W. and Mahesh, V.B., Excitatory amino acids: function and significance in reproduction and neuroendocrine regulation, *Front. Neuroendocrinol.* 15 (1994) 3-49.

Cathala L. and Paupardin T.D. Effect of catecholamines on the hyperpolarization-activated cationic  $I_h$  and the inwardly rectifying potassium

I(Kir) currents in the rat substantia nigra pars compacta. *Eur J Neurosci.* 2 (1999) 398-406.

Cajochen, C., Khalsa, S.B., Wyatt, J.K., Czeisler, C.A. and Dijk, D.J., EEG and ocular correlates of circadian melatonin phase and human performance decrements during sleep loss, *"Am. J. Physiol."*, 277 (1999) R640-R69.

Cassone, V.M., Melatonin role in vertebrate circadian rhythms, *Chronobiol. Int.*, 15 (1998) 457-473.

Crews, D., Behavioural endocrinology and reproduction: an evolutionary perspective. *Rev. Reprod. Biol.*, 14 (1992) 303-370.

Cupp, M.J., Melatonin, *"Am. Fam. Physician."*, 56 (1997) 1421-5, 1428.

Doupnik A. C., Davidson N., and Lester A. H. The inward rectifier potassium channel family. *Curr Biol.* 5 (1995) 268-277.

Edwards, G. and Weston, A.H., The role of potassium channels in excitable cells, *"Diabetes Res. Clin. Pract."*, 28 Suppl (1995) S57-66.

Flament D. J., The hypothalamus: anatomy and functions, *Acta Psychiatr. Belg.*, 80 (1980) 364-375.

Foulkes, N.S., Whitmore, D. and Sassone-Corsi, P., Rhythmic transcription: the molecular basis of circadian melatonin synthesis, *Biol. Cell.* 89 (1997) 487-494.

Franz, W.B., Basic review: endocrinology of the normal menstrual cycle, *Prim. Care*, 15 (1988) 607-616.

Fraser, S.P., Barrett, P., Djamgoz, M.B. and Morgan, P.J., Melatonin receptor mRNA expression in *Xenopus* oocytes: inhibition of G-protein-activated response, *Neurosci. Lett.*, 124 (1991) 242-25.

Gasparini S. Difrancesco D., Action of serotonin on the hyperpolarization-activated cation current (I<sub>h</sub>) in rat CA1 hippocampal neurons. *Eur J Neurosci.* 11(1999). 3093-3100.

Gerlach, T. and Aurich, J.E. Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster, *Anim. Reprod. Sci.* 2000. Mar. 15;58(3-4):197-213., 58 (1988) 197-213.

Goldman, B.D., The circadian timing system and reproduction in mammals, *Steroids*, 64 (1999) 679-685.

Hardeland, R., New actions of melatonin and their relevance to biometeorology, *Int. J. Biometeorol.*, 41 (1997) 47-57.

Hille B. Ionic channels of excitable membranes. Second edition. Sinauer associates INC. Sunderland, Massachusetts. 1992, paginas 545.

Hiruma, H. Nishihara, M. and Kimura F., Hypothalamic electrical activity that relates to the pulsatile release of luteinizing hormone exhibits diurnal variations in ovariectomized rats. *Brain Res.* 582 (1992) 119-122

Horvath, T.L., Garcia-Segura, L.M. and Naftolin, F., Control of gonadotropin feedback: the possible role of estrogen-induced hypothalamic synaptic plasticity, *Gynecol. Endocrinol.*, 11 (1997) 139-143.

Isomoto, S., Kondo, C. and Kurachi, Y., Inwardly rectifying potassium channels: their molecular heterogeneity and function, "*Jpn. J. Physiol.*", 47 (1997) 11-39.

Jarolimiek, W., Baurle, J. and Misgeld, U., Pore mutation in a G-protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel subunit causes loss of K<sup>+</sup>-dependent inhibition in weaver hippocampus, "*J. Neurosci.*", 18 (1998) 4001-407.

Jerierowski, W. T., Bargsten G. D., Heterogeneity of pituitary gonadotrope cells in male rats. *Arch. Histol. Cytol.* 60:4 (1997) 355-78.

Jockers, R., Petit, L., Brydon, L., de Coppet, P. and Strosberg, A.D., Structure and function of melatonin receptors], "*C. R. Seances. Soc. Biol. Fil.*", 192 (1998) 659-67.



Karschin, C., Schreibmayer, W., Dascal, N., Lester, H., Davidson, N. and Karschin, A., Distribution and localization of a G protein-coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel in the rat, "FEBS Lett.", 348 (1994) 139-44.

Kawata, M., Roles of steroid hormones and their receptors in structural organization in the nervous system, *Neurosci. Res.*, 24 (1995) 1-46.

Klein H., L., Schwerk, C., Kahmann, S. and Vassen, L., Targets of activated steroid hormone receptors: basal transcription factors and receptor interacting proteins [see comments], *J. Mol. Med.*, 76 (1998) 490-496.

Kokkola, T. and Laitinen, J.T., Melatonin receptor genes, *Ann. Med.*, 30 (1998) 88-94.

Krause N. D. and Duvocovich., Melatonin Receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 31 (1991) 549-68.

Kumar, V., Photoperiodism in higher vertebrates: an adaptive strategy in temporal environment, *Indian J. Exp. Biol.*, 35 (1997) 427-437.

Leung, P.C. and Peng, C., Gonadotropin-releasing hormone receptor: gene structure, expression and regulation, *Biol. Signals.*, 5 (1996) 63-69.

Li, Y.W., Bayliss, D.A. and Guyenet, P.G., C1 neurons of neonatal rats: intrinsic beating properties and alpha 2-adrenergic receptors, "Am. J. Physiol.", 269 (1995) R1356-R169.

Liem K.L, Simard M.J., Song Y and Tewari K., The patch clamp technique. *Neurosurgery*. 2 (1995) 382-392.

Lightman S.L., The neuroendocrine paraventricular hypothalamus: receptors, signal, transduction, mRNA and neurosecretion. *J. Exp. Biol.* 139 (1988) 31-49.

Lincoln, G.A. and Richardson, M., Photo-neuroendocrine control of seasonal cycles in body weight, pelage growth and reproduction: lessons from the HPD sheep model, *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 119 (1998) 283-294.

López J. F., Merchenthaler J.I., Moretto M. and Negro-Vilar A., Modulating mechanisms of neuroendocrine cell activity: The LHRH pulse generator. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 1 (1998) 125-146.

Malpoux, B., Thiery, J.C. and Chemineau, P., Melatonin and the seasonal control of reproduction, *Reprod. Nutr. Dev.*, 39 (1999) 355-366.

Malpoux, B., Viguie, C., Skinner, D.C., Thiery, J.C. and Chemineau, P., Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe, *Brain Res. Bull.*, 44 (1997) 431-438.

Marshall, J.C., Dalkin, A.C., Haisenleder, D.J., Paul, S.J., Ortolano, G.A. and Kelch, R.P., Gonadotropin-releasing hormone pulses: regulators of

gonadotropin synthesis and ovulatory cycles, *Recent. Prog. Horm. Res.*, 47 (1991) 155-87; discussion 188-9.

Martinez de la Escalera, G. and Weiner, R.I., Dissociation of dopamine from its receptor as a signal in the pleiotropic hypothalamic regulation of prolactin secretion, *"Endocr. Rev."*, 13 (1992) 241-55.

McCann, S.M., Kimura, M., Walczewska, A., Karanth, S., Rettori, V. and Yu, W.H., Hypothalamic control of gonadotropin secretion by LHRH, FSHRF, NO, cytokines, and leptin, *"Domest. Anim. Endocrinol."*, 15 (1998) 333-44.

McCann, S.M., Kimura, M., Walczewska, A., Karanth, S., Rettori, V. and Yu, W.H., Hypothalamic control of FSH and LH by FSH-RF, LHRH, cytokines, leptin and nitric oxide, *"Neuroimmunomodulation."*, 5 (1998) 193-202.

Mor, M., Plazzi, P.V., Spadoni, G. and Tarzia, G., Melatonin, *"Curr. Med. Chem."*, 6 (1999) 501-18.

Morgan J. P., Barret P., Howell E. H., and Helliwell R., Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int.* 24 (2), (1994)101-146.

Naor, Z., Harris, D. and Shacham, S., Mechanism of GnRH receptor signaling: combinatorial cross-talk of Ca<sup>2+</sup> and protein kinase C, *Front. Neuroendocrinol.*, 19 (1998) 1-19.

Negro V. A., Valenca M.M., and Culler M. D., Transmembrane signals and intracellular messengers mediating LHRH and LH secretion. *Neuroendocrinology*.85(2) (1987)85-107.

Nelson, C.S., Marino, J.L. and Allen, C.N., Melatonin receptors activate heteromeric G-protein coupled Kir3 channels, *Neuroreport.*, 7 (1996) 717-720.

Nishihara, M., Takeuchi, Y., Tanaka, T. and Mori, Y., Electrophysiological correlates of pulsatile and surge gonadotropin secretion, *Rev. Reprod.*, 4 (1999) 110-116.

North A. R. Drug receptors and the inhibition of nerve cells. *Br.J. Pharmacol.* 98 (1989) 13-28.

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

Pang, S.F., Dubocovich, M.L. and Brown, G.M., Melatonin receptors in peripheral tissues: a new area of melatonin research, *"Biol. Signals."*, 2 (1993) 177-80.

Pape H. C. Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol.* 58 (1996) 299-327.

Parvizi, N., Neuroendocrine regulation of gonadotropins in the male and the female, *Anim. Reprod. Sci.* 2000. Jul. 2;60-61:31-47.

Pellegrino J.L., Pellegrino S.A. Cushman J.A. A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain. Plenum Press. New York and London (1986) 4-122.

Pelletier, G., Anatomy of the hypothalamic-pituitary axis, *Methods Achiev. Exp. Pathol.*, 14 (1991) 1-22.

Petit, L., Guardiola, B., Delagrangé, P., Jockers, R. and Strosberg, A.D., [Signaling by melatonin receptors], *Thérapie*, 53 (1998) 421-48.

Pevet, P., The role of the pineal gland in the photoperiodic control of reproduction in different hamster species, *Reprod. Nutr. Dev.*, 28 (1988) 443-458.

Pevet, P., Melatonin and biological rhythms, *Biol. Signals. Recept.* 9 (2001) 203-12.

Prieto Gómez B. (tesis doctoral). Modificación de la actividad unitaria del hipotálamo inducida por la aplicación sistémica y local de melatonina en ratas. UNAM. (1989). 383 pags.

Reimann, F. and Ashcroft, F.M., Inwardly rectifying potassium channels, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11 (1999) 503-58.

Reppert, S.M., Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors, *J. Biol. Rhythms*, 12 (1997) 528-531.

Rettori, V. and McCann, S.M., The mechanism of action of alcohol to suppress gonadotropin secretion, *Mol. Psychiatry*, 2 (1997) 350-354. (a)

Rettori, V., Canteros, G. and McCann, S.M., Interaction between NO and oxytocin: influence on LHRH release, *"Braz. J. Med. Biol. Res."*, 30 (1997) 453-47. (b)

Rogalski, S.L., Cyr, C. and Chavkin, C., Activation of the endothelin receptor inhibits the G protein-coupled inwardly rectifying potassium channel by a phospholipase A2-mediated mechanism, *"J. Neurochem."*, 72 (1999) 1409-116.

Sandyk, R., Diurnal variations in vision and relations to circadian melatonin secretion in multiple sclerosis, *"Int. J. Neurosci."*, 83 (1995) 1-6.

Sassone C. P., Coupling gene expression to cAMP signalling: role of CREB and CREM, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 30 (1998) 27-38.

Scott, C.J., Tilbrook, A.J., Rawson, J.A. and Clarke, I.J., Gonadal steroid receptors in the regulation of GnRH secretion in farm animals, *Anim. Reprod. Sci.* 2000. Jul. 2;60-61:313-26.

- Shibata, S., Cassone, V.M. and Moore, R.Y., Effects of melatonin on neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro, "Neurosci. Lett.", 97 (1989) 140-14.
- Sminorv, A. N., Nuclear Melatonin Receptors. Biochemistry., 66 (2001) 28-36.
- Solis A. R., Abreu P, Lopez C. I., Hernandez G, Fajardo N, Hernandez-Diaz F, Diaz C. A., Hernandez A., Gonadal steroid modulation of neuroendocrine transduction: a transynaptic view. Cell Mol Neurobiol. 16 (1996) 357-82.
- Stankov, B. and Reiter, R.J., Melatonin receptors: current status, facts, and hypotheses, "Life Sci.", 46 (1990) 971-82.
- Stehle, J., Vanecek, J. and Vollrath, L., Effects of melatonin on spontaneous electrical activity of neurons in rat suprachiasmatic nuclei: an in vitro iontophoretic study, "J. Neural Transm.", 78 (1989) 173-17.
- Stomati, M., Genazzani, A.D., Petraglia, F. and Genazzani, A.R., Contraception as prevention and therapy: sex steroids and the brain, Eur. J. Contracept. Reprod. Health Care, 3 (1998) 21-28.
- Styne, D.M., Physiology of puberty, Horm. Res., 41 Suppl 2 (1994) 3-6.

Sundgren A K. A. and Johansson S. Calcium spikes and calcium currents in neurons from the medial preoptic nucleus of rat. *Brain Research*. 783 (1998) 194-209.

Thimonier, J., Control of seasonal reproduction in sheep and goats by light and hormones, *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 30 (1981) 33-45.

Vanecek J. and Klein D. C. Melatonin inhibits gonadotropin-releasing hormone-induced elevation of intracellular  $Ca^{2+}$  in neonatal rat pituitary cells. *Endocrinology*. 130(1992) 701-707.

Vanecek, J., Cellular mechanisms of melatonin action, *Physiol. Rev.*, 78 (1998) 687-721.

Willoughby, J.O., Jervois, P.M., Menadue, M.F. and Blessing, W.W., Noradrenaline, by activation of alpha-1-adrenoceptors in the region of the supraoptic nucleus, causes secretion of vasopressin in the unanaesthetized rat, *Neuroendocrinology*, 45 (1987) 219-26.

Wilczynski, W., Allison, J.D. and Marler, C.A., Sensory pathways linking social and environmental cues to endocrine control regions of amphibian forebrains, *Brain Behav. Evol.*, 42 (1993) 252-264.

Wuttke W., Jarry H., Feleder C., Moguilevsky J., Leonhardt S., Seong J Y and Kim K. The neurochemistry of the GnRH pulse generator. *Acta Neurobiol. Exp.* 56(1996) 707-713.



Yokoyama A. Brain control of the reproductive system. Japan Sci Soc Press Tokio, Japan. (1992) 69-139.

Zarate T. A., Morán V E. C., Feria V A., Kubli G. C. Fundamentos de neuroendocrinología. Fondo de la cultura economica. (1993) 53-123.

Zawilska, J.B., Melatonin as a chemical indicator of environmental light-dark cycle, Acta Neurobiol. Exp. (Warsz)., 56 (1996) 757-767.

Zhi-Gen J, Cole S, N. and Charles N. A. Melatonin activates an outward current and inhibits Ih in rat suprachiasmatic nucleus neurons. Brain Research.687(1995) 125-132.

## Abreviaturas.

ATP. Adenosina trifosfato  
CaCl<sub>2</sub>. Cloruro de potasio.  
DAG. Diacilglicerol.  
DHT. Dihidrotestosterona.  
DOP. Dopamina  
EGTA. Etilenglicol-bis(β-aminoetil) N, N'-ácido tretácetico.  
FSH. Hormona foliculo estimulante.  
GnRH. Hormona liberadora de gonadotropinas.  
Gq. Proteína G, tipo q.  
GTP. Guanidil trifosfato.  
GΩ. Gigaohms.  
HEPES. (N-(2-hidroxiethyl) piperazina N'(2-etano sulfonico))  
5-HTP. 5-hidroxitriptamina (serotonina).  
InsP<sub>3</sub>. Trifosfato inositol.  
i.p. Intraperitoneal.  
I-V. Corriente contra voltaje.  
Kg. Kilogramo.  
Kir. Canal de potasio entrante rectificador.  
KHz. Kilohertz.  
KCl. Cloruro de potasio.  
LCRA. Líquido cefalorraquídeo (solución).  
LH. Hormona luteinizante.  
M. Molar.  
MEL. Melatonina.  
MgCl<sub>2</sub>. Cloruro de magnesio.  
MgSO<sub>4</sub>. Sulfato de magnesio.  
MΩ. Megaohms.  
μA. Microamperios.  
μm. Micras.  
μM. Micromolar.  
μV. Microvoltios.  
mA. Miliamperios  
mm. milimetro.  
mM. Milimolar.  
mseg. Milisegundo.  
mV. Milivoltios.  
Mosm. Miliosmoles.  
NaCl. Cloruro de sodio.  
NaHCO<sub>3</sub>. Bicarbonato de sodio.  
Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Fosfato dibásico.  
NOR. Noradrenalina.  
PIP<sub>2</sub>. Fosfatidil Inositol difosfato.  
PKC. Proteína Cinasa C.

pS. Picosimes (unida de conductancia).

Psi. Unidades de presión (Pascuales).

RE. Reticulo endoplásmico.

SNC. Sistema nervioso central.