



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

# Biblioteca Digital FCEN-UBA

## La actividad cronobiológica de la melatonina : Relación con el sistema gabaérgico central

Golombek, Diego Andrés

1992

Tesis Doctoral

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Universidad de Buenos Aires

[www.digital.bl.fcen.uba.ar](http://www.digital.bl.fcen.uba.ar)

Contacto: [digital@bl.fcen.uba.ar](mailto:digital@bl.fcen.uba.ar)

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

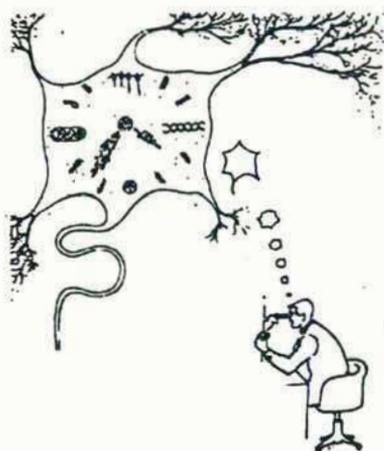
Fuente / source:

Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CS. EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**LA ACTIVIDAD  
CRONOBIOLOGICA DE LA  
MELATONINA:  
RELACION CON EL SISTEMA  
GABAERGICO CENTRAL**

**Trabajo presentado para optar al título de  
Doctor en Ciencias Biológicas**



**Autor: Diego Andrés Golombek  
Director: Dr. Daniel P. Cardinali**

**Lugar de trabajo: Depto. de Fisiología  
Facultad de Medicina, UBA**

*Tesis.  
2489  
ej. 2*

1992

...The captain at last said, he had one question to ask me, to answer with all truth. It was, "Whether the ladies of Buenos Ayres were not the handsomest in the world". I replied, like a renegade, "Charmingly so"...

...Police and justice are quite inefficient... Sensuality, mockery of all religion and the grossest corruption, are far from uncommon. Nearly every public officer can be bribed...

Charles Darwin: "*Buenos Ayres*", El viaje del Beagle, 1839

Allá en el fondo del reloj está la muerte, pero no tenga miedo.

Julio Cortázar  
*Historias de Cronopios y de Famas*, 1962

## **AGRADECIMIENTOS** (lo único que realmente se lee en una tesis)

al dr. daniel cardinali que impulsó todo lo hecho a lo largo de estos años y me ayudó y apoyó permanentemente en esto de jugar a ser científico

a ruth que se metió en la cabeza enseñarme cosas (infructuosamente?) y me hizo repensar todo (muy a mi pesar) con su entusiasmo a toda prueba

al kalpa, beatriz y guiye que son los compañeros mas maravillosos (de aventuras, de comidas y hasta de trabajo, mire) que se puedan soñar

a ruben dezi que me metió los ritmos en la cabeza

a los verdaderos co-autores de este trabajo de tesis, que resistieron la esclavitud y las noches: jorgito (ídolo), esteban, guillermo, leila, diego, gabriela y mariana

a toda la gente del laboratorio que estando metida entre medialunas cocas y tubos, forma parte de esto que estás leyendo: horacio, cesar, elba, mercedes, irene, maria ines, adriana, rosalia, paula, salvador, marquitos, felipe, leonardo, lionel, leandro, benito

a mis padres y hermanos por su constante apoyo y porque al interesarse en estas gansadas rítmicas me hicieron entender un poco más de que se trataba

a los medinas (jorge, dani, diana, lina, claudia, sonia, edgar, haydee, rudy) porque siempre me dieron una mano, algunos peipers y muchas orejas

a los uchiteles (osvaldo, daro, vero, fabian, viviana, marcelo, carlitos) que siempre me dieron de comer

algunos más serios: claudio hamster padovano; cora, canatita y las soniqueadas; jorge medina y la prueba del binding; drogas robadas en los jardines de hoffmann laroche, roche y otros lugares inmencionables; guillermo, hacho, ruben y sus paciencias informaticas; y al grupo multidisciplinar de ritmos biológicos (sao paulo), por papiros, cosinores, pescado a la parrilla, caipirinhas y tantas ganas

a mis amigotes que siempre me rescataron cuando estaba perdido entre ritmos y melatoninas: hacho, javier, beto, danis, mariana, rud, pablo, gaby, raca, rafa, paula, luis, vale, alelodi, maria, pato y siguen las firmas

## INDICE

INDICE .....	acá
ABREVIATURAS .....	5
1. INTRODUCCION .....	6
¿Los ritmos biológicos? - Sí, los ritmos biológicos - Relojes endógenos - Adaptatividad de los ritmos biológicos - Caracterización de los ritmos biológicos - Los circarritmos - Cronofisiología - La glándula pineal - Receptores de melatonina - Efectores de la melatonina: el sistema gabaérgico central	
2. OBJETIVOS .....	33
3. MATERIALES Y METODOS .....	34
Depresión de actividad locomotora - Analgesia - Efecto anticonvulsivante - Efecto ansiolítico - Efecto sobre la resincronización - Monitoreo de ritmos biológicos - Efecto antigonal - Determinación del turnover de GABA bajo distintos fotoperíodos y del influjo de cloro inducido por GABA bajo fotoperíodos estimulatorio	
4. RESULTADOS .....	46
Depresión de actividad locomotora en el hamster - Analgesia en el ratón - Efecto anticonvulsivante en el hamster - Efecto ansiolítico en la rata - Resincronización tras desfasajes en el ciclo L:O - Variaciones diarias del turnover y efecto postsináptico del GABA en el hamster	
5. DISCUSION GENERAL.....	93
Experimentos comportamentales - Resincronización de ritmos de actividad locomotora - Regresión gonadal - El antagonismo con flumazenil: ¿qué es lo que se esta bloqueando? - El turnover de GABA y el fotoperíodo - Sobre dosis, especies y entrecruzamientos - Consideraciones finales	
5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	113
CREDITOS .....	134

## ABREVIATURAS

AMP <sub>c</sub>	Adenosina monofosfato cíclico
ARN	Acido ribonucleico
BZP	Benzodiazepina
°C	Grados centígrados
Ci	Curie
DZP	Diazepam
E.S.	Error estándar
GABA	Acido $\gamma$ -amino butírico
GAD	Glutámico descarboxilasa
GCS	Ganglio cervical superior
GMP	Guanosina monofosfato
h	Hora
<sup>3</sup> H	Tritio
HIOMT	Hidroxi-O-Metil transferasa
5-HT	Serotonina
i.p.	Intraperitoneal
Kd	Constante de disociación
kg	Kilogramo
LCR	Líquido cefalorraquídeo
M	Molar
min	Minuto
mg	Miligramo
ML	Melatonina (receptores)
ml	Mililitro
mM	Milimolar
$\mu$ l	Microlitro
$\mu$ g	Microgramo
3-MPA	Acido 3-mercapto propiónico
NAT	N-acetil transferasa
NE	Norepinefrina
nM	Nanomolar
NSQ	Núcleo supraquiasmático
PG	Prostaglandinas
Px	Pinealectomía
seg	Segundo
SNC	Sistema nervioso central

# 1. INTRODUCCION

## 1.1 ¿Los ritmos biológicos?

En el principio fue la nada. Después se crearon los días. Y después la sucesión de los días y las noches (al menos, así lo cuenta el Génesis). En ese momento podríamos afirmar que lo más importante ya existía: una materia inorgánica con elementos periódicos impresos de tal forma que la vida que pudiera auto-organizarse en torno a ella tuviera que ser necesariamente rítmica. Cotidianamente, nos enfrentamos con una realidad de nuestra constitución biológica: somos organismos periódicos, en fase con ciclos geofísicos de gran regularidad, el día, el mes o el año.

Los organismos son depositarios tanto de un reloj como de un calendario biológico. La Cronobiología, persigue comprender y explicar las bases biológicas de estas variaciones, es decir, cómo percibimos, reaccionamos, actuamos, aprendemos y recordamos de manera periódica (16, 144, 56). Claramente somos organismos de costumbres. Y "las costumbres, Andre, son sólo una expresión del ritmo. Son la cuota del ritmo necesaria para vivir", como dijo Julio Cortázar, uno de nuestros más grandes cronobiólogos, en *Bestiario* (1960).

Podemos afirmar que el cambio continuo caracteriza tanto a los organismos vivos como a su medio ambiente. Muchos de estos cambios se dan irregularmente, es decir, son aperiódicos. Ejemplos son las variaciones irregulares en temperatura, luz, humedad y otros factores físicos asociados con los sistemas meteorológicos. Aperiódicas son también las fluctuaciones biológicas que se originan en respuesta ante dichos cambios ambientales (5).

Por el contrario, existen variaciones ambientales periódicas, cambios regulares que se repiten a intervalos de tiempo constantes. Ejemplos conspicuos de periodicidad ambiental son las fluctuaciones naturales en las horas diarias de luz y oscuridad (16), o en las mareas (145). Las variaciones diarias y mareales en plantas y animales que responden y se ajustan a estos cambios ambientales, son, por lo tanto, periódicas. Se ha propuesto que los cambios ambientales periódicos son los que han tenido mayor influencia para modelar la evolución biológica (5)

La vinculación de la periodicidad biológica con los ciclos geofísicos posee dos ventajas objetivas: la predictibilidad - por ejemplo, el período medio de la rotación de la Tierra ha disminuido sólo unos veinte segundos en el último millón de años - y la posibilidad de detectar cambios de amplitud suficiente en el medio ambiente. En este último aspecto es clara la influencia

que los ciclos geofísicos ejercen en particular, sobre la iluminación y la temperatura. Así, por ejemplo, la iluminación puede variar desde 105 lux en el mediodía de un día soleado hasta  $10^{-3}$  lux en una noche de tormenta con cielo encapotado (1 lux es equivalente a aproximadamente 1/10 de una "bujía/pie", la intensidad de iluminación vista a 12 pulgadas de una bujía incandescente). En regiones continentales de las zonas templadas (de alta latitud, alejadas del Ecuador) la temperatura puede variar desde más de 35°C en verano, a varios grados bajo cero en invierno. La amplitud de estos cambios hace que sean detectados por una amplia gama de organismos vivientes.

No es de extrañar, entonces, que la conducta y fisiología de la inmensa mayoría de las especies se haya adaptado y muestre periodicidades acordes con los ciclos geofísicos. La diferenciación en especies con actividad diurna, nocturna o crepuscular indica la poderosa función modeladora que la noche y el día han tenido en el proceso evolutivo. Dicha función modeladora fue ejercida también por los ciclos anuales, como lo podemos apreciar en conductas biológicas como la hibernación o la reproducción estacional.

Las variaciones rítmicas encontradas en los sistemas vivientes abarcan un amplio espectro de frecuencias (Tabla 1). Las hay de muy alta frecuencia, como el batir de las alas de un insecto (20-2000 ciclos por seg), las ondas cerebrales del electroencefalograma (1-60 ciclos por seg), la contracción del músculo cardíaco (20-1000 ciclos por min), o el ritmo respiratorio (4-250 ciclos por min).

**TABLA 1: Frecuencias de los ritmos biológicos**

	ALTA FRECUENCIA $\tau < 0.5$ h	FRECUENCIA MEDIA $0.5 < \tau < 3$ d	BAJA FRECUENCIA $\tau > 3$ d
Regiones de los ritmos	$\tau \approx 0.10$ seg  $\tau \approx 0.01$ seg etc.	Ultradiano: $0.5 \text{ h} < \tau < 20 \text{ h}$  Circadiano: $20 \text{ h} < \tau < 28 \text{ h}$ Infradiano: $\tau > 28 \text{ h}$ Circamareal: $\tau \approx 12 \text{ h}$	Circaseptano $\tau \approx 7\text{d}$  Circadiseptano $\tau \approx 14\text{d}$ Circavigintiano $\tau \approx 20\text{d}$ Circatrigintano $\tau \approx 30\text{d}$ Circanual $\tau \approx 1$ año
Ritmos en:	Electroencefalograma Electrocardiograma Respiración Peristalsis	Sueño-Vigilia Reposo-actividad Movimientos oculares Componentes en sangre, orina, etc. Temperatura Procesos metabólicos	Apareamiento Migración Menstruación

Otros ritmos biológicos presentan sólo unos pocos ciclos diarios. Ejemplos de ellos son las variaciones en actividad de los recién nacidos, en los estadios del sueño en los adultos, en el crecimiento de las plantas, o en varias funciones corporales durante la enfermedad. Períodos aún mayores (de varios días a varios años) comprenden las recurrencias de fiebre en el paludismo, o los ritmos reproductivos en los mamíferos, o los ritmos en guerras, en prosperidad económica de las sociedades humanas, o en democracias y dictaduras en Latinoamérica (¿es que será realmente éste último, un ritmo inescapable?). Estas fluctuaciones periódicas funcionales en los seres vivientes se dan en cada nivel de organización, desde el celular a la actividad del organismo como un todo, y por ende, el social.

Las variaciones biológicas rítmicas con correlatos geofísicos presentan períodos fijos y son relativamente resistentes para cambiar su frecuencia ante drogas o la temperatura. A primera vista estos ritmos biológicos parecen ser una respuesta de tipo "causa-efecto" ante las variaciones periódicas del ambiente. Pero no nos apresuremos. La estabilidad en el período de estos ritmos biológicos se debe, no a que son consecuencia directa de los cambios producidos por los ciclos geofísicos, sino a que dependen de un mecanismo endógeno, que más adelante analizaremos.

Esta capacidad temporal de los seres vivos es de máxima utilidad adaptativa, ya que les permite anticipar y explotar a su favor los momentos más adecuados del día, mes o año para su fisiología, y les sirve para sincronizar su capacidad reproductiva a las condiciones de mayor probabilidad de éxito. Se ha propuesto la denominación genérica de "homeostasis predictiva" para estas propiedades anticipatorias (143).

## 1.2 Sí, los ritmos biológicos

Los ritmos de 24 horas están presentes en casi todos los organismos vivos; una excepción la constituyen los procariontes (\*\*). Estos ritmos son consecuencia del proceso de evolución de la vida en la Tierra, el que se ha dado en la dirección de la utilización máxima de cada nicho habitable por especies capacitadas para aprovechar toda clase de nichos ecológicos.

Tal especialización está relacionada no sólo al espacio sino también con tiempo. Algunos organismos están especializados para el ambiente oscuro, frío y húmedo de la noche; otros, para la luz, altas temperaturas y clima seco del día; otros, en fin, son activos en las transiciones luminosas del alba y del crepúsculo. Es decir, el uso del ambiente es "a tiempo completo" y para su máxima eficiencia los diversos organismos se organizan en verdaderos "turnos de trabajo". R ratones, cucarachas, escorpiones, vampiros o croupiers forman parte del "turno nocturno"; diversas aves, lagartijas, mariposas, abejas o panaderos constituyen el "turno diurno". Las plantas verdes alternan entre la fotosíntesis diurna y la asimilación y crecimiento nocturnos. Algunas plantas abren sus flores por la noche y otras por la mañana, en coincidencia con el esquema de actividad de los insectos y aves que las polinizan.

El ejemplo de las plantas que abren y cierran sus flores a diversas horas del día es muy interesante y llevó a Linneo a diseñar su "reloj floral", en el que la hora se mide románticamente mediante la observación de flores que se abren o cierran a horas precisas del día. Así que, atención a los niños exploradores: una forma - bastante precisa, por cierto - de saber la hora del día será remitirse a la tabla de hora de apertura y cierre de distintas especies de flores, dependiendo de la estación y de la zona geográfica de exploración.

La actividad de 24 horas de un organismo es el resultado de múltiples procesos rítmicos bioquímicos y fisiológicos. En el hombre, por ejemplo, la alternancia diaria de sueño y vigilia se acompaña de numerosos ritmos diarios en la función neural y endocrina. Se producen variaciones diarias en la temperatura corporal, las frecuencias respiratoria y cardíaca, y en la presión y composición de la sangre, así como en prácticamente todas las demás funciones corporales.

---

(\*\*): El hecho de que se requiera una estructura de membranas organizadas, y una zona especializada en la organización genética, como el núcleo, para poseer una estructura cronobiológica, nos hace pensar en otra evidencia de que los ritmos biológicos tienen una base endógena, basada en la organización genética del individuo. De cualquier manera, en muchas especies de bacterias se encuentran ritmos "sociales" o "poblacionales", esto es, el conjunto de organismos tiende a sincronizar sus actividades.

Asimismo, y como resultado de estas variaciones, existen cambios diarios en la susceptibilidad a agentes físicos o químicos (128, 179). Las dosis de rayos X que en ciertos momentos del día producen la muerte de todos los animales en experimentación, en otros mata a algunos pocos. Dosis de venenos letales son, en ciertos horarios, de mucho menor potencia que en otros. Un ruido suficientemente intenso como para producir convulsiones en todos los ratones expuestos, es inocuo en otros horarios. La efectividad del alcohol, aspirina o insulina varía sistemáticamente con la hora del día. En los insectos, el grado de resistencia a los insecticidas o a la exposición a altas temperaturas depende de la hora del día. Aquellos lectores familiarizados con la acción de drogas encontrarán un mundo nuevo al agregar un simple "crono" a sus conocidos conceptos; aparecerán así disciplinas como la cronofarmacología, la cronotoxicología o la cronoterapia.

Otro fenómeno ambiental periódico de importancia es el de las mareas; ellas determinan, en plantas y animales marinos y en las especies terrestres que viven de ellos, ritmos mareales (165, 145). Las mareas dependen primariamente de la fuerza de atracción de la Luna, y varias especies costeras de plantas y animales presentan ritmos en fase con ellas. Varios de los organismos que viven en las regiones intermareales, como algunos caracoles y ostras, son más activos al quedar sumergidos por la marea alta. Otras especies, como aves costeras o cangrejos, están especialmente adaptadas para alimentarse durante la marea baja. Estos son ejemplos de los "turnos de trabajo" que mencionáramos más arriba.

En varios primates del viejo mundo se han registrado períodos menstruales que se inician con la luna nueva. Esta observación dio origen a la especulación acerca del vínculo entre el período del ciclo menstrual humano y el mes lunar (o "sinódico"). Existen observaciones sobre la regularización de los ciclos en mujeres por exposición a luz durante ciertas fases de ciclo. Asociados con las variaciones menstruales, existen ritmos en gran número de funciones biológicas en la mujer.

Pero no sólo del día y la noche viven los relojes biológicos. Otro período de importancia para los seres vivos es el año. En todas las regiones del globo, con excepción de la zona ecuatorial, tienen lugar cambios estacionales marcados en luz y temperatura, que se correlacionan con ritmos biológicos anuales en actividad, reproducción y crecimiento (16). La floración en zonas templadas del globo se da en los meses cálidos; en los océanos, existen ritmos anuales de abundancia de plancton; la reproducción es típicamente estacional en las diversas especies animales a fin de asegurar la sobrevivencia del recién nacido. La hibernación de ciertas especies, que cubre el período más frío del año, y la estivación de otras, que evita la sequedad extrema del

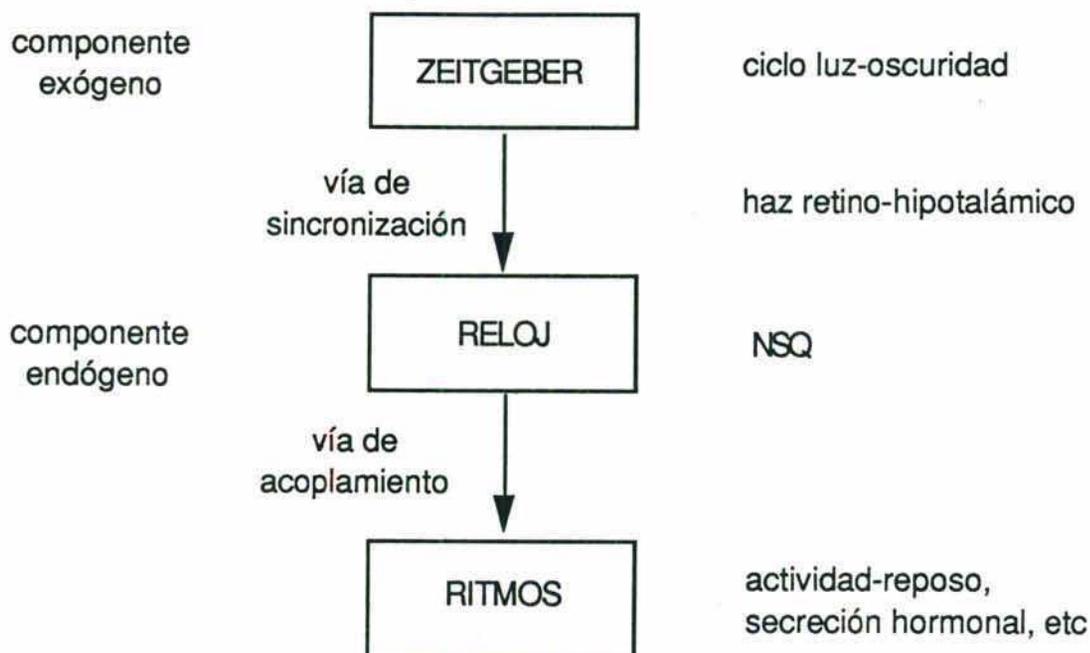
desierto, son también ejemplos de ritmos anuales. Estas variaciones anuales claramente identificables se acompañan de un sinnúmero de cambios fisiológicos y metabólicos en los seres vivos que las experimentan.

### 1.3. Relojes endógenos

Numerosos organismos, entre ellos el hombre, al aislarse de su ambiente natural y ser colocados en condiciones constantes de laboratorio, repiten el ritmo que habían experimentado antes del aislamiento, aunque con ligeras diferencias en la longitud de su período (15, 234). En la práctica puede afirmarse que todo organismo vivo funciona como si tuviera un reloj biológico endógeno. Las características especiales de este reloj sugieren que implica algún mecanismo o propiedad única de la materia viva. Una manera de conocer las propiedades del reloj es a través de la medición indirecta de los ritmos bioquímicos, fisiológicos y conductuales que regula.

Los relojes circadianos, que "miden" el día solar, o sea el período de rotación de la Tierra sobre su eje, han sido los más estudiados. Con la única excepción de las bacterias, estos relojes circadianos están presentes en todos los seres vivos. Se conocen hoy varias de las propiedades de estos relojes circadianos (16, 140, 172, 209). En primer lugar, en aislamiento de todo sincronizador ambiental, el período del ritmo cambia ligeramente, haciéndose más corto o más largo que 24 horas. Los animales diurnos como el hombre tienen un período circadiano de más de 24 horas; los animales nocturnos como el hámster presentan un período circadiano de menos de 24 horas. La rata es una excepción en que a pesar de ser un animal de actividad nocturna tiene un período de más de 24 horas (140, 209).

Claro está que para que un ritmo biológico tenga significado adaptativo, no será muy conveniente que se exprese su período endógeno de "libre curso" (esto es, en ausencia de pautas ambientales), ya que se irá desfasando continuamente de las condiciones periódicas ambientales. Lo que hacen los factores exógenos (ciclo luz-oscuridad, ciclo de temperatura, ciclo de mareas, etc.) es "poner en hora" ciclo a ciclo a los ritmos biológicos (Fig. 1).



**Figura 1:** Componentes endógeno y exógeno de los ritmos biológicos

El período de "libre curso" ("free-running") de los ritmos biológicos es sumamente estable y refractario a modificaciones por drogas o temperatura. Uno de los agentes que los modifica es el agua pesada; la melatonina, las benzodiacepinas (BZP) o el litio también producen cambios en el período del "free-running", como veremos más adelante (140, 209).

En cambio, el período circadiano sólo puede ser levemente alterado por modificaciones en la iluminación ambiental o en la temperatura. Un incremento de 10°C en la temperatura cambia el período (en general acortamiento) en no más de un 10%. Este modesto cambio contrasta con el dramático incremento de 200 a 300% en la velocidad de los procesos bioquímicos o fisiológicos normales ante un incremento de temperatura semejante. Algunas veces, los ritmos circadianos desaparecen en condiciones constantes por unos pocos períodos para recomenzar después. En otras situaciones, dichos ritmos se incrementan en amplitud en condiciones de libre curso. Los inhibidores metabólicos, como el cianuro o el enfriamiento, reducen la oscilación del reloj, pero sólo por poco tiempo, para reiniciarse al desaparecer el efecto (75).

Existe un componente genético en la organización circadiana. Distintos organismos desarrollados a partir de huevos mantenidos en condiciones de temperatura y luz constantes muestran ritmos circadianos. Plantas

seleccionadas con distintos períodos de "free-running" dan origen a generaciones de plantas de períodos cortos, largos o intermedios. Estos resultados avalan la determinación genética de la longitud del período de "free-running". Por otra parte, se han aislado y caracterizado mutantes con períodos de libre curso diferentes al normal, en organismos tales como *Drosophila* (117), hámster (*M. auratus*) (176) o *Neurospora* (72). Los estudios de genética molecular indican que existe una importante homología entre los genes afectados por las mutaciones de período (189).

La adaptación de los ritmos circadianos a nuevos horarios, como por ejemplo, luego de vuelos transmeridianos, no es inmediata. Durante los primeros días que siguen a la transferencia de abejas y cangrejos a través de varios husos horarios se mantiene la periodicidad de origen. Así, abejas entrenadas para volar en búsqueda de comida en una dirección determinada, y a una determinada hora del día, mantendrán la relación espacial de origen con la posición solar en su nueva locación, es decir, volarán, en el horario determinado, con un desvío semejante al cambio de posición solar. En el caso de los cangrejos, estos mantienen el ritmo de actividad y variación de color del lugar de origen por unos días luego del vuelo. Este cuadro de desincronización es bien conocido por los viajeros transmeridianos ("jet-lag", 232).

Hemos ya señalado que no sólo los ritmos circadianos presentan períodos propios de "free-running". En el caso de los ritmos mareales, se ha verificado que persisten en condiciones constantes de laboratorio. En la naturaleza, el período de estos ritmos es de 12 horas 25 minutos, o 24 horas 50 minutos para el ciclo doble.

Los ritmos circanales persisten en situaciones de iluminación y temperatura constantes. Esto se ha demostrado para diversas funciones fisiológicas en especies animales y vegetales. Las semillas tienen un ritmo anual en su capacidad germinativa y metabolismo. Varias aves muestran ritmos circanales precisos en la reproducción o en la alimentación, llegándose a registrar estas variaciones periódicas en laboratorio durante años (16). Como en el caso de otros ritmos, estas periodicidades son relativamente independientes de la temperatura o de la acción de drogas.

#### **1.4 Adaptatividad de los ritmos biológicos**

No sabemos nosotros, pobres mortales, si el tiempo ha sido eterno o no. Al menos, podemos afirmar, sin temer a equivocarnos, que la sucesión de días y años existe desde bastante antes que el origen de las especies. A diferencia del ambiente ecológico que ha ido cambiando notoriamente (es, justamente, la

aparición de las especies terrestres uno de los factores que desencadena los cambios en la geografía), el ambiente temporal se ha mantenido constante a lo largo de las eras.

Marcelino Cereijido (20) propone una selección evolutiva de aquel homínido que presentó una definitiva "angustia frente a lo desconocido", gracias a la cual pudo encontrar elementos que le permitieron conocer, y finalmente domesticar, a un ambiente hostil. En una tesis semejante, podríamos postular que otro elemento de selección debe haber sido la capacidad de "predicción frente a lo conocido", particularmente en el dominio del tiempo. Esta última función se vincula con los ritmos biológicos.

La conducta cíclica de células, tejidos u organismos es probablemente tan antigua como la vida misma. Es posible que las fuerzas de la evolución hayan seleccionado a aquellos organismos que presentaron una actividad sincrónica con los ciclos ambientales (5). Es decir, que si bien por mucho tiempo se pensó que las variaciones ambientales eran el factor condicionante de los ritmos biológicos, hoy es claro que estos ritmos están codificados genéticamente. En el hombre, por ejemplo, las características periódicas del ritmo cardíaco en gemelos univitelinos criados y educados en ambientes familiares separados (un experimento natural muy empleado en estudios genéticos humanos) son las mismas (16,144,234).

La sucesión de los días es posiblemente el aspecto ambiental que más modeló la cronofisiología de los organismos. Los ritmos biológicos surgen así como propiedades anticipativas regulares de los organismos. Para entender esto, podemos remontarnos al concepto que en Ecología se conoce como "nicho". El nicho ecológico de un organismo dado comprende todas las dimensiones en que éste desarrolla su vida: su hábitat, su alimentación, sus relaciones de predador y de presa, su organización social, etc. Un componente de estos nichos es la situación temporal, es decir, cuándo realiza el animal sus diversas actividades. Así, encontraremos organismos diurnos o nocturnos, o de reproducción invernal o estival, o cuya actividad responde a los ciclos de mareas, es decir, en todos los casos confinados en nichos temporales precisos.

El valor adaptativo de los ritmos biológicos es tan importante que prácticamente todos los organismos vivos, desde los unicelulares hasta el hombre, muestran ritmicidades propias. La consideración del tiempo como un factor fundamental en la evolución y modelación de los organismos vivos introduce una nueva variable, novedosa, acerca de procesos evolutivos básicos.

## 1.5 Caracterización de los ritmos biológicos

Los científicos pueden ser considerados, con cierta razón, una clase de individuos obsesivos, analíticos y clasificadores de las cosas que ven y estudian. Los cronobiólogos no escapan a esta regla (\*\*) y han tratado por todos los medios a su alcance de establecer una caracterización y clasificación adecuadas de los ritmos biológicos (los ritmos no biológicos merecen otros estudios, y posiblemente otros libros, aunque es pertinente preguntarse hasta qué punto son "no biológicos" un tango, un merengue o el rock 'n roll). Cualquier evento "recurrente", ya sea el ciclo celular, la siesta o alguna secreción hormonal, que ocurra con una cierta periodicidad, puede ser considerado un ritmo biológico.

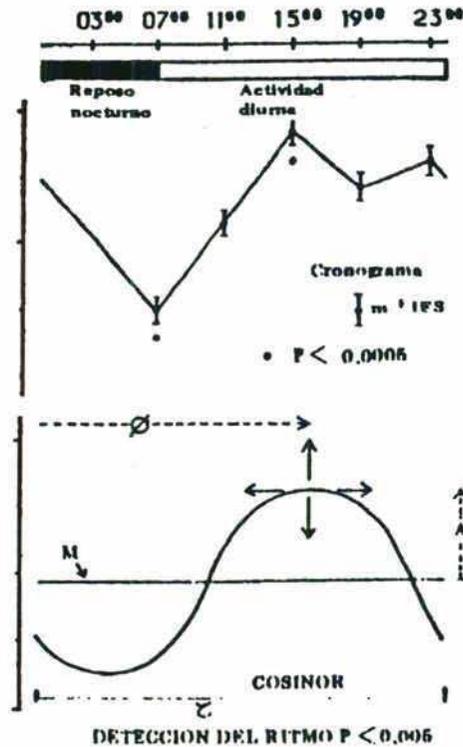
Analicemos cuáles son los componentes característicos de una función rítmica (98). Para ello nos basaremos en una simplificación geométrica, representando a nuestro "ritmo biológico tipo" por una función cosenoidal (Fig. 2). Inmediatamente son aparentes dos componentes fundamentales de la función: su amplitud - la fluctuación entre valores máximos y mínimos, medida en las unidades que correspondan a la variable: grados, gramos, índices de estado de ánimo, etc. -, y el período, o sea el tiempo transcurrido desde que la función atraviesa un valor determinado de su amplitud hasta que vuelve al mismo valor. El período se representa por la letra griega tau ( $\tau$ ).

Muchas veces es más cómodo hablar de frecuencias en lugar de períodos, o sea del número de ciclos que ocurren por unidad de tiempo. Claro está, la frecuencia no es otra cosa que la inversa del período. Por ejemplo, si entre la aparición de un evento y el momento en que dicho evento se repite transcurren 30 minutos, y la unidad de tiempo es la hora, entonces en la unidad de tiempo ocurrirán dos ciclos completos. Por lo general, la frecuencia se utiliza para caracterizar ritmos más bien rápidos (como el del electroencefa-

---

(\*\*): nos referimos a que no escapan a la regla de ser clasificadores exhaustivos. Algunos lectores suspicaces tal vez se preguntarán si no escapan a la regla de ser "científicos", ya que la joven Cronobiología no goza aún de buena prensa, en un universo plagado de biorritmos, "manosantas", "dietas de la luna" y otras pseudocronobiologías. Baste destacar que el único libro "serio" sobre el tema en idioma español - una vieja y útil traducción de 'Les rythmes biologiques' de Reinberg - no será encontrado en las librerías en los anaqueles de ciencia, medicina o biología. Por el contrario, el lector curioso deberá procurarse su ejemplar revolviendo entre libros de biorritmos, dietas y astrología (sin querer desmerecer estos brillantes aportes de la ciencia moderna).

lograma o el del electrocardiograma). Cuando la frecuencia se mide en ciclos por segundo se utiliza la unidad "hertz": un ritmo de 3.2 Hz es aquel en el que se dan 3.2 períodos de la variable rítmica por segundo.



**Figura 2:** una función cosenoidal representando un ritmo biológico. M: mesor, A: amplitud,  $\tau$ : período,  $\phi$ : acrofase.

La amplitud, si bien de enorme importancia para la fisiología clásica, es demasiado variable como para ser considerada un marcador útil de los ritmos. Supongamos que estamos considerando la fluctuación de la glucemia en un grupo de voluntarios sanos a lo largo del día. Más allá de la existencia de un presunto componente endógeno de esta fluctuación (hoy discutido), la cantidad de azúcar reflejará fielmente la ingesta de alimentos realizada a intervalos determinados durante el día. Claro que siempre pueden estandarizarse las condiciones de las mediciones (por ejemplo, toma de muestras en ayunas, o luego de una comida tipo), pero aún así la amplitud presenta una incómoda dispersión interindividual que invalida en gran parte su utilidad.

Para aclarar más este concepto, es interesante que el lector reflexione por un instante sobre lo que resulta lo fundamental en un reloj de pie: ¿la intensidad de sus campanadas o que éstas suenen a intervalos fijos?. Sin duda, preferirá su precisión (período), más que el volumen de las

campanadas. Sin embargo, la amplitud no deja de tener cierta importancia cronobiológica en algunos problemas concretos, como la adaptación a turnos de trabajo rotativos o el debilitamiento de algunos ritmos con la edad.

A esta altura, y ya satisfechos con nuestros períodos y amplitudes bajo el brazo, podemos salir por el mundo a diferenciar y clasificar ritmos biológicos. Sin embargo, existe otro componente fundamental de los ritmos biológicos, no mencionado hasta ahora: su fase. La fase describe en qué momento de la escala temporal está ubicado el ritmo biológico en estudio; a qué hora ocurre el pico diario de temperatura, o en qué estación del año se aparea una determinada especie. En general, la fase está relacionada con otra función periódica de referencia, la cual puede ser externa (hora del día) o bien interna (otro ritmo biológico). Para caracterizar la fase, lo más usual es ubicar el momento del máximo de la variable en estudio, y a este tiempo se lo denomina "acrofase".

Los ritmos biológicos se clasifican por su período. Así, las funciones rítmicas se extienden a través de varios órdenes de frecuencia, desde un ciclo por milisegundo hasta un ciclo cada varios años. Un resumen de esta clasificación fue mostrado en la tabla 1. Hemos ya señalado que los ciclos que más atención han recibido, debido a su creciente importancia biomédica, son aquéllos cuyo período fluctúa alrededor de 24 horas (llamados "circadianos").

Se definen como circadianos a los ritmos de período de 20-22 horas como límite inferior, y de 26-28 horas como límite superior. Los ritmos de periodicidades más rápidas son llamados ultradianos, mientras que los de menor frecuencia se denominan infradianos. Se denomina "mapa de fases" a la descripción de las acrofases sucesivas de los distintos ritmos circadianos en un individuo. Estos valores pico ocurren en una característica secuencia durante el día. El mapa de fases revela las relaciones de orden y temporales de causa-efecto en la interacción normal entre los distintos procesos fisiológicos. Los mapas de fase se modifican transitoriamente en los viajes transmeridianos o en los turnos rotatorios de trabajo, no dándose la resincronización de los distintos ritmos a la misma velocidad. Tal disociación es la causa de la fatiga y bajo rendimiento detectados en esas situaciones.

## 1.6 Los circarritmos

Hemos visto que los ritmos biológicos responden a verdaderos "relojes" internos con un período endógeno codificado genéticamente. Ese período es sincronizado por factores ambientales o "exógenos". Para poder expresar el componente endógeno del ritmo, debemos mantener al organismo alejado de toda influencia ambiental que pueda sincronizar o "dar la hora" al ritmo en

estudio. En ausencia de patrones ambientales, se dice que los ritmos están en "libre curso" ("free-running"), y se ha comprobado que los períodos endógenos que expresan son en general cercanos a los de las variables externas que los sincronizan. Dado que el período del ritmo de libre curso se aproxima al de la variable ambiental que está reflejando, el prefijo "circa" fue introducido por Franz Halberg para caracterizar a los ritmos que en la Naturaleza son de periodicidad diaria, pero que en el laboratorio, y en condiciones constantes, pueden aparecer como "circadianos".

El uso del mismo prefijo "circa" fue extendido por Jurgen Aschoff (16), adoptándolo para otras periodicidades como las de los ritmos "circamareales", "circalunares" y "circanuales". Para que un ritmo biológico corresponda a alguna de estas categorías, no sólo debe demostrarse que el período es el adecuado, sino que la oscilación es endógena y autosostenida, es decir, permanece en condiciones de constancia ambiental.

Por supuesto, en la Naturaleza ritmos de diversas frecuencias interactúan estrechamente entre sí para dar un estado fisiológico de funcionamiento óptimo.

### **1.7 Cronofisiología**

Muchos procesos bioquímicos, fisiológicos y conductuales fluctúan rítmicamente con una periodicidad diurna o anual en condiciones naturales. Estos ritmos biológicos están bajo el control de "relojes biológicos" presentes en el SNC (56, 128, 180, 215).

En los mamíferos, el reloj circadiano involucrado en la generación de muchos ritmos diarios está constituido por los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) del hipotálamo (142, 201, 203). Para demostrar que los NSQ representan verdaderos relojes se transitó por una verdadera odisea cronobiológica, marcada por los hitos siguientes (116):

i- la lesión de los NSQ elimina la ritmicidad de diversos parámetros (ritmo actividad-reposo, ingesta de líquidos, secreción de determinadas hormonas, etc.);

ii- los NSQ mantienen ritmicidad "in vitro", tanto de parámetros bioeléctricos como neuroquímicos;

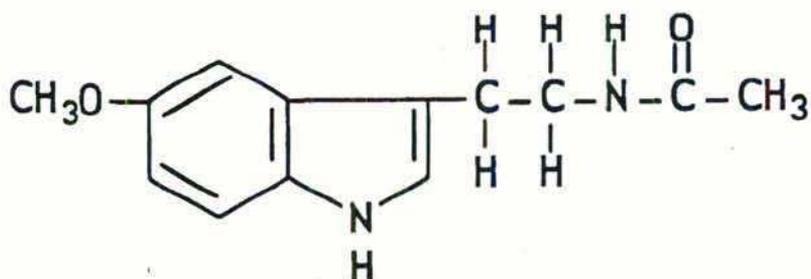
iii- el transplante de NSQ fetales a animales con los núcleos lesionados restaura la ritmicidad perdida;

iv- en el caso de mutaciones que modifican el período circadiano, los transplantes de NSQ mantienen en los huéspedes el período original.

Debe mencionarse también el hecho de que recientemente se han descrito oscilaciones circadianas independientes del NSQ en la rata, aunque todavía no están muy bien comprendidas (100).

Para numerosas especies, el ciclo luz-oscuridad es la señal primaria ambiental que sincroniza y reajusta el reloj circadiano a un período de exactamente 24 h (44). Fue una coincidencia afortunada que Moore (142) describiera una vía que, a partir de la retina, proyecta directamente a los NSQ. Lógicamente este "haz aberrante" (porque no cumplía las funciones de un nervio óptico que se precie de tal) fue llamado "haz retinohipotalámico", y es de fundamental importancia en el acoplamiento del sincronizador ambiental (ciclo luz-oscuridad) y el reloj (NSQ). Nuevamente, nos vemos obligados a citar a uno de nuestros mentores, Julio Cortázar, quien, precediendo a todos estos tecnicismos profetizó *"El tiempo entra por los ojos. Eso lo sabe cualquiera"*.

Parece claro que estos fenómenos deben evidenciarse en diversas funciones orgánicas. La medición de la longitud de las horas de luz y oscuridad (fotoperiodicidad) es fundamental para una adecuada funcionalidad estacional, y también para la regulación de los ritmos diarios. La longitud de la noche es evaluada a partir de una señal circulante, la hormona pineal melatonina (N-acetil 5-metoxitriptamina) (Fig. 3) (9,13,23,27,36,92,170,181,182,227,210). Esta es la base tanto de un reloj como de un "calendario" biológico, este último participante en los cambios estacionales en la función de diversos órganos y aparatos, como p. ej., la reproducción (110). Debe notarse que ambos ritmos geofísicos, el día y el año, tienen la regularidad necesaria como para ser usados como señal en las respuestas correctivas que se inician en anticipación a un estímulo temporalmente predecible.



**Figura 3:** Fórmula de la melatonina.

Tal función predictiva del sistema circadiano es preponderante, y confiere ventaja adaptativa al organismo pues activa respuestas efectoras con la antelación suficiente como para que sean adaptativamente adecuadas

nocturnas, diurnas o crepusculares de acuerdo al momento en que muestran su actividad, indica la poderosa fuerza modeladora que la noche y el día han tenido en el proceso de la evolución. Igualmente, el desarrollo de conductas estacionales como la hibernación o la actividad reproductiva, subraya la importancia de los ritmos anuales en la función biológica (56,170,184).

### 1.8 La glándula pineal

La pineal es uno de esos misterios que nos pusieron encima de la cabeza (literalmente). Para Descartes, autor de bellas especulaciones sobre la pineal humana, a la que visionariamente relacionó con los ojos, era nada menos que la sede del alma (Fig. 4).

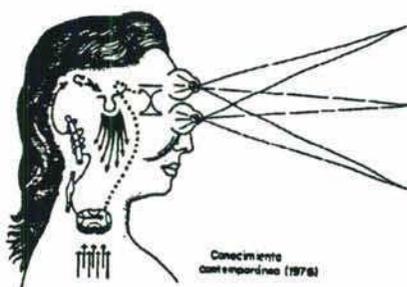
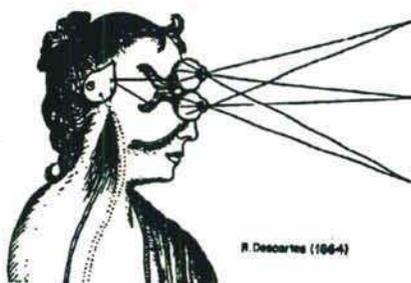


Figura 4: La pineal cartesiana y su versión actual.

Es necesario destacar (para mantener el rigor científico del presente trabajo de tesis), que la propuesta cartesiana de la relación pineal-alma no ha sido aún afirmada ni refutada. Esta idea fue también tomada por el escritor argentino Bioy Casares en su novela "*Dormir al sol*" (1973), en la que podemos leer el siguiente diálogo:

"- ¿Recuerda lo que decía Descartes? ¿No? Cómo se va a acordar si nunca lo ha leído. Descartes pensaba que el alma estaba en una glándula del cerebro.

Dijo un nombre que sonó como 'pinerál' o 'mineral'. Pregunté:

- ¿El alma de mi señora?"

Los hindúes han situado en la pineal humana a uno de sus chakrams, o centros de energía. Para beneplácito de este trabajo de tesis, el "ajna-chakram", donde esta situada nuestra heroína neuroendocrina, representaría al importantísimo "tercer ojo". Otra idea acerca de la pineal la da el escandaloso Henry Miller, quien de paseo por el *Trópico de Capricornio* nos enseña que la música tonifica el alma, y es percibida a través de la glándula pineal.

En el siglo XIX, tal vez con mayor criterio que el demostrado por el presente tesista, la pineal llegó a ser considerada "incomprensible", y, peor aún, "insignificante".

Pero ahora vayamos a la etapa científico-canónica. El estudio de la glándula pineal, en apenas unas décadas, ha pasado de una etapa en la que evocaba escepticismo y perplejidad, a adquirir no sólo respetabilidad científica sino también gran interés biológico y médico. Numerosas investigaciones recientes han redefinido la función pineal, a través del reconocimiento de la importancia de los ritmos circadianos en la fisiología de todas las especies incluyendo el hombre, así como la posibilidad de nuevas perspectivas en la terapéutica de ciertos trastornos cronobiológicos, que incluyen algunos tipos de depresión y disturbios del sueño, "jet-lag", posible control de cánceres hormono-dependientes, y en la ganadería, para el mejoramiento del ganado ovino y equino. Si hemos de ser sinceros, debe afirmarse que, como con cualquier entidad (glándula, núcleo, sustancia) de la que desconocemos su función, la pineal y su hija dilecta, la melatonina, han sido propuestas como participantes en casi todo proceso fisiológico de relevancia (9,27,92,170,181-183).

La glándula pineal (o epítesis cerebral) pertenece al grupo de los órganos circunventriculares, que derivan de células ependimarias y se encuentran situados fuera de la barrera hematoencefálica y en comunicación con el sistema ventricular (227) (Fig. 5).

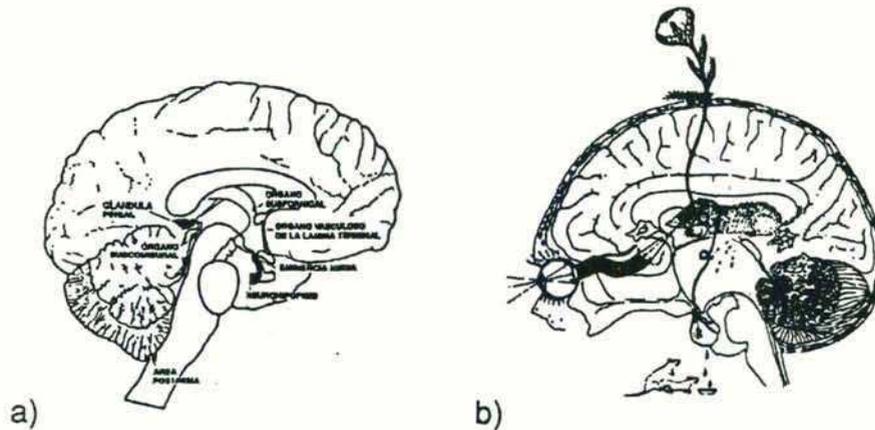


Figura 5: Dos versiones de la ubicación de la pineal.

La pineal se origina a partir de una evaginación neuroepitelial del techo del diencefalo, que en el hombre es evidente durante el 2º mes de vida intrauterina. En el hombre adulto pesa alrededor de 100 a 200 mg y está ubicada en el borde posterior e inferior del cuerpo calloso, entre ambos tubérculos cuadrigéminos superiores y en proximidad anatómica con el tercer ventrículo. Se halla encapsulada por la piamadre, desde la cual le llegan vasos, fibras nerviosas amielínicas y estroma conjuntivo (227). El flujo sanguíneo pineal sigue en importancia al flujo renal, lo que de por sí constituye una prueba en contrario de la naturaleza vestigial con que se ha rotulado a la epífisis durante años. El origen de tal teoría fue seguramente el hallazgo de calcificaciones en el tejido, observadas ya en algunos casos durante el desarrollo intrauterino; sin embargo, se sabe que estas concreciones calcáreas no tienen implicancias en la funcionalidad glandular (228,229).

El órgano pineal se caracteriza por una gran variabilidad a través de la escala zoológica. En peces y anfibios contiene células fotorreceptoras semejantes a las retinianas. En mamíferos es típicamente endocrina, careciendo de fotorreceptores desarrollados. Existen suficientes evidencias experimentales como para suponer que los pinealocitos endocrinos de los vertebrados superiores resultan de la evolución filogenética de células fotorreceptoras presentes en las formas más primitivas (163,227-229).

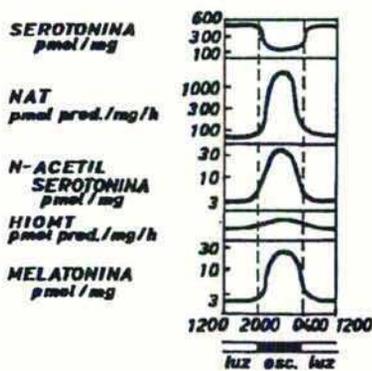
Si bien no es del todo conocida su función en una cantidad de procesos fisiológicos, podemos afirmar que la glándula pineal es el principal mediador de la respuesta fisiológica ante los ritmos anuales y un potente modulador de los ritmos circadianos. La pineal es la principal interfase entre el medio ambiente luminoso y el SNC y endocrino; su función primaria es la secreción

de melatonina, una señal producida en función del estado de iluminación ambiental (7, 27, 35, 69, 92, 110, 170, 181, 182, 215, 237).

La síntesis de melatonina se inicia con la captación de triptófano por los pinealocitos, parte del cual es utilizado para la producción de proteínas, mientras que una fracción cuantitativamente mayor es convertida a indolaminas. Los niveles de triptófano son máximos cerca del final del período de luz y disminuyen durante el período de oscuridad. El triptófano es convertido en 5-hidroxitriptófano y serotonina (5-HT), por la acción sucesiva de las enzimas triptófano hidroxilasa y descarboxilasa de aminoácidos aromáticos. Las concentraciones de 5-HT pineal son las más elevadas del organismo y son precursoras de compuestos biológicamente activos como la melatonina (9,27,34,37,43,45,74,115,227).

La vía endocrina específica y prioritaria del metabolismo de 5-HT intrapineal es su conversión a melatonina, la cual comprende dos reacciones enzimáticas. En primer término, la 5-HT es acetilada a N-acetilserotonina por la acción de la enzima serotonina-N-acetiltransferasa (NAT), paso limitante en la biosíntesis de melatonina. A continuación, otra enzima, la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT), transfiere el grupo metilo donado por la S-adenosilmetionina a la posición 5-hidroxi de la N-acetilserotonina, dando como resultado la formación de melatonina (45).

Un hecho remarcable en la bioquímica pineal es la capacidad de las enzimas NAT y HIOMT para responder rápidamente a cambios en luz ambiental con actividades altas en la oscuridad y bajas durante el día, en todas las especies, incluida la humana (9,115). Esta particularidad tiene un corolario obvio: los ciclos normales de luz y oscuridad, generan un ritmo paralelo en la producción de melatonina, el que provee al organismo de una señal circulante indicativa de la longitud del fotoperíodo (27) (Fig. 6).



**Figura 6:** Ritmos diarios en la producción de melatonina y precursores en la glándula pineal de la rata.

La síntesis de melatonina no es exclusiva de la glándula pineal; también está presente en retina, glándula harderiana, intestino y glándulas lacrimales (45). Sin embargo, la pinealectomía (Px) en mamíferos, así como también en pacientes con pinealomas, resulta en niveles plasmáticos indetectables de melatonina; esto ha llevado al concepto de que la producción extrapineal de la hormona tiene una acción exclusivamente local (9,23,27,115,181,227).

La hormona melatonina se secreta por un mecanismo de difusión simple primariamente hacia la sangre, penetrando en diversos humores corporales, como el líquido amniótico y líquido cefalorraquídeo (27). La melatonina no se almacena, de tal forma que la variación diaria en la biosíntesis o contenido tisular del metoxindol es un indicador de la secreción glandular. La concentración intrapineal de melatonina en humanos varía entre los valores diurnos y nocturnos de 50 a 40 000 ng/g respectivamente (9). La melatonina circula en plasma unida en un 80% a la albúmina y el resto en forma libre (32), presentando un ritmo circadiano, con valores máximos nocturnos que oscilan entre 100 y 200 pg/ml en humanos (9,80,233). El pico de secreción se halla entre las 2 y las 6 de la mañana, sin relación con la fase de sueño. La amplitud del pico secretorio está influida por diferentes factores (9):

i-la edad: las diferencias mañana-noche en la concentración de melatonina plasmática son entre 3 a 5 veces mayores en los niños y menores en los ancianos, en comparación con lo hallado en los adultos.

ii-la estación del año: en verano, el comienzo de la secreción de la hormona, por lo general se adelanta una hora y en invierno se retrasa.

iii-el ciclo menstrual: en la fase preovulatoria está descrito una disminución de la secreción (9).

iv-estilos de vida, tipos de trabajo, que condicionan diferentes tiempos de exposición al sol.

v-drogas que disminuyen la amplitud del pico nocturno de melatonina, tales como bloqueantes  $\alpha$  adrenérgicos y BZP; drogas que lo incrementan: antidepressivos tricíclicos, neurolépticos como clorpromazina, inhibidores de la MAO.

vi-efecto de la luz: la luz brillante artificial de una intensidad aproximada de 2500 lux (similar a la hallada en el mediodía de un día de verano), anula el pico nocturno dentro de los 10 a 20 min de la exposición, retornando la melatonina a su valor dentro de los 40 min de nueva oscuridad. La misma intensidad lumínica aplicada por la mañana adelanta el pico secretorio, y por

la tarde, en las últimas horas de luz, lo retrasa. Está demostrado que la luz fluorescente presente en hogares y lugares de trabajo, con una intensidad promedio de 200-400 lux, no suprime la secreción de la hormona.

vii- estrés: diferentes tipos de estrés inducidos en animales, tales como cirugía, hipoglucemia e inmovilización, aumentan el contenido pineal y/o la secreción de melatonina; el ejercicio en el hombre puede incrementar la secreción.

La melatonina se metaboliza periféricamente en el hígado en un 90% a través de la hidroxilación en posición 6, para formar un compuesto considerado inactivo, la 6-hidroximelatonina (6-OH-melatonina), que luego se conjuga con ácido sulfúrico (70-80%) o glucurónico (5-30%), formas de excreción fundamentales en orina y heces (Fig. 7) (9,23,80,99,118,130). La melatonina remanente (1%), permanece inalterada o como el metabolito no indólico N-acetil-5-metoxiquinurenamina (15%). La 6-OH-melatonina plasmática, así como su principal producto urinario, la 6-sulfatximelatonina, guardan una buena correlación con los niveles plasmáticos de melatonina y son representativos de la producción diaria de la hormona y de la magnitud del pico nocturno de la hormona (80). En el SNC, la metabolización de la melatonina implica la ruptura del anillo indólico, con formación de N-formil-5-metoxiquinurenamina y N-acetil-5-metoxiquinurenamina, compuestos de comprobada acción biológica (99).

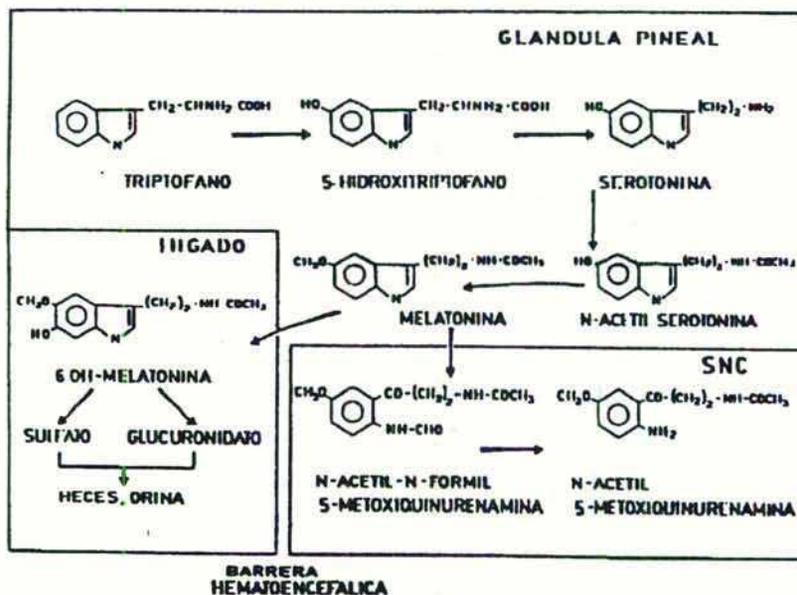


Figura 7: Biosíntesis y metabolismo de la melatonina.

La investigación clínica orientada a elucidar la naturaleza y función de la glándula pineal ha tropezado con una serie de dificultades derivadas de su particular funcionamiento (46). En primer lugar, la carencia hasta hace poco tiempo de métodos reproducibles para la estimación de las hormonas pineales en plasma, necesaria teniendo en cuenta que sus niveles diurnos son prácticamente indetectables ( $<$  de 20 pg/ml) y los nocturnos apenas superan en un orden de magnitud esta cantidad. La melatonina puede determinarse por cromatografía gaseosa y por radioinmunoanálisis en sangre, saliva y orina (39, 23). En segundo lugar, la hormona muestra un ritmo circadiano con máxima secreción nocturna, lo que hace dificultosa la obtención de las muestras. Por otra parte, este ritmo circadiano es poco susceptible de ser modificado agudamente por variaciones humorales o drogas, por lo cual se carece de pruebas de estimulación o inhibición de melatonina de utilidad clínica (9).

Si bien la secreción de la hormona es reproducible día a día en un mismo individuo, existe un amplio rango de dispersión interindividual (9). Asimismo, debe destacarse que, aunque los niveles circulantes de una hormona son una indicación de su actividad biológica, en numerosas ocasiones un cambio de sensibilidad del tejido efector (p.ej., descenso o aumento en el número de receptores específicos, 27,36,121,182,218,240) condiciona modificaciones en la actividad hormonal sin cambios en los niveles circulantes de la hormona. Por todo lo señalado se hace difícil el obtener conclusiones de los estudios clínicos que tratan de analizar el papel de la glándula pineal en diferentes situaciones, a través de la mera determinación de la concentración plasmática o urinaria de la hormona o de sus metabolitos. En una serie de trabajos recientes de nuestro laboratorio se ha validado la aplicación de las plaquetas como marcadores periféricos de la actividad hormonal de la melatonina (64,65).

La actividad biosintética y secretoria de la glándula pineal responde primariamente a estímulos lumínicos (regulación de tipo neural) y secundariamente a estímulos hormonales provenientes de los tejidos periféricos (regulación de tipo hormonal) (27,28,34,37,40,41,227). Existe una evolución filogenética en la respuesta pineal a la luz (45,163). En los vertebrados inferiores la glándula pineal es un fotorreceptor, semejante al ojo humano, que traduce un estímulo externo (luz) en un impulso nervioso. En las aves, la glándula pineal es un transductor fotoendocrino, ya que responde en forma directa a los cambios de luz, modificando la tasa de secreción hormonal. En los mamíferos es considerada un órgano endocrino con propiedades de transductor neuroendocrino, ya que la información fótica, canalizada a través de una señal de la vía simpática, la norepinefrina (NE), arriba a la glándula pineal dando lugar a una secreción hormonal, la melatonina.

En los mamíferos, la información luminosa ambiental es captada por los fotorreceptores retinianos y se transmite al hipotálamo anterior (NSQ) por el camino monosináptico que más arriba mencionáramos, el haz retinohipotálamico (142). Desde la vía óptica principal (cuerpo geniculado lateral) existen también proyecciones hacia el NSQ. Desde estos pequeños núcleos hipotalámicos un segundo grupo de fibras viaja hacia la región hipotalámica periventricular y tuberal media, y luego al hipotálamo lateral, cuyas neuronas finalmente proyectan a la columna intermediolateral de la médula espinal (115,142). Allí se originan las conexiones preganglionares que llegan a los ganglios cervicales superiores (GCS), para finalmente arribar a la glándula pineal a través de las fibras postganglionares noradrenérgicas. La exposición de un animal a la luz mantiene inhibida la actividad eléctrica de las neuronas ganglionares, mientras que la interrupción del estímulo lumínico produce una inmediata activación neuronal (27).

La NE liberada por las fibras simpáticas postganglionares interactúa con receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, lo cual conlleva a una serie de eventos metabólicos: aumentos del potencial de membrana, incremento de la actividad de la adenilato ciclasa y de los niveles de AMP cíclico (AMPc), síntesis de ARN y proteínas, y activación de enzimas involucradas en la síntesis hormonal, tales como NAT y HIOMT (37,45,115). El número de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos aumenta durante la segunda mitad de la fase de luz, y con la estimulación adrenérgica iniciada en la fase de oscuridad se produce una disminución de receptores  $\alpha_1$ , "down-regulation", en el transcurso de la noche.

El esquema sobresimplificado de regulación pineal (NE  $\rightarrow$  receptores adrenérgicos  $\alpha_1$   $\rightarrow$  aumento de AMPc  $\rightarrow$  síntesis y liberación de melatonina) ha sido reemplazado recientemente por un modelo más complejo, "multi-señal", del control de la secreción de melatonina (34,37). Esta evolución conceptual se basa en distintos hallazgos.

En primer término, se ha descrito la presencia de receptores  $\beta_1$  postsinápticos, los cuales potencian el efecto  $\alpha_1$ , a través de una serie de eventos que incluyen: activación de fosfolipasa C, movilización de calcio citosólico, activación de proteína-quinasa C y fosfolipasa A2, producción y liberación de prostaglandinas (PG), tromboxanos y leucotrienos (34,37, 74,206).

En segundo término, existen investigaciones neuroanatómicas y electrofisiológicas que avalan la existencia de una inervación central que contribuye al control secretorio de la glándula. Esto se correlaciona con el hallazgo de varias poblaciones de terminales nerviosas en la pineal, además

de las clásicas catecolaminérgicas. Se trata de terminales que contienen vesículas grandes, que corresponden a fibras peptidérgicas y otras con vesículas pequeñas, que podrían corresponder a terminales colinérgicas y/o aminoacidérgicas (228,229). Se han identificado también numerosos sitios aceptores para neurotransmisores o neuromoduladores en la glándula pineal de mamíferos, entre ellos "binding" de glutamato, receptores para GABA tipo A y B, BZP (centrales y periféricos), 5-HT (S2), acetilcolina (muscarínicos), sustancia P, polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), dopaminérgicos, neuropéptido Y (NPY), opioides y diversas hormonas (28,40,41,55,74).

En tercer término, existen evidencias claras acerca de un control paracrino de la actividad pineal. Un caso recientemente identificado en nuestro laboratorio es el del sistema GABAérgico, que cumple con una serie de requisitos para ser considerado una señal paracrina (193). El GABA pineal: a)-es sintetizado por una subpoblación de pinealocitos; b)-es liberado por estímulos fisiológicos que arriban a la glándula; c)-los receptores para GABA tipo A y B caracterizados farmacológicamente, producen respectivamente inhibición de la liberación de melatonina inducida por NE (efecto postsináptico) y de la liberación de NE de las terminaciones nerviosas (efecto presináptico) (34,192,194,196).

### 1.9 Receptores de melatonina

La melatonina ejerce sus efectos a través de la interacción con receptores específicos. Los receptores cerebrales para melatonina fueron identificados en nuestro laboratorio en 1979 mediante el empleo de [<sup>3</sup>H]-melatonina como ligando en membranas de hipotálamo bovino, corteza cerebral y cerebelo (38). La coexistencia de los sitios de unión de [<sup>3</sup>H]-melatonina en citosol y membrana fue posteriormente descrita en diferentes zonas del cerebro (124,153, 159). Estudios de afinidad con distintos análogos de la melatonina indicaron que los grupos 5-metoxi y N-acetilo son necesarios para dicha unión. La constante de disociación (Kd) de los sitios descritos con [<sup>3</sup>H]-melatonina como ligando es del orden de  $10^{-8}$  - $10^{-9}$  M.

Con la introducción del compuesto [2-<sup>125</sup>I]-melatonina como marcador de sitios de unión para la melatonina (222) se identificaron, por métodos bioquímicos y autorradiográficos, una población de sitios receptores con un Kd subnanomolar en NSQ, pars tuberalis, área postrema, y en retina de pollo y cerebro de hámster (68,70-72,121,125,146,158,184, 185,202,239, 240). Los estudios de competición realizados para los sitios reconocidos por [2-<sup>125</sup>I]-melatonina en cerebro de hámster y retina de pollo, revelaron que melatonina, 2-iodomelatonina, 6-cloro-melatonina y 6-metoximelatonina presentan una

afinidad similar para el binding, mientras que 6-OH-melatonina fue 60 veces menos potente. Mediante el uso de la [2-<sup>125</sup>I]-melatonina se demostró también la existencia de los sitios receptores de baja afinidad (Kd nanomolar) revelables por melatonina tritiada (72,158,202,238). Como conclusión de estos estudios fue propuesta la clasificación de los sitios de unión para la melatonina resumida en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Tipos de receptor, localización, especificidad y señales intracelulares para la melatonina en el SNC.

tipo	localización	especificidad	mecanismo intracel.
ML-1 Kd= 0.1 nM Bmax= 8-10 fmol/mg prot	n.supraquiasmá- tico, pars tube- ralis, retina	melatonina> 6-OH-melatonina>> N-acetilserotonina	proteína G (Gi, Go) inhibición de adenilato ciclasa
ML-2 Kd= 1-10 nM Bmax= 20-100 fmol/mg prot	hipotálamo, cort.cerebral, cerebelo, hipocampo	melatonina> N-acetilserotonina>> 6-OH-melatonina> 5-HT	Ca <sup>2+</sup> , GMPc, AMPc, prostaglandinas
ML-3 Kd= 100 nM Bmax=190-360 fmol/mg prot	glándula pineal	melatonina>> N-acetilserotonina, 5-HT>> 6-OH-melatonina	?

Se muestran los valores de las constantes de disociación (Kd) y concentración máxima de sitios de unión (Bmax) para cada uno de los subtipos de receptor de melatonina descritos.

Los ML1 son máximos durante las horas de la mañana (131) y se los involucra en el efecto inhibitorio de la melatonina sobre la liberación de dopamina en retina de pollo y conejo (68,69). Los sitios de "binding" nanomolar (ML2) muestran diferencias circadianas en su número, con un máximo en las últimas horas de luz, momento de mayor sensibilidad neuroendocrina demostrada para la melatonina (218,240). La supresión de la ritmicidad en los niveles de melatonina por Px, desnervación pineal o exposición a la luz continua, elimina las diferencias mañana-tarde en el número de receptores ML2 en SNC (36). Un ejemplo de correlación entre

"binding" al receptor ML2 y actividad biológica lo brindan los experimentos en ratas desnutridas, donde la deprivación proteica se acompaña de incrementos significativos en el número de sitios de unión de [<sup>3</sup>H]-melatonina en membrana de cerebro, así como de una mayor sensibilidad del sistema reproductivo tanto a la melatonina endógena como exógena (29). A pesar de la aceptación que ha tenido la posible naturaleza heterogénea de los sitios de unión cerebrales para melatonina, un punto a resolver aún, es determinar si las afinidades diferentes encontradas en el "binding" reflejan la regulación de un solo tipo de receptor o representan distintos sitios de unión (35).

Si bien los sitios receptores con un Kd picomolar son claramente compatibles con los niveles circulantes de la melatonina, es importante aclarar que las concentraciones de la hormona alcanzadas en los sitios receptores en SNC bajo condiciones fisiológicas y farmacológicas son mucho mayores (52,166). En nuestro laboratorio se ha determinado recientemente la concentración de melatonina por cromatografía líquida de alta presión en hipotálamo mediobasal (HMB) y glándula pineal de rata en intervalos de cuatro horas a lo largo de un día. Los niveles detectados en HMB fueron aproximadamente de 10 pg/mg de tejido a las 2400-0400 h, valores cinco veces más altos que los hallados durante el día; en ambas fases del ciclo diario los niveles hallados se encuentran dentro del rango nanomolar, unas 50 veces por encima de las concentraciones circulantes de melatonina, lo cual indica que la hormona es concentrada en el hipotálamo (35).

En cuanto a los eventos post-receptor, la primera indicación sobre la participación de los nucleótidos cíclicos se obtuvo al observar una disminución en el contenido de AMPc inducido por la MSH por efecto de melatonina en la piel de los anfibios (1). La Px incrementa y la administración de melatonina o su agregado in vitro ( $10^{-8}$  M) disminuye, la síntesis de AMPc en HMB de rata (147,220). También se ha demostrado en células gliales de rata un efecto inhibitorio a concentraciones nanomolares de la hormona sobre el incremento en la síntesis de AMPc inducido por la estimulación del receptor adrenérgico a (217).

Estudios de las señales de transducción de la hormona en cerebro de lagartija y hámster y en la piel de los anfibios han revelado que la melatonina inhibe, a una concentración nanomolar, la estimulación de la producción de AMPc inducida por forskolina, proceso que puede ser bloqueado por la incubación previa con toxina pertussis (47,146,154,184,186,235). Estos resultados sugieren que los receptores para melatonina están acoplados a proteínas Gi o Go inhibitorias de la adenilato ciclasa a través de la cual producen los cambios en AMPc.

La melatonina modifica también los niveles de otro nucleótido, el GMP cíclico (GMPc). La inyección de 1 mg de melatonina en la cisterna magna de conejos, incrementa la concentración de GMPc en el LCR (198). Posteriormente se observó que la hormona ( $10^{-8}$  M), es capaz de aumentar la acumulación de GMPc en HMB de rata (220).

Basándonos en similitudes estructurales entre la melatonina y la indometacina, se ha propuesto que la melatonina puede deprimir la síntesis de PG a nivel de las células efectoras (33). Ambas compuestos tienen propiedades antigénicas comunes (como haptenos) e inhiben el incremento de la hormona luteinizante (LH) post-castración o el inducido por esteroides, efecto vinculado a la producción de PG. En explantos de HMB de rata, la melatonina en concentraciones nanomolares inhibe la liberación de PGE2 (28). Estudios "in vivo" indicaron que la inyección intracisternal del metoxindol en el LCR de la coneja previene tanto la ovulación como el incremento de PGE2 en el LCR, que sigue a la estimulación del cuello del útero (126), y que la administración de la melatonina en ratas Px disminuye la liberación de PGE2 del HMB (133). Estos efectos fueron atribuidos a la acción inhibitoria de melatonina sobre la actividad de la ciclooxigenasa, demostrada directamente (112) o indirectamente en los estudios de conversión de [ $^{14}$ C]-araquidonato a derivados de la ciclooxigenasa en HMB de rata "in vitro" (69). La melatonina también es capaz de inhibir el "uptake" de  $^{45}\text{Ca}^{++}$  inducido por  $\text{K}^{+}$ , por su acción a nivel de los canales de calcio voltaje-dependientes en preparaciones de sinaptosomas y en concentraciones de  $10^{-8}$  M (221,239).

### **1.10 Efectores de la melatonina: el sistema gabaérgico central**

Desde la descripción inicial de un efecto neuroendocrino de la melatonina en la ovulación de la rata, se plantearon diversas posibilidades sobre los sistemas de neurotransmisión efectoras de la acción de la hormona en el SNC. En 1968 se describió la acción de la melatonina sobre los niveles de 5-HT en hipotálamo y mesencéfalo (7). Estudios posteriores involucraron también a la NE (78,89), aunque tanto en el caso de la 5-HT como de la NE, se carece de la prueba fundamental para avalar la hipótesis, es decir, la anulación de la acción de la melatonina por bloqueo del sistema monoaminérgico en cuestión.

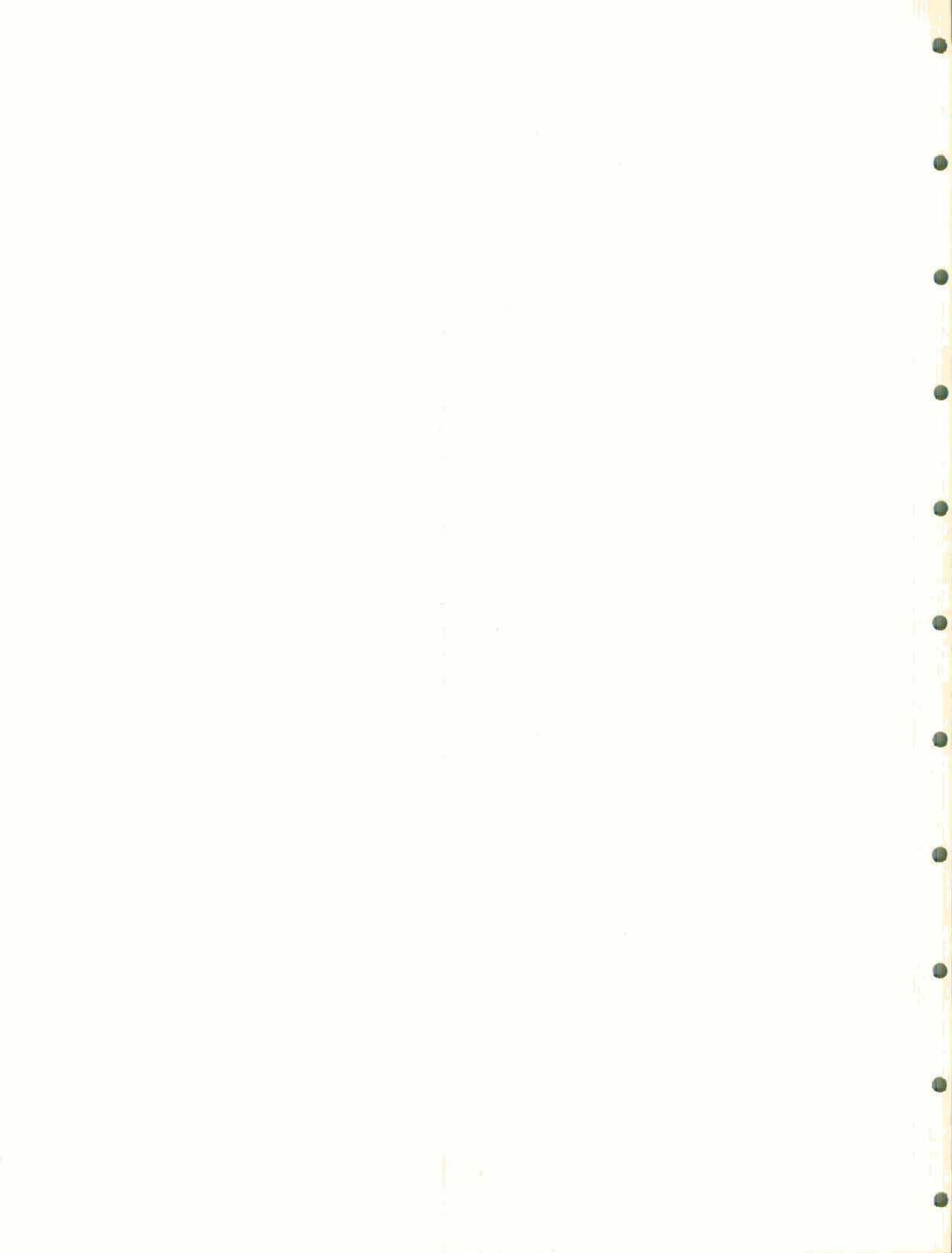
Más recientemente se ha propuesto que la melatonina puede ejercer su función sincronizadora en roedores a través de la interacción con el sistema GABAérgico (191). El papel que desempeñan las neuronas GABAérgicas en el procesado de información neural es relevante (22). El neurotransmisor inhibitorio más abundante en el SNC es el GABA, en particular en las regiones supraespinales del encéfalo. El GABA es el neurotransmisor en interneuronas

(tipo Golgi II), que median la integración y procesamiento de la información en las distintas estructuras corticales y subcorticales. En particular, las interneuronas GABAérgicas participan en el proceso de antagonismo "centro-periferia", que destaca una vía preferencial de la información neural por inhibición simultánea de la zona circundante (29,187).

En relación a los ritmos circadianos, no resulta trivial relacionar a la melatonina con el sistema GABAérgico central. En tal sentido es conocida la capacidad de los agentes que afectan la neurotransmisión GABAérgica para modificar la ritmicidad del reloj circadiano (21,131,174-177). P.ej., las BZP facilitan la resincronización de los ritmos circadianos a nuevos regímenes de luz (171,172,180), efecto que es compartido por la melatonina (10,13,49,50,139,178). Armstrong (12) afirma que la melatonina sería un "zeitgeber" interno, vale decir que constituiría el factor humoral sincronizante de las diversas actividades periódicas (muchas de las cuales están primariamente reguladas por el NSQ). ¿Será entonces posible que, al menos en sus efectos centrales, la melatonina sincronice los ritmos biológicos a través de un efecto sobre el sistema GABAérgico?

En estudios previos de nuestro y otros laboratorios se ha determinado que la inyección de melatonina es capaz de modificar los sitios de "binding" para GABA y BZP en cerebro de rata (2,3,57,113,135,141,155,157). Por otra parte, la hormona incrementa el "turnover" de GABA (190), así como su acción a nivel del canal de Cl<sup>-</sup> en SNC (156,195).

El presente trabajo de tesis continúa con esta línea de investigación y analiza diversos aspectos del sistema GABAérgico central como posible efector de los efectos cronobiológicos de la melatonina.



## 2. OBJETIVOS

Los experimentos aquí presentados han tenido como objetivo:

**2.1** Determinar la actividad cronofarmacológica de la melatonina en los siguientes modelos experimentales:

**2.1.1** Actividad locomotora en el hámster

**2.1.2** Actividad analgésica en el ratón

**2.1.3** Actividad anticonvulsivante en el hámster

**2.1.4** Actividad ansiolítica en la rata

**2.2** Verificar en una serie de modelos experimentales si el bloqueo de la expresión de los receptores tipo A del GABA, obtenida mediante la administración del antagonista central de las BZP Ro 15-1788 (flumazenil; etil-8-fluoro-5-6, dihidro-5-metil-6-oxo-4H-imidazo[1,5a]-[1-4] benzodiazepina-3-carboxilato) elimina la actividad de la melatonina. Debe notarse que los antagonistas directos del sitio receptor tipo A del GABA (p.ej., bicuculina) o del canal de Cl<sup>-</sup> (picrotoxina) tienen una poderosa actividad convulsivante "per se" lo que impide su uso con el objetivo farmacológico arriba planteado. El Ro 15-1788, carente de actividad intrínseca cuando se lo administra solo, ofrece una herramienta farmacológica ideal para analizar la actividad de la hormona pineal. Los modelos experimentales examinados fueron los mencionados en el punto 2.1, sumándose los siguientes estudios:

**2.2.1** Actividad resincronizante de la melatonina en el hámster

**2.2.2** Regresión gonadal post-tratamiento con melatonina en el hámster

**2.3** Examinar los cambios circadianos en el "turnover" del GABA de hámsteres sometidos a fotoperíodos estimulatorios (L:O=14:10) o inhibitorio (L:O=10:14) en las siguientes áreas nerviosas y endocrinas:

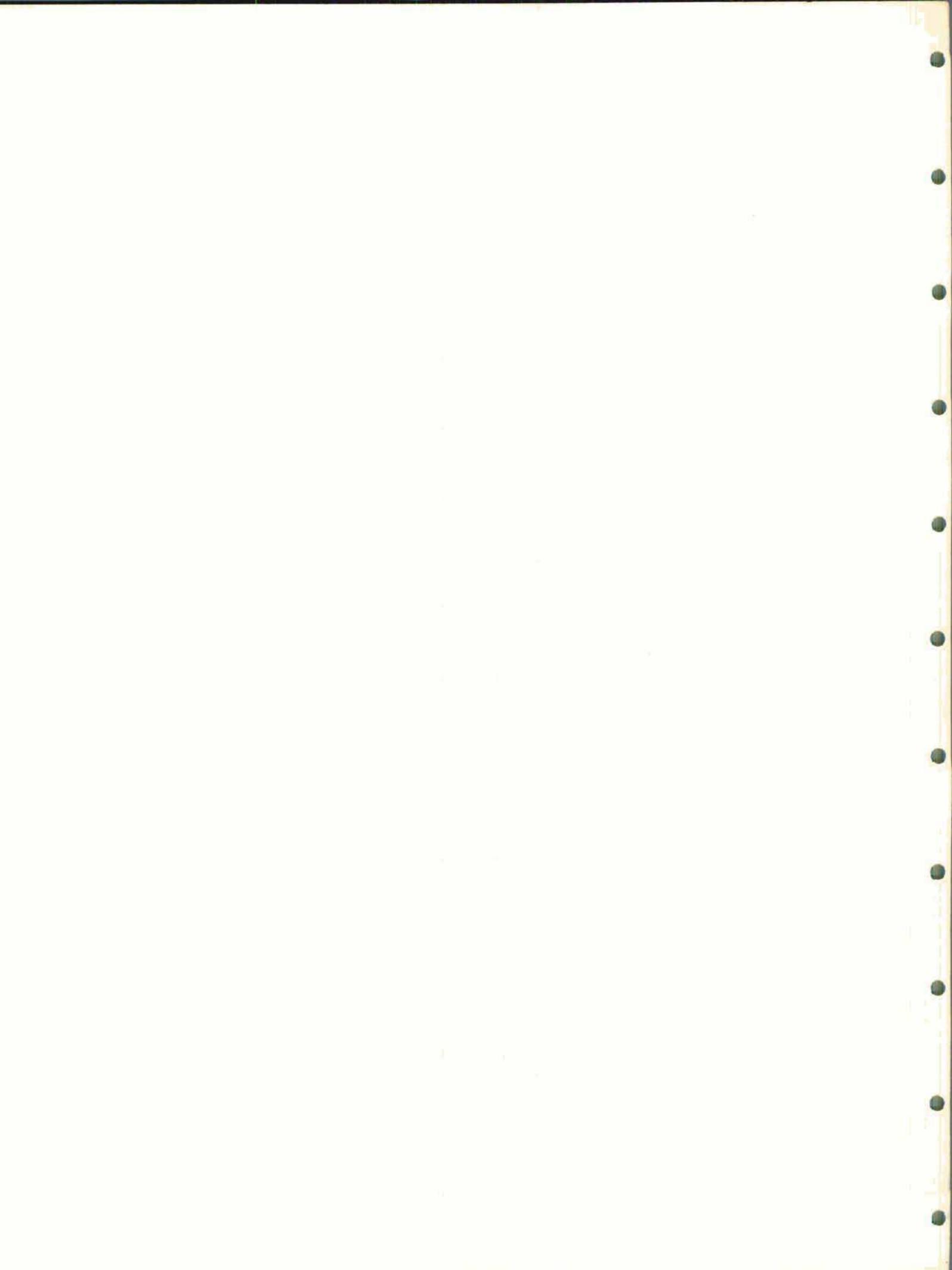
**2.3.1** corteza cerebral

**2.3.2** hipotálamo

**2.3.3** cerebelo

**2.3.4** glándula pineal

**2.4** Estudiar las variaciones diarias del efecto postsináptico del GABA sobre receptores tipo A, expresado este último por la captación sinaptoneurosomal de <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> en corteza cerebral e hipotálamo de hámster.



## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Depresión de actividad locomotora

#### Animales

Se utilizaron hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*) criados en nuestra colonia bajo un fotoperíodo de 14:10 (L:O) (encendido de luces a las 0600 h), con alimentación y comida ad libitum. Los experimentos se realizaron con machos adultos (100-170 g).

#### Drogas

La melatonina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) (30  $\mu$ g/kg - 3 mg/kg) fue administrada en forma intraperitoneal disuelta en 1:4 etanol:solución fisiológica (v:v). Las soluciones de melatonina fueron preparadas inmediatamente antes de las inyecciones, y el volumen inyectado fue de 0.2 ml. Los animales controles recibieron inyecciones del vehículo; en algunos experimentos se examinaron también animales sin inyectar.

El antagonista del receptor central de benzodiazepinas Ro 15-1788 (flumazenil, donado por Hoffmann La Roche, Basilea, Suiza) fue disuelto en el mismo vehículo que la melatonina y fue administrado i.p. 15 min antes de la hormona pineal o vehículo en una dosis de 5 mg/kg. Las inyecciones se efectuaron a las 2000 h durante 5 días, recibiendo los controles 2 inyecciones de vehículo cada día.

#### Registro de actividad locomotora

La actividad de los animales fue monitoreada y registrada por medio de un actómetro de dos canales Varimex (Columbus Instruments International Co., Columbus, OH, USA) dentro de una cámara aislada sujeta a las mismas condiciones ambientales que el resto de la colonia (fotoperíodo, temperatura, etc.). Los animales fueron transferidos a las jaulas plásticas inmediatamente después de la administración de las drogas y la actividad fue registrada a lo largo de 210-240 min como cuentas acumuladas, es decir, el número de veces que el hámster atravesaba alguno de los seis sensores para cada canal cada 15 min. Se registraron 2 animales en forma simultánea en cada horario por día. Los datos experimentales fueron almacenados para su posterior análisis en una computadora digital.

## Análisis estadístico

El análisis de los resultados fue realizado mediante un test t de Student o un ANOVA de dos factores, seguido de test de Dunnett o Tukey.

## 2.2 Analgesia

### Animales

Se utilizaron ratones albinos suizos macho (20-30 g, donados generosamente por laboratorios Beta S.A.). Los animales fueron mantenidos en un régimen de 12:12 L:O (encendido de la luz a las 8 hs), con agua y comida ad libitum.

### Drogas

El vehículo utilizado para las drogas (melatonina, Sigma Chemical Co.; naloxona, Endo Lab. Inc., USA; Ro-15-1788, Hoffman La Roche) fue etanol: solución salina, 1:4, v/v. La cantidad total de etanol administrada no excedió los 20 ml. Los animales fueron inyectados por vía intraperitoneal (100 µl por animal). Las dosis de melatonina variaron entre 5 a 30 mg/kg, mientras que la naloxona y el Ro 15-1788 fueron administrados en dosis de 10 y 20 mg/kg, respectivamente.

### Evaluación de analgesia

El umbral doloroso fue determinado mediante el test de plancha caliente ("hot plate") (90). Los ratones fueron colocados individualmente en jaulas de vidrio sumergidas en agua caliente (temperatura del piso de la jaula  $50 \pm 1$  °C) y se registró el tiempo de primera respuesta (TPR). El TPR se define como el tiempo transcurrido hasta obtener una de las siguientes respuestas: lamida de las patas, salto o rápido batido de las patas. La analgesia se definió como una diferencia significativa entre los TPR de ratones controles y tratados. Los animales fueron expuestos a la plancha caliente 15, 30 y 60 min luego de la administración i.p. de drogas o vehículo. Se registró también el TPR de animales vírgenes de tratamiento.

### Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante la prueba t de Student, ANOVA factorial o ANOVA de uno o dos factores seguido de las pruebas de Dunnett o Tukey.

## 2.3 Efecto anticonvulsivante

### Animales

Se utilizaron hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*) macho adultos (100-150 g) criados en nuestra colonia bajo un fotoperíodo de 14:10 L:O y con libre acceso a comida y agua.

### Drogas

Todas las inyecciones fueron i.p. La melatonina (Sigma) fue disuelta en 0.2 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) - solución fisiológica (1:1, v/v). La solución fue preparada antes de cada experimento. El ácido 3-mercaptopropiónico (3-MPA) fue disuelto en solución fisiológica; el volumen total de inyección fue de 0.1 ml. El Ro 15-1788 (facilitado por Hoffmann La Roche) fue disuelto en el mismo vehículo que la melatonina, y fue administrado 15 min antes de ésta o vehículo.

### Estimación del umbral convulsivo

Se registró la conducta de los animales tratados con 3-MPA en jaulas plásticas durante un período de 15 min. Los cambios comportamentales desarrollados luego de la administración del convulsivante fueron clasificados de acuerdo a una modificación de la escala propuesta por Ito y col (104), de la siguientes forma: (0) temblor; (2) contorsiones de la cabeza y el cuerpo; (3) gran actividad espasmódica; (4) corridas y saltos violentos. La actividad clónica, tónica o tónico-clónica también fue computada. Se registraron los tiempos de primera respuesta (TPR), definido como el tiempo necesario para la aparición de la primera señal de actividad convulsiva, y los tiempos de máxima respuesta (TMR), el tiempo necesario para obtener una respuesta convulsiva completa. Los resultados también se expresaron como porcentaje de animales que mostraron respuesta convulsiva.

### Procedimiento experimental

Los animales fueron estudiados a determinados intervalos a lo largo del día. Se utilizó luz roja tenue durante los experimentos nocturnos. El primer grupo de experimentos tuvo como objetivo determinar la existencia de cambios diarios en la respuesta convulsivante al inhibidor de la GAD 3-MPA. Se administró 3-MPA (10-60 mg/kg) a las 1300 y 2000 h, y una dosis estándar de convulsivante (30 mg/kg) para evaluar la variabilidad en la respuesta en 4

horarios distintos (1300, 2000, 2400 y 0400 h). En todos los casos se determinó el umbral y la calidad de la respuesta convulsiva.

En otra serie de experimentos, se administró melatonina (50 mg/kg) o vehículo 20 min antes de la inyección de 3-MPA (30 mg/kg en los horarios nocturnos, 40 mg/kg a las 1300) en los mismos intervalos de tiempo arriba citados. Los valores de TPR y TMR fueron expresados como el cociente entre el comportamiento de animales tratados con melatonina y con vehículo en cada intervalo.

El último grupo de experimentos fue realizado con el objeto de determinar si la actividad anticonvulsivante de la melatonina a las 2000 h depende en algún grado de la acción de receptores centrales de BZP. El Ro 15-1788 (50 mg/kg) fue administrado 15 min antes que la melatonina (50 mg/kg) o vehículo, lo que fue seguido 20 min más tarde por la inyección de 3-MPA (30 mg/kg). Luego de esta última inyección, los hámsteres fueron puestos en las jaulas plásticas para registrar su comportamiento en la forma descripta.

#### Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante ANOVA de uno o dos factores, seguido de la prueba t de Student o Dunnett. El análisis de los experimentos de DE 50 (dosis efectiva 50) fue realizado de acuerdo al método desarrollado por Litchfield y Wilcoxon (133). El análisis de datos categóricos fue realizado por la prueba de chi cuadrado.

## 2.4 Efecto ansiolítico

### Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho (250-300 g) criadas en nuestro bioterio bajo un fotoperíodo L:O 12:12, con luz de 0600 a 1800 h. Tanto la alimentación (alimento balanceado para roedores) como la bebida fueron administrados *ad libitum*.

### Drogas

La melatonina (Sigma Chemical Co., USA), el diazepam (donado por Roche Argentina) y el Ro 15-1788 (donado por Hoffmann-La Roche, Basilea) fueron disueltos en una solución de DMSO 50%, la cual fue a su vez utilizada para los grupos controles. Se administraron 200 µl de las drogas en forma intraperitoneal.

### Procedimiento experimental

Se utilizó la prueba del laberinto en cruz elevado (168). El principio de dicha prueba es que, al colocar a las ratas en un laberinto cuyas opciones son ramas abiertas o cerradas, el noble animal tenderá a cruzar y mantenerse en las ramas abiertas. El método ha sido validado administrando drogas de probado efecto ansiolítico para luego comprobar un aumento del porcentaje de entradas a las ramas abiertas y del porcentaje de tiempo pasado en las mismas. En los trabajos en los que originalmente se propuso el método, el número de entradas totales (es decir, a ambas ramas del laberinto) era grande, y permitía una modulación por drogas ansiolíticas o ansiogénicas (cabe agregar que nuestros experimentos fueron realizados en las mismas condiciones). Sin embargo, en las pruebas realizadas para el presente trabajo de tesis el número de entradas totales a las ramas del laberinto fue extremadamente bajo, tal vez denotando la baja propensión de los animales a colaborar con este trabajo de tesis, o más probablemente una carga intrínseca de estrés ya suficientemente alta. Una vez comprobado este inconveniente, se tomó como índice ansiolítico de las drogas en estudio el número absoluto de entradas a las ramas abiertas (ya que una leve variación en este parámetro haría variar en proporción significativa al porcentaje). El número total de entradas fue registrado, e interpretado posteriormente como comportamiento exploratorio.

El laberinto fue construido en madera, y consistió en dos ramas abiertas de 50 x 10 cm., y dos ramas cerradas, de 50 x 10 x 40 cm, de forma tal que los pares de brazos (abiertos y cerrados) quedaban enfrentados. Para las mediciones, el aparato fue puesto a 50 cm. del suelo. Las determinaciones fueron realizadas en varios puntos horarios: 0700, 1200, 1800, 2200 y 0200 h. En todos los casos las mediciones se hicieron bajo luz tenue, debido a que la luz intensa es una condición no permisiva para la expresión del comportamiento exploratorio en la rata.

Se prepararon distintos grupos experimentales. Los grupos de melatonina y diazepam fueron registrados 20-30 min luego de la inyección. Para evaluar la participación del sitio receptor central de BZP, grupos de animales recibieron flumazenil solo o 15 min antes de la melatonina a las 1800 h o a las 2200 h. Para mejorar el desarrollo de la prueba, los animales fueron dejados 5 min en una "arena" de madera, cerrada, luego de lo cual fueron transferidos al laberinto. Durante el tiempo de registro (5 min) se computaron las entradas a las distintas ramas, discriminando ramas abiertas y cerradas, y el tiempo pasado en cada uno de los compartimientos. Para la comparación se utilizaron

los siguientes parámetros: número total de entradas, número de entradas a las ramas abiertas, y porcentaje de tiempo pasado en las ramas abiertas.

Los estudios del ritmo de la actividad de la melatonina y de la participación del sistema GABAérgico central fueron realizados con 1 mg/kg de la hormona, y el efecto fue comparado con grupos de animales que recibieron vehículo (DMSO 50%) ó 0.5 mg/kg de diazepam. Para la evaluación más detallada del efecto ansiolítico de la hormona pineal se realizó un estudio dosis-respuesta (1-20 mg/kg) a las 1200 h (en la mitad de la fotofase) y a las 1800 h (en el momento de transición L:O).

## 2.5 Efecto sobre la resincronización

### Animales

Se utilizaron hámsteres macho adultos de peso aproximado a los 150 gramos, de forma tal que el peso de los sensores no representara más de un 1% del peso corporal. Los animales fueron criados en nuestra colonia bajo las condiciones ya citadas, y luego de la implantación de los sensores fueron colocados en jaulas individuales de vidrio provistas con una rueda de locomoción de 14 cm. de diámetro. Si el lector curioso desea saber cuanto corre el noble animal a lo largo de la noche, no tiene más que multiplicar el número de vueltas por 43.98 cm. (perímetro de las ruedas). En una noche normal, puede calcularse que los hámsteres corren hasta 6-7 km.

### Monitoreo de ritmos biológicos

Dependiendo de la especie que se desee estudiar, se utilizan distintos marcadores del sistema circadiano. El ritmo diario de temperatura corporal es uno de ellos. Aquí surge la necesidad de un registro en el que no se perturbe a los animales con cables o electrodos que dificultaran el seguimiento crónico de las variables, lo que generalmente se resuelve mediante el registro telemétrico. En este estudio fue utilizado un sistema (Minimitter Co. Inc.) en el que se registran conjuntamente la temperatura profunda, la actividad general y la actividad en rueda ("wheel-running") de los animales. Los datos son recogidos y analizados en una computadora AT mediante la interfase adecuada (se utilizó la interfase DQ-III, Minimitter Co. Inc., Data Sciences Inc.) (Fig. 8).

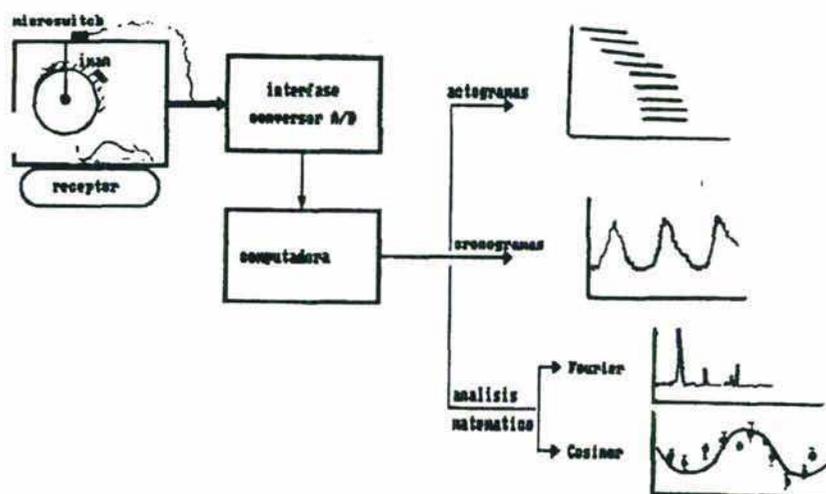


Figura 8: Sistema de detección de ritmos de actividad y temperatura en el hámster

#### Implantación de los sensores

Para determinar la temperatura corporal y actividad general se colocó en los animales un sensor intraperitoneal mediante una operación quirúrgica sencilla. Se anestesió a los animales con 60 mg/kg de pentobarbital sódico. Luego se realizó una incisión abdominal y se introdujo el sensor, el cual queda suelto en la cavidad peritoneal. Los animales respondieron satisfactoriamente a la operación, requiriéndose solamente una leve antibioticoterapia preventiva (Terramicina i.m.). Tres días después de la intervención se comenzó el registro de la actividad y temperatura.

#### Principio del registro telemétrico

En principio, el sensor posee un microcircuito cuya salida es una oscilación variable con la temperatura. Los sensores se calibraron a valores conocidos de temperatura previamente a la operación. La salida de los sensores fue captada por receptores individuales, situados debajo de cada jaula, que interpretan la oscilación y la señal fue recibida en una computadora AT. Mediante la programación adecuada, esta señal fue descodificada y convertida en grados (de acuerdo a la calibración anterior).

Cada receptor posee dos antenas, de modo que la señal es recibida doblemente. Si el animal está quieto, la relación de la amplitud de la señal emitida por los sensores que recibe cada antena es constante. Por el contrario, si el animal se mueve, varía la amplitud recibida en cada antena, y esto es interpretado como actividad general. Mediante los ajustes de sensibilidad adecuados, es posible registrar diversos niveles de esta

"actividad general". Estas señales de actividad son también enviadas a la computadora, en donde son almacenadas para su posterior análisis.

#### Registro de la actividad locomotora

Muchas veces la actividad general es una variable "ruidosa", y no necesariamente expresa cuan preciso es el ritmo circadiano de los animales. Esto es particularmente importante en el caso de los hámsteres, para los que suele registrarse su movimiento en ruedas de actividad. Cualquiera que haya tenido un hámster como mascota habrá observado que son grandes corredores, y si se investiga con mayor atención, se notará que la hora del comienzo de la actividad en la rueda es notoriamente constante a lo largo de las noches (para desesperación del sueño de los due:os, quienes finalmente decidirán aceitar esa maldita ruedita...)

Para registrar las vueltas que dan los animales en las ruedas se colocaron ruedas de actividad suspendidas del techo de las jaulas. En el borde de la rueda se fijó un pequeño imán, el que interacciona con un microinterruptor situado en el techo de la jaula. Este par de elementos (imán-microinterruptor) es del tipo que se utiliza para activar alarmas que indiquen apertura de puertas. De esta manera, cada vez que la rueda dé una vuelta, se activa o inactiva el interruptor superior, y esta señal es también dirigida a la computadora, en donde es interpretada en un contador y almacenada para su análisis. Debe aclararse que cada señal que es almacenada en la memoria de la computadora se graba junto con su marca horaria, vale decir que se posee un registro crónico de los valores de actividad (general y de rueda) y de temperatura junto con el registro del momento exacto en que fueron tomados.

#### Procedimiento experimental

Una vez que los animales se recuperaron completamente de la operación, se procedió a realizar el estudio de base de los ritmos circadianos de actividad y temperatura. Inicialmente se registraron estos ritmos circadianos durante 30 días en condiciones constantes de fotoperíodo (14:10), ambiente y temperatura ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Posteriormente se analizó la modulación que la actividad en rueda ejerce sobre el ritmo de temperatura corporal. Para ello los animales tuvieron alternadamente acceso o no a las ruedas de locomoción y se registró en forma crónica la temperatura. Se realizaron controles con animales que tuvieron acceso a ruedas inmovilizadas. Para determinar que efectivamente se estaban registrando los ritmos endógenos de actividad y temperatura, se realizaron experimentos de "libre curso" ("free running"), registrando estos ritmos bajo condiciones de oscuridad constante. Para determinar el período de libre curso se confeccionaron actogramas, y se

determinó la recta de mejor ajuste para el inicio de la actividad a lo largo de los días.

#### Experimentos de resincronización

Para estos experimentos se utilizaron aquellos animales que poseyeron una línea de base de los ritmos de actividad y temperatura extremadamente constante. En el día D (también llamado Pearl Harbour) del experimento se procedió a un adelanto de 6 horas de la fase de apagado de las luces, manteniendo a partir de ese momento el ritmo de L:O=14:10. En los días D-2, D-1 y D, grupos de al menos 6 animales recibieron alguno de los siguientes tratamientos:

- i- vehículo y 15 min más tarde melatonina 1 mg/kg
- ii- vehículo y 15 min más tarde nuevamente vehículo
- iii- flumazenil 5 mg/kg y 15 min más tarde vehículo
- iv- flumazenil 5 mg/kg y 15 min más tarde melatonina 1 mg/kg

El volumen de cada inyección fue de 100 ml, y las drogas (en cada grupo) fueron administradas i.p. con un intervalo de 15 minutos. Las drogas fueron disueltas en DMSO, vehículo que no posee efectos sobre el reloj circadiano ni sobre su expresión.

Se continuó el registro de los ritmos de temperatura y actividad de los animales hasta obtener una resincronización completa de los mismos. Se definió como resincronización el comienzo de la actividad locomotora o el aumento de temperatura por sobre un cierto umbral dentro de los 15 minutos de apagado de las luces.

#### Análisis estadístico

La variable registrada fue "días hasta resincronización", y los datos fueron analizados mediante ANOVA seguido de prueba de Dunnett.

## 2.5 Efecto antigonal

### Animales

Se utilizaron hámsteres macho adultos criados en nuestra colonia bajo un fotoperíodo L:O de 14:10, con libre acceso a agua y comida.

### Drogas

## Drogas

Tanto la melatonina (Sigma) como el bloqueante del receptor central de BZP Ro 15-1788 (Hoffmann La Roche) fueron disueltos en etanol, y las soluciones a inyectar se prepararon diariamente mediante el agregado de solución fisiológica. Los controles recibieron una inyección diaria de vehículo (etanol: sol. fisiológica 1:4, v/v).

## Procedimiento experimental

Se administró a diferentes grupos de animales, alguno de los siguientes tratamientos, 5 días por semana, durante ocho semanas:

- (a) vehículo;
- (b) vehículo + melatonina 25 µg/kg;
- (c) Ro 15-1788 (50 µg/kg) + melatonina (25 µg/kg);
- (d) Ro 15-1788 (50 µg/kg) + vehículo.

Las drogas se administraron en el momento de transición luz - oscuridad; el Ro 15-1788 fue inyectado 15 min antes de la melatonina. Al cabo de las 8 semanas de tratamiento, los animales fueron sacrificados por decapitación. Se extrajeron y pesaron las gónadas y glándulas accesorias.

## 2.6 Determinación del "turnover" de GABA bajo distintos fotoperíodos y del influjo de cloro inducido por GABA bajo fotoperíodo estimuladorio

### Animales

Se utilizaron hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*) criados en nuestra colonia bajo un fotoperíodo de 14 horas de luz : 10 horas de oscuridad (14:10 L:O) (encendido de luces a las 0600 h) o animales sometidos durante 10 semanas a un fotoperíodo de 10 horas de luz: 14 horas de oscuridad (encendido de luces a las 0500 h), con alimentación y bebida ad libitum. Los experimentos se realizaron en machos adultos (100-170 g).

### Determinación del contenido de GABA

La determinación del contenido de GABA se realizó por la técnica de radioreceptor (64,143). Los animales fueron sacrificados por decapitación, y sus cerebros removidos y disecados sobre hielo, manteniéndose los tejidos congelados hasta su posterior procesamiento. La homogeneización se efectuó en agua destilada.

Para el ensayo, alícuotas de 100 µl de una preparación cruda de membranas sinápticas de cerebelo de rata (aproximadamente 300 µg de proteínas), mantenidas en buffer Tris-citrato, pH 7.2, se incubaron con 100 µl de muestras de tejido o con varias concentraciones de GABA disuelto en agua destilada. También se agregaron 100 µl de  $^3\text{H}$ -muscimol (actividad específica 27.8 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, MA, USA), en una concentración final de 5 nM. La unión inespecífica se determinó en presencia de 200 µM de GABA y cada determinación se realizó por triplicado. Se incubaron las muestras durante 10 min a temperatura ambiente y luego se las centrifugó a 12000 g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue descartado y se lavó el precipitado superficialmente 2 veces con 1 ml de buffer Tris-Citrato frío. La radiactividad del precipitado fue extraída con hidróxido de amoníaco y fue cuantificada por espectrometría de centelleo líquido.

#### Determinación del "turnover" de GABA

La determinación del "turnover" de GABA se realizó por la cuantificación de la acumulación del aminoácido luego de la inhibición de la enzima GABA transaminasa (143). La inhibición enzimática fue obtenida por administración (i.p.) de gamma acetileno GABA (200 mg/kg) 62.5 min antes del sacrificio. Para prevenir el aumento post mortem del contenido de GABA se administró (i.p.) 3-MPA 2.5 min antes del sacrificio en una dosis de 50 mg/kg (102).

#### Determinación del influjo de $^{36}\text{Cl}^-$

Para la determinación de la captación de  $^{36}\text{Cl}^-$  (148), los cerebros e hipotálamos fueron homogeneizados en buffer Hepes 10 mM (ClNa 145 mM, ClK 5 mM,  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  2.5 mM,  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  1 mM, glucosa 10 mM) ajustado a pH 7.5 con Tris, en un homogeneizador vidrio-teflón. El homogenato fue centrifugado a 900 g durante 15 min a 4 °C, el sobrenadante fue descartado y el "pellet" final fue resuspendido en buffer hasta obtener una concentración de 2-5 mg de prot/ml. Se incubaron alícuotas de 200 µl de la suspensión durante 10 min a 30 °C. Luego de la incubación, el influjo de  $^{36}\text{Cl}^-$  fue iniciado por el agregado de 200 µl de una solución del nucleído (actividad específica del  $^{36}\text{Cl}^-$ , 14.3 mCi/g, New England Nuclear, concentración final 0.5 mCi/ml). Luego de 5 seg del agregado de  $^{36}\text{Cl}^-$  con o sin GABA, el "uptake" fue detenido por medio del agregado de 4 ml de buffer frío y filtrado rápido a presión reducida a través de filtros Whatman GF/C embebidos en polietilénimina al 0.05% (a fin de reducir la pegada inespecífica de  $^{36}\text{Cl}^-$ ). Los filtros fueron lavados 2 veces con 4 ml de buffer y se transfirieron posteriormente a viales de conteo. La radiactividad se determinó por espectrometría de centelleo líquido. La cantidad de  $^{36}\text{Cl}^-$  unido a los filtros en ausencia de tejido fue sustraída de todos los valores. El GABA

(concentración final 50  $\mu\text{M}$ ) se agregó conjuntamente con el  $^{36}\text{Cl}^-$ , mientras que la picrotoxina (100  $\mu\text{M}$ ) fue agregada 10 min antes.

#### Análisis estadístico

El análisis de los resultados fue realizado mediante un test t de Student o un análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores, seguido de test de Dunnett o Tukey. Para determinar los parámetros de los ritmos de "turnover" de GABA se aplicó un análisis de cosinor, desarrollado a partir de un programa gentilmente cedido por el Grupo Multidisciplinar de Ritmos Biológicos (Universidad de San Pablo, Brasil). Este análisis consiste en realizar un ajuste de los datos experimentales a una función cosenoidal de período variable, por el procedimiento de cuadrados mínimos. El programa va variando los siguientes parámetros de la función:

- amplitud (diferencia entre el valor medio de la función ajustada y su máximo o mínimo)
- mesor (valor medio de la función ajustada)
- fase (tiempo al cual ocurre el máximo de la función ajustada)

Para el análisis de significación estadística se pone a prueba la hipótesis nula de que el ritmo ajustado posee amplitud nula (o sea, no es un ritmo). De esta manera, el criterio de ajuste significativo es que la probabilidad de amplitud nula sea menor al 5% ( $p < 0.05$ ). También se puede comparar en función del porcentaje de datos experimentales que caen dentro del intervalo de confianza de la función ajustada (porcentaje rítmico, P.R.)

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Depresión de actividad locomotora en el hámster

La función fisiológica más estudiada de la melatonina es su capacidad de sincronizar la reproducción estacional, merced a la variación diaria de sus niveles circulantes, un verdadero código neuroendocrino del fotoperíodo ambiental (27,102,110,123, 182,204, 205,211). Sin embargo (y he aquí algo novedoso, por fin), se ha descrito también una serie de efectos comportamentales de la hormona, como la inducción de sueño en roedores (17,101,139,141,175,207) y humanos (8,59,230,237), depresión de actividad motora y actividad analgésica y anticonvulsiva en ratas y ratones (4,108,122) y sincronización de actividad locomotora en roedores (178). Al menos para los efectos neuroendocrinos de la hormona, el horario de su administración es crítico. En hámsteres (102,182,204,205,211) y ratas (123) existe un período de sensibilidad máxima al comienzo de la fase oscura, y otro secundario hacia el final de la noche.

Si bien como indicáramos en la Introducción de este trabajo de tesis, el sitio de acción de la hormona pineal aún no ha sido definido, existen evidencias indicando al NSQ hipotalámico como el blanco de su actividad (51,113,121,185,201,203). En vista de la existencia de activos mecanismos GABAérgicos en el NSQ (131) es posible que la melatonina actúe sobre el sistema circadiano a través de la modificación del complejo "receptor GABA A - BZP" central.

El objetivo de esta parte del estudio fue determinar si la depresión de actividad locomotora inducida por la melatonina en hámsteres muestra la cronodependencia conocida para otros efectos de la hormona pineal, y si esta acción es susceptible de modificación por el antagonista del sitio receptor central para BZP Ro 15-1788.

Como puede apreciarse en la Fig. 10, los patrones de actividad locomotora del hámster en la 6a o 12a hora de luz (esto es, a las 1200 y a las 2000 h) difieren significativamente entre sí. Al mediodía se detectaron dos fases de actividad locomotora en animales intactos o inyectados con vehículo. Con posterioridad a un incremento temprano en la actividad, observado luego de introducir a los animales en las jaulas experimentales (actividad inducida por ambiente novedoso, de tipo aperiódico), ésta disminuye progresivamente hasta alcanzar, a los 100-120 min, un estado de inactividad (revelado por la pendiente de valor cercano a 0 en los

actogramas acumulativos). La segunda fase se mantuvo hasta la finalización del registro.

### ACTIVIDAD LOCOMOTORA DE HAMSTERS

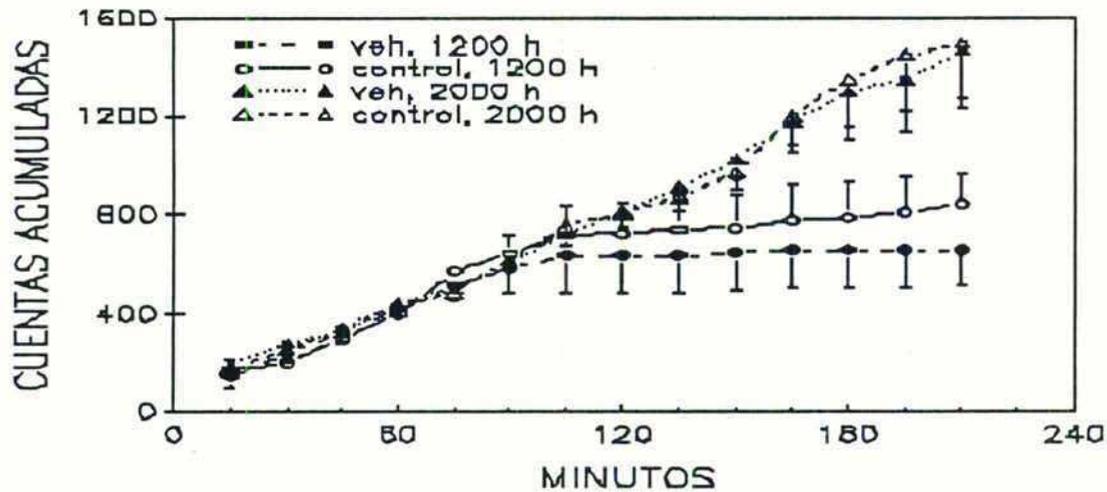


Fig. 10: Actividad locomotora de hámsteres a las 1200 o 2000 h (4ta. y 12da. hora de la fase de luz del fotoperíodo diario). La actividad fue registrada mediante un actómetro de 2 canales como se describe en Material y Métodos. Se utilizaron hámsteres intactos y otros inyectados i.p. con 0.2 ml de etanol-sc. fisiológica (1:4). Se muestran las medias  $\pm$  error estándar de 6 animales por grupo, expresado como cuentas acumuladas: el número de veces que los animales cruzaron alguno de los sensores en la jaula experimental. Se hallaron diferencias significativas entre animales examinados a las 1200 y a las 2000 h, a cada intervalo de 15 minutos desde los 180 hasta los 210 minutos de registro ( $p < 0.05$ , ANOVA, prueba de Tukey).

En cambio, en los registros de las 2000 h, tanto los animales intactos como los tratados con vehículo mostraron un patrón relativamente constante de actividad a lo largo del registro, lo que se revela por el incremento lineal en los actogramas correspondientes (Fig. 11).

## ACTIVIDAD LOCOMOTORA DE HAMSTERS

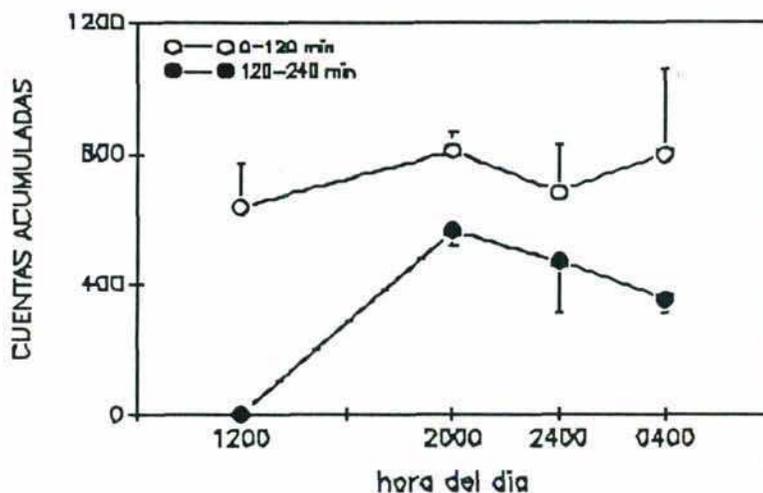


Fig. 11: Cambios diarios en las fases temprana (0-120 min) y tardía (120-240 min) de actividad locomotora de hámsteres. Se muestran las medias  $\pm$  error estándar de 4 animales por grupo. Se encontraron diferencias significativas en la fase tardía de actividad como función de la hora de registro: los valores medios determinados a las 1200 h fueron significativamente menores que aquéllos medidos a las 2000 h ( $p < 0.05$ , ANOVA, prueba de Tukey).

Las diferencias en el patrón de actividad de hámsteres examinados a las 1200 y a las 2000 h se reflejan también computando el número de cuentas acumuladas durante la fase temprana (0-120 min) o tardía (120-210 min) de actividad. Los resultados de este análisis están resumidos en la Tabla 3. No se detectaron diferencias significativas entre las fases de actividad temprana a las 1200 y a las 2000 h; hemos señalado que esta actividad responde al estrés del nuevo ambiente y es intrínsecamente aperiódica. En cambio, la actividad tardía resultó ser una 10 veces más intensa durante la noche. Los animales intactos y aquellos tratados con vehículo exhibieron patrones similares de actividad locomotora, independientemente de la hora de registro, hecho que indica una relativa falta de interferencia de la manipulación de la inyección (Tabla 3).

La Fig. 12 muestra los cambios en las fases temprana o tardía de actividad locomotora en hámsteres, registradas durante 4 horarios diferentes a lo largo del día. Si bien la primera fase de actividad locomotriz no exhibió variación diurna, la fase tardía fue máxima al comienzo de la oscuridad y mínima al mediodía. En conjunto, estos resultados constituyen una evidencia más del hecho reconocido de que la actividad motora del hámster muestra un ritmo diario con máximos durante la noche (46).

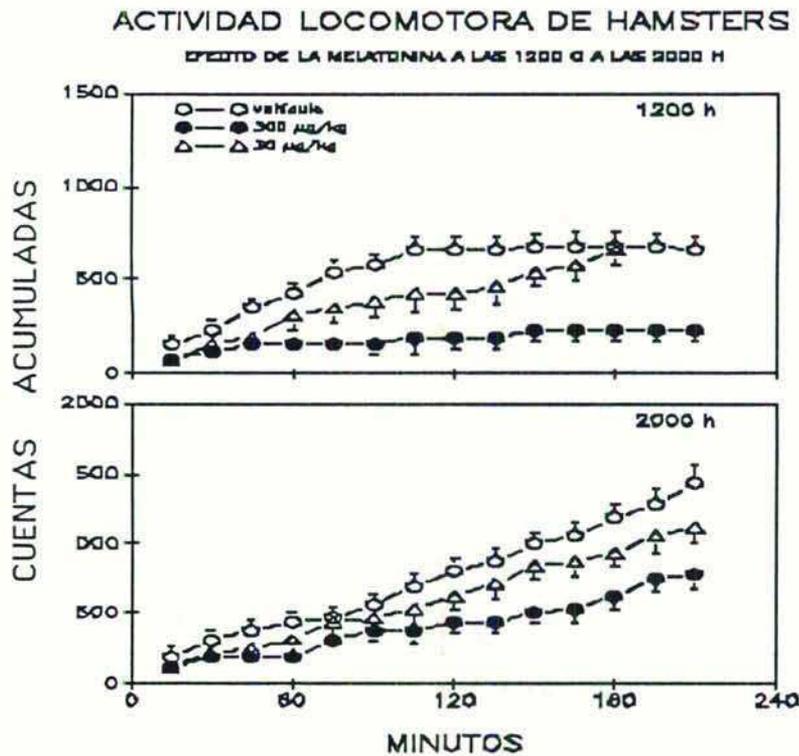


Fig. 12: Efecto del tratamiento con melatonina sobre la actividad locomotora de hámsteres inyectados i.p. a las 1200 o a las 2000 h. Se hallaron diferencias significativas entre los animales que recibieron la dosis más alta de melatonina (300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) y los controles en cada intervalo registrado entre los 75 y 210 minutos de medición, a las 1200 o a las 2000 h ( $p < 0.05$ , ANOVA, prueba t de Dunnett).

Tabla 3. Actividad locomotora en hámster a las 12.00 y 20.00 h

GRUPO	Actividad acumulativa (cuentas por intervalo)			
	12.00 h		20.00 h	
	0-120 min	120-210 min	0-120 min	120-210 min
Intactos	720 $\pm$ 120	120 $\pm$ 20	810 $\pm$ 50	690 $\pm$ 43*
Vehículo	639 $\pm$ 149	26 $\pm$ 6	813 $\pm$ 44	654 $\pm$ 35*

La actividad fue registrada hasta 210 minutos en un actómetro óptico de 2 canales, según se describe en materiales y métodos. Se utilizaron controles intactos y animales que recibieron una inyección i.p. única de 0.2 ml de solución salina-etanol (1:4). Se representan las medias  $\pm$  desviación standard de las cuentas acumulativas durante los intervalos consignados, 0-120 y 120-210 minutos luego del inicio del experimento. Se utilizó un  $n=6$  en cada grupo. \* $p < 0.001$  comparado con las 12.00 h, test de Student.

Las Fig. 13 y 14, así como la Tabla 4, resumen el efecto de la administración crónica (5 días) de 30 o 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de melatonina sobre la actividad locomotora del hámster. La dosis menor no tuvo efecto sobre el comportamiento locomotor a las 2000 h, y a las 1200 h produjo un acortamiento significativo de la fase temprana de

actividad y un alargamiento de la actividad tardía. La administración de 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de melatonina, tanto al mediodía como al comienzo de la noche, fue igualmente efectiva para deprimir la actividad locomotora temprana, mientras que sólo disminuyó la fase tardía de locomoción a las 2000 h.

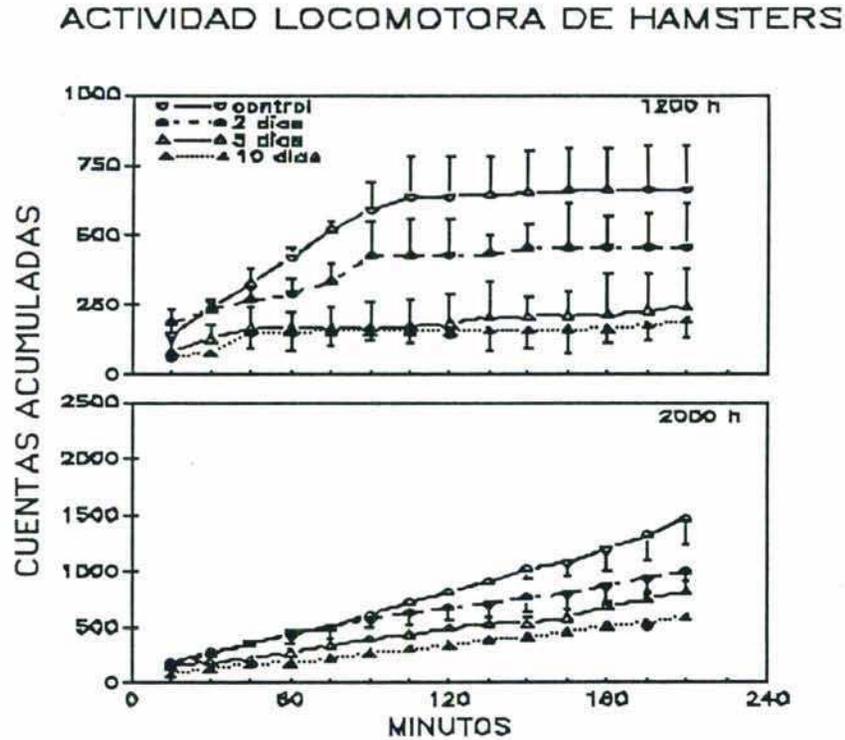


Fig. 13: Efecto de la duración del tratamiento con melatonina (300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  durante 2, 5 ó 10 días) sobre la actividad locomotora de hámsteres a las 1200 o a las 2000 h. Los controles recibieron administración i.p. de vehículo. Se detectaron diferencias significativas entre animales inyectados durante 5 o 10 días con melatonina y los controles a cada intervalo de medición desde los 60 hasta los 210 min de registro (1200 h) o desde los 90 hasta los 210 minutos de registro (2000 h) ( $p < 0.05$ , ANOVA, prueba de Dunnett). No se hallaron diferencias entre animales inyectados con vehículo durante 2, 5 ó 10 días (datos no mostrados).

## ACTIVIDAD LOCOMOTORA DE HAMSTERS

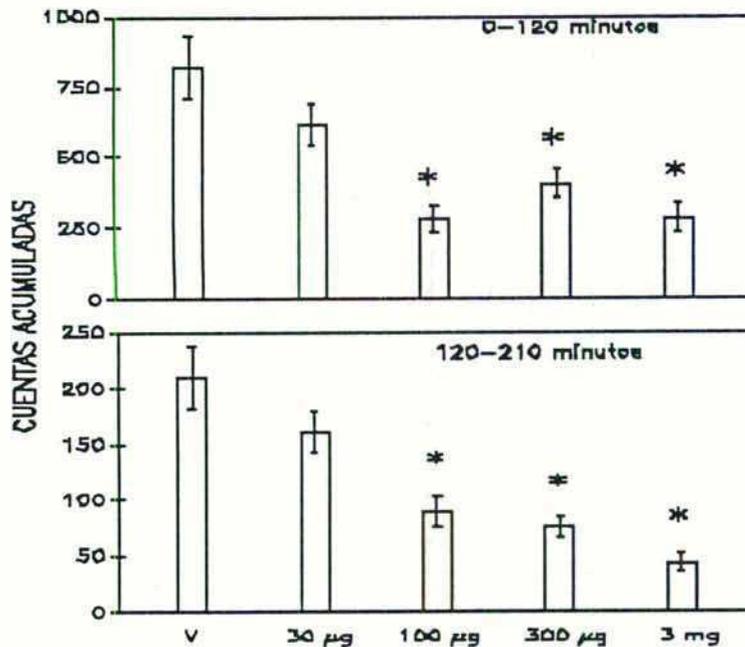


Fig. 14: Efecto de diferentes dosis de melatonina sobre la actividad locomotora de hámsteres luego de 5 días de tratamiento a las 2000 h. Los resultados (media  $\pm$  error estándar para 6 animales por grupo) se expresan como cuentas de actividad acumuladas para las fases temprana y tardía de actividad, esto es, 0-120 y 120-210 min. \* $p < 0.05$  comparado con animales tratados con vehículo, ANOVA, prueba de Dunnett.

Tabla 4 . Efecto del tratamiento con melatonina sobre la actividad locomotora del hámster a las 12.00 y 20.00 h

Tratamiento min	12.00 h		20.00 h	
	0-120 min	120-210 min	0-120 min	120-210 min
Vehículo	639 $\pm$ 146	59 $\pm$ 34	813 $\pm$ 51	654 $\pm$ 103
Melatonina 30 µg/kg	423 $\pm$ 85*	221 $\pm$ 31	678 $\pm$ 75	456 $\pm$ 49
Melatonina 300 µg/kg	186 $\pm$ 105*	30 $\pm$ 6	494 $\pm$ 44 *	325 $\pm$ 3*

Los animales fueron inyectados con melatonina a las 12.00 o a las 20.00 h. La actividad fue registrada hasta 210 minutos luego de la inyección en un actómetro óptico de 2 canales descrito en materiales y métodos. Se indican las medias  $\pm$  desviación standard de las cuentas acumulativas en los intervalos consignados: 0-120, 120-210 minutos luego de la inyección (n=6 en cada grupo). \* $p < 0.05$  comparado con los animales inyectados con vehículo, ANOVA, test de Dunnett.

Es de destacar que la actividad de la melatonina al mediodía es explicable por sus efectos sedantes, los que han sido descritos en

ratones y ratas en pruebas de actividad sedativa/hipnótica, anticonvulsivante y analgésica (11,166). Por ejemplo, en registros de locomoción en ratón, realizados durante el día, cuando la actividad espontánea es baja, se observó un efecto estimulador fugaz del vehículo (aproximadamente de 20 min de duración) el que fue inhibido por la melatonina en forma dosis-dependiente ( $IC_{50} \approx 30$  mg/kg) (166). Nuestros resultados demuestran una actividad sedante similar de la melatonina en hámsteres, pero a dosis considerablemente menores que las descritas para ratones (100-300  $\mu$ g/kg).

En la Tabla 5 se resumen los resultados de un experimento destinado a analizar los efectos de la administración de melatonina (300  $\mu$ g/kg, 5 días) sobre la locomoción de hámsteres evaluada en 3 momentos distintos durante la noche. El efecto depresor de la melatonina fue observado sólo a las 2000 y 0400 h y no llegó a ser significativo a las 2400 h.

Tabla 5. Efecto del tratamiento con melatonina sobre la actividad locomotora del hámster a las 20.00, 24.00 y 04.00 h.

Tratamiento	Actividad acumulativa (cuentas por intervalo)			
	20.00 h		24.00 h	
	0-120 min	120-240 min	0-120 min	120-240 min
Vehículo	869 $\pm$ 126	436 $\pm$ 77	655 $\pm$ 88	466 $\pm$ 110
Melatonina 300 $\mu$ g/kg	254 $\pm$ 67*	116 $\pm$ 25*	422 $\pm$ 56	384 $\pm$ 107
Tratamiento	04.00 h			
	0-120 min	120-240 min		
Vehículo	791 $\pm$ 133	275 $\pm$ 36		
Melatonina 300 $\mu$ g/kg	351 $\pm$ 52*	64 $\pm$ 7*		

Los animales fueron inyectados con melatonina i.p. La actividad fue registrada hasta 240 minutos luego de la inyección en un actómetro de 2 canales según se describe en materiales y métodos. se indican las medias  $\pm$  desviación standard de las cuentas acumulativas durante los intervalos consignados: 0-120, 120-240 minutos luego de la inyección (n=4 en cada grupo). \*p< 0.05 comparado con los animales inyectados con vehículo. Test de Student.

La depresión de la fase temprana de actividad locomotora por la melatonina a las 1200 ó 2000 h alcanzó significación estadística luego de 5 días de tratamiento, mientras que el efecto sobre la fase tardía de actividad (sólo encontrado a las 2000 h) llegó a ser significativo luego de 2 días de administración de melatonina (Fig. 13 y Tabla 6). A las 2000 h, la dosis efectiva mínima de melatonina para deprimir la actividad locomotora fue de 100 µg/kg (Fig. 14).

**Tabla 6 . Efecto de la longitud del tratamiento con melatonina sobre la actividad locomotora del hámster.**

Días de tratamiento	Actividad acumulativa (cuentas por intervalo)			
	12.00 h		20.00 h	
	0-120 min	120-210 min	0-120 min	120-210 min
Control	639 ± 146	26 ± 6	813 ± 51	654 ± 104
2	432 ± 124	30 ± 10	678 ± 121	324 ± 57*
5	186 ± 105*	59 ± 34	494 ± 44*	325 ± 36*
10	159 ± 28*	38 ± 12	339 ± 4*	250 ± 18*

Los animales fueron inyectados con melatonina (i.p.), 300 µg/kg, a las 12.00 y 20.00 h durante 2, 5 o 10 días . La actividad se registró en la forma usual. Los controles recibieron inyección de vehículo durante 10 días. Se presentan las medias ± desviación standard de las cuentas acumulativas en los intervalos mencionados: 0-120, 120-210 min luego de la inyección (n=6 en cada grupo). \*p <0.05 comparado con los animales inyectados con vehículo. ANOVA, test de Dunnett. No se encontraron diferencias significativas entre los animales inyectados con vehículo durante 2, 5 o 10 días.

Como ya mencionáramos, es conocida la capacidad de los agonistas o antagonistas de las BZP para interactuar, en la membrana neuronal, con el complejo supramolecular del receptor tipo A del GABA, el receptor de BZP, el ionóforo de Cl<sup>-</sup> y sitios de reconocimiento para barbitúricos y picrotoxina (48,79,168). De los diversos agentes empleados, el antagonista central de las BZP Ro 15-1788 es de particular utilidad debido a que carece de efectos neurofarmacológicos demostrables, pero es capaz de obliterar eficazmente la actividad pro-GABAérgica sin presentar los efectos convulsivantes de otros antagonistas (48,180,185). La Fig. 15 resume los resultados de un experimento tendiente a evaluar la actividad del antagonista del receptor central de BZP Ro 15-1788 para inhibir el efecto de la melatonina sobre el comportamiento locomotor del hámster a las 2000 h. La administración del Ro 15-1788, carente "per se" de actividad en este sistema, bloqueó efectivamente el efecto depresor de la melatonina.

## ACTIVIDAD LOCOMOTORA DE HAMSTERS

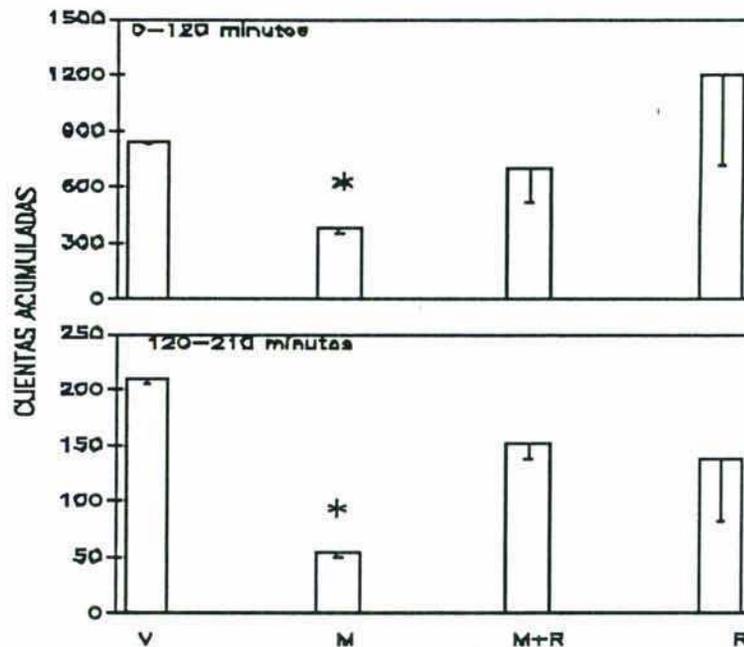


Fig. 15: Antagonismo del Ro 15-1788 de la depresión de actividad locomotora inducida por melatonina en hámsteres. Los animales recibieron 300  $\mu$ g/kg de melatonina o vehículo i.p. durante 5 días a las 2000 h. El Ro 15-1788 (5 mg/kg) fue administrado i.p. 15 minutos antes que la melatonina. Los resultados se expresan de la misma manera que en la Fig. 11. \* $p < 0.05$  comparado con animales tratados con vehículo, ANOVA, prueba de Dunnett.

En conclusión, los resultados de esta serie experimental indican que la melatonina produce, a través del sistema GABAérgico central, una depresión crono y dosis-dependiente de la actividad locomotora del hámster (fase tardía). Es conocido que para la expresión de diversos efectos fisiológicos y endocrinos de la melatonina el momento de administración es crítico, existiendo en hámsteres un período de sensibilidad hacia el final de la tarde-comienzo de la noche y otro período menor precediendo al encendido de las luces (82,144,163,164,169). En los presentes experimentos hemos hallado sensibilidades máximas a las 2000 y a las 0400 h, pero no a las 2400 h, coincidiendo con las "ventanas" de sensibilidad neuroendocrina descritas para la hormona. Los resultados expuestos indican que la sensibilidad comportamental a la melatonina en hámsteres también muestra una variación diaria similar a la de los efectos fisiológicos de la hormona pineal.

### 3.2 Analgesia en el ratón

Entre los efectos extra-reproductivos de la hormona pineal melatonina se ha descrito una cierta actividad analgésica en diversos modelos experimentales. En ratones, la Px reduce la respuesta analgésica a la morfina, mientras que administración de melatonina (30-90 mg/kg) trae aparejada una analgesia reversible por naloxona (108). Esta última observación no ha sido siempre reproducible, y se ha sugerido una acción inespecífica de grandes dosis de melatonina, más que un efecto mediado por opioides (207). Incluso se ha descrito una actividad hiperalgésica de la melatonina en el ratón (208).

Otras observaciones avalan la existencia de una interacción significativa entre la pineal y mecanismos opioides cerebrales (77,132). La Px de ratas (120) o la manipulación del ciclo luz-oscuridad en hámsteres (119) modifica los niveles y ritmicidad circadiana de met-enkefalina en áreas hipotalámicas. También ha sido demostrado un efecto de la iluminación ambiental sobre los niveles hipotalámicos de  $\beta$ -endorfina (90).

Esta parte del estudio fue realizada para obtener información acerca de las propiedades analgésicas de la melatonina en el ratón. Se diseñó una serie de experimentos destinados a responder las siguientes preguntas: (a) ¿existe un ritmo diario de analgesia inducida por melatonina en el ratón?; (b) ¿puede este ritmo ser interrumpido por la exposición de los animales a luz constante?; (c) ¿pueden el antagonista opioide naloxona o el antagonista del receptor central de BZP Ro 15-1788 interferir con la analgesia inducida por la hormona pineal?

Distintos estudios previos han indicado la existencia de un ritmo diario en analgesia (87,111,122,127,137,164). La misma observación fue hecha en los presentes experimentos, resumidos en la Fig. 16, que demuestra el ritmo de analgesia en ratones controles tratados con vehículo. Hubo una significativa variación diaria en el umbral doloroso, con un aumento de la latencia en plancha caliente (TPR) durante la fase oscura del fotoperíodo. Los animales sin inyectar respondieron de la misma manera que aquéllos tratados con vehículo (datos no mostrados).

## RITMO DE ANALGESIA EN EL RATON

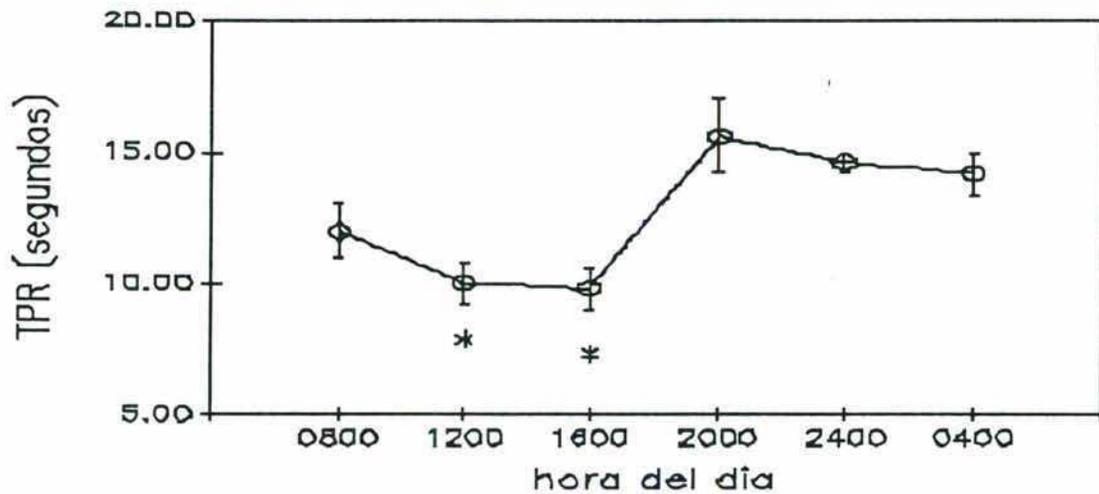


Fig. 16: Ritmo diario de analgesia en el ratón, determinado por la prueba de la plancha caliente ("hot plate"), como se describe en Material y Métodos. Los animales estaban expuestos a un fotoperíodo 12 L:12 O (luz de 0800 a 2000 h). Grupos de 10 animales recibieron i.p. inyecciones de vehículo (etanol:sc. fisiológica 1:4,  $100 \pm 1$ ) 30 minutos antes de realizar la prueba. Se muestran las medias  $\pm$  error estándar del tiempo de primera respuesta (TPR), determinado como se describe en Material y Métodos. \* $p < 0.05$  comparado con animales observados a las 2000 h, ANOVA, prueba de Tukey.

En la Fig. 17 se resume una serie de experimentos desarrollados para determinar la ritmicidad diaria de la analgesia inducida por melatonina. Los datos están expresados como el cociente entre los TPR de animales tratados con la hormona y con vehículo, determinados 30 min luego de las inyecciones. Se observó una máxima respuesta a la melatonina a las 2000 h. Esta actividad cronodependiente de la hormona se obtuvo con una dosis 20 mg/kg (Fig. 17) o de 40 mg/kg. No se obtuvo aumento del TPR luego de la administración de 5 mg/kg de melatonina (resultados no mostrados). Estos datos, que constituyen la primera descripción de un efecto cronodependiente de la analgesia inducida por melatonina, están de acuerdo con la variación circadiana reportada para el efecto de la hormona sobre otras funciones del SNC y que analizáramos en detalle en la Introducción del presente trabajo de tesis.

## ANALGESIA INDUCIDA POR MELATONINA

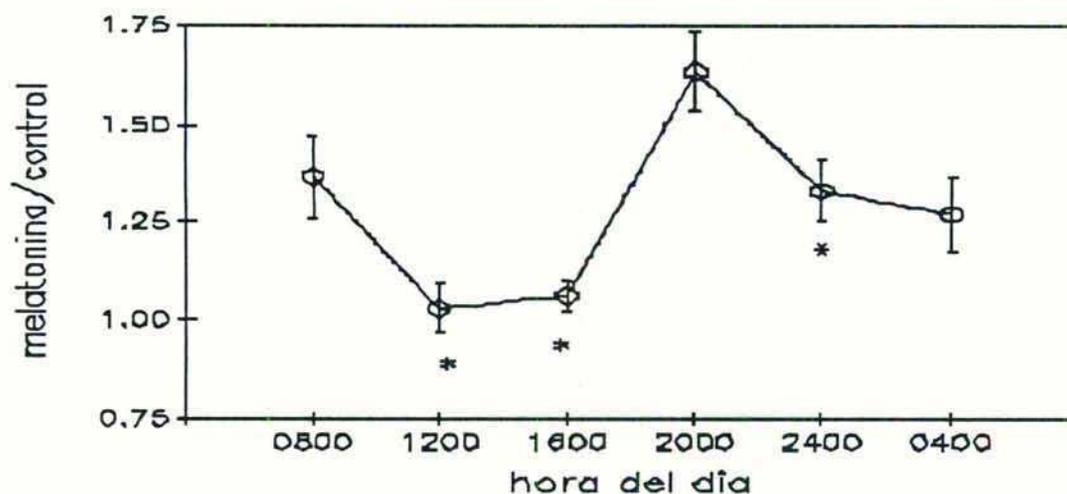


Fig. 17: Ritmo diario de analgesia inducida por melatonina en ratones. Grupos de 10 animales recibieron inyecciones i.p. de 20 mg/kg de melatonina o vehículo 30 minutos antes de realizar la prueba de la plancha caliente. Se muestran las medias  $\pm$  error estándar de los cocientes entre los TPR para animales tratados con melatonina y vehículo. \* $=p<0.05$ , ANOVA, prueba de Tukey.

## ANALGESIA INDUCIDA POR MELATONINA

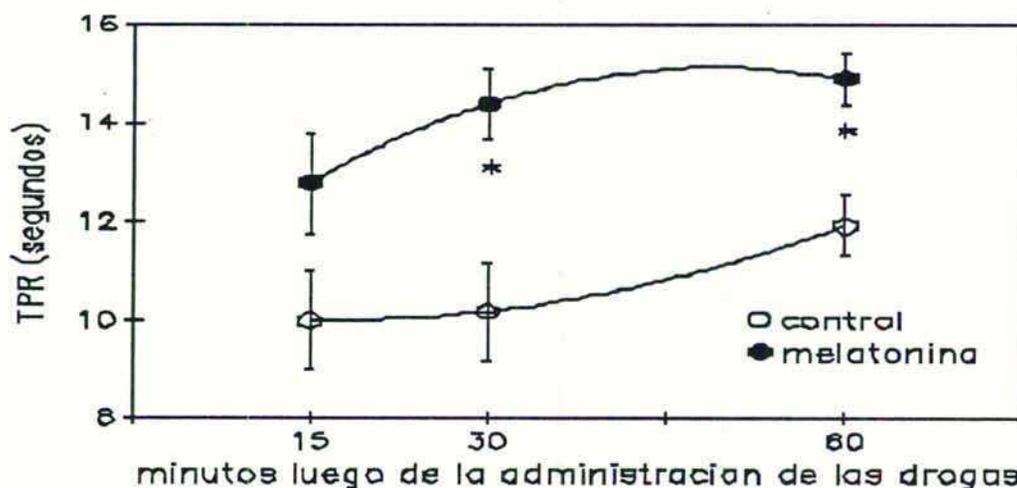


Fig. 18: Analgesia inducida por melatonina en el ratón, determinada por la prueba de la plancha caliente a las 2000 h. Grupos de 10 animales recibieron inyecciones i.p. de 20 mg/kg de melatonina o vehículo 15, 30 ó 60 minutos antes de realizar la prueba. Se muestran las medias  $\pm$  error estándar de los tiempos de primera respuesta (TPR). \* $=p<0.01$ , comparando ratones inyectados con melatonina y con vehículo, prueba t de Student.

La acción analgésica de la melatonina a las 2000 h fue caracterizada más detalladamente en el estudio de la Fig. 18. El

efecto máximo de la hormona fue hallado a los 30 min luego de su administración, con un efecto significativo también a los 60 min de administración. Los cocientes melatonina/control para la actividad analgésica fueron  $1.30 \pm 0.30$ ,  $1.44 \pm 0.08$  y  $1.27 \pm 0.03$ , luego de colocar a los animales en la plancha caliente a los 15, 30 o 60 min de administración, respectivamente.

Es posible que ocurriera una respuesta condicionada de lamido o salto al someter a los animales al test por segunda o tercera vez (esto es, a los 30 o 60 min de administradas las drogas). Para descartar tal posibilidad, los ratones fueron expuestos a la plancha caliente sólo una vez, a los 30 o 60 min de la administración de vehículo. Los resultados obtenidos indican que los valores de TPR no difieren significativamente de los de aquellos animales que hab2an experimentado la prueba previamente (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto de múltiples exposiciones en la prueba del "hot plate"

Número de exposiciones	TPR	
	30 min	60 min
Exposición única	12.2±1.8	12.4±1.4
Exposiciones múltiples	13.4±2.1	13.9±0.4

Efecto de exposiciones previas a la plancha caliente ("hot plate") sobre la respuesta algésica de ratones. Se muestran las medias  $\pm$  errores estándar (n=10 en cada grupo). Los umbrales algésicos fueron evaluados a las 1400 h en la forma descrita en la sección Material y Métodos. Los ratones fueron inyectados i.p. con vehículo y fueron puestos individualmente en la plancha caliente, una (a los 30 o 60 minutos de la inyecciones, grupo de exposición única) o dos veces (a los 15 y a los 30 minutos de la administración de vehículo, grupo de exposición múltiple). El tiempo de primera respuesta (TPR) fue registrado de la forma indicada en Material y Métodos. La prueba t de Student indicó ausencia de diferencias significativas en función de la exposición previa a la plancha caliente.

Con objeto de evaluar si la exposición de los animales a luz constante, una situación que afecta la ritmicidad circadiana, elimina la dependencia temporal del efecto de la melatonina se realizó el experimento mostrado en la Fig. 19. En este estudio grupos de ratones fueron mantenidos bajo un esquema de iluminación constante durante 5 días. Se realizaron pruebas de analgesia a las 1200 h y a las 2000 h, esto es, en los puntos horarios de mínimo y máximo efecto de la hormona bajo condiciones de iluminación normal. Las diferencias en TPR entre ambos horarios persistieron, hecho revelado por un ANOVA factorial ( $F= 19.96$ ,  $p < 0.0005$ ). Sin embargo, los resultados obtenidos indican una ausencia de diferencias significativas entre los TPR de animales tratados con melatonina y aquéllos inyectados con vehículo cuando se compararon ambos

horarios del experimento ( $F = 0.123$ ,  $p > 0.73$ ) (Fig. 20). Es decir, la exposición a luz permanente elimina las diferencias diarias en la acción de la melatonina.

### ANALGESIA INDUCIDA POR MELATONINA luz constante (LL)

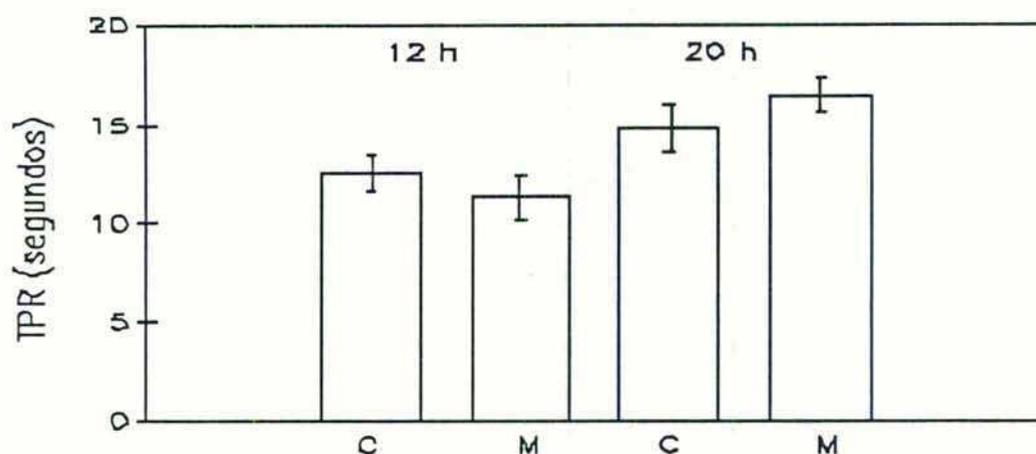


Fig. 19: Efecto de exposición continua (una semana) de ratones a luz constante (LL) sobre la analgesia inducida por melatonina, determinado a las 1200 o a las 2000 h. Grupos de 10 animales recibieron 20 mg/kg de melatonina (M) o vehículo (C) 30 minutos antes de realizar la prueba de la plancha caliente. Se muestran las medias  $\pm$  error estándar de los tiempos de primera respuesta (TPR).

Tabla 8. Efecto de Ro 15-1788 y naloxona sobre la analgesia inducida por melatonina.

Grupo experimental	TPR (s)		
	15 min	30 min	60 min
Vehículo	10.6 $\pm$ 0.5	13.9 $\pm$ 0.7	15.3 $\pm$ 0.8
Melatonina	19.2 $\pm$ 2.1*	17.2 $\pm$ 1.8**	21.4 $\pm$ 2.1*
Melatonina + Naloxona	12.5 $\pm$ 0.8	12.5 $\pm$ 1.2	15.2 $\pm$ 0.9
Melatonina + Ro 15-1788	11.4 $\pm$ 1.3	12.6 $\pm$ 0.8	15.3 $\pm$ 0.9
Naloxona	11.9 $\pm$ 0.5	14.9 $\pm$ 0.5	16.9 $\pm$ 0.4
Ro 15-1788	12.6 $\pm$ 0.8	11.4 $\pm$ 1.3	12.6 $\pm$ 0.8

Los animales fueron inyectados con 20 mg/kg de melatonina o vehículo i.p., 15, 30 o 60 minutos antes del test de la plancha caliente. La naloxona (10 mg/kg) fue administrada 5 minutos antes y el Ro 15-1788, 15 minutos antes que la melatonina o vehículo. Se expresan los resultados como medias desviación standard del tiempo de primera respuesta (FRT) registrado según se detalla en materiales y métodos ( $n = 10$  en cada grupo). \* $p < 0.05$  ANOVA a dos v2as, Test de Dunnett \*\* $p < 0.05$  ANOVA una vía, test de Dunnett. diferencias significativas comparadas con el grupo inyectado con vehículo.

En la Tabla 8 se resumen los resultados de un experimento diseñado para analizar el efecto de la naloxona o del Ro 15-1788 sobre la analgesia inducida por melatonina. Cuando se analiza el umbral doloroso a las 2000 h, tanto la naloxona como el Ro 15-1788 bloquearon la respuesta analgésica a la melatonina, sin poseer efectos "per se". En un experimento independiente se demostró una inducción significativa de la analgesia por parte del diazepam, 15-60 min luego de su administración. Este efecto fue bloqueado por Ro 15-1788 (en todos los intervalos de tiempo probados) y por naloxona (a los 15 y 30 min de administrada) (Tabla 9).

**Tabla 9. Efecto del Ro 15-1788 y la naloxona sobre la analgesia inducida por diazepam.**

Grupo experimental	FRT (s)		
	15 min	30 min	60 min
Vehículo	8.7 ± 0.4	8.3 ± 0.6	10.9 ± 1.2
Diazepam	14.4 ± 2.2*	15.9 ± 2.1*	15.4 ± 1.9**
Diazepam + naloxona	10.9 ± 1.1	12.5 ± 0.8	14.2 ± 0.9
Diazepam + Ro 15-1788	8.4 ± 0.7	11.2 ± 0.9	11.3 ± 0.9

Los animales fueron inyectados con 5 mg/kg de diazepam o vehículo i.p., 15, 30 o 60 minutos antes del test de la plancha caliente. La naloxona (5 mg/kg) o el Ro 15-1788 (10 mg/kg) fueron administrados i.p., 5 o 15 minutos antes que el diazepam respectivamente. Se expresan los resultados como la media desviación standard del tiempo de la primera respuesta (FRT), registrado según se detalla en materiales y métodos (n=10 en cada grupo). \*p< 0.05 ANOVA a dos vías, test de Dunnett; \*\*p< 0.05 ANOVA a una vía, test de Dunnett, diferencias significativas comparado con los animales inyectados con vehículo.

Debe hacerse notar que las dosis de melatonina necesarias para obtener analgesia en el ratón son bastante mayores que las necesarias para ejercer efectos neuroendocrinos. Pese a que no existen datos acerca de los niveles de melatonina luego de la administración sistémica de la hormona en el ratón, datos de nuestro laboratorio indican que, en la rata, los niveles hipotalámicos de melatonina (medidos por cromatografía líquida de alta presión) alcanzados 20 min luego de la administración i.p. de 5 o 10 mg/kg de hormona fueron de  $3.1 \pm 0.5$  y  $6.8 \pm 0.9$  ng/mg de hipotálamo mediobasal (H. E. Chuluyan, B. I. Kanterewicz, D. P. Cardinali, resultados inéditos).

El sitio de acción de la melatonina para ejercer sus efectos analgésicos es desconocido. Un candidato obvio es el sistema opioide central, dado que la Px o la administración de melatonina causa

modificaciones en el contenido de met-enkefalina cerebral (90,119,120). La inyección de melatonina también reduce los niveles de  $\beta$ -endorfina sanguínea e impide el efecto liberador de LH inducido por naloxona en humanos (77,132). Otro antagonista opiáceo, la naltrexona, bloquea el efecto inmunoestimulador de la melatonina en ratones (137).

Nuestros resultados apoyan la existencia de un efecto de la melatonina sensible a naloxona, dado que el antagonista opioide bloqueó totalmente los efectos de la hormona. El vínculo propuesto entre la melatonina y el sistema serotoninérgico central (6,89) y el rol que las neuronas serotoninérgicas juegan en el control de la analgesia opioide endógena (127) sugiere que ambos mecanismos pueden estar ligados.

Como en el caso de los experimentos de otros efectos de la melatonina, nuestros resultados son compatibles con la hipótesis de que las sinapsis GABAérgicas centrales pueden ser un blanco para la actividad de la melatonina, ya que el antagonista del sitio receptor central de BZP (ligado al receptor GABA A), Ro 15-1788 fue eficaz para prevenir la acción de la melatonina. En nuestros experimentos, el agonista del sitio receptor central de BZP diazepam indujo un aumento en la latencia en la prueba de plancha caliente, efecto también bloqueado por naloxona y Ro 15-1788. Es de destacar que existe evidencia experimental acerca del bloqueo por naloxona in vitro de la actividad postsináptica del GABA (67).

### 3.3 Efecto anticonvulsivante en el hámster

La importancia de la glándula pineal y la melatonina en la regulación y estabilización de la actividad eléctrica cerebral ha sido demostrada en numerosas situaciones experimentales (4,6,17,19,22,67,93,108,160, 171,188,197,207). Por ejemplo, distintos trabajos farmacológicos han demostrado que la melatonina potencia la sedación inducida por barbitúricos o hidrato de cloral en ratones (207) y previene las convulsiones inducidas por ouabaína en la rata (108).

La administración sistémica de melatonina disminuye la inducción (evocada sensorialmente) de estados convulsivos luego de la aplicación local de diversos agentes epileptogénicos en el cerebro de la rata (79). Asimismo, la hormona pineal reduce el intervalo post-descarga luego de inducción eléctrica de convulsiones en amígdala de rata, y modifica las escalas e índices convulsivos luego de la administración de pentilentetrazol a valores similares a los

producidos por fenobarbital o diazepam (4). En babuinos fotosensibles, la melatonina disminuye el umbral convulsivo frente a estimulación lumínica (22), mientras que en meriones pinealectomizados la hormona presentó actividad antiepiléptica (171). En todos estos estudios las propiedades anticonvulsivantes de la melatonina fueron examinadas a tiempos únicos, en horas del día.

Entre los muchos ritmos circadianos de importancia clínica, deben considerarse las repuestas tanto terapéuticas como tóxicas a una gran variedad de drogas de acción central (24,25,76,128,129,162,179,180). Estos ritmos en el efecto y toxicidad de drogas pueden depender de la vía de administración y dosis empleada (150,151). En el caso de de drogas convulsivantes como el pentilentetrazol (76) o anestésicos locales (24,25), la actividad medida en ratas a lo largo de un ciclo de 24 h mostró un máximo nocturno. En el estudio que sigue fue empleado como agente convulsivante el ácido 3-mercaptopropiónico (3-MPA), un inhibidor selectivo de la GAD, enzima de síntesis del GABA (134). El mecanismo de acción del 3-MP para inducir convulsiones es el decremento en los niveles de GABA a nivel sináptico (85,91,134,212).

Los objetivos de esta parte del trabajo de tesis fueron: (a) determinar si el efecto anticonvulsivante de la melatonina exhibe variación diaria en hámsteres; (b) analizar la capacidad del Ro 15-1788 para antagonizar los efectos anticonvulsivantes de la melatonina.

La actividad epileptogénica de distintas dosis de 3-MPA a las 1300 o 2000 h se muestra en la Fig. 20. Como en el caso numerosos fenómenos convulsivos (24,25,76,88,136,200) el 3-MPA exhibió una actividad significativamente mayor durante la noche en el hámster.

RESPUESTAS CONVULSIVAS MAXIMAS  
INDUCIDAS POR 3-MPA

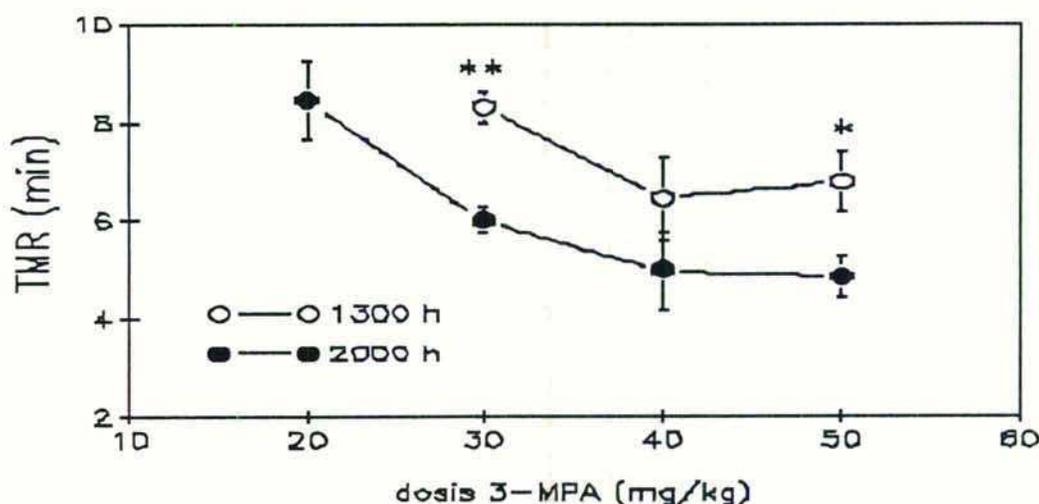


Fig. 20: Actividad epileptogénica de diferentes dosis de 3-MPA en hámsteres, determinada a las 1300 o a las 2000 h. El 3-MPA (10-60 mg/kg) fue administrado i.p., y los animales fueron inmediatamente puestos en jaulas plásticas, y su comportamiento fue registrado a lo largo de 15 minutos como se describe en Material y Métodos. Se muestran las medias  $\pm$  error estándar (12 animales por grupo) de los tiempos de máxima respuesta (TMR), esto es, el tiempo necesario para obtener una respuesta convulsiva completa. Los asteriscos designan diferencias significativas (\*\*= $p < 0.01$ ; \*= $p < 0.2$ ) comparado con animales que recibieron la menor de las dosis de 3-MPA en el mismo horario, prueba t de Student.

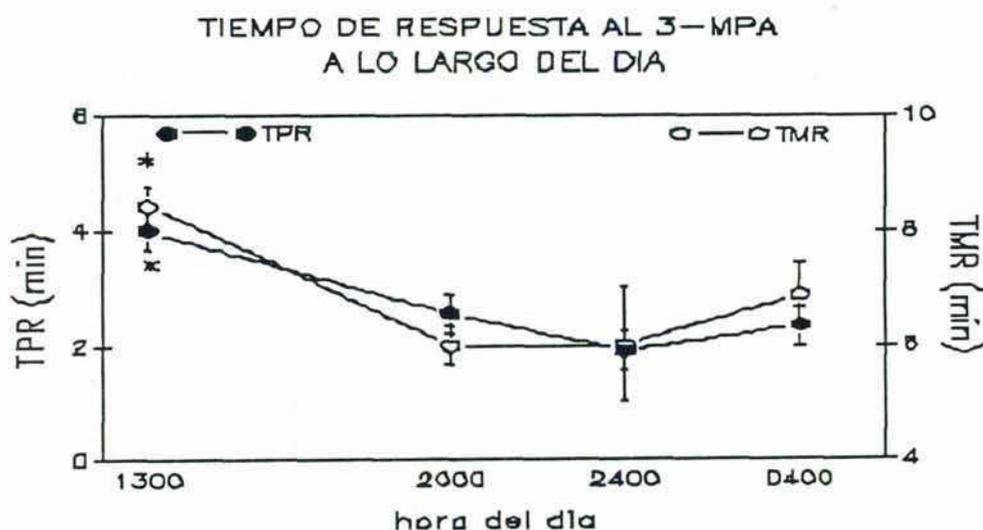
El intervalo de tiempo necesario para alcanzar máxima respuesta (TMR) fue significativamente menor a las 2000 h. La Tabla 10 resume la determinación de las DE 50 para 3-MPA (como porcentaje de animales exhibiendo respuesta convulsiva) en ambos horarios. La actividad convulsiva del 3-MPA difirió significativamente entre las 1300 y las 2000 h (ED 50= 39.7 y 24.9 mg/ kg, respectivamente).

La Fig. 21 muestra los valores de TPR y TMR para convulsiones inducidas por 3-MP en cuatro horarios diarios. Los valores nocturnos fueron menores que los diurnos para ambos parámetros examinados. Estos resultados pueden interpretarse como un incremento de la sensibilidad al 3-MPA en los tejidos blanco durante la fase de oscuridad; una explicación alternativa es la de una variación en la farmacocinética del 3-MPA a lo largo del día, como ya fue descrito para otras drogas de acción central (150,151).

**Tabla 10. Respuesta convulsiva al 3-MPA en hámster, determinada a las 13.00 y a las 20.00 h.**

Dosis (mg/kg)	% de animales con respuesta	
	13.00 h	20.00 h
10	0	0
20	0	40
30	20	60
40	40	80
50	80	100
60	100	100
ED50 (mg/kg)	39.7	24.9
Intervalo de confianza 95%	30.4-48.1	15.1-33.5

Se indican los porcentajes de hámster que respondieron al 3-MPA ( $n=10$  en cada grupo). El 3-MPA (10-60 mg/kg) fue inyectado i.p. y los animales fueron colocados en forma inmediata en cajas de plástico y su comportamiento fue registrado durante 15 minutos según se detalla en materiales y métodos. El ED50 fue calculado por el método de Litchfield y Wilcoxon (1949); el valor estadístico experimental calculado a partir de los datos fue de 1.5927, que resultó mayor que el valor crítico teórico: 1.5895 ( $p < 0.05$ )



**Fig. 21:** Ritmicidad diaria de la inducción de convulsiones por 3-MPA en hámsteres observados a cuatro horarios distintos, como se describe en Material y Métodos. Grupos de 12 animales recibieron una inyección i.p. de 30 mg/kg de 3-MPA y su comportamiento fue registrado durante 15 minutos. Se muestran las medias  $\pm$  error estándar de los tiempos de primera (TPR) y máxima respuesta (TMR). \* $p < 0.05$  comparado con animales inyectados a las 1300 h, ANOVA, prueba de Dunnett.

Las propiedades anticonvulsivantes de la melatonina han sido examinadas en babuinos (15), roedores (4,17,79,93,108) y en el hombre (8). En todos estos estudios la actividad de la hormona fue

examinada sólo durante las horas de luz. La Fig. 22 ilustra el aumento del umbral para la actividad convulsiva inducido por una dosis de 50 mg/kg de melatonina. En base a los resultados del estudio de las DE 50 para el 3-MPA (Tabla 10) se utilizaron diferentes dosis de convulsivante a fin de lograr una respuesta homogénea en los horarios examinados (40 mg/kg a las 1300 h, 30 mg/kg a las 2000, 2400 y 0400 h). Los valores de TPR (expresados como el cociente entre los valores de animales tratados con melatonina o vehículo) fueron significativamente incrementados por la melatonina. El efecto de la melatonina tuvo una variación diaria, con valores máximos a las 2000 h. Los valores de TMR de aquellos animales que alcanzaron estados de convulsión máxima no fueron afectados significativamente por la melatonina (Fig. 20).

#### ACTIVIDAD ANTICONVULSIVANTE DE LA MELATONINA

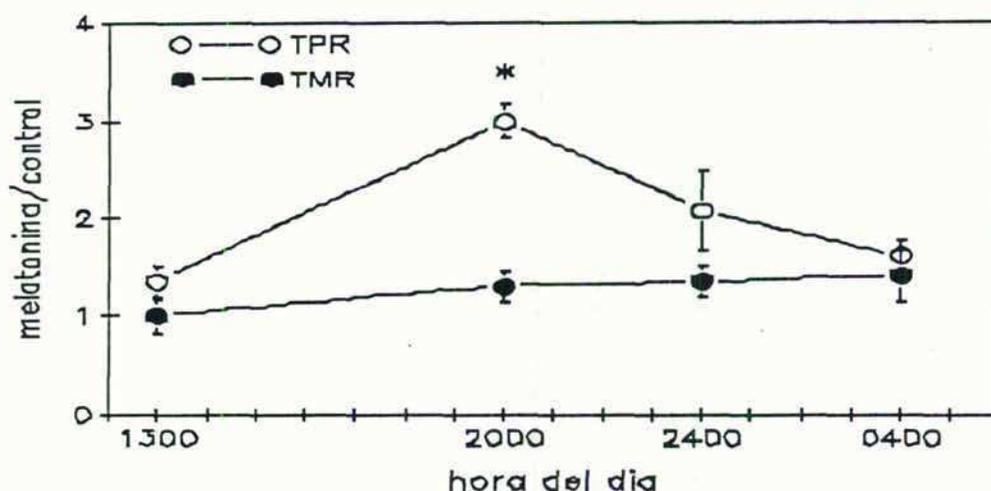


Fig. 22: Actividad anticonvulsivante de la melatonina sobre convulsiones inducidas por 3-MPA. Sobre la base del estudio de las DE50 para el 3-MPA, se utilizaron dosis apropiadas del convulsivante para producir una respuesta homogénea: 40 mg/kg de 3-MPA a las 1300, y 30 mg/kg de 3-MPA a las 2000, 2400 y 0400 h. La melatonina (50 mg/kg) o el vehículo fueron administrados 20 minutos antes que el 3-MPA. Se muestran las medias  $\pm$  error estándar del cociente melatonina/vehículo para tiempo de primera (TPR) o máxima respuesta (TMR), definidos en Material y Métodos. Los valores de TMR computados corresponden a los animales tratados con melatonina que exhibieron máxima respuesta convulsiva (ver Tabla 10). \*= $p < 0.05$  comparado con animales observados a las 1300, 2400 o 0400 h, ANOVA, prueba de Dunnett.

En la Tabla 11 se resume el porcentaje de animales que exhibió respuesta convulsiva máxima luego de la administración de 3-MPA (40 mg/kg a las 1300 h, 30 mg/kg a las 2000, 2400 y 0400 h) o de melatonina (50 mg/kg) más 3-MPA. Sobre la base de este parámetro, la hormona tuvo un efecto anticonvulsivante claro sólo a las 2000 h.

**Tabla 11 . Efecto de la melatonina en hámster sobre la respuesta convulsiva al 3-MPA examinada a lo largo del día.**

Hora del día	% de animales con respuesta		valor de P
	3-MPA	Melatonina + 3-MPA	
13.00	68	69	NS
20.00	75	46	<0.01
24.00	83	75	NS
04.00	74	69	NS

Se indica el porcentaje de animales que respondieron al 3-MPA (n=12 en cada grupo). La melatonina (50 mg/kg) o el vehículo fue administrado 20 minutos antes que el 3-MPA. El 3-MPA fue inyectado i.p., en dosis de 30 mg/kg (20.00, 24.00 o 04.00 h) o 40 mg/kg ( a las 13.00 h); los animales fueron ubicados en forma inmediata en cajas de plástico y su comportamiento fue registrado durante 15 minutos según se detalla en materiales y métodos. La significación estadística fue calculada por el método de chi-cuadrado.

**Tabla 12 . Efecto del Ro 15-1788 sobre la actividad anticonvulsivante de la melatonina, examinado a las 20.00 h**

Tratamiento	% de animales con convulsiones máximas	valor de P
3-MPA (30 mg/kg)	73	
3-MPA + Melatonina	44.7	< 0.01
3-MPA + Melatonina + Ro 15-1788	77	NS
3-MPA + Ro 15-1788	68.3	NS

Se indica el porcentaje de animales que respondieron al 3-MPA (n=12 en cada grupo). La melatonina (50 mg/kg) o su vehículo fue administrada 20 minutos antes que el 3-MPA y el Ro 15-1788 (50 mg/kg) o su vehículo fue inyectado i.p., 15 minutos antes que la melatonina. Los animales fueron ubicados en cajas de plástico en forma inmediata luego de la administración de 3-MPA y su comportamiento fue examinado durante 15 minutos, como se describe en materiales y métodos. La significación estadística para la diferencia entre el grupo control y cada grupo experimental fue calculada por el análisis de chi-cuadrado.

La Tabla 12 resume los resultados de los experimentos destinados a examinar la relación de estos efectos de la melatonina con el receptor central de BZP. La administración de Ro 15-1788 en una dosis de 50 mg/kg antagonizó totalmente la acción anticonvulsivante de la melatonina.

En conjunto, los resultados correspondientes a esta sección indican que las convulsiones inducidas por 3-MP, así como la atenuación de las mismas por parte de la melatonina, son máximas durante la noche. La hormona pineal tuvo tanto un efecto cualitativo (decremento significativo del porcentaje de animales que alcanzan estados convulsivos máximos) como cuantitativo (aumento de los valores de TPR). Esta atenuación por parte de la melatonina de las convulsiones inducidas por 3-MP resultó ser sensible a la acción del Ro 15-1788. Nuestros resultados indican que en hámsteres mantenidos en un fotoperíodo 14 h luz: 10 h oscuridad la actividad anticonvulsiva máxima de la melatonina ocurrió hacia el comienzo de la noche, coincidiendo con las ventanas de sensibilidad para otros efectos de la hormona (102,182,204,205,211).

Como en el estudio de la sección B, la administración del bloqueante del receptor central de BZP Ro 15-1788 antagonizó la actividad anticonvulsiva de la melatonina en relación al 3-MPA. A semejanza de otros estados convulsivos vinculados al bloqueo del receptor tipo A del GABA (p.ej., por picrotoxina, 48) el Ro 15-1788 careció de efectos "per se". Nuestros resultados apoyan la noción de que las BZP y la melatonina comparten un mecanismo central común, la acción alostérica sobre la actividad de los receptores GABAérgicos tipo A.

Es de destacar que en un trabajo previo (93) fue observado que la melatonina (200 mg/kg, i.p.) aumentaba significativamente el umbral de convulsiones inducidas por pentilentetrazol, efecto no antagonizado por Ro 15-1788 (10 mg, i.p.), administrado 45 min después de la melatonina. Una diferencia sustancial entre dichas experiencias y los datos aquí presentados es el esquema temporal de administración del bloqueante. Parece razonable que, siendo la melatonina un compuesto de vida media corta y metabolismo cerebral temprano (31), deba administrarse el Ro 15-1788 previamente, o a lo sumo en forma conjunta, a fin de obtener una respuesta detectable.

### 3.4 Efecto ansiolítico en la rata

De acuerdo a la hipótesis central de este trabajo de tesis, la melatonina podría ejercer sus efectos cronodependientes a través de alguna modificación en el sistema GABAérgico central, particularmente mediada por el sitio receptor central de BZP asociado al receptor GABAérgico de tipo A.

Las pruebas clásicas para los efectos comportamentales de las BZP son aquellas en las que se determina su efecto ansiolítico y, por extensión, "ansiolicidad" o "ansiogenicidad" de cualquier tipo de drogas. Dentro de las numerosas pruebas para ansiolíticos merecen ser mencionadas las siguientes (94,95);

i- interacción social, que mide la cantidad de comportamientos estereotípicos tales como olfacción, posturas y forcejeos entre dos animales machos en una jaula de experimentación. El nivel de interacción se reduce ante un ambiente novedoso o al aumentar la intensidad de luz; una droga ansiolítica aumenta el grado de interacción (82);

ii- pasaje de un compartimento iluminado a uno más oscuro. Se utiliza una "arena" de dos compartimentos, uno oscuro y uno claro. La conducta natural de las ratas es dirigirse al compartimento oscuro, mientras que los ansiolíticos aumentan los cruces hacia, y el tiempo pasado en, la zona clara (60);

iii- pruebas de comportamiento exploratorio;

iv- respuesta de espanto ("startle response") potenciada por la simultánea presentación de ruido con luz intensa, la cual fue condicionada previamente por un choque eléctrico (62);

v- pruebas de condicionamiento operante (226);

vi- prueba de conflicto de bebida (test de Vogel), en el que se presenta un pico metálico para bebida de agua a ratas sedientas, al mismo tiempo que se administran por contacto con el pico del bebedero descargas eléctricas débiles. Las drogas ansiolíticas reducen el nivel del conflicto, llevando a las ratas a beber superando el estímulo aversivo (226);

vii- prueba del laberinto en cruz elevada (168), consistente en pares de brazos en oposición, uno de los cuales está cerrado por paredes y el otro no. Las ratas tienden a quedarse en las ramas cerradas, mientras que los ansiolíticos aumentan, en relación a las ramas abiertas, el número total de entradas, el número de entradas y el tiempo pasado en ellas.

Existen evidencias de que la melatonina comparte algunas de las propiedades comportamentales de las drogas ansiolíticas. Neville y Mc Naughton (152) demostraron que la hormona pineal actuaba en forma similar a las BZP en la adquisición, pero no en el desarrollo,

de un paradigma de condicionamiento operante (refuerzo diferencial a bajas tasas de respuestas).

Sin embargo, no existen pruebas directas sobre el posible efecto ansiolítico de la melatonina, así como tampoco sobre la relación de este efecto con el sistema GABAérgico central. Para determinar dichos efectos escogimos la prueba del laberinto en cruz elevado, ya que es un método sencillo de llevar a cabo e interpretar, y porque ha sido ampliamente validado para la rata (168). Por otra parte, también dentro de esta serie de experimentos, se determinó la posible variación temporal del efecto ansiolítico del derivado BZP diazepam.

En la Fig. 23 se observa que tanto la melatonina como el diazepam elevaron el número de entradas totales en el laberinto en cruz elevado en forma significativa (ANOVA,  $F=7.691$ ,  $p<0.001$ ), sin considerar la hora del estudio. Por otra parte, los animales controles no exhibieron una variación diaria en este parámetro.

#### ENTRADAS TOTALES A LAS RAMAS DEL LABERINTO

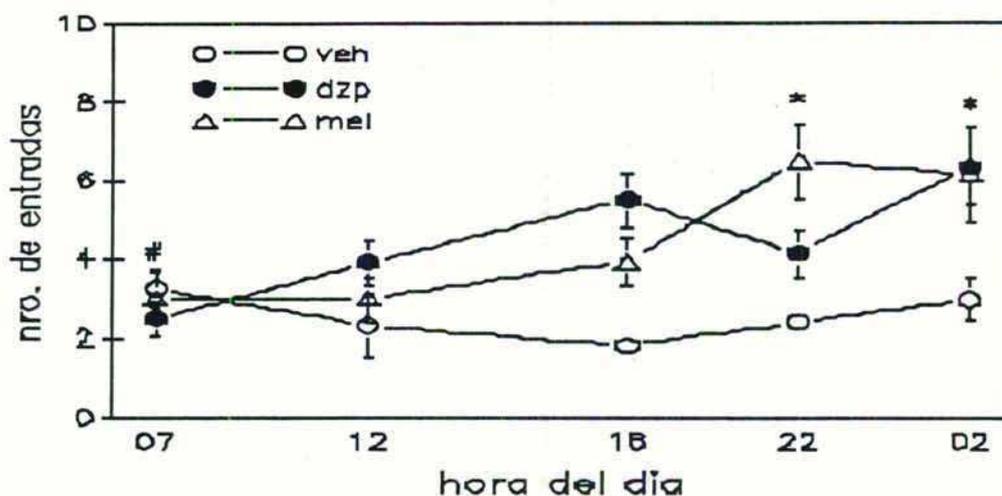


Figura 23: Ritmo de entradas totales al laberinto en cruz elevado

Se muestra el número de entradas de los animales a ambas ramas del laberinto en cruz elevado en un período de 5 min, para grupos tratados con vehículo, melatonina (1 mg/Kg) o diazepam (0.5 mg/kg). (\*)  $p<0.05$  vs 0700, 1200 o 1800 h (melatonina), prueba de mínima diferencia significativa. (#)  $p<0.05$  vs 1800 o 0200 h (diazepam), prueba de Tukey.

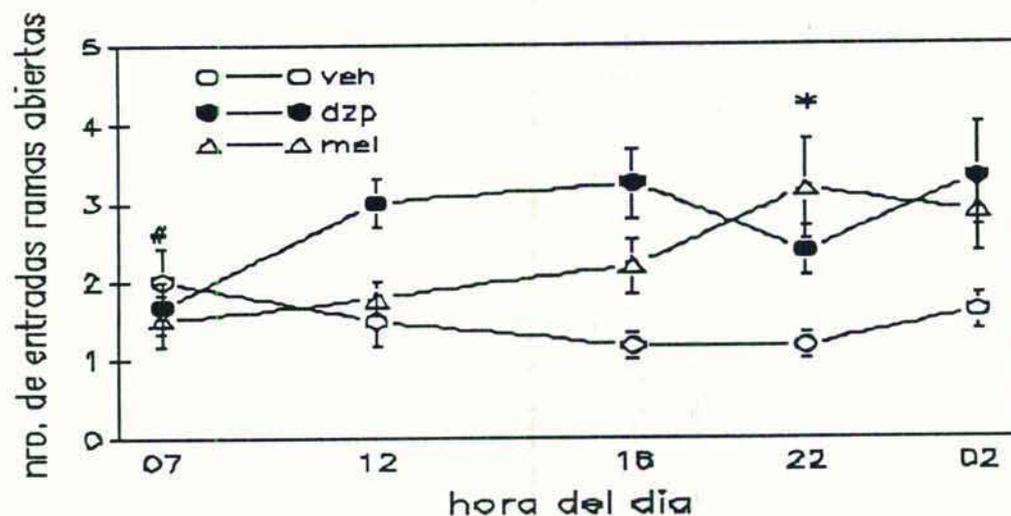
Tanto las ratas que recibieron diazepam como aquellas que fueron inyectadas con melatonina exhibieron un ritmo en este comportamiento exploratorio. En el caso de la BZP, la variación

diaria ( $F=4.16$ ,  $p<0.008$ ) fue explicada por el mínimo efecto hallado a las 0700 h ( $p<0.05$  comparado con las 1800 y las 0200 h, prueba de Tukey). La melatonina exhibió un ritmo diario en la inducción de este comportamiento ( $F=4.21$ ,  $p<0.007$ ), basado en una clara diferencia entre las horas diurnas y nocturnas (0700, 1200 y 1800 vs 2200 y 0200,  $p<0.05$ , prueba de mínima diferencia significativa).

Tanto las ratas que recibieron diazepam como aquellas que fueron inyectadas con melatonina exhibieron un ritmo en este comportamiento exploratorio. En el caso de la BZP, la variación diaria ( $F=4.16$ ,  $p<0.008$ ) fue explicada por el mínimo efecto hallado a las 0700 h ( $p<0.05$  comparado con las 1800 y las 0200 h, prueba de Tukey). La melatonina exhibió un ritmo diario en la inducción de este comportamiento ( $F=4.21$ ,  $p<0.007$ ), basado en una clara diferencia entre las horas diurnas y nocturnas (0700, 1200 y 1800 vs 2200 y 0200,  $p<0.05$ , prueba de mínima diferencia significativa).

La Fig. 24 muestra el ritmo de entradas a las ramas abiertas a lo largo del día para grupos de animales tratados con vehículo (DMSO 50%), diazepam 0.5 mg/kg o melatonina 1 mg/kg. Como fuera ya mencionado (ver Métodos) el parámetro normalmente utilizado como índice del efecto del efecto ansiolítico de una droga en la prueba del laberinto en cruz elevado es el porcentaje de entradas de los animales a las ramas abiertas, con respecto a las entradas totales. Sin embargo, dado que en nuestras condiciones experimentales el número de entradas totales fue muy bajo (como se puede observar, lamentablemente para este tesista, en la Fig. 23), se optó por utilizar como parámetro del grado de ansiedad de las ratas el número absoluto de entradas a las ramas abiertas.

## EFECTO ANSIOLITICO DE LA MELATONINA Y EL DIAZEPAM



**Figura 24:** Ritmo de entradas a las ramas abiertas. Se muestra la media  $\pm$  E.S. del número de entradas a las ramas abiertas del laberinto en cruz elevada, para los mismo grupos de animales que los representados en la Fig. 23. (\*)  $p < 0.05$  vs 0700 h (melatonina), prueba de mínima diferencia significativa). (#)  $p < 0.05$  vs 1800, 2200 o 0200 h (diazepam), prueba de intervalos de confianza.

El grupo de animales que recibió el vehículo no mostró una variación diaria en el parámetro considerado ( $F=1.512$ ,  $p > 0.2$ ). Por otra parte, cuando se consideró el efecto de tratamiento independientemente de las horas de administración de las drogas, se comprobó que los grupos que recibieron diazepam o melatonina entraron significativamente más veces a las ramas abiertas del laberinto ( $F=10.73$ ,  $p=0.0001$ ). Tanto el grupo que recibió la BZP como el que se le administró melatonina tuvieron variaciones diarias en su efecto ansiolítico (para el diazepam:  $F=3.521$ ,  $p < 0.02$ ; para la melatonina,  $F=3.176$ ,  $p < 0.03$ ). El diazepam tuvo un efecto mínimo (no llegó a diferenciarse del control) a las 0700 h ( $p < 0.05$ , prueba de intervalos de confianza), mientras que la melatonina fue solamente activa en los horarios nocturnos, encontrándose una máxima diferencia entre los horarios de las 2200 h y las 0700 h ( $p < 0.056$ , prueba de mínima diferencia significativa). En los horarios correspondientes a la oscuridad la hormona pineal (1 mg/kg) mostró la misma potencia farmacológica que el diazepam (0.5 mg/kg).

A continuación se realizó un estudio más detallado de la actividad de la hormona en los horarios de mayor y menor efecto neuroendocrino (y de otros parámetros comportamentales estudiados en esta tesis), esto es, en la mitad de la fase de luz (1200 h) y cerca del momento de transición L:O (1800 h). La Fig. 25 muestra el número total de entradas a ambas ramas del laberinto en función

del momento del día y de los distintos tratamientos. Puede considerarse a este parámetro como indicativo de la actividad exploratoria de los animales.

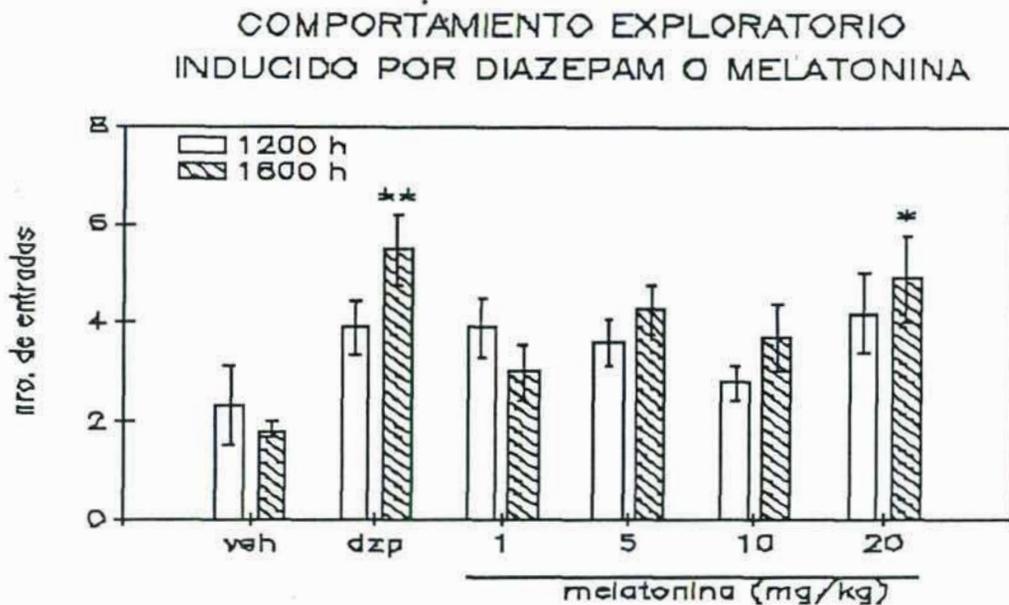


Figura 25. Efecto de la melatonina y el diazepam sobre las entradas totales en el laberinto en cruz elevado a las 1200 y a las 1800 h. (\*)  $p < 0.05$ , prueba de Dunnett, comparado con los grupos controles a los mismos horarios.

Debido a que se trató de animales "vírgenes" de tratamiento, no es sorprendente la ausencia de diferencias significativas en el comportamiento exploratorio (inducido por el ambiente novedoso) de los animales controles a las 1200 o a las 1800 h. Debe notarse que, habiéndose realizado numerosos experimentos con la metodología descrita, los valores registrados (número de entradas, entradas a las ramas abiertas, porcentaje de tiempo en rama abierta) son notoriamente menores que los encontrados en la literatura (134). Esto dificulta en parte el estudio de la posible modulación por parte de las drogas estudiadas.

Si bien hubo un aumento general de la actividad exploratoria inducido por diazepam (0.5 mg/kg) o melatonina (1-20 mg/kg) en ambos horarios, las diferencias encontradas a las 1200 h no llegaron a ser significativas ( $F = 1.067$ ,  $p > 0.05$ , ANOVA). En cambio, las variaciones en el número total de entradas realizadas por los animales a las 1800 h fueron significativas ( $F = 3.33$ ,  $p < 0.05$ , ANOVA). La inducción del comportamiento exploratorio (comparado con los grupos controles) fue significativa tanto para el caso del diazepam como de la melatonina en la dosis de 20 mg/kg ( $p < 0.05$ , prueba t de Dunnett de 1 cola) (Fig. 25).

El efecto ansiolítico de las drogas en estos horarios fue nuevamente caracterizado por el número de entradas a las ramas abiertas del laberinto, tal como se expresa en la Fig. 26. Tanto a las 1200 h ( $F= 3.79$ ,  $p < 0.01$ , ANOVA) como a las 1800 h ( $F= 4.28$ ,  $p < 0.01$ , ANOVA) hubo un efecto general significativo de los tratamientos. En el caso de los experimentos realizados al mediodía, la variación se explica exclusivamente por el efecto ansiolítico del diazepam ( $p < 0.05$ , prueba t de Dunnett de 2 colas), mientras que tanto la BZP ( $p < 0.05$ , prueba t de Dunnett de 2 colas) como 20 mg/kg de melatonina ( $p < 0.05$ , prueba t de Dunnett de 1 cola) dan cuenta del efecto observado a las 1800 h.

### EFFECTO ANSIOLITICO DE LA MELATONINA Y DEL DIAZEPAM

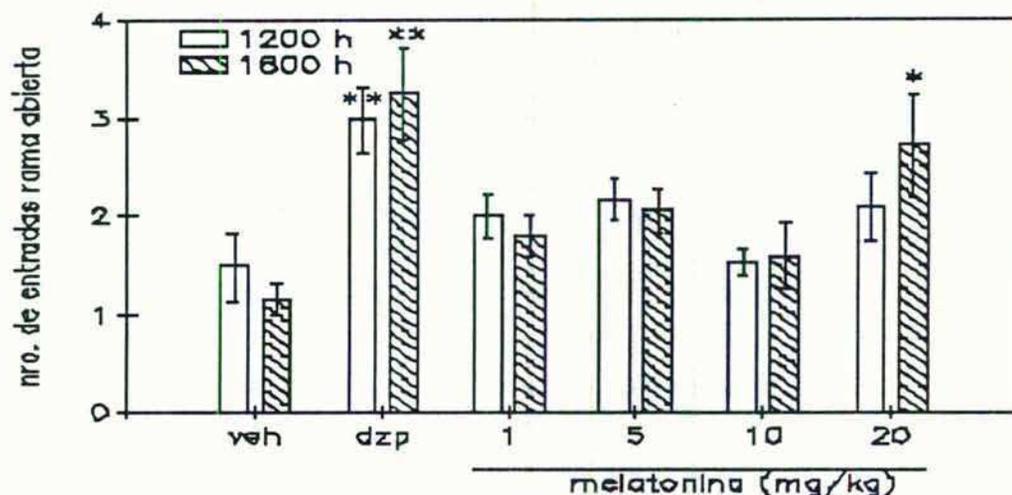


Figura 26. Efecto de la melatonina y el diazepam sobre las entradas a las ramas abiertas en el laberinto en cruz elevado a las 1200 y a las 1800 h. (\*)  $p < 0.05$ , prueba de Dunnett, comparado con los grupos controles a los mismos horarios.

En cuanto al porcentaje de tiempo pasado por los animales en las ramas abiertas del laberinto, se detectó una tendencia hacia valores mayores en el caso de tratamiento con BZP o melatonina, pero la gran dispersión interindividual produjo diferencias no significativas (resultados no mostrados).

La siguiente serie de experimentos fue realizada para determinar la relación que el efecto -tanto exploratorio como ansiolítico- de la melatonina tiene con el sistema GABAérgico central. Para ello, se administró Ro 15-1788 (5 mg/kg) 15 min antes de la melatonina (1 mg/kg). A los 20 min de la segunda inyección se colocó a los animales individualmente en el laberinto y se registró su comportamiento. Los resultados de experimentos realizados a las 1800 h se muestran en la Fig. 27.

Se observaron efectos globales tanto sobre el número total de entradas ( $F= 4.139$ ,  $p < 0.05$ , ANOVA) como sobre el número de entradas a las ramas abiertas ( $F= 4.558$ ,  $p < 0.01$ , ANOVA). En ambos casos los efectos de tratamiento pueden ser explicados exclusivamente por el efecto de la melatonina ( $p < 0.05$ , prueba t de Dunnett de 2 colas para efecto exploratorio y de 1 cola para efecto ansiolítico), ya que el flumazenil no tuvo efecto intrínseco, mientras que bloqueó completamente el de la melatonina: el grupo que recibió la combinación de las drogas no difiere de los controles ( $p < 0.05$ , prueba de Tukey).

La Fig. 28 muestra la tendencia de la melatonina a aumentar el porcentaje del tiempo total pasado en las ramas abiertas, así como el bloqueo que el Ro 15-1788 ejerce sobre este efecto. Nuevamente, debido a la gran dispersión entre los datos, las diferencias distan de ser significativas ( $F= 1.56$ ,  $p > 0.05$ , ANOVA).

#### EFFECTO ANSIOLITICO DE LA MELATONINA: ANTAGONISMO POR Ro 15-1788

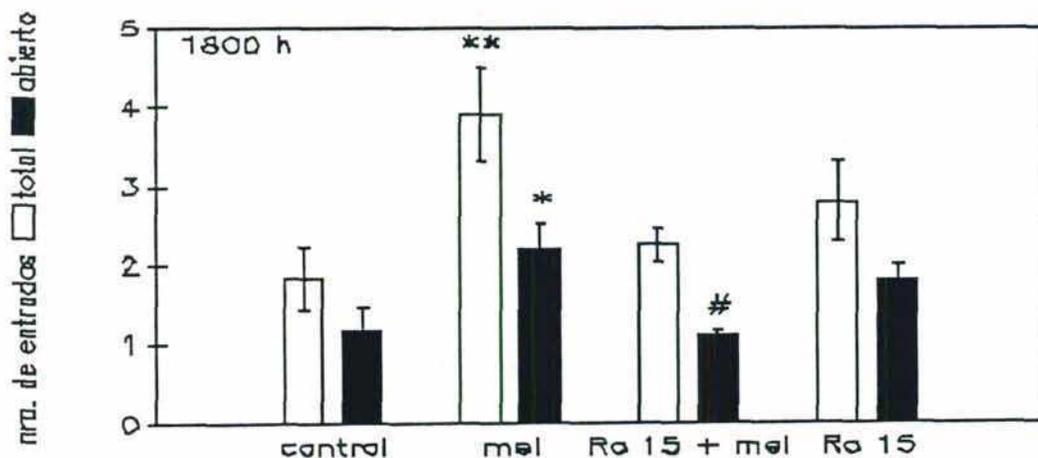


Figura 27. Antagonismo por flumazenil del efecto ansiolítico de la melatonina a las 1800 h: entradas totales y a las ramas abiertas. (\*)  $p < 0.05$ , prueba de Dunnett, comparado con el grupo control.

### EFFECTO ANSIOLITICO DE LA MELATONINA: TIEMPO EN RAMAS ABIERTAS

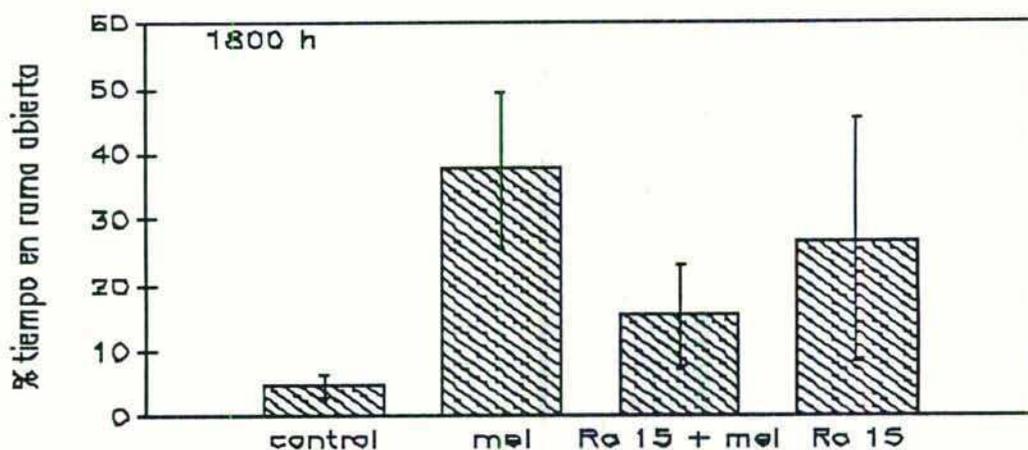


Figura 28. Antagonismo por flumazenil del efecto ansiolítico de la melatonina a las 1800 h: porcentaje de tiempo en las ramas abiertas

En la Fig. 29 se observa que el efecto ansiolítico máximo de la melatonina (es decir, aquel hallado luego de 4 horas de oscuridad, a las 2200 h) también fue pasible de bloqueo por flumazenil, existiendo una variación significativa entre los grupos (ANOVA,  $F= 3.66$ ,  $p<0.031$ ), claramente explicable por el efecto ansiolítico de la melatonina ( $p<0.05$ , prueba de Dunnett), ya que ni el grupo que recibió el bloqueante ni el que recibió la combinación hormona-bloqueante difirieron de los controles ( $p>0.05$ , prueba de Dunnett).

### EFFECTO ANSIOLITICO DE LA MELATONINA: ANTAGONISMO POR FLUMAZENIL

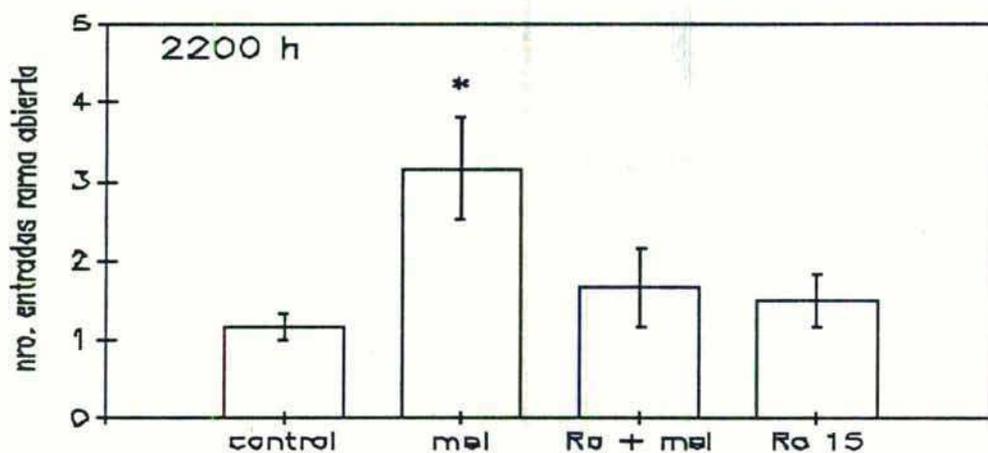


Figura 29. Antagonismo por flumazenil del efecto ansiolítico de la melatonina a las 2200 h: entradas totales y a las ramas abiertas. (\*)  $p<0.05$ , prueba de Dunnett, comparado con el grupo control.

Los resultados descritos en esta sección indican que la melatonina comparte un importante aspecto funcional de algunas drogas BZP, es decir, su efecto ansiolítico en pruebas validadas para determinar modelos de ansiedad en roedores. Más aún, el efecto de la melatonina fue antagonizado efectivamente por la administración previa del antagonista del sitio receptor central de BZP flumazenil, indicando una estrecha relación entre el efecto de la hormona y el sistema GABAérgico central.

Nuevamente, la hormona tuvo efectos cronodependientes, con una mayor actividad ansiolítica y sobre el comportamiento exploratorio en el momento de la transición L:O, cuando se la comparó en relación a un punto intermedio de la fotofase.

### **3.5 Resincronización tras desfasajes en el ciclo L:O**

Para muchas especies, incluyendo la humana, un desfasaje en el ciclo de iluminación ambiental de un cierto número de horas resulta, luego de un cierto período transiente, en un desfasaje acorde en sus ritmos circadianos (84,144,172). El hecho de que la resincronización no sea inmediata es una indicación del carácter endógeno de los ritmos circadianos. En seres humanos, la desincronización puede ocurrir luego de vuelos transmeridianos o en turnos de trabajo rotativos (140,144). La resincronización a las nuevas condiciones ambientales puede tomar varios días, y durante este estado transitorio se notan alteraciones, a veces marcadas (como el tan publicitado "jet-lag").

En tratamientos experimentales se ha utilizado la melatonina como medio para acelerar el tiempo de resincronización luego de vuelos transmeridianos (106). Por otra parte, la hormona pineal posee efectos sincronizantes sobre ritmos de libre curso en ratas (13,178), y se ha podido definir una curva de respuesta de fase del ritmo de actividad locomotora de ratas inyectadas con melatonina. Los desfasajes producidos por la hormona son independientes de la actividad locomotora (Redman, comunicación personal).

En modelos experimentales de desfasaje en hámsteres, se demostró que el triazolam, una BZP de acción corta, induce una curva de respuesta de fase (213) y disminuye significativamente el tiempo de resincronización del ritmo de actividad luego de desfasajes en el ciclo L:O (224). En vista de los trabajos de Mrosovsky y col, sobre la sincronización no fótica de los ritmos circadianos (148), estos experimentos fueron repetidos y se demostró que los cambios inducidos por el triazolam eran en realidad dependientes del aumento de actividad locomotora luego de la administración de la droga (149).

En esta parte del trabajo de tesis, se sometió a hámsteres a avances de fase de 6 horas en el apagado de las luces y se registró su posterior resincronización. Posteriormente se determinó: (i) si la administración de melatonina durante los dos días previos y en el día del desfasaje podía acelerar el tiempo de resincronización de los ritmos de actividad locomotora y temperatura de hámsteres; (ii) si este efecto de la hormona estaba ligado de alguna manera al sitio receptor central de BZP.

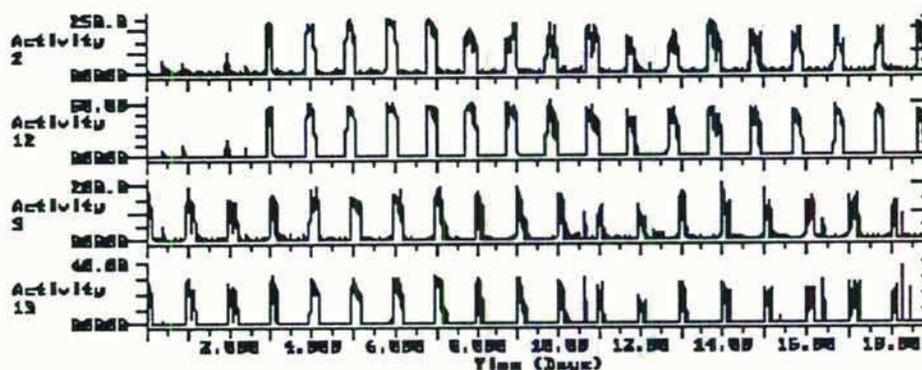


Figura 30: Ritmos de actividad en rueda de locomoción y actividad general. Se muestra un registro representativo de los ritmos de actividad en rueda locomotora (12-13) y actividad general (2-3) de los animales a lo largo de 20 días. La actividad en rueda fue registrada mediante un microswitch fijado al techo de la jaula, mientras que la actividad general fue registrada telemáticamente, como se indica en Materiales y Métodos.

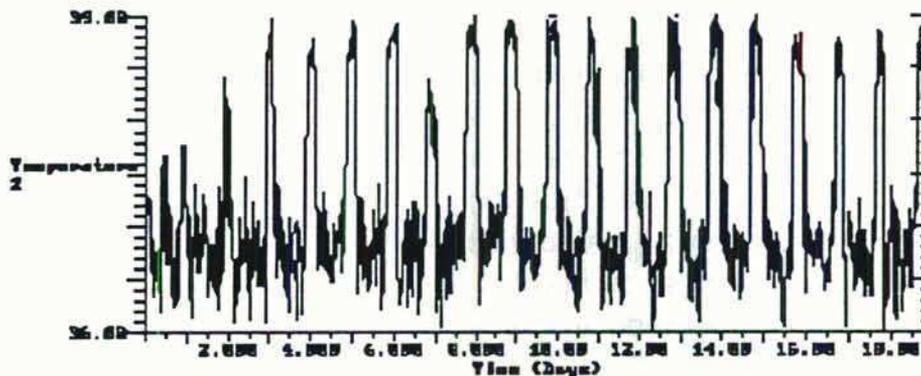


Figura 31: Ritmos de temperatura corporal. Se muestra un registro representativo del ritmo diario de temperatura en animales sincronizados en L:O=14:10. La temperatura fue registrada telemáticamente por medio de sensores intraperitoneales como se indica en Materiales y Métodos.

Los registros de los parámetros básicos de los ritmos circadianos de actividad locomotora y temperatura de los hámsteres se ven en las Fig. 30 y 31. Se observa que ambos parámetros mostraron robustos ritmos diarios en

registros de varios días, con máximos nocturnos. Los parámetros del ritmo de temperatura corporal de los animales (determinados por el método del cosinor y ajustado a un período de 24 horas), pueden verse en la Tabla 13.

Tabla 13. Parámetros del ritmo circadiano de temperatura en hámsteres

	Acceso a ruedas de locomoción		P
	SI	NO	
mínimo	37.12 ± 0.64	36.80 ± 0.71	NS
máximo	39.25 ± 0.40	38.57 ± 0.65	<0.05
mesor	38.40 ± 0.80	37.50 ± 0.71	<0.05
amplitud	0.99 ± 0.16	0.56 ± 0.10	<0.0001

Se muestran medias ± E.S. para 10 animales. La temperatura fue registrada teleméricamente como se describe en Materiales y Métodos. Para el cálculo de los parámetros de mesor y amplitud, los datos fueron ajustados por un procedimiento de cuadrados mínimos a una función cosenoidal de 24 h de período. Las diferencias entre los grupos fueron determinadas mediante una prueba t de Student.

Como se ve en la Fig. 32, ambos ritmos están directamente relacionados: tanto la amplitud como la forma de la onda del ritmo de temperatura corporal varían si los animales tienen o no acceso a ruedas de actividad locomotora. En presencia de estas ruedas, el máximo y la amplitud de las variaciones de temperatura corporal aumentan, posiblemente debido al efecto calorigénico de la actividad nocturna constante.

Es interesante señalar que el efecto de cambio de la onda (en presencia de la rueda el ritmo se asemeja más a una onda cuadrada) se observa también cuando a animales sin acceso a las ruedas se les aloja en una jaula con una hembra en estro. La primera noche "con hembra" presenta un ritmo de temperatura corporal más robusto, pero sólo la primera noche (resultados no mostrados, para no ofender al lector sensible, y además porque no tiene mucho que ver con el tema de este trabajo de tesis).

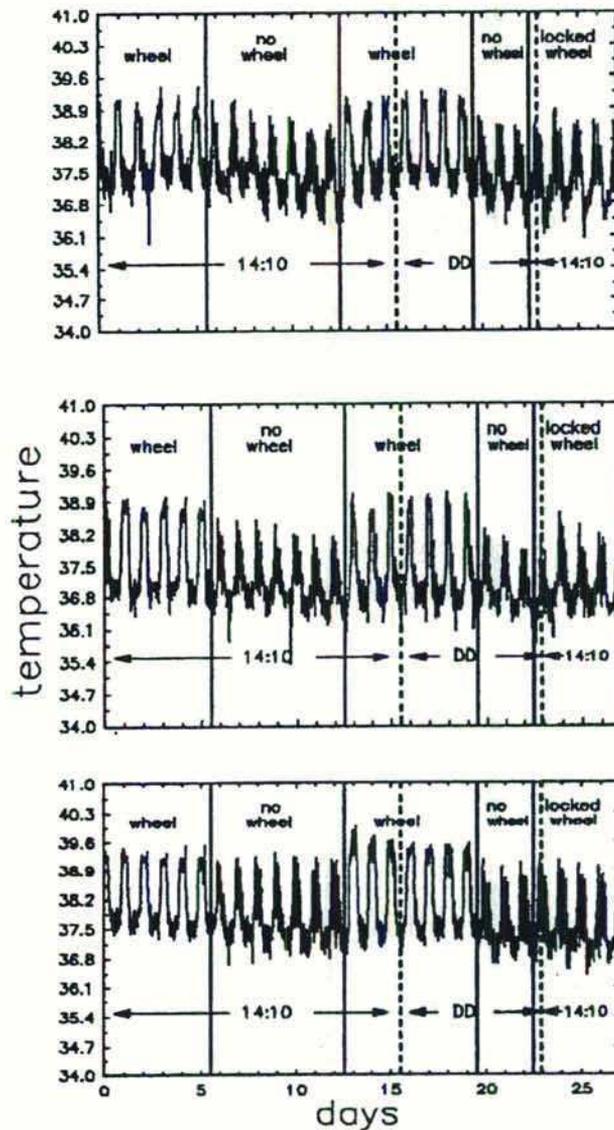


Figura 32. Ritmo circadiano de temperatura corporal de hámsteres (A, B y C), registrado a lo largo de 27 días. Los animales tuvieron o no acceso a las ruedas de locomoción consecutivamente ("wheel" o "no wheel"), tanto bajo condiciones de L:O=14:10 o bajo oscuridad constante ("DD"). Hacia el final, los animales tuvieron acceso a ruedas bloqueadas ("locked wheel"). La temperatura fue registrada teleméricamente como se indica en Materiales y Métodos

Con objeto de comprobar que se estaban registrando ritmos verdaderamente endógenos, se analizó el ritmo de actividad locomotora en condiciones de oscuridad constante. El "free-running" resultante arrojó un período de  $23.5 \pm 0.23$  horas. Un ejemplo representativo de este ritmo de libre curso se muestra en el actograma de la Fig. 33.

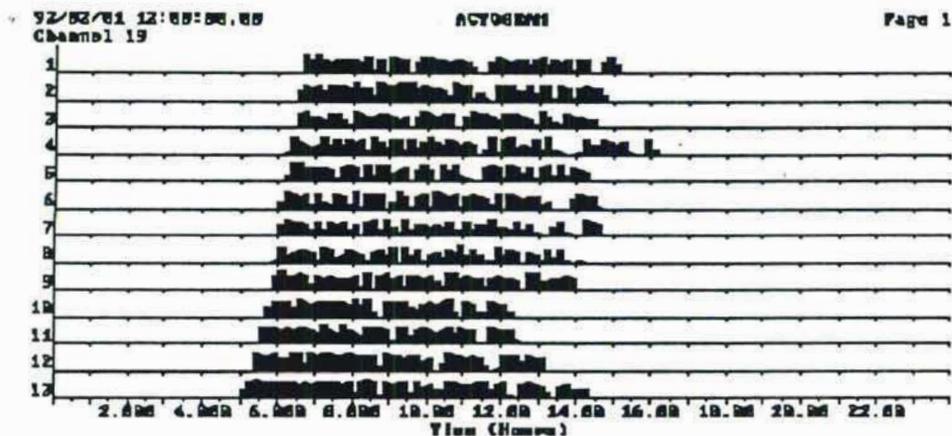


Figura 33: Libre curso de actividad. Se muestra el actograma correspondiente a un hámster bajo condiciones de oscuridad constante durante los 14 días de medición. La actividad en la rueda fue registrada como se indica en Materiales y Métodos. El período fue calculado mediante una regresión lineal de los puntos de inicio de actividad; de la pendiente de esta recta se estimó un período de aproximadamente 23.5 h.

Una vez logradas las líneas de base adecuadas (estabilidad de los parámetros periódicos), se procedió al desfasaje en el ciclo de iluminación ambiental. Esto se realizó adelantando el horario de apagado de las luces 6 horas (el día "D"). Los resultados de la resincronización exhibida por animales intactos o inyectados con vehículo se ejemplifican en los actogramas y termogramas de la Fig. 34, en la que se demuestra que tanto los ritmos de temperatura como los de actividad tardan aproximadamente un día por hora de desincronización hasta volver a su relación de fase natural con el estímulo ambiental. Por otra parte, la inyección de vehículo (DMSO 50%) no tuvo efecto sobre los parámetros estudiados.

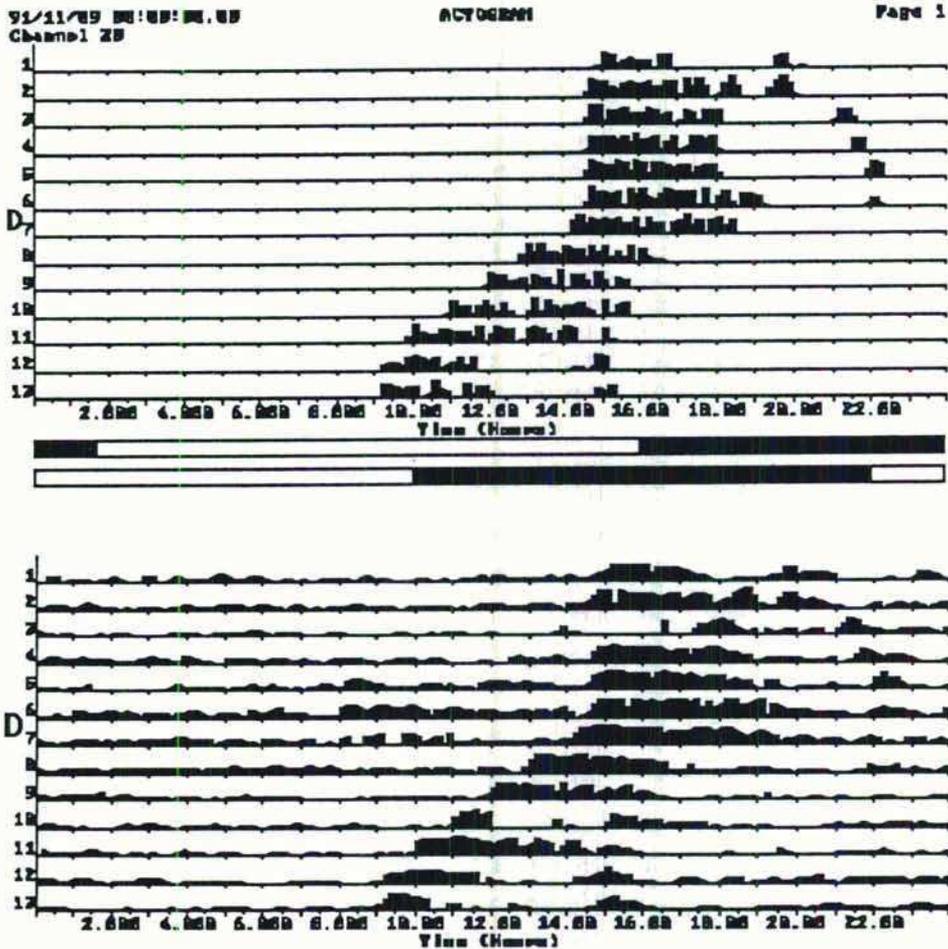


Figura 34: Actograma y termograma de controles luego de desincronizaciones

(a) Actograma de un animal control (inyectado con vehículo) antes y después de un adelanto de fase de 6 h en el apagado de las luces en el día "D". Los hámsteres fueron inyectados en los días D-2, D-1 y D. Se observa una resincronización gradual, que se completa aproximadamente 6 días luego de la desincronización.

(b) Termograma para un animal sometido a las mismas condiciones que las indicadas en la parte (a).

La administración de 1 mg/kg de melatonina en los días D-2, D-1 y D acortó el tiempo de resincronización, como se ejemplifica en la Fig. 35. En algunos casos se comprobó un claro adelanto de fase inducido por la melatonina en los días D o D+1, pero lo que se analizó fue su efecto general sobre el tiempo de resincronización (Tr).

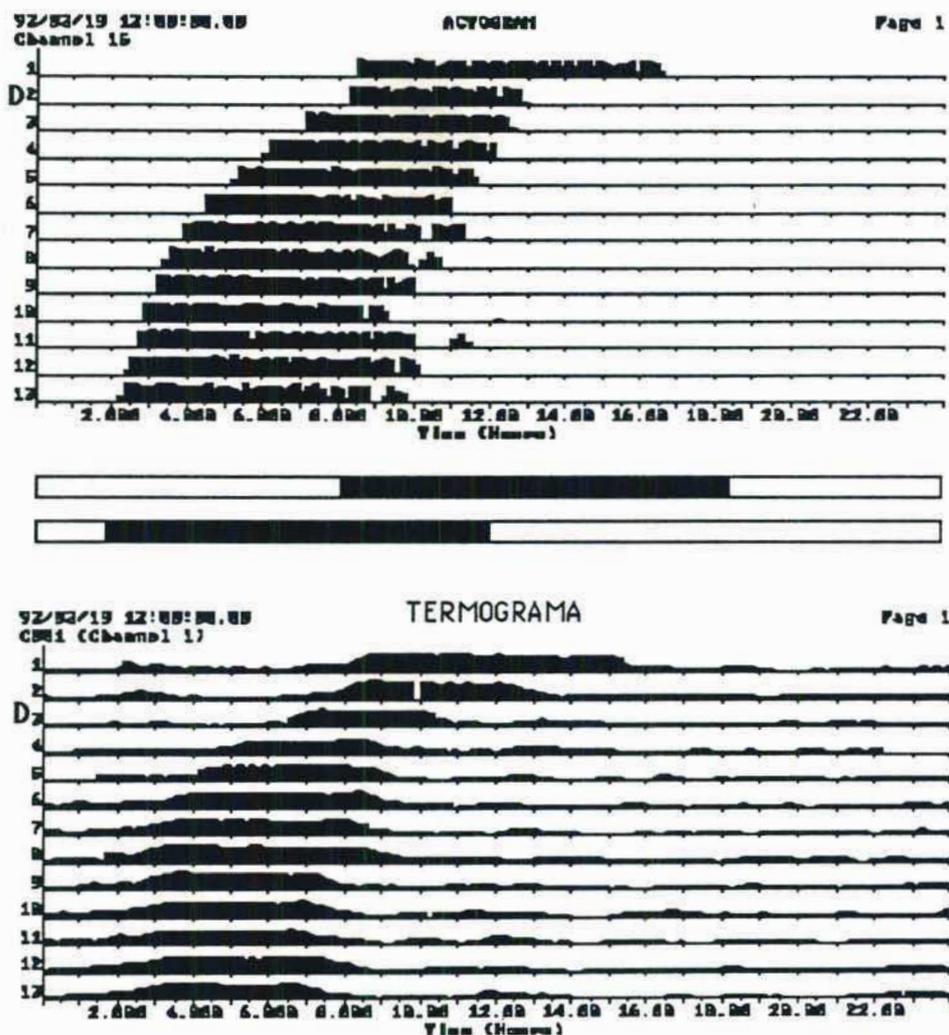
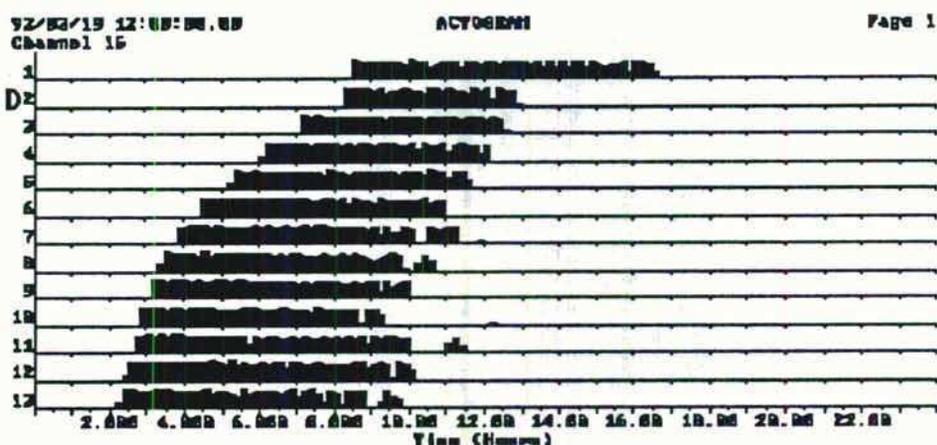
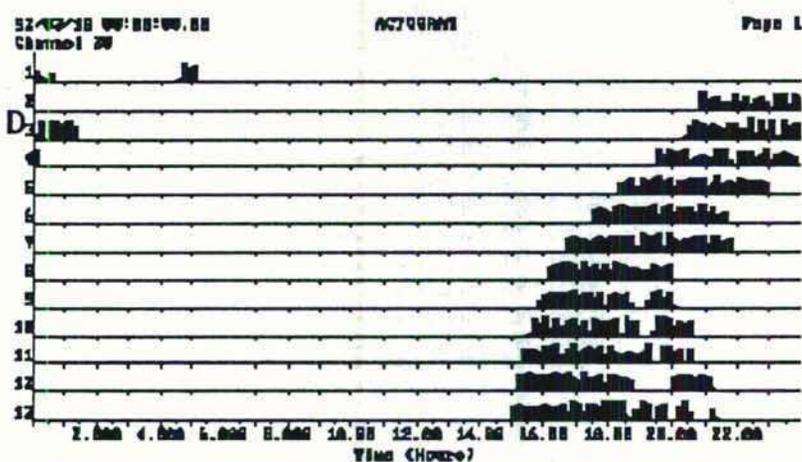


Figura 35. Se muestran el actograma y termograma representativos de un animal al que se le administró 1 mg/kg de melatonina en los días D-2, D-1 y D. En este último día se realizó un adelanto de fase de 6 horas en el apagado de las luces. La resincronización del ritmo de actividad locomotora requirió de aproximadamente 4 días.

Los actogramas representados en la Fig. 36 demuestran el antagonismo del efecto resincronizante de la melatonina por la administración previa de 5 mg/kg de flumazenil, el cual vuelve el tiempo de resincronización a valores similares a los del control. En parte b de la figura de muestra que la administración del bloqueante solo no tuvo efecto sobre los parámetros estudiados.



(a)



(b)

Figura 36: Se representan actogramas de animales tratados con (a) flumazenil (5 mg/kg) y 15 minutos más tarde melatonina (1 mg/kg) y (b) flumazenil (5 mg/kg) seguido de vehículo. En ambos casos el tiempo de resincronización fue similar al de los grupos controles.

La Fig. 37 resume los resultados de tiempo de resincronización de actividad locomotora en los distintos grupos analizados. Se demostró una variación significativa entre estos grupos (ANOVA,  $F=5.114$ ,  $p<0.008$ ), explicada principalmente por una disminución del Tr en el grupo de animales que recibió melatonina.

## RESINCRONIZACIÓN DE RITMOS CIRCADIANOS

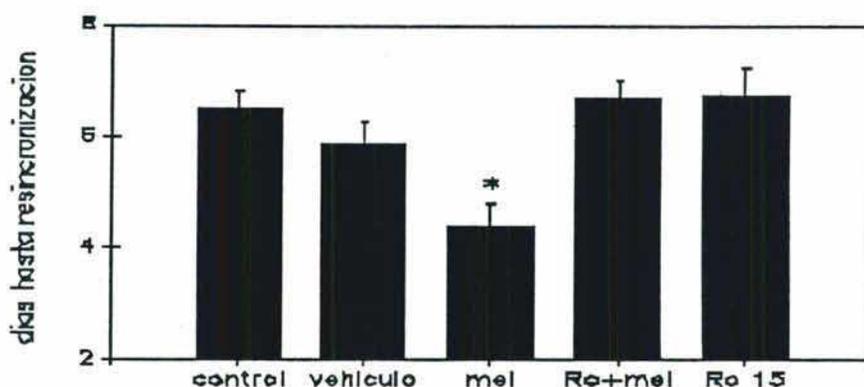


Figura 37: Se muestra media  $\pm$  E.S. del tiempo (días) hasta resincronización completa de los ritmos de actividad locomotora en los distintos grupos. (\*)  $p < 0.05$  vs control, prueba de Dunnett de 1 cola.

### 3.6 Regresión gonadal en el hámster

Como hemos ya afirmado en repetidas oportunidades en este trabajo de tesis, el efecto fisiológico más estudiado de la melatonina es la sincronización de la reproducción estacional (9,13,23,27,36,92, 170,181,182,210,227). La hormona pineal actúa como un verdadero transductor neuroendocrino que informa al organismo acerca del fotoperíodo ambiental. Este efecto fue demostrado, y ha sido documentado en mayor detalle, en el hámster. La estimulación con un fotoperíodo inhibitorio (por ejemplo, 10:14, L:O) provoca una mayor secreción de melatonina, responsable de la involución gonadal estacional en una especie de apareo "de día largo" como el hámster. Por su parte, la inyección de melatonina (10-30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en la última parte del período de luz en hámsteres mantenidos en 14:10 L:O durante 6-8 semanas reproduce en su totalidad la inhibición gonadal de períodos no estimulatorios (204-205).

Por lo tanto, una prueba contundente de la interacción entre la melatonina y el sistema GABAérgico central sería bloquear los efectos neuroendocrinos de la hormona con un antagonista central de las BZP como el Ro 15-1788, lo que constituye el objetivo de esta sección del trabajo de tesis.

Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 14. La melatonina disminuyó significativamente el peso de los testículos, hecho que fue completamente bloqueado por la administración del Ro 15-1788. El

antagonista no tuvo un efecto apreciable sobre la reducción del peso de epidídimos inducida por melatonina.

Tabla 14. Efecto del Ro 15-1788 sobre la regresión gonadal inducida por melatonina

grupo	Testículos (mg)	Epidídimos(mg)	Ves.seminales (mg)
control (vehículo)	1654 ± 45	259 ± 75	375 ± 92
melatonina (25 µg/kg)	371 ± 180 *	92 ± 27 *	201 ± 14 *
melatonina (25 µg/kg) + Ro 15-1788	1703 ± 115	132 ± 61	304 ± 44
Ro 15-1788 (50 µg/kg)	1841 ± 338	248 ± 67	403 ± 94

-----  
Efecto del tratamiento crónico con melatonina (25 µg/kg) y/o Ro 15-1788 (50 µg/kg) sobre el peso de testículos y glándulas accesorias de hámsteres mantenidos bajo un fotoperíodo de 14 L:10 O. Los animales fueron inyectados i.p. diariamente durante ocho semanas con las distintas drogas: la melatonina fue administrada en el momento de la transición L:O (2000 h), y el Ro 15-1788 15 minutos antes. Ambas drogas fueron disueltas en etanol : sc. fisiológica (1:4, v/v), solución que fue utilizada como tratamiento control. \* = p<0.05, prueba t de Student.

Estos resultados indican que el efecto fisiológico por antonomasia de la melatonina, la regresión gonadal en el hámster, es antagonizado por el bloqueante de receptores centrales de BZP Ro 15-1788.

### 3.7 Variaciones diarias del "turnover" y efecto postsináptico del GABA en el hámster

De acuerdo a la hipótesis central de este trabajo, se postula que la acción de la hormona pineal involucra modificaciones significativas en la transmisión GABAérgica. Un aval indirecto de esta hipótesis es la demostración de la existencia de variaciones circadianas en el "turnover" y efectos postsinápticos del GABA que reflejen la presunta modulación ejercida por la hormona, cuyos niveles, según ya se ha señalado, fluctúan en función

del ciclo de luz-oscuridad ambiental. Por otra parte, y asumiendo que el principal transductor fisiológico de las variaciones del fotoperíodo es la secreción de la hormona pineal, se pueden realizar experimentos en animales sometidos a fotoperíodos estimulatorios o inhibitorios de la actividad reproductiva.

Con objeto de cuantificar los niveles de GABA se seleccionó la técnica de radiorreceptor (81), modificada en nuestro laboratorio (190). Debe notarse, sin embargo, que la determinación del contenido de un neurotransmisor es a menudo un pobre indicador de la actividad neural de la vía estudiada. Este hecho, generalizable a la mayoría de los neurotransmisores, tiene particular validez para el caso del GABA, para el cual los datos de contenido quedan adicionalmente invalidados porque a pocos minutos después de la muerte del animal, se produce un incremento de los niveles del aminoácido como resultado de la inhibición diferencial de las enzimas que catalizan la síntesis y la degradación del GABA. La enzima de degradación, GABA-transaminasa, se inhibe irreversiblemente por efecto de la anoxia, mientras que la actividad de la enzima de síntesis (glutámico Descarboxilasa, GAD) no se afecta (107). Como consecuencia de estos fenómenos se produce un aumento post-mortem en el contenido de GABA, el que puede ser prevenido por la administración de ácido 3-mercaptopropiónico (3-MPA), un inhibidor de la GAD, 2.5 min antes del sacrificio (134).

Una caracterización más apropiada de la actividad neural que la medición del contenido del transmisor consiste en la determinación del "turnover" del neurotransmisor, evaluado por medio de la acumulación de GABA luego de la inhibición de la enzima de degradación, GABA transaminasa (190). Esta inhibición se logra por la administración del inhibidor enzimático irreversible gamma acetileno GABA, 62.5 min antes del sacrificio. Con este esquema experimental se determinaron las variaciones circadianas de la acumulación de GABA en corteza cerebral, cerebelo e hipotálamo de hámsteres sometidos a fotoperíodo estimulatorio. De acuerdo a las consideraciones arriba mencionadas, los animales también recibieron 3-MPA en dosis de 50 mg/kg, 2.5 min antes del sacrificio (para prevenir el aumento post-mortem del GABA cerebral).

En cuanto a los efectos postsinápticos del GABA, estudios previos indicaron que un marcador sensible lo constituye la determinación de la captación temprana de  $^{36}\text{Cl}^-$  vinculada al efecto del receptor GABAérgico tipo A sobre el canal de  $\text{Cl}^-$  (18,97,195,210). Por lo tanto, se examinó la variación circadiana de la respuesta postsináptica GABAérgica mediante la cuantificación del "uptake" de  $^{36}\text{Cl}^-$  en sinaptoneurosomas corticales e hipotalámicos de hámsteres, en función del ciclo de luz-oscuridad ambiental.

Como se muestra en la Fig. 38, se hallaron ritmos significativos en el "turnover" de GABA en las cuatro áreas estudiadas (corteza cerebral, hipotálamo, cerebelo, glándula pineal) en animales sometidos a fotoperíodo largo (L:O=14:10). La característica general de estos ritmos fue la de presentar valores máximos durante la noche, con aumentos significativos a las 2400 h, esto es, a las 4 horas de oscuridad. En las áreas nerviosas que fueron estudiadas, también se observó un aumento del "turnover" del neurotransmisor en las primeras horas de la mañana, que disminuyó significativamente hacia el mediodía. Estos resultados son coherentes con datos previos de nuestro laboratorio obtenidos en la rata, que avalan un incremento en la actividad del sistema GABAérgico central, evaluada por el "turnover" del aminoácido, luego de la inyección de melatonina (190). Los parámetros de los ritmos, analizados por el método del Cosinor, se muestran en la Tabla 15.

Cuando se determinaron los ritmos del "turnover" de GABA en animales que habían estado bajo fotoperíodo corto o inhibitorio (L:O=10:14) durante 3 meses, el tipo de sincronización que se había alcanzado en la condición lumínica anterior fue perdido (Fig. 39). No se halló un ritmo significativo del "turnover" de GABA en corteza cerebral (pese a observarse una tendencia hacia valores máximos durante las horas de luz) y los picos en el resto de las áreas no resultaron tan claros. En el hipotálamo se observó un mínimo en el "turnover" hacia el final de la noche (0100 y 0500 h), con valores altos hacia la cuarta hora de oscuridad (2100 h), como en el caso del cerebelo. En la glándula pineal se observó un nuevo máximo en el "turnover" del aminoácido a las 0500 h (inmediatamente antes del encendido de las luces). El análisis de cosinor indicó que los valores de mesor aumentaron en el hipotálamo, cerebelo y glándula pineal, así como las amplitudes de los ritmos hipotalámico y pineal (Tabla 15).

## TURNOVER DE GABA — FOTOPERIODO ESTIMULATORIO

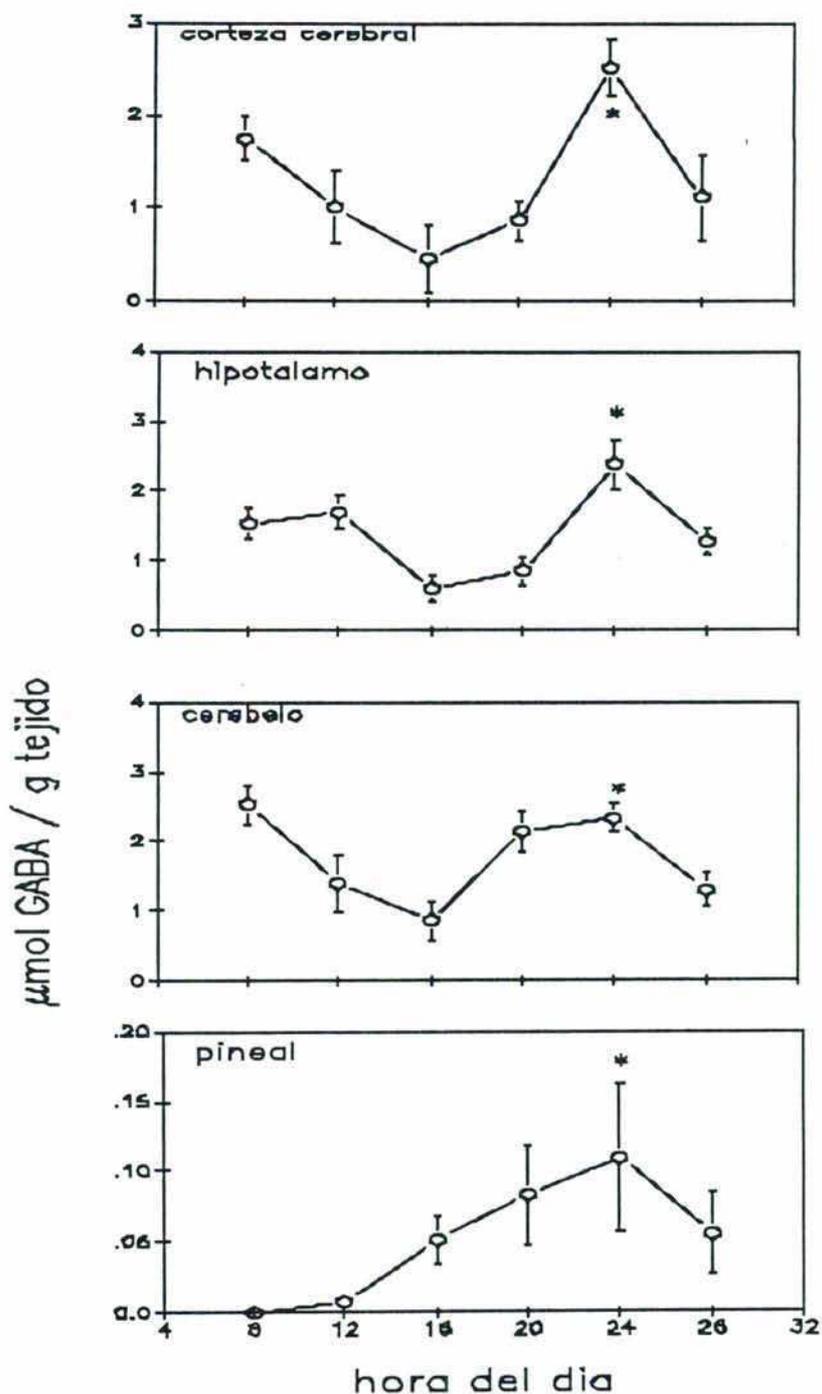


Figura 38: Ritmos de "turnover" de GABA en L:O=14:10. El "turnover" de GABA fue determinado como se detalla en Materiales y Métodos. Se muestran medias  $\pm$  E.S. para los ritmos de "turnover" en las diversas áreas estudiadas en condiciones de fotoperíodo estimuladorio (luz de 0800 a 2000 h). Corteza cerebral: ANOVA  $F=4.35$ ,  $p<0.0005$ ; (\*)= $p<0.05$  vs 1200, 1600, 2000 o 0400 h, prueba de Dunnett. Hipotálamo: ANOVA  $F=7.23$ ,  $p<0.0001$ , (\*)  $p<0.05$  vs 1600, 2000 o 0400, prueba de Dunnett. Cerebelo: ANOVA  $F=5.416$ ,  $p<0.0002$ ; (\*)= $p<0.05$  vs 1600 o 0400 h, prueba de Dunnett. Pineal: ANOVA  $F=2.45$ ,  $p<0.05$ ; (\*)  $p<0.05$  vs 0800 h, prueba de mínima diferencia significativa.

Tabla 15. Análisis de cosinor de los ritmos de "turnover" de GABA bajo diferentes fotoperíodos

a) Fotoperíodo largo (L:O=14:10)

	Mesor ( $\mu\text{mol GABA/mg tejido}$ )	Amplitud	Acrofase (horas)
corteza cerebral	$1.25 \pm 0.28$	$0.61 \pm 0.29$	$2.57 \pm 2.27$
hipotálamo	$1.39 \pm 0.28$	$0.45 \pm 0.25$	$4.00 \pm 3.21$
cerebelo	$1.70 \pm 0.33$	$0.56 \pm 0.26$	$1.49 \pm 3.10$
glándula pineal	$0.05 \pm 0.001$	$0.05 \pm 0.01$	$23.20 \pm 0.26$

b) Fotoperíodo corto (L:O= 10:14)

	Mesor ( $\mu\text{mol GABA/mg tejido}$ )	Amplitud	Acrofase (horas)
hipotálamo	$2.99 \pm 0.52$	$1.73 \pm 0.74$	$16.01 \pm 1.37$
cerebelo	$4.51 \pm 0.55$	$0.32 \pm 0.12$	$3.19 \pm 9.21$
glándula pineal	$0.25 \pm 0.13$	$0.31 \pm 0.21$	$1.17 \pm 2.17$

## TURNOVER DE GABA — FOTOPERIODO INHIBITORIO

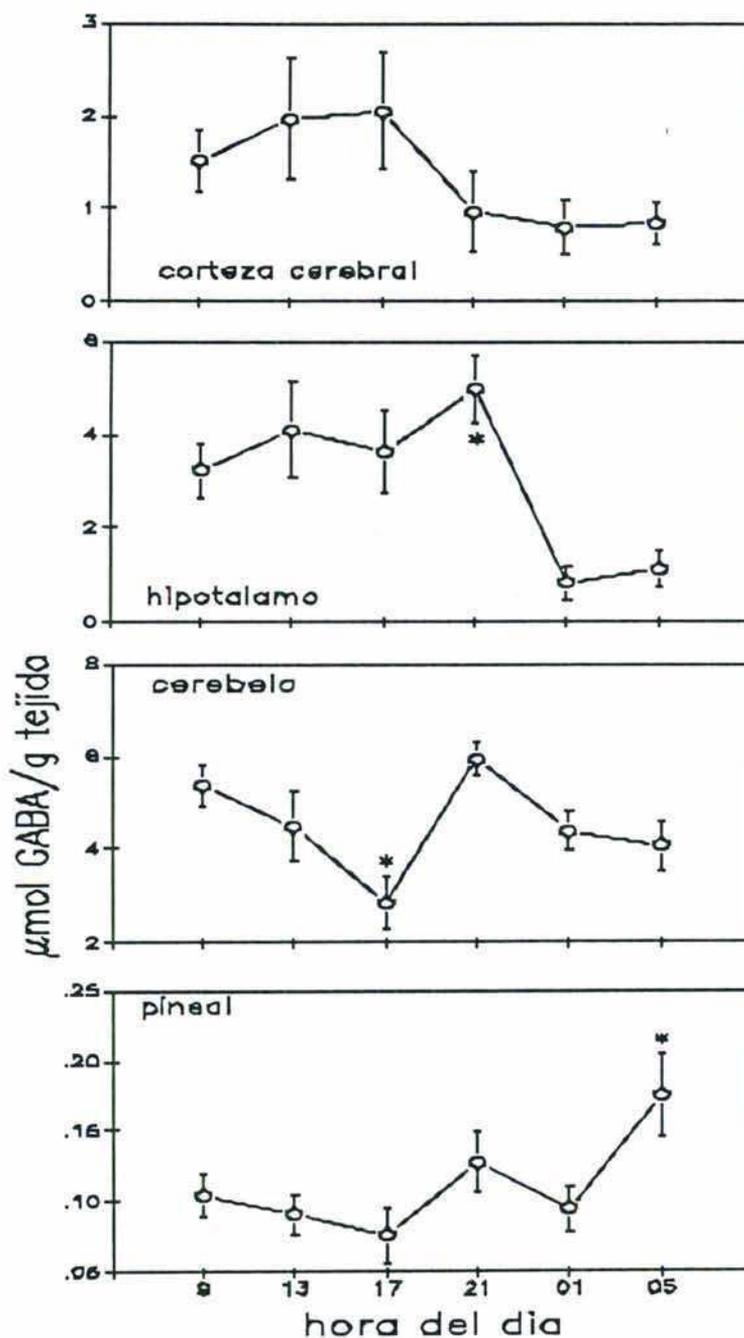


Figura 39: Ritmos de "turnover" de GABA en L:O=10:14

La figura es equivalente a la anterior, para animales sometidos a fotoperíodo inhibitorio (luz de 0500 a 1700 h). Corteza cerebral: ANOVA  $F=1.536$ ,  $p>0.1$ . Hipotálamo: ANOVA  $F=5.31$ ,  $p<0.0002$ , (\*)  $p<0.05$  vs 0100 o 0500 h, prueba de Dunnett. Cerebelo: ANOVA  $F=4.086$ ,  $p<0.002$ ; (\*)  $p<0.05$  vs 0900 o 2100 h, prueba de Dunnett. Píneal: ANOVA  $F=3.41$ ,  $p<0.008$ ; (\*)  $p<0.05$  vs 1300 o 1700 h, prueba de Dunnett

Como la tasa de "turnover" del neurotransmisor fue calculada como la diferencia entre animales tratados con gamma-acetilen GABA y valores

basales, estos últimos se muestran en las Tablas 16 y 17. El contenido basal de GABA exhibió ritmos diarios significativos en corteza cerebral, hipotálamo y cerebelo de hámsteres bajo fotoperíodo largo (Tabla 16).

TABLA 16. Contenido de GABA ( $\mu\text{mol/g}$  tejido) en hámsteres bajo fotoperíodo largo (14 L : 10 O) a lo largo del día

	hora del día						F	p
	0800	1200	1600	2000	2400	0400		
corteza								
cerebral	1.85±0.14*	2.49±0.32	2.44±0.29	1.84±0.11*	2.38±0.07	2.93±0.24	4.43	<.003
hipotálamo	13.8±3.5	13.3±2	23.35±2.7	11.35±1.5#	7.75±1.2#	9.6±1.3#	5.08	<.001
cerebelo	0.68±0.15@	2.33±0.34	2.03±0.18	1.35±0.17@	1.27±0.26@	1.64±1.71	6.08	<.0002
pineal	0.07±0.016	0.066±0.02	0.135±0.03	0.087±0.02	0.14±0.03	0.12±0.048	1.52	>.22

\*  $p < 0.05$  vs 0400 h, prueba de Dunnett (corteza cerebral)

#  $p < 0.05$  vs 1600 h, prueba de Dunnett (hipotálamo)

@  $p < 0.05$  vs 1200 h, prueba de Dunnett (cerebelo)

TABLA 17. Contenido de GABA ( $\mu\text{mol/g}$  tejido) en hámsteres bajo fotoperíodo corto (10 L : 14 O) a lo largo del día

	hora del día						F	p
	0900	1300	1700	2100	0100	0500		
corteza								
cerebral	3.55±0.16	3.53±0.18	3.13±0.11	4.01±0.21	3.53±0.12	3.55±0.16	0.22	>.5
hipotálamo	8.3±0.6	9.82±0.3*	7.7±0.5	6.3±0.3	9.5±0.8*	8.3±0.6	5.43	<.001
cerebelo	7.39±0.48	8.9±0.26	7.63±0.45	6.6±0.7#	6.43±0.51#	7.39±0.48	3.14	<.005
pineal	0.03±0.006	0.026±0.004	0.025±0.008	0.03±0.005	0.04±0.01	0.03±0.006	0.56	>.5

\*  $p < 0.05$  vs 2100 h, prueba de Dunnett (hipotálamo)

#  $p < 0.05$  vs 1300 h, prueba de Dunnett (cerebelo)

No se halló un ritmo significativo en el contenido de GABA en corteza cerebral de animales bajo fotoperíodo corto, mientras que en las otras regiones del SNC estudiadas los ritmos se mantuvieron, aunque con diferente relación de fases (Tabla 17). No se hallaron periodicidades significativas para este parámetro en glándulas pineales de hámsteres bajo ninguna de las condiciones fotoperiódicas estudiadas.

En la Fig. 40 se representan los resultados obtenidos en la evaluación de la respuesta postsináptica al GABA del influjo de  $^{36}\text{Cl}^-$  en función de la hora del sacrificio en corteza cerebral e hipotálamo de hámster. En sinaptoneurosomas de corteza cerebral se observaron modificaciones significativas con valores máximos en horas de la noche, consistentes con los resultados obtenidos en el estudio del "turnover" de GABA.

#### VARIACION DIARIA DEL INFLUJO DE CLORO INDUCIDO POR GABA

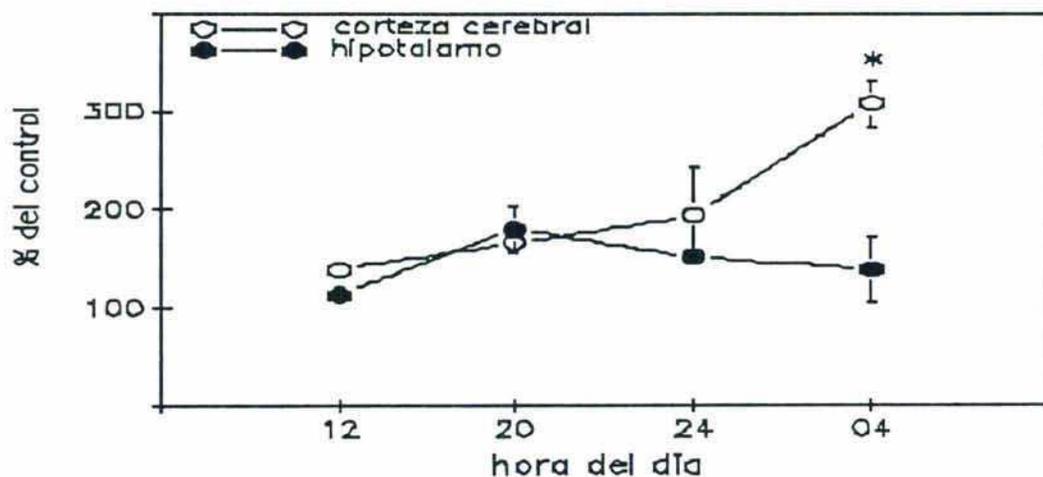


Fig. 40: Influxo de  $^{36}\text{Cl}^-$  en sinaptoneurosomas de corteza cerebral y de hipotálamo de hámsteres a lo largo del día. ANOVA global para corteza cerebral:  $F=15.9$ ,  $p<0.001$ ;  $*=p<0.05$ . ANOVA global para hipotálamo:  $F=2.518$ ,  $p>0.08$ .

En el hipotálamo, no se detectaron modificaciones significativas en el "uptake" de  $^{36}\text{Cl}^-$  en función de la hora del sacrificio (Fig. 40). Esta aparente falta de correlación entre los niveles circulantes de melatonina y la actividad del sistema GABAérgico hipotalámico puede deberse a un efecto de "dilución" de áreas sensibles (en particular, el NSQ) entre regiones sin capacidad de respuesta. Debido a la sensibilidad limitada del método utilizado para medir la actividad postsináptica del GABA es imposible realizar las determinaciones descritas en áreas hipotalámicas específicas, como el NSQ.

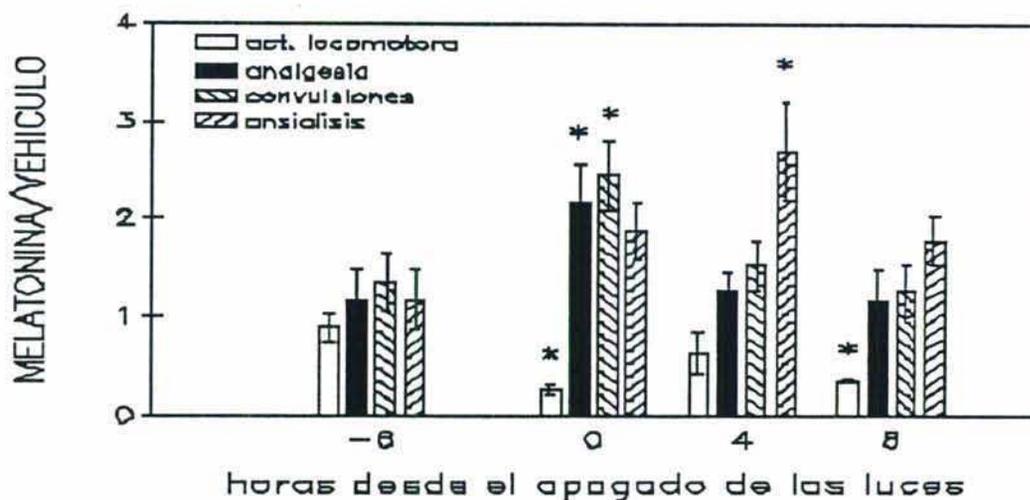


## 4. DISCUSION GENERAL

### Experimentos comportamentales

Para facilitar la evaluación de los experimentos de sedación, analgesia, anticonvulsión y efecto ansiolítico de la melatonina, los resultados principales se han resumido en la Fig. 41. Vayamos primero a lo obvio: la hormona posee actividad máxima durante la noche. En efecto, para los tres primeros parámetros analizados, la actividad fue máxima cerca de la transición L:O, mientras que el efecto ansiolítico obtuvo su máxima expresión 4 horas después del apagado de las luces (debe destacarse que ésta fue la única serie de experimentos realizada en ratas).

### CRONOFARMACOLOGIA DE LA MELATONINA



**Figura 41:** Ritmos diarios para la inducción por melatonina de: (i) depresión de actividad locomotora en hámsteres, (ii) analgesia en ratones, (iii) actividad anticonvulsivante en hámsteres y (iv) actividad ansiolítica en ratas, todos los cuales fueron determinados como se indica en Materiales y Métodos. Los animales fueron mantenidos bajo fotoperíodos de L:O=14:10 (hámsteres, encendido de luces a las 0600 h) o L:O=12:12 (ratas, ratones, encendido de luces a las 0800 h). Se muestran las medias  $\pm$  E.S. de los cocientes melatonina/vehículo para cuentas acumuladas (actividad locomotora), valores de tiempo de primera respuesta, (TPR, para analgesia y convulsiones) o entradas a las ramas abiertas en el laberinto en cruz elevado (actividad ansiolítica). Los asteriscos designan diferencias significativas ( $p < 0.05$ , ANOVA, prueba de Tukey), comparado con los otros 3 intervalos de tiempo (analgesia, convulsiones), o a los grupos de la 6ta. hora de luz o 4ta de oscuridad (1200 o 2400 h, actividad locomotora), o a los grupos de la 6ta. o 12da. hora de luz (1200 o 1800 h, actividad ansiolítica).

Estamos, por lo tanto, en presencia de un definido efecto cronofarmacológico, y es interesante que el momento de máxima sensibilidad para la hormona coincida con los efectos neuroendocrinos clásicos (regresión gonadal). Ahora bien, ¿qué significa la detección de un ritmo diario de efectividad farmacológica para un compuesto determinado? En principio existirían dos posibilidades:

(i) una variación en los parámetros farmacocinéticos (cronocinética): cambios en la metabolización de la hormona, variaciones en el flujo sanguíneo hacia los órganos blanco, etc.

(ii) cambios en los efectos de la hormona en sus tejidos blanco (cronestesia).

Para los presentes experimentos, no puede descartarse, en absoluto, la primera posibilidad. En relación a la segunda, numerosas observaciones, como los ritmos en los efectos de la melatonina "in vitro" (51) sugieren que existen cambios diarios a nivel de los efectores. Esta posibilidad es atractiva, ya que coincide con la hipótesis de la "ventana de sensibilidad" para efectos tanto neuroendocrinos (204, 205) como sincronizantes (178) de la melatonina.

Para los efectos neuroendocrinos, la hormona debe administrarse en forma crónica alrededor de la transición L:O. Para los efectos sincronizantes, es conocido que inyecciones diarias de melatonina sincronizan ritmos de actividad de libre curso en diversas especies nocturnas sólo cuando son administradas en la transición entre la fase de reposo y la de actividad. En especies diurnas, como en ciertas aves (96) o el lagarto (216), la fase en que la melatonina posee actividad sincronizadora esta desfasada en 180° con respecto a las especies nocturnas.

Es muy posible que la secreción endógena de melatonina condicione, por medio de procesos de "up-" o "down-regulation", la disponibilidad de receptores de alta afinidad para la hormona a diversas horas del día. Esto concuerda plenamente con la llamada "hipótesis de coincidencia" (182,183) que propone que los efectos neuroendocrinos de la melatonina alcanzan significación biológica sólo cuando los niveles elevados de la hormona coinciden con un alto número de receptores para la misma.

In vitro ha sido comprobada una variación diaria en el efecto de la melatonina sobre el influjo de glucosa en slices hipotalámicos conteniendo el NSQ (51). También existen evidencias preliminares de el ritmo en el número de receptores a la melatonina (y a otros compuestos), presente en animales

pinealectomizados, se vería afectado en animales con lesiones del NSQ, sugiriendo un efecto directo del marcapasos circadiano sobre este parámetro (Cassone, comunicación personal).

### **Resincronización de ritmos de actividad locomotora**

Los experimentos en los que se analizó detalladamente los ritmos de actividad y temperatura de hámsteres son los más genuinamente cronobiológicos de esta tesis. Algunos de los datos presentados sirvieron para caracterizar estos ritmos, que no habían sido estudiados en nuestro laboratorio con anterioridad. De esta manera, se comprobó:

(i) que los ritmos existen;

(ii) que existe una estrecha relación de fase entre los ritmos de actividad locomotora y temperatura en el hámster y el ciclo de iluminación ambiental (esto se demostró mediante experimentos de desfasajes y contrafases del fotoperíodo, y la posterior resincronización de los ritmos);

(iii) la estrecha relación entre los ritmos de temperatura y de actividad en rueda. La actividad locomotora no sólo resultó calorigénica sino que moduló la forma de la onda de los ciclos de temperatura corporal, asemejándolos a una onda cuadrada, en concordancia con el concepto de "retroalimentación no fótica" (148) del oscilador circadiano (Golombek, Ortega y Cardinali, enviado a *Physiol Behav*, 1992);

(iv) que los ritmos de locomoción y temperatura poseen un fuerte componente endógeno (14,173), evidenciado por la persistencia de los mismos en condiciones ambientales constantes (en nuestro caso, oscuridad constante). Se obtuvo un período de libre curso ligeramente menor que 24 horas.

Para la mayoría de las especies estudiadas, un corrimiento en el ciclo L:O de un cierto número de horas produce, luego de una etapa transitoria, un corrimiento en su sistema circadiano del mismo número de horas (144). La desincronización de ritmos circadianos humanos ocurre luego de vuelos transmeridianos ("jet-lag") y también puede desarrollarse en los sistemas de trabajo con turnos rotativos (232). Como generalización, puede afirmarse que se requieren tantos días como horas se hayan desfasado para recuperar la relación de fase ritmo-zeitgeber original (al menos para los ritmos de actividad-reposo).

Hace unos 20 años se realizaron experimentos en los que, luego de determinar el ritmo circadiano de paradigmas de aprendizaje en ratas, se aceleraba su resincronización ante desfases de 6 horas en el ciclo L:O mediante la administración de BZP (54,61). Estos estudios fueron retomados por F. Turek (213,224), quien demostró que la curva de respuesta de fase inducida por triazolam (una BZP de acción corta) podía ser utilizada para acelerar enormemente la adaptación de ritmos locomotores luego de desfases L:O. Experimentos recientes demostraron que la actividad del triazolam estaba en realidad mediada por efectos motores agudos inducidos por la droga (149). Nótese que la implementación de tratamientos benzodiacepínicos "anti jet-lag" no parece muy aplicable debido a los efectos hipnóticos de dichos fármacos. ¡Nadie desearía adormecer a un piloto de aviación para evitar efectos indeseados de desfases horarios...!

Es en este punto donde aparece una definida oportunidad terapéutica para la melatonina. Tanto en estudios en vuelos reales (10) como en desfases simulados (199) se ha propuesto que la hormona pineal puede ser un medio eficiente para reducir los efectos indeseados de los vuelos transmeridianos, relacionado ciertamente con los efectos sincronizantes de la hormona. La melatonina carece de efectos hipnóticos importantes. Algunos investigadores, un tanto apasionados por sus temas de trabajo, no dejan pasar oportunidad para demostrar en ellos mismos los efectos resincronizantes "milagrosos" de la melatonina (cabe destacar que algunos de estos investigadores son, incluso, directores de trabajos de tesis).

Es de interés destacar que el efecto hallado para la melatonina en el presente trabajo no coincide exactamente con el de las BZP. Estas últimas aceleran la resincronización mediante un brusco desfase agudo en el ritmo de actividad locomotora tras la administración, relacionado con el efecto motor de la administración de las drogas. En el caso de la melatonina este efecto motor agudo no fue hallado (Redman, comunicación personal). Lo que la melatonina modificó en los experimentos aquí presentados fue la velocidad de resincronización (es decir, la pendiente del inicio de la actividad en función de los días sucesivos). Sólo en algunos casos se halló un avance de fase único responsable de la resincronización.

La aceleración por melatonina de la tasa de resincronización luego del avance de fase en el ciclo L:O observado en este trabajo de tesis puede deberse, en principio a tres mecanismos principales:

(i) un efecto de la melatonina sobre el reloj, que modifique sus parámetros oscilatorios produciendo un avance de fase lento en el período endógeno del ritmo circadiano;

(ii) la modificación de la vía que comunica al reloj con el ritmo finalmente registrado (en este caso, la vía multisináptica que comunica al hipotálamo con los sitios de origen de la vía motora);

(iii) un efecto de la hormona sobre la fotorrecepción responsable de la sincronización de ritmos circadianos o sobre la vía de acoplamiento entre el "zeitgeber" y el reloj (en este caso, la vía retinohipotalámica).

La primera de estas 3 posibilidades es la más avalada por los datos experimentales. Las evidencias previas existentes, tales como la obtención de una curva de respuesta de fase o efectos sincronizantes en libre curso de la melatonina (11, 178), así como la dependencia de éstos y otros efectos de la hormona pineal de un NSQ intacto (49-51) apuntan hacia algún efecto directo de la melatonina sobre el reloj, que permita una adaptación más rápida de los ritmos controlados por este.

En nuestro estudio, el procedimiento experimental empleado (tratamiento con melatonina) pudo haber "acostumbrado", en los días previos al desfasaje, al sistema circadiano a concentraciones altas de melatonina en la fase que posteriormente sería de transición L:O. Este "acostumbramiento" se traduciría en términos cronobiológicos en un sutil avance de fase del reloj producido por la administración de la hormona, el cual se expresa en el ritmo de actividad-reposo sólo después del cambio de las condiciones ambientales (desincronización de 6 horas).

### **Regresión gonadal**

Estos resultados, por fin, tienen genuino significado fisiológico. Se logró una completa regresión gonadal tras 8 semanas de administración diaria i.p. de 25 µg/kg de melatonina a hámsteres bajo fotoperíodo estimulador. Este es un hecho ampliamente documentado en la bibliografía (92, 170). De acuerdo a lo conocido (recordemos que fue en el hámster dorado que se demostró el rol fisiológico de la melatonina), la hormona tuvo efecto pues fue administrada dentro de la ventana de sensibilidad, esto es, unos minutos antes de la transición L:O.

Uno de los mecanismos por el cual la melatonina ejerce su función de sincronización de la reproducción estacional (alterando el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal) es gracias a una modificación en la frecuencia de disparo del "generador de pulsos" hipotalámico que controla la liberación de hormona liberadora de gonadotropinas (183). Esta acción podría ser desencadenada por la unión de la melatonina en sitios específicos en el NSQ o en la pars

tuberalis (113). En el laboratorio se puede reproducir fielmente el ciclo reproductivo anual mediante la administración apropiada de melatonina a animales pinealectomizados (92). Lo novedoso de los resultados presentados en esta tesis consiste en el bloqueo farmacológico de la acción de la melatonina, hecho que será discutido en la sección siguiente.

### El antagonismo con Ro 15-1788 (flumazenil): ¿qué es lo que se está bloqueando?

Cuando se inició esta serie de experimentos, se deseaba poner a prueba una hipótesis que había surgido principalmente a partir de trabajos previos de nuestro laboratorio: uno de los posibles sitios de acción de la melatonina es el sistema GABAérgico central. Por otra parte, resultaba de gran interés documentar en forma detallada una cronofarmacología de la hormona pineal. De esta manera, la idea primaria fue identificar sistemas con efectos cronobiológicos definidos de la melatonina e intentar, en los momentos de máxima actividad, antagonizar estos efectos mediante manipulaciones farmacológicas del sistema GABAérgico central. Uno de los pasos, entonces, era encontrar el agente farmacológico adecuado para bloquear algún sitio del receptor GABA A sin que este bloqueo tuviera algún efecto intrínseco sobre las variables en estudio.

El receptor GABA A es en realidad un complejo receptor con sitios de unión para diversos ligandos, incluyendo GABA, muscimol, BZP, esteroides y barbitúricos, y posee como expresión común final un canal de cloruro (18,97).

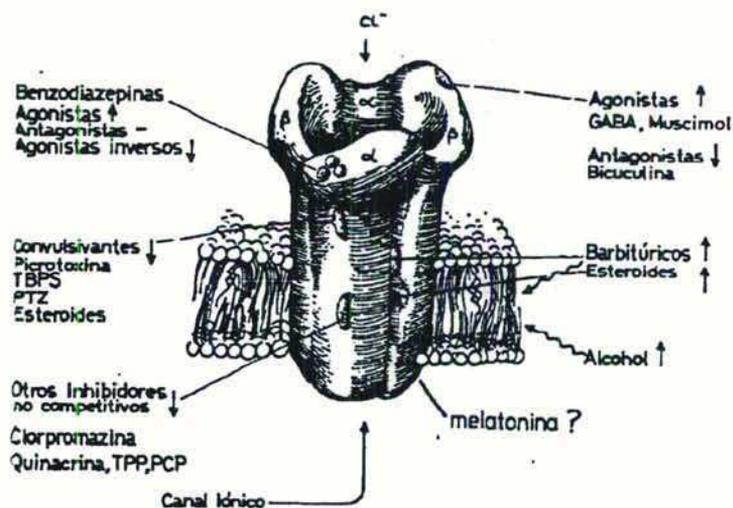


Figura 42: El receptor GABA A

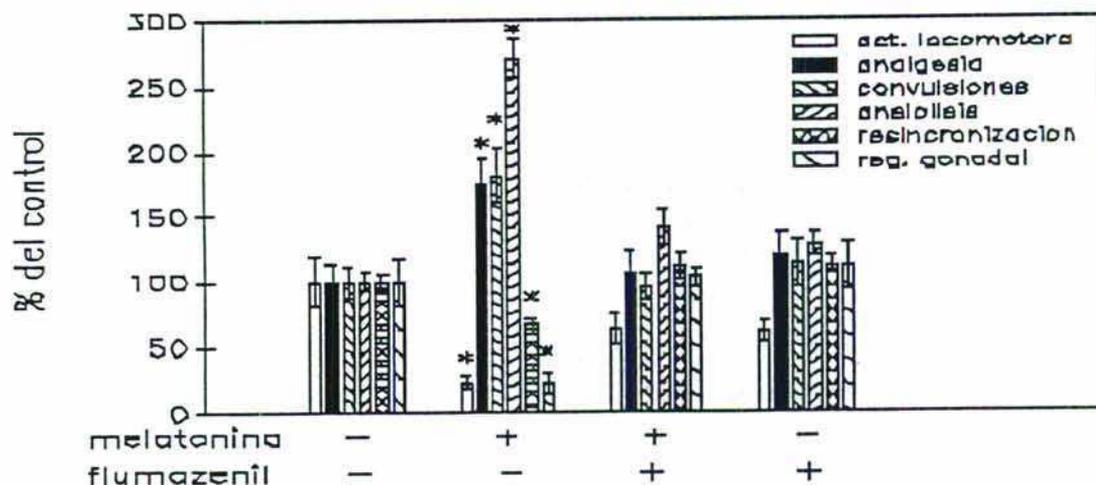
Las neuronas GABAérgicas cumplen una función preponderante en el SNC, ejerciendo un tono inhibitorio que ha hecho comparar al cerebro como "una ciudad de noche vista desde un avión" (109) (detrás de todo neurobiólogo hay un poeta en ciernes). La inhibición de este tono GABAérgico puede tener importantes consecuencias en variables comportamentales o neuroquímicas. P.ej., se podría, repentinamente, iluminar "a giorno" la "ciudad" con luces de intensidad de relámpago, un símil adecuado para las crisis convulsivas que siguen a la administración de antagonistas GABAérgicos.

De esta forma se fueron descartando los antagonistas que poseían alguna actividad intrínseca, ya que no fue posible hallar una dosis verdaderamente "antagonista" (es decir, que bloquee algún sitio pero no tenga efectos convulsivantes "per se"). Así quedaron en el camino la bicuculina (que bloquea el sitio de unión del GABA) y la picrotoxina (bloqueante del canal de cloruro), ya que presentan efectos comportamentales tales como efectos motores o proconvulsivantes (18).

Esto nos llevó a adoptar una solución de compromiso: utilizar el entonces llamado Ro 15-1788, un antagonista selectivo del sitio de unión de BZP asociado al complejo receptor GABA A. Este compuesto se ha comercializado recientemente como flumazenil, cuya acción terapéutica es la de revertir intoxicaciones agudas con BZP (también es utilizado como agente finalizador de anestias). El flumazenil carece de efectos intrínsecos, con unas pocas excepciones (no siempre replicadas) (83,97).

La Fig. 43 resume los resultados de antagonismo por flumazenil hallados en este trabajo de tesis:

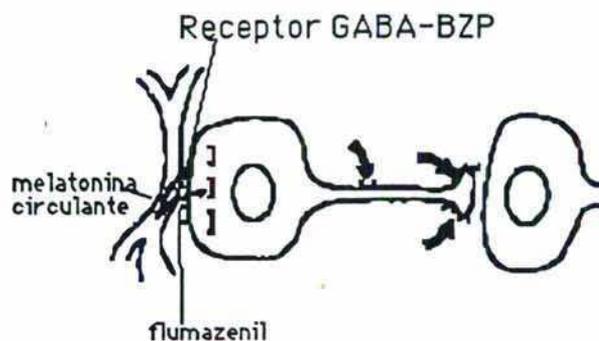
## ANTAGONISMO DE MELATONINA POR FLUMAZENIL



**Figura 43:** Antagonismo por flumazenil de los siguientes efectos de la melatonina: depresión de actividad locomotora, analgesia, actividad anticonvulsivante, actividad ansiolítica, actividad resincronizante e inducción de regresión gonadal. En todos los casos las pruebas se realizaron en el momento del día de mayor efecto de la melatonina (ver Resultados y Fig. 41), y el flumazenil fue administrado 15 min antes que la hormona pineal en las dosis indicadas en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como el porcentaje de los cambios comparado con los grupos controles (media  $\pm$  E.S. de 6-8 animales por grupo). Los asteriscos designan diferencias significativas ( $p < 0.05$ , ANOVA, prueba de Dunnett), comparado con los grupos controles.

Luego de haber antagonizado alegremente los efectos de la melatonina, surgen 4 posibles alternativas para explicar el bloqueo de la acción de la hormona pineal por flumazenil:

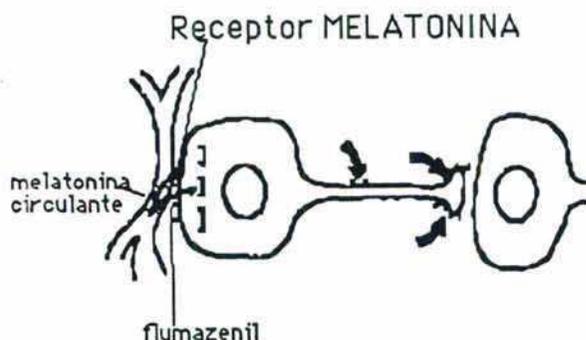
(i) la melatonina se une en el sitio de BZP del complejo receptor GABA A, y es desplazada por el flumazenil



Esta atrayente alternativa ya había sido evaluada en este y otros laboratorios, con resultados negativos o, al menos, de poco significado. En ratas, concentraciones de melatonina de hasta  $10^{-4}M$  no lograron desplazar el flunitrazepam ligado específicamente a su sitio receptor (135). En otro estudio, la hormona sí desplazó al diazepam ligado a su sitio de unión, pero con una muy baja afinidad: la CE50 fue de aproximadamente  $400 \mu M$  (138). Debe recordarse que el diazepam no es un ligando puro del sitio central de BZP (aquél presente en el complejo receptor GABA A), sino que se une también al sitio periférico. Dado que estos experimentos habían sido realizados en ratas, se procuró obtener alguna información acerca de la interferencia de la melatonina en la unión del flunitrazepam a membranas de corteza cerebral del hámster. En una prueba realizada en el laboratorio de receptores del Instituto de Biología Celular (IBC, Facultad de Medicina, UBA), se encontró que  $20 \mu M$  de la hormona desplazaron en un 24% a la unión específica de flunitrazepam (Jorge Medina, comunicación personal). Este último resultado indica una mayor afinidad de la melatonina por el sitio receptor de BZP en el hámster con respecto a la rata, aunque igual resultaría insuficiente como para justificar los efectos observados por medio de un bloqueo directo in vivo, pues debe recordarse que la cantidad de melatonina que alcanza el SNC luego de la administración periférica es mínima (del orden nM).

De cualquier manera, no puede descartarse la posibilidad de que la melatonina se comporte como un competidor alostérico del sitio de unión de GABA o BZP, modificando indirectamente la afinidad por alguno de estos ligandos. Deben realizarse pruebas específicas (análisis de Scatchard de la unión de estos ligandos en presencia o ausencia de melatonina) para poder determinar esta última posibilidad. Pero ésta es otra tesis.

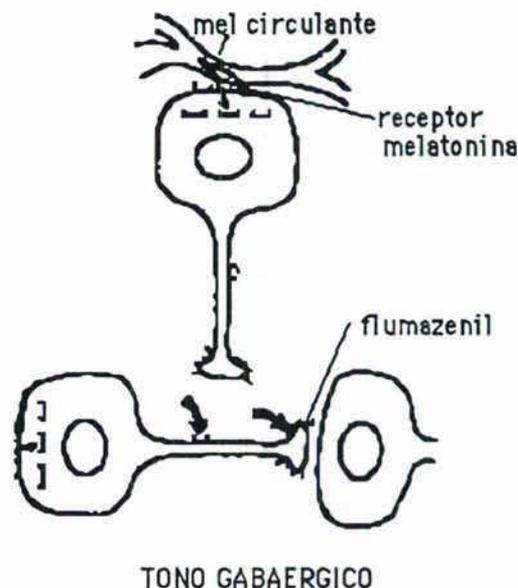
(ii) el flumazenil bloquea los receptores de melatonina



Esta es una alternativa carente por ahora de evidencia experimental que la avale. Sin embargo, debe mencionarse ya que constituiría una explicación

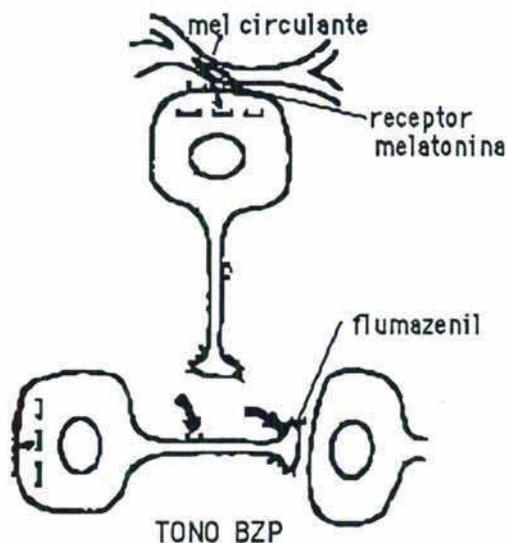
posible para los efectos hallados. Nuevamente, el sometimiento a verificación experimental es tema de trabajo ulterior.

(iii) para que la melatonina ejerza sus efectos debe estar intacto el tráfico neuronal GABAérgico, el cual sería modificado mediante la administración del flumazenil



Esta alternativa está basada en los trabajos de nuestro laboratorio en los que se demostró la actividad "in vitro" de la hormona pineal sobre diversos parámetros del sistema GABAérgico (190,191,193,195). Si se hubiera utilizado bicuculina o picrotoxina como bloqueantes, ésta hubiera sido la explicación predilecta. Sin embargo, el flumazenil es lo suficientemente específico como para bloquear efectos puramente benzodiazepínicos (y no GABAérgicos), y por lo tanto, esta alternativa no parece tener demasiadas evidencias como para sostenerse. Hay sin embargo una excepción auspiciosa: en un estudio realizado sobre los mecanismos de aprendizaje el flumazenil disminuyó en un factor de 100 el efecto del agonista GABAérgico muscimol (106). Se requerirían más pruebas de la interacción flumazenil-efectos de agonistas GABAérgicos para sustentar esta hipótesis.

(iv) la melatonina requiere de un tono de BZP endógenas intacto para ejercer sus efectos



Recientemente se ha descrito la presencia de ligandos endógenos para los receptores de BZP, incluyendo un derivado del diazepam (63) y n-butil-carbolina-3-carboxilato (66). Estos ligandos endógenos tuvieron actividad comportamental variada (161), y se ha propuesto recientemente que las BZP endógenas serían moduladores de procesos de aprendizaje y memoria (105,107). Podría, entonces, suponerse un tono endógeno del tráfico de BZP, el cual sería inhibido por la administración del flumazenil. La modificación conformacional del complejo receptor GABA A impediría de alguna forma que la melatonina tenga efecto.

La conclusión objetiva sobre esta parte de nuestro estudio es que si bien de los resultados se desprende que los "caminos" de la melatonina y del sitio de unión central de BZP se cruzan en algún momento, no hay aún evidencias para proponer alguna explicación fehaciente.

Un modelo muy general puede verse en la Fig. 44, suponiendo que tanto los efectos de la melatonina como los GABAérgicos afecten la misma célula nerviosa. La melatonina se uniría a sus receptores específicos, y como resultado de esta interacción, en forma más o menos directa se modificarían parámetros ligados al receptor GABA A: tanto por medio de un "cross-talk" directo entre los receptores, como por la inducción de síntesis de proteínas que a su vez modifiquen el tráfico nervioso ligado a los receptores GABAérgicos.

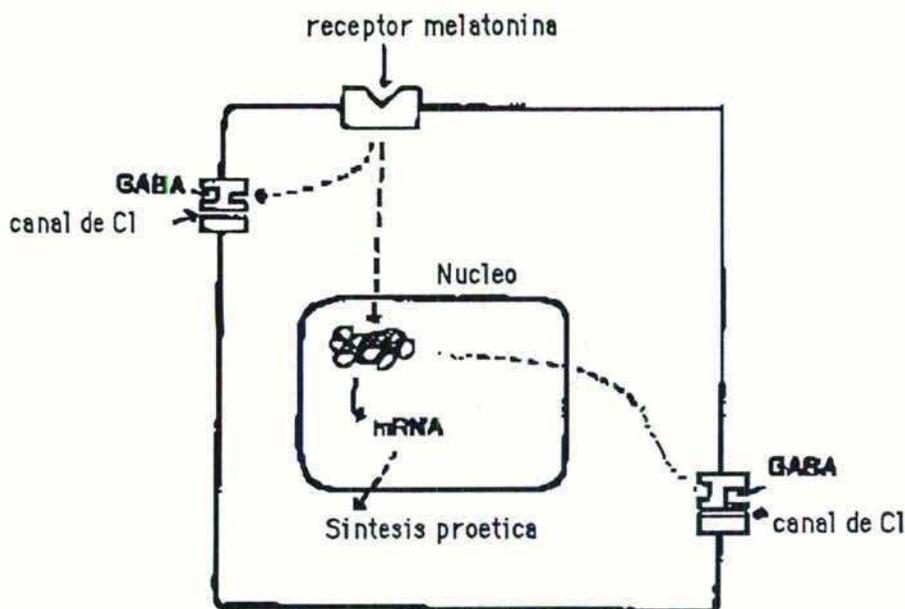


Figura 44: *cross-talk* melatonina-GABA

### El "turnover" de GABA y el fotoperíodo

Los resultados de esta sección del trabajo de tesis constituyen la primera descripción de una variación circadiana del "turnover" de GABA en el SNC y glándula pineal del hámster. Otras variaciones periódicas de parámetros del sistema GABAérgico han sido previamente estudiadas, incluyendo fluctuaciones en el contenido del neurotransmisor (48,53,231). Sin embargo, se considera al "turnover" como un mejor indicador de la actividad de un sistema neurotransmisor cerebral. El "turnover" de GABA fue cuantificado como la acumulación de neurotransmisor (calculada como la diferencia con respecto a valores basales) luego de la inhibición de la degradación mediante la administración de gamma-acetilen GABA 1 hora antes del sacrificio (190). Por otra parte, al comparar datos de animales que habían sido sometidos a diferentes fotoperíodos, se pudieron evaluar algunas implicancias estacionales en la regulación de la actividad GABAérgica.

Globalmente, se hallaron ritmos circadianos significativos en el "turnover" del GABA en corteza cerebral, hipotálamo, cerebelo y pineal de hámsteres sometidos a fotoperíodos estimulatorios o inhibitorios. En condiciones de fotoperíodo "de día largo" (14L:10O) se halló una estrecha relación de fase entre estos ritmos, con una clara tendencia a exhibir picos máximos hacia la 4a. hora de oscuridad. En animales que fueron sujetos a fotoperíodo "corto" durante 3 meses, aún se evidenció periodicidad diaria en el "turnover" de GABA. Sin embargo, en esta última situación, se perdió la estrecha relación de

fase entre las distintas regiones estudiadas, encontrándose valores elevados de "turnover" también durante las horas diurnas, o hacia el final del período de oscuridad.

Cuando se examinaron las concentraciones basales de GABA, en la mayoría de los casos también se encontraron ritmos circadianos. Sin embargo, la relación de fase entre el contenido y "turnover" de GABA varió mucho de tejido a tejido y también pareció depender de la condición fotoperiódica imperante. En el caso de hipotálamo y cerebelo, el pico en contenido precedió en unas 8 horas al del "turnover". El significado funcional de los cambios en el contenido del GABA no resulta evidente, y merece ser estudiado en profundidad. Debido a que existe una interrelación directa entre la síntesis y la degradación del neurotransmisor, variaciones periódicas en el contenido del GABA podrían estar indicando que otro(s) factor(es) puedan contribuir a la concentración estacionaria del mismo, por ejemplo la disponibilidad de un cierto "pool" de neurotransmisor a procesos de degradación podría variar a lo largo del día.

En cuanto al ritmo en el efecto postsináptico del GABA, medido como aumento del influjo de cloro en sinaptoneurosomas, se halló una variación periódica en corteza cerebral coherente con el ritmo encontrado en el "turnover" del neurotransmisor. En efecto, la tasa actividad del GABA fue máxima unas 4 horas después del apagado de las luces, precediendo en 4 horas el efecto postsináptico. Tal vez el desfase entre ambos procesos resulte excesivo, pero no debe olvidarse que la metodología empleada no permite una frecuencia de muestreo mayor (y tampoco el FMI), que podría indicar una relación de fases más estrecha. Resulta sorprendente que no se hayan obtenido variaciones temporales en el influjo de cloro inducido por GABA en sinaptoneurosomas obtenidos de hipotálamo. Una posible explicación para esta falta de ritmicidad sería la de estar trabajando con un bloque que contiene al hipotálamo mediobasal, en lugar de realizar estas mediciones en zonas más restringidas, como rodajas conteniendo al NSQ u otros núcleos de importancia en el sistema circadiano.

Los resultados de los ritmos de "turnover" de GABA en hámsteres bajo condiciones de día largo están de acuerdo con parte, pero no la totalidad, de los trabajos sobre los ritmos del transmisor. En nuestro laboratorio, Acuña Castroviejo y col. (2) describieron que la unión del GABA a receptores de tipo A en membranas de corteza cerebral de ratas era máxima a las 2400 h. Con respecto a las concentraciones de GABA en el SNC de ratas, Casanueva y col. (48) encontraron niveles hipofisarios elevados 2 horas antes del apagado de las luces, Cattabeni y col. (53) reportaron un pico en el contenido hipotalámico (pero no en corteza cerebral ni cerebelo) en la mitad de la

fotofase, y Waniewski y Suria (231) describieron un pico en el GABA pineal aproximadamente 6 horas luego del apagado de las luces. Debido a que diferentes áreas y parámetros fueron examinados en estos estudios, no resultan sorprendentes las discrepancias entre los patrones de ritmicidad hallados. De cualquier manera, dada la importancia funcional que cumplen las neuronas GABAérgicas en los procesos nerviosos integrativos (187), el estudio de aspectos dinámicos de la fisiología del GABA, como los del "turnover" que han sido descritos aquí, pueden ser de importancia para el esclarecimiento de las funciones del marcapasos cerebral.

Con respecto a la sincronización de los ritmos del "turnover" del GABA en hámsteres bajo fotoperíodo largo, ésta podría interpretarse como la consecuencia de la actividad de un "zeitgeber" interno. Armstrong (12) ha propuesto que la melatonina bien podría cumplir ese rol. En hámsteres criados en 14L:10O, el pico de melatonina endógena ocurre aproximadamente a partir de las 4 horas de oscuridad (183), coincidiendo con el máximo en los ritmos del GABA aquí mencionados. Siguiendo la hipótesis de Armstrong (12), la melatonina podría constituir el transductor neurohumoral circadiano que sincroniza tal fenómeno.

Ya hemos mencionado las evidencias que hablan a favor de la relación entre la actividad de la melatonina y el sistema GABAérgico central, incluyendo las modificaciones que la hormona produce en la unión al receptor GABA-BZP (2,157,114), o el aumento del "turnover" y síntesis del neurotransmisor (190,195). Surge como una interesante hipótesis de trabajo el examen de la acción de la melatonina como "zeitgeber" interno en los procesos que involucren ritmos circadianos en parámetros del sistema GABAérgico central. Una de las pruebas necesarias (pero de ninguna manera suficiente) para demostrar formalmente esta hipótesis sería el estudio de las variaciones circadianas del GABA en animales pinealectomizados, pero el autor ofrece una disculpa pública (que incluye a los animales) debido a que tal intervención quirúrgica originó una de las mayores tasas de mortalidad en el bioterio de hámsteres, hecho por el cual se decidió postergar esta fase del estudio hasta tiempos quirúrgicos mejores.

La pérdida de sincronización en los ritmos de "turnover" de GABA en SNC de hámsteres sometidos a fotoperíodos cortos no tiene una explicación directa hasta el momento. Dado que la secreción de melatonina en estas condiciones no presenta un pico nocturno claro, sino más bien un patrón secretorio en onda cuadrada (183), podría postularse que la hormona posee una menor influencia como "zeitgeber" interno en fotoperíodo corto.

## Sobre dosis, especies y entrecruzamientos

Una pregunta pertinente que queremos contestar antes de llegar a las conclusiones finales de este trabajo de tesis es la razón de haber utilizado modelos experimentales tan variados. Intentamos, por supuesto, privilegiar el uso del hámster como modelo por antonomasia en cronobiología. Sin embargo, algunos de los efectos comportamentales evaluados se hallaban perfectamente validados para otras especies, y no fue posible replicarlos en el hámster dorado. Quizá el ejemplo más patético en este sentido fue el que encontramos en los experimentos de analgesia, al aplicar la prueba del "hot-plate", tradicional para ratones, a los hámsteres. En número significativo, los individuos de esta especie optaron por la masoquista solución de quemarse las patas, sin demostrar ningún comportamiento algésico evidente, más que el sospechoso tufillo a carne quemada.

En algunos experimentos (muy) preliminares en los que se aplicó un estímulo algésico eléctrico a los hámsteres, el procedimiento demostró la sensibilidad suficiente como para determinar un ritmo circadiano en el umbral del dolor, semejante al que aquí describimos en el ratón.

Con respecto a la determinación del efecto ansiolítico de la melatonina y el diazepam, se realizó la prueba del laberinto en cruz elevado en ratas y no en hámsteres, debido a que esta prueba está ampliamente validada en esta especie por el grupo de S. File (83) para agentes benzodiazepínicos.

En otro orden de cosas, nuestros lectores podrían preguntarse sobre algunas posibles interrelaciones entre los efectos comportamentales de la melatonina. Por ejemplo, ¿no podría existir correlación entre los efectos sedantes de la melatonina y otros que requieren de un comportamiento motor intacto? ¿o no será posible que la melatonina, al deprimir la locomoción, impida que los ratones salten en la prueba del "hot-plate" o que los hámsteres exhiban movimientos clónicos frente a un agente convulsivante, y así sucesivamente?

Afortunadamente, tenemos respuesta para estas pertinentes objeciones. Es así que para obtener el efecto depresor de la actividad locomotora hubo necesidad de administrar crónicamente (5 días) melatonina durante la transición L:O, ya que la administración única de dosis bajas (del orden de  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) o altas ( $\text{mg}/\text{kg}$ ) de melatonina no causaron efectos sedantes inmediatos.

No existen experimentos definitorios acerca de la cinética de la melatonina luego de la administración parenteral en roedores. Ya fueron

brevemente discutidos los resultados que indican que la melatonina secretada endógenamente por la pineal (en la que se detectan máximos nocturnos de aproximadamente 3 ng/glándula) es concentrada en el hipotálamo mediobasal hasta concentraciones del orden de 10 pg/mg de tejido (35). Con respecto a la administración de melatonina, es muy poco lo que se sabe acerca de cuánta es la cantidad de hormona que efectivamente alcanza sus sitios de acción centrales. Hemos ya mencionado que en nuestro laboratorio se han realizado experimentos que indican que 20 minutos después de la administración de dosis altas de melatonina a ratas (5 ó 10 mg/kg), se alcanzan concentraciones hipotalámicas del orden de 3-6 ng/mg de tejido, respectivamente (Chuluyan y col, inédito). Por supuesto, estos datos no pretenden "fisiologizar" los experimentos farmacológicos presentados en este trabajo de tesis; sólo indican que las concentraciones centrales realmente alcanzadas por la melatonina luego de su administración periférica pueden ser sorprendentemente bajas.

### **Consideraciones finales**

Los resultados aquí presentados constituyen la primera demostración experimental de que los receptores tipo A del aminoácido inhibitorio GABA desempeñan un papel central en la mediación de diversos efectos fisiológicos y farmacológicos de la melatonina en animales de experimentación. Si bien han sido numerosos los estudios previos (analizados en detalle en diversos pasajes de este trabajo) sobre variadas acciones de la melatonina sobre la neuroquímica y actividad bioeléctrica de áreas cerebrales, en ninguno de estos estudios pudo establecerse el rol causal del efecto observado en cuanto a la expresión de la acción hormonal.

La única forma viable de analizar esta causalidad es la "disección" farmacológica del fenómeno mediante antagonistas carentes "per se" de acción farmacológica significativa. El antagonista del sitio de unión central de las BZP, Ro 15-1788 o flumazenil, posee estas propiedades, pues en diferentes modelos farmacológicos ha demostrado carecer de actividad intrínseca relevante, siendo sin embargo capaz de obliterar en forma completa la actividad del complejo supramolecular constituido por el receptor GABAérgico tipo A, el sitio central de las BZP y el canal de Cl<sup>-</sup> (58,97,103,210). En este sentido, el uso del Ro 15-1788 es significativamente superior al de otros agentes que en forma más directa interfieren con la actividad GABAérgica tipo A, como el bloqueante de los receptores tipo A bicuculina, o el antagonista del canal de Cl<sup>-</sup> picrotoxina, todos ellos de poderosa actividad convulsivante intrínseca.

Hemos analizado en la introducción el papel que desempeña el sistema GABAérgico central dando origen a circuitos predominantemente responsables de 2 funciones centrales de las redes neuronales: el enfocado espacial y temporal de la actividad neural (29,236. En una hipótesis muy atrayente E. Roberts, quien describiera por primera vez al GABA en el sistema nervioso central, atribuye a estas redes neuronales la propiedad de transformar de digital en analógica la respuesta neuronal (187). Para avalar esta hipótesis recurre al argumento de la actividad sincronizada y rítmica que se produce al administrar agentes convulsivantes cuyo efecto primario es el bloqueo del sistema, como la bicuculina o la picrotoxina (91,212). Otro argumento de importancia es que en distintos modelos experimentales el resultado conductual del bloqueo del sistema GABAérgico no es una modificación de los valores medios sino una disminución significativa de la varianza de la población, es decir, la respuesta se hace homogénea ("0" o "1", y no todas las gamas posibles) (187).

En el oscilador primario cerebral de mayor importancia, el NSQ, existe una población definida de interneuronas GABAérgicas que han sido vinculadas en distintos modelos experimentales con la génesis de la oscilación circadiana intrínseca de estos núcleos hipotalámicos (116,131,142). Asimismo, y como consecuencia de la actividad rítmica de las distintas redes neuronales GABAérgicas puede postularse que la esencial diferencia en el SNC de hámsteres durante la fase diurna y nocturna del ritmo diario descansa en parte en las modificaciones de dichas redes de interneuronas GABAérgicas.

En el presente estudio se examinó esta última hipótesis mediante la determinación de la actividad pre- y postsináptica del sistema GABAérgico central en distintos intervalos horarios durante un ciclo de 24 horas. Como ha sido verificado concluyentemente en distintos estudios, es la presencia de la glándula pineal a través de la secreción de melatonina la responsable de los efectos del fotoperíodo sobre la actividad neuroendocrina. Parte de los resultados de este trabajo de tesis indican la existencia de una aceleración significativa en el "turnover" in vivo de GABA como en la acción del neurotransmisor in vitro sobre la captación neuronal de  $^{36}\text{Cl}^-$  (ejercida a través de receptores de GABA tipo A) en la corteza cerebral en horas de la noche, es decir, en correlación con los niveles plasmáticos elevados de melatonina. El aumento nocturno del "turnover" de GABA fue también verificado en hipotálamo y cerebelo. Queda por evaluar en trabajos futuros la persistencia o no de estos cambios en hámsteres sometidos a remoción o desnervación de la glándula pineal.

Si bien en forma general los fármacos que actúan sobre el SNC muestran cambios circadianos en su actividad, sólo unos pocas drogas poseen la propiedad de modificar el período del oscilador cerebral primario (56,128,180). Un común denominador de este último grupo de drogas es el afectar a los circuitos GABAérgicos cerebrales (21,131,174-177). Neurofármacos de actividad central como la melatonina (10,13,49,50,169,178) y las BZP (213,214,225) han sido identificados como efectivos para cambiar el período de oscilación del NSQ. Ambos compuestos afectan al sistema GABAérgico central, a nivel de los receptores de tipo A vinculados al ionóforo de cloro. La ventaja principal de la melatonina en su efecto como fármaco es que, en dosis efectivas para modificar el reloj circadiano, carece de los efectos sedantes descritos para las BZP. Asimismo, no existe dosis tóxica para la melatonina, siendo inocua en animales de experimentación y en el hombre (9).

Los resultados del presente trabajo de tesis confirman la existencia de ritmos circadianos en la actividad locomotora y respuesta convulsivante a 3-MPA en el hámster, en la latencia para responder a un estímulo doloroso en el ratón, y en el efecto ansiolítico en ratas. Varias de estas conductas específicas presentaron máximos valores durante la fase nocturna del ritmo de 24 h. Uno de los objetivos del presente estudio ha sido el verificar si la actividad de la hormona pineal melatonina, una sustancia de efectos vinculados con la hora del día, tiene también efectos cronodependientes sobre las conductas arriba citadas.

Los resultados obtenidos indican que el efecto depresor de la melatonina sobre la actividad locomotriz en el hámster, observable a dosis de 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , es máxima a las 2000 y 0400 h, en coincidencia con las "ventanas" de sensibilidad neuroendocrina descritas para la hormona. Asimismo, la inyección de concentraciones farmacológicas de melatonina (20 mg/kg) produce analgesia en el ratón, un efecto que fue también máximo a las 2000 h. Una situación semejante fue observada en el caso de las convulsiones inducidas en el hámster por la inyección del inhibidor de la GAD 3-MPA, siendo el efecto anticonvulsivante de la melatonina máximo durante la noche. En el caso de la actividad ansiolítica y sobre el comportamiento exploratorio el efecto de la melatonina fue mayor en el momento de la transición L:O, cuando se la comparó en relación a un punto intermedio de la fotofase.

Los fenómenos cronodependientes mencionados de la melatonina fueron suprimidos en todos los casos por la inyección previa del bloqueante central de la BZP Ro 15-1788. Puede entonces concluirse que la integridad del sistema GABAérgico central es imprescindible para la actividad farmacológica citada de la melatonina.

La última serie de experimentos farmacológicos fue realizada para evaluar si la regresión gonadal producida por la melatonina es también sensible al bloqueo por flumazenil. La inyección de 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  diarios de melatonina durante 8 semanas en hámsteres mantenidos en 14L:10O produce la ampliamente documentada involución gonadal, en un todo semejante a la observada luego de exponer a los animales durante 6 semanas a fotoperíodos de menos de 12 h de luz por día. La inyección de 50 mg/kg de Ro 15-1788 15 min antes de la melatonina previno totalmente el efecto inhibitor de la melatonina sobre el peso gonadal, pero fue incapaz por sí misma de modificar el peso gonadal. Por lo tanto, nuestros resultados indican que tanto efectos farmacológicos como fisiológicos de la melatonina son sensibles al bloqueo del complejo supramolecular del receptor GABAérgico tipo A cerebral.

En conclusión, la presente serie de experimentos se inserta en el conocimiento básico cuya obtención es imprescindible para una manipulación farmacológica racional de los ritmos biológicos tanto en la salud como en la enfermedad. Pueden identificarse numerosas situaciones clínicas en las cuales es de importancia modificar el sistema circadiano. En el hombre se verifica la existencia de ritmos circadianos alterados en situaciones tales como el insomnio, depresión, enfermedad emocional estacional, envejecimiento o ceguera (16,56), estados susceptibles de tratamiento con melatonina, lo que indica la importancia de la hormona desde el punto de vista terapéutico. Por otra parte, la dirección y velocidad de la respuesta del NSQ hipotalámico por cambios en el horario de la fase de luz (turnos de trabajo rotatorio, "jet-lag"), pueden ser restablecidas por la hormona pineal (9,169).

Nuestros relojes biológicos se resincronizan muy lentamente ante un cambio brusco de fase en la información ambiental. En consecuencia, los seres humanos no estamos bien preparados para adaptarnos a situaciones como los requerimientos de trabajo prolongado, los turnos rotatorios de trabajo, o los vuelos transmeridianos, en las cuales se producen cambios repentinos de fase en las señales ambientales. Las consecuencias de esta desadaptación son variadas y comprenden desde malestares transitorios (el llamado "jet-lag" de los viajeros de avión) a cuadros de desajustes neurovegetativos crónicos, de graves consecuencias para la salud y la productividad.

Estas situaciones ocurren porque ninguna de las desincronizaciones citadas han sido experimentadas durante la evolución de la raza humana (26, 144). Puede afirmarse que nuestro cuerpo está diseñado para un mundo que ya no existe. En los últimos 100 años, hemos cambiado radicalmente nuestro medio ambiente. Comenzando por la introducción de la lámpara de luz eléctrica hasta el desarrollo de las tecnologías de computación digital, control

de procesos, telecomunicaciones, y diseño y construcción de aviones comerciales, hemos sido catapultado a una "Sociedad de 24 Horas", con intercomunicaciones "around the clock" y McDonald's incluidos, para el cual, tal vez, no tenemos un diseño fisiológico adecuado.

La melatonina constituye la primera de una serie de manipulaciones que, sin provocar efectos adversos, es capaz de optimizar la adaptación de poblaciones humanas a cambios en los sincronizadores ambientales. Algo (unos pasitos) creemos haber avanzado en este trabajo de tesis, hacia la definición de la actividad y mecanismo de acción de la melatonina.

Para este tesista ha sido tarea divertida, por qué negarlo. Pero "en el fondo del reloj está la muerte" (de nuevo, Cortázar), y será mejor detenerse aquí.

*"Time is on my side"* (Mick Jagger, Rolling Stones).



Dr. DANIEL P. CARDINALI  
PROFESOR REGULAR TITULAR  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES



## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Abe K, Robison GA, Liddle GW, Butcher RW, Nicholson WE, Baird CE. Role of cyclic AMP in mediating the effect of MSH, norepinephrine and melatonin on frog skin color. *Endocrinology* 1969;85:674-682.
2. Acuña-Castroviejo D, Lowenstein PR, Rosenstein R, Cardinali DP. Diurnal variations of benzodiazepine binding in rat cerebral cortex: Disruption by pinealectomy. *J Pineal Res* 1986;3:101-109.
3. Acuña-Castroviejo D, Rosenstein RE, Romeo HE, Cardinali DP. Changes in gamma-aminobutyric acid high affinity binding to cerebral cortex membranes after pinealectomy or melatonin administration to rats. *Neuroendocrinology* 1986; 43: 24-31.
4. Albertson TE, Peterson SL, Stark LG, Lakin ML, Winters WD. The anticonvulsant properties of melatonin on kindled seizures in rats. *Neuropharmacology* 1981;20:61-66.
5. Anshkin P. Biology and neurophysiology of the conditioned reflex and its role in adaptive behavior. Oxford: Pergamon Press, 1974:1-24.
6. Anton-Tay F. Melatonin: effects on brain function. *Adv Biochem Psychopharmacol* 1974;11:315-324.
7. Anton-Tay F, Chou C, Anton S, Wurtman RJ. Brain serotonin concentration: Elevation following intraperitoneal administration of melatonin. *Science* 1968;162:277-278.
8. Anton-Tay F, Diaz JL, Fernandez-Guardiola A. On the effect of melatonin upon human brain. Its possible therapeutic implications. *Life Sci* 1971;10:841-850.
9. Arendt J. Melatonin. *Clin Endocrin* 1988;29:205-229.
10. Arendt J, Aldhous M, Markus V. Alleviation of jet lag by melatonin: Preliminary results of controlled double blind trials. *Br Med J* 1986;292:1170.
11. Armstrong SM. Melatonin and circadian control in mammals. *Experientia* 1989;45:932-938.
12. Armstrong SM. Melatonin: the internal zeitgeber in mammals? In: Reiter RJ, ed. *Pineal Res Rev*. New York: Alan R. Liss, 1989:157-202.

13. Armstrong SM, Redman J. Melatonin administration: Effects on rodent rhythms. In: Evered D, Clark S, eds. *Photoperiodism, melatonin and the pineal*, Ciba Foundation Symposium 117. London: Pitman, 1985:188-207.
14. Aschoff J. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1960;25:11-28.
15. Aschoff J. Circadian rhythms in man. *Science* 1965;148:1427-1432.
16. Aschoff J(ed.) *Handbook of Behavioral Neurobiology* vol 4: Biological rhythms. New York: Plenum Press, 1981.
17. Barchas J, DaCosta F, Spector S. Acute pharmacology of melatonin. *Nature* 1967;214:919-920.
18. Barnard EA, Darlison MG, Seeburg P. Molecular biology of the GABA receptor: the receptor/channel superfamily. *Trends Neurosci* 1988;10:502-509.
19. Bindoni M, Rizzo R. Hippocampal-evoked potentials and convulsive activity after electrolytic lesions of the pineal body in chronic experiments on rabbits. *ArchSciBiol* 1965;49: 223-233.
20. Blanck-Cereijido F, Cereijido M. *La vida, el tiempo y la muerte*. Fondo de Cultura Economica (Mexico) 1988;155 pp.
21. Borsook D, Richardson GS, Moore-Ede MC, Brennan MJ. GABA and circadian time-keeping: Implications for manic- depression and sleep disorders. *Med Hypotheses* 1986; 19:185-198.
22. Brailowsky S. Effects of melatonin on the photosensitive epilepsy of the baboon, *Papio papio*. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 1976;41:314-319.
23. Brown G, Grotta L, Niles L. Melatonin: Origin, control of circadian rhythm and site of action. *Adv Biosc* 1981; 29: 193-196.
24. Bruguerolle B, Prat M. Circadian phase dependent acute toxicity and pharmacokinetics of etidocaine in serum and brain of mice. *J Pharm Pharmacol* 1989;42:201-202.
25. Bruguerolle B, Jadot G. Circadian changes in procainamide and N-acetylprocainamide kinetics in the rat. *J Pharm Pharmacol* 1985;37:654-656.

26. Cardinali, DP, Golombek, DA, Bonanni Rey, R. La desicronizacion de los ritmos biologicos, *Ciencia Hoy* 1991;3(16): 6-10.

27. Cardinali. DP. Melatonin. A mammalian pineal hormone. *Endocr Rev* 1981;2:327-346.

28. Cardinali DP. Hormone effects on the pineal gland. In: Reiter RJ, ed. *The Pineal Gland. Vol. I. Anatomy and Biochemistry.* Boca Raton, FA: CRC Press, 1981:243-272.

29. Cardinali DP. *Manual de Neurofisiologia.* Madrid: Diaz de Santos, 1992.

30. Cardinali DP, Fuentes AM. Radioinmunoanálisis de aminas biogénas. Melatonina. In: Libertun C, ed. *Radioinmunoanálisis.* Buenos Aires: Lopez Libreros, 1980:171-178.

31. Cardinali DP, Hyypä MT, Wurtman RJ. Fate of intracisternally injected melatonin in the rat brain. *Neuroendocrinology* 1973;12:30-40.

32. Cardinali DP, Lynch HJ, Wurtman RJ. Binding of melatonin to human and rat plasma proteins. *Endocrinology* 1972;91:1213-1218.

33. Cardinali DP, Ritta MN, Fuentes AM, Gimeno MF, Gimeno AL. Prostaglandin E release by rat medial basal hypothalamus in vitro. Inhibition by melatonin at submicromolar amounts. *Eur J Pharmacol* 1980;67:151-153.

34. Cardinali DP, Rosenstein RE, Chuluyan HE, Vacas MI. Regulation of melatonin synthesis and release: Paracrine relationships in mammalian pineal gland. In: Fraschini F, Reiter RJ, eds. *Role of Melatonin and Pineal Peptides in Neuroimmuno- modulation.* New York: Plenum Press, 1991.

35. Cardinali DP, Rosenstein RE, Golombek DA, Chuluyan HE, Kanterewicz B, Del Zar MM, Vacas MI. Melatonin binding sites in brain: Single or multiple? In: Arendt J, ed. *Advances in Pineal Research, vol. 5.* London: John Libbey, 1991:159-165.

36. Cardinali DP, Vacas MI. Molecular endocrinology of melatonin: Receptor sites in brain and peripheral organs. *Adv Biosci* 1981;29:237-246.

37. Cardinali DP, Vacas MI. Cellular and molecular mechanisms controlling melatonin release by mammalian pineal gland. *Cell Mol Neurobiol* 1987;7:323-337.

38. Cardinali DP, Vacas MI, Boyer EE. Specific binding of melatonin in bovine brain. *Endocrinology* 1979;105:437-441.

39. Cardinali DP, Vacas MI, Lowenstein PR. Melatonin action on brain: Presumptive receptors and second messengers. In: Mess B, Ruszas C, Tima L, Pevet P, eds. *The Pineal Gland. Current State of Pineal Research*. Budapest: Akademiai Kiado, 1985:273-290.

40. Cardinali DP, Vacas MI, Ritta MN, Gejman PV. Neurotransmitter-controlled steroid hormone receptors in pineal gland and brain. In: Meyer BJ, Kramer S, eds. *Neuronal Communications*. Rotterdam: A. A. Balkema, 1984:155-171.

41. Cardinali DP, Vacas MI, Ritta MN, Gejman PV. Neurotransmitter-controlled steroid hormone receptors in the central nervous system. In: Osborne N, ed. *Selected Topics from Neurochemistry*. New York: Pergamon, 1985:307-316.

42. Cardinali DP, Vacas MI, Rosenstein RE. Cellular effects of melatonin: Receptors, second messengers and cell targets in the brain. In: Gupta D, Attanasio A, Reiter RJ, eds. *The Pineal Gland and Cancer*. London: Brain Research Promotion, 1988:77-88.

43. Cardinali DP, Vacas MI, Rosenstein RE, Etchegoyen GS, Sarmiento MI, Solveyra CG, Pereyra EN. Multifactorial control of pineal melatonin synthesis: an analysis through binding studies. *Adv Pin Res* 1987;2:51-66.

44. Cardinali DP, Wurtman RJ. Methods for assessing the biological activity of the mammalian pineal organ. In: O'Malley BW, Hardman JG, eds. *Methods in Enzymology*. Vol. 39. Hormone Action. Part D. Isolated Cells and Organ Systems. New York: Academic Press, 1975:376-397.

45. Cardinali DP, Wurtman RJ. Control of melatonin synthesis in the pineal organ. In: Altschule MD, ed. *Frontiers of Pineal Physiology*. Cambridge, MA: The MIT Press, 1975:12-41.

46. Cardinali DP, Wurtman RJ. Effects of light on man. In: Damon A, ed. *Physiological Anthropology*. New York: Oxford University Press, 1975:13-38.

47. Carlson LL, Weaver DR, Reppert SM. Melatonin signal transduction in hamster brain: Inhibition of adenylyl cyclase by pertussis toxin-sensitive G protein. *Endocrinology* 1989; 125: 2670-2676.

48. Casanueva F, Apud JA, Masotto C, Cochi D, Locatelli V, Racagni G, Muller A. Daily fluctuations in the activity of the tuberoinfundibular GABAergic system and prolactin levels. *Neuroendocrinology* 1984;39:367-370.
49. Cassone VM, Chesworth MJ, Armstrong SM. Entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin depends upon the hypothalamic suprachiasmatic nuclei. *Physiol Behav* 1986; 36:1111-1121.
50. Cassone VM, Chesworth MJ, Armstrong SM. Dose-dependent entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin. *J Biol Rhythms* 1986;1:219-229.
51. Cassone VM, Roberts MH, Moore RY. Effects of melatonin on 2-deoxy-1- C glucose uptake within rat suprachiasmatic nucleus. *Am J Physiol* 1988;255:R332-R337.
52. Catala MD, Quay WB, Vibat PS, Timiras P. Hypothyroidism and rehabilitation on day and night melatonin levels in pineal, hypothalamus and serum of male rats. *Neuroendocrinol Lett* 1987; 9:379-388.
53. Cattabeni F, Maggi A, Monduzzi M, De Angelis L, Racagni G. GABA:circadian fluctuations in rat hypothalamus. *J Neurochem* 1978;31:565-567.
54. Childs G, Redfern PH. A circadian rhythm in passive avoidance behavior: the effect of phase shift and the benzodiazepines. *Neuropharmacol* 1981;20:1365-1366.
55. Chuluyan HE, Rosenstein RE, Cardinali DP. Serotonin release mechanisms in bovine pineal gland: Stimulation by norepinephrine and dopamine. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1989;64:71-80.
56. Cipolla-Neto J, Marques N, Menna-Barreto LS. *Introducao Ao Estudo Da Cronobiologia*. Sao Paulo: Icone, 1988.
57. Coloma FM, Niles LP. In vitro effects of melatonin on H-muscimol binding in rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1984;8:669-672.
58. Corda MG, Costa E, Guidotti A. Specific proconvulsant action of an imidazobenzodiazepine (RO 15-1788) on isoniazid convulsions. *Neuropharmacology* 1982;21:91-94.

59. Cramer H, Rudolf J, Consbruch U, Kendel K. On the effects of melatonin on sleep and behavior in man. *Adv Biochem Psychopharmacol* 1974;11:187-191.

60. Crawley JN. *Pharmacol Biochem Behav* 1981;15:695-699.

61. Davies JA, Navaratnam V, Redfern PH. The effect of phase-shift on the passive avoidance response in rats and the modifying action of chlordiazepoxide. *Br J Pharmacol* 1974; 51:447-451.

62. Davis M. In: Eaton RC, ed. *Neural mechanisms of startlebehavior*. New York: Plenum Press, 1984:287-351.

63. De Blas AL, Park D, Friedrich P. Endogenous benzodiazepine-like molecules in the human, rat and bovine brain studied with a monoclonal antibody to benzodiazepines. *Brain Res* 1987; 413:275-284.

64. Del Zar MM, Martinuzzo M, Cardinali DP, Carreras LO, Vacas MI. Diurnal variation in melatonin effect on adenosine triphosphate and serotonin release by human platelets. *Acta Endocrinol* 1990a;123:453-458.

65. Del Zar M, Martinuzzo M, Falcon C, Cardinali DP, Carreras LO, Vacas MI. Inhibition of human platelet aggregation and thromboxane B2 production by melatonin. Evidence for a diurnal variation. *J Clin Endocr Met* 1990b;70:246-251.

66. De Robertis E, Pena C, Paladini AC, Medina JH. New developments on the search for the endogenous ligand(s) of central benzodiazepine receptors. *Neurochem Int* 1988;13:1-11.

67. Dingle R, Iversen LL, Breuker E. Naloxone as a GABA antagonist: Evidence from iontophoretic, receptor binding and convulsant studies. *Eur J Pharmacol* 1978;47:19-27.

68. Dubocovich ML. Characterization of a retinal melatonin receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 1985;234:395-401.

69. Dubocovich ML. Pharmacology and function of melatonin receptors. *FASEB J* 1988;2:2765-2773.

70. Dubocovich ML, Shankar G, Mickel M. 2-125 I-melatonin labels sites with identical pharmacological characteristics in chicken brain and chicken retina. *Eur J Pharmac* 1989;162:289-299.

71. Dubocovich ML, Takahashi JS. Use of 2-125 I -melatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:3916-3920.

72. Duncan MJ, Takahashi JS, Dubocovich ML. 2-125 I-Iodomelatonin binding sites in hamster brain membranes: Pharmacological characteristics and regional distribution. *Endocrinology* 1988;122:1825-1833.

73. Dunlap JC, Feldman JF. On the role of protein synthesis in the circadian clock of *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1988;85:1096-1100.

74. Ebadi M, Hexum TD, Pfeiffer RF, Govitrapong P. Pineal and retinal peptides and their receptors. *Pineal Res Rev* 1989;7:1-156.

75. Edmunds LN. *Cell cycle clocks*. New York, Decker, 1988;720p.

76. Eidman DS, Benedito MA, Leite JR. Daily changes in pentylenetetrazole-induced convulsions and open-field behavior in rats. *Physiol Behav* 1990;47:853-856.

77. Esposti D, Lissoni P, Mauri R, Rovelli F, Orsenigo L, Pescia S, Vegetti G, Esposti G, Fraschini F. The pineal gland-opioid system relation: Melatonin-naloxone interactions in regulating GH and LH release in man. *J Endocrinol Invest* 1988; 11:103-106.

78. Fang JM, Dubocovich ML. Activation of melatonin receptor sites regulates noradrenergic activity in the hypothalamus of C3H/HeN mouse. *FASEB J* 1988;A1802.

79. Farriello R, Bubenik G. Melatonin-induced changes in the sensory activation of acute epileptic foci. *Neurosci Lett* 1975; 3:151-155.

80. Fellenberg AJ, Phillipou G, Seamark RF. Urinary 6-sulphatoxymelatonin excretion and melatonin production rate: Studies in sheep and man. In: Matthews CD, Seamark RF, eds. *Pineal Function*. Amsterdam: Elsevier, 1981:143-149.

81. Ferkany JW, Smith LA, Seifert WE, Caprioli RM, Enna SJ. Measurement of gamma-aminobutyric acid (GABA) in blood. *Life Sci* 1978;22:2121-2128.

82. File SE, Hyde JR. A test of anxiety that distinguishes between the actions of benzodiazepines and those of other minor tranquilisers and of stimulants. *Pharmacol Biochem Behav* 1979; 11:65-69.

83. File SE, Pellow S. Intrinsic actions of the benzodiazepine receptor antagonist Ro 15-1788. *Psychopharmacol* 1986;88:1-11.

84. Finkelstein JS, Baum FR, Campbell CS. Entrainment of the female hamster to reversed photoperiod: role of the pineal. *Physiol Behav* 1978;21:105-111.

85. Fisher RS. Animals models of the epilepsies. *Brain Res Rev* 1989;14:245-278.

86. Franchi AM, Gimeno MF, Cardinali DP, Vacas MI. Melatonin, 5-methoxytryptamine and some of their analogs as cyclooxygenase inhibitors in rat medial basal hypothalamus. *Brain Res* 1987;405:384-388.

87. Frederikson RC, Burgis V, Edwards JD. Hyperalgesia induced by naloxone follows diurnal rhythm in responsivity to painful stimuli. *Science* 1977;198:756-758.

88. Freeman FG. Development of kindled seizures and circadian rhythms. *Behav Biol* 1980;30:231-235.

89. Gaffori O, van Ree JM. Serotonin and antidepressant drugs antagonize melatonin-induced behavioural changes after injection into the nucleus accumbens of rats. *Neuropharmacology* 1985;24:237-244.

90. Genazzani AR, Criscuolo M, Bergamaschi M, Cleva M, Petraglia F, Trentini GP. Daily photoperiod and endorphin concentrations in medial basal hypothalamus and pituitary gland. In: Trentini GP, DeGaetani C, Pevet P, eds. *Fundamentals and Clinics in Pineal Research*. New York: Raven Press, 1977:270-275.

91. Gloor P, Fariello RG. Generalized epilepsy: some of its cellular mechanisms differ from those of focal epilepsy. *Trends Neurosci* 1988;11:63-68.

92. Goldman BD. The physiology of melatonin in mammals. *Pineal Res Rev* 1983;1:145-182.

93. Green AR, Nutt DJ, Cowen PJ. Using Ro 15-1788 to investigate the benzodiazepine receptor in vivo: Studies on the anticonvulsant and sedative effect of melatonin and the convulsant effect of the benzodiazepine Ro 05-3663. *Psychopharmacology* 1982;78:293-295.
94. Green S. Benzodiazepines, putative anxiolytics and animal models of anxiety. *Trends Neurosci* 1991;14:101-104.
95. Greenshaw AJ, Van Nguyen T, Sanger DJ. Animal models for assessing anxiolytic, neuroleptic and antidepressant drug action. In: Boulton AA, Baker GB, Coutts RT, eds. *Neuromethods vol. 10. Analysis of Psychiatric drugs*. Clifton, N.J.: Humana Press, 1988:379-427.
96. Gwinner E, Benzinger I. Synchronization of a circadian rhythm in pinealectomized European starlings by daily injections of melatonin. *J Comp Physiol* 1978;127:209-213.
97. Haefely WE. Pharmacology of the allosteric modulation of GABA receptors by benzodiazepine receptor ligands. In: Barnard EA, Costa E, eds. *Allosteric Modulation of Amino Acid Receptors: Therapeutic Implications*. New York: Raven, 1989:47-70.
98. Halberg F, Caradente F, Cornelissen G, Katinas GS. Glossary of chronobiology. *Chronobiologia* 1977;4 (Supp 1):189 pp.
99. Hirata F, Hayaishi O, Tokuyama T, Senoh S. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J Biol Chem* 1974;249:1311-1313.
100. Hiroshige T, Honma K, Honma S. SCN-independent circadian oscillators in the rat. *Brain Res Bull* 1991;27:441-445.
101. Holmes SW, Sugden D. Effects of melatonin on sleep and neurochemistry in the rat. *Brit J Pharmacol* 1982;76:95-101.
102. Hong SM, Stetson MH. Detailed diurnal rhythm of sensitivity to melatonin injections in Turkish hamsters, *Mesocricetus brandti*. *J Pineal Res* 1987;4:69-79.
103. Hunkeler W, Mohler R, Pieri L, Polc P, Bonetti EP, Cumin R, Shaffner R, Haefely W. Selective antagonists benzodiazepines. *Nature* 1981;290:514-516.

104. Ito T, Hori M, Yoshida K, Shimizu M. Effect of anticonvulsants on seizures developing in the course of daily administration of pentylenetetrazole to rats. *Eur J Pharmac* 1977;45:165-172.

105. Izquierdo I, Da Cunha C, Medina JH. Endogenous benzodiazepine modulation of memory processes. *Neurosci Biobehav Rev* 1990;14:419-424.

106. Izquierdo I, De Cunha C, Huang CH, Walz R, Wolfman C, Medina JH. Post-training down-regulation of memory consolidation by a GABA A mechanism in the amygdala modulated by endogenous benzodiazepines. *Behav Neural Biol* 1990;54:105-109.

107. Izquierdo I, Medina JH. GABA A receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. *Trends Pharmacol Sci* 1991;12: 260-265.

108. Izumi K, Donaldson J, Minnich J, Barbeau A. Ouabain-induced seizures in rats: Modification by melatonin and melanocyte-stimulating hormone. *Can J Physiol Pharmacol* 1973;51:572-578.

109. Kandel ER, Schwartz JH. Principles of neural science. Elsevier 1985;980 pp.

110. Karsch FJ, Bittman EL, Foster DL, Goodman RL, Legan SJ, Robinson JE. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Rec Prog Horm Res* 1984;40:185-222.

111. Kavaliers M, Hirst M. Daily rhythm of analgesia in mice: Effects of age and photoperiod. *Brain Res* 1983;279:387-393.

112. Kelly RW, Amato F, Seamark RF. N-Acetyl 5-methoxykynurenamine, a brain metabolite of melatonin, is a potent inhibitor of prostaglandin synthesis. *Biochim Biophys Res Commun* 1984;121:372-375.

113. Kennaway DJ, Hugel HM. Melatonin, melatonin metabolites and the suprachiasmatic nucleus. In: Foldes A, Reiter RS, eds. *Adv Pin Res*. New York: John Libbey & Co., Ltd., 1991:169-178.

114. Kennaway DJ, Royles P, Webb H, Carbone F. Effects of protein restriction, melatonin administration, and short daylength on brain benzodiazepine receptors in prepubertal male rats. *J Pineal Res* 1988;5:455-467.

115. Klein DC. Circadian rhythms in the pineal gland. In: Krieger DT, ed. *Endocrine Rhythms*. New York: Raven, 1979:203-223.
116. Klein D, Moore RY, Reppert SM. *Suprachiasmatic nucleus. The mind's clock*. Oxford Univ Pres, New York, 1991;496 pp.
117. Konopka RJ, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1971;68:2112-2116.
118. Kopin IJ, Pare CM, Axelrod J, Weissbach H. The fate of melatonin in animals. *J Biol Chem* 1961;236:3072-3075.
119. Kumar MS, Besch EL, Millard WJ, Sharp DC, Leadem CA. Effect of short photoperiod on hypothalamic methionine-enkephalin and LHRH content and serum  $\beta$ -endorphin-like immunoreactivity ( $\beta$ -LI) levels in golden hamsters. *J Pineal Res* 1984;1:197-205.
120. Kumar MS, Che CL, Sharp DC, Liu JM, Kalra PS, Kalra SP. Diurnal fluctuation in methionine-enkephalin levels in the hypothalamus and preoptic area of male rats: Effects of pinealectomy. *Neuroendocrinology* 1982;35:28-31.
121. Laitinen JT, Castren E, Vakkuri O, Saavedra JM. Diurnal rhythm of melatonin binding in the rat suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology* 1989;124:1585-1587.
122. Lakin ML, Miller CH, Stott ML, Winters WD. Involvement of the pineal gland and melatonin in murine analgesia. *Life Sci* 1981;29:2543-2551.
123. Lang U, Aubert ML, Conne BS, Bradtke JC, Sizonenko PC. Influence of exogenous melatonin on melatonin secretion and the neuroendocrine reproductive axis of intact male rats during sexual maturation. *Endocrinology* 1983;112:1578-1584.
124. Lang U, Aubert ML, Sizonenko PC. Location of melatonin receptors. *Pediatr Res* 1981;15:80.
125. Laudon M, Zisapel N. Characterisation of central melatonin receptors using  $^{125}$ I-melatonin. *FEBS Lett* 1986; 197:9-12.
126. Leach CM, Reynoldson JA, Thornburn GD. Release of E prostaglandins into cerebrospinal fluid and its inhibition by melatonin after cervical stimulation in the rabbit. *Endocrinology* 1982;110:1320-1324.

127. Le Bars D, Dickenson AH, Besson JM, Villanueva L. Aspects of sensory processing through convergent neurons. In: Yaksh TL, ed. Spinal Afferent Processing. New York: Plenum, 1986:467-504.

128. Lemmer B (ed). Chronopharmacology. Cellular and Biochemical Interactions. New York: M. Dekker, 1989.

129. Lemmer B, Winckler H, Ohm T, Fink M. Chronopharmacokinetics of beta-receptor blocking drugs of different lipophilicity (propranolol, metoprolol, sotalol, atenolol) in plasma and tissues after single and multiple dosing in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1985;330:42-49.

130. Leone RM, Silman RE. Melatonin can be differentially metabolized in the rat to produce N-acetylserotonin in addition to 6-hydroxymelatonin. *Endocrinology* 1984;114:1825-1832.

131. Liou SY, Albers HE. Single unit response of neurons within the hamster suprachiasmatic nucleus to GABA and low chloride perfusate during the day and night. *Brain Res Bull* 1990;25:93-98.

132. Lissoni P, Esposti D, Esposti G, Mauri R, Resentini M, Moravito F, Fumagalli P, Santagostino A, Delitala G, Fraschini F. A clinical study on the relationship between the pineal gland and the opioid system. *J Neural Transm* 1986;65:63-73.

133. Litchfield JT, Wilcoxon F. A simplified method of evaluating dose-effect relationships. *J Pharmacol Exp Ther* 1949;96:99-113.

134. Loscher W.  $\alpha$ -Acetylenic GABA antagonizes the decrease in synaptosomal GABA concentrations but not the seizures induced by 3-mercaptopropionic acid in rats. *Biochem Pharmacol* 1986; 35:3176-3180.

135. Lowenstein PR, Rosenstein R, Cardinali DP. Melatonin reverses pinealectomy-induced decrease of benzodiazepine binding in rat cerebral cortex. *Neurochem Int* 1985;7:675-681.

136. Lutsch EF, Morris RW. Circadian periodicity in susceptibility to lidocaine hydrochloride. *Science* 1967;156:100-103.

137. Maestroni GJ, Conti A, Pierpaoli W. Melatonin, stress, and the immune system. *Pineal Res Rev* 1989;7:203-226.

138. Marangos PJ, Patel J, Hirata F, Sonhein D, Paul SM, Skolnick P, Goodwin F. Inhibition of diazepam binding by tryptophan derivatives including melatonin and its brain metabolite N-acetyl-5-methoxy kynurenamine. *Life Sci* 1981;29:259-267.

139. Marczyński T, Yamaguchi PN, Ling GM, Grodzinska L. Sleep induced by the administration of melatonin (5-methoxy-N-acetyltryptamine) to the hypothalamus of unrestrained cats. *Experientia* 1964;20:435-437.

140. Minors DS, Waterhouse JM. Circadian rhythms and their mechanisms. *Experientia* 42:1-11 1986.

141. Mirmiran M, Pevet P. Effects of melatonin and 5-methoxytryptamine on sleep-wake patterns in the male rat. *J Pineal Res* 1986;3:135-141.

142. Moore RY. The suprachiasmatic nucleus and the organization of a CNS circadian rhythm. *Trends Neurosci* 1983;5:404-407.

143. Moore-Ede M. Physiology of the circadian timing system; predictive versus reactive homeostasis. *Am J Physiol*. 1986;R737-R752.

144. Moore-Ede MC, Sulzman FM, Fuller CA. *The clocks that time us: Physiology of the mammalian circadian clock* Harvard, Mass: Harvard Univ Press, 1982, 480 pp.

145. Morgan E. An appraisal of tidal activity rhythms. *Chronobiol Int* 1991;8:283-306.

146. Morgan PJ, Williams LM, Davidson G, Lawson W, Howell E. Melatonin receptors on ovine pars tuberalis: Characterization and autoradiographical localization. *J Neuroendocr* 1989;1:1-4.

147. Morguenstern EA, Vacas MI, Sarmiento MI, Cardinali DP. Pineal-related changes in cyclic AMP levels of rat medial basal hypothalamus. *Experientia* 1984;40:223-224.

148. Mrosovsky N, Reeb SG, Honrado GI, Salmon PA. Behavioral entrainment of circadian rhythms. *Experientia* 1989;45:696-702.

149. Mrosovsky N, Salmon PA. Triazolam and phase-shifting acceleration re-evaluated. *Chronobiol Int* 1990;7:35-41.

150. Nakano S, Nagai K, Ogawa N. Role of feeding schedule and pharmacokinetics in chronopharmacology of drugs acting on the central nervous system. *Ann Rev Chronopharmacol* 1984a; 1:263-266.

151. Nakano S, Watanabe H, Nagai K, Ogawa N. Circadian stage-dependent changes in diazepam kinetics. *Clin Pharmacol Ther* 1984b;36:271-277.

152. Neville K, McNaughton N. Anxiolytic-like action of melatonin on acquisition but not performance of DRL. *Pharmacol Biochem Behav* 1986;24:1497-1502.

153. Niles LP. 3H-melatonin binding in membrane and cytosol fractions from rat and calf brain. *J Pineal Res* 89-98:1987.

154. Niles LP. Effects of melatonin on adenylate cyclase activity in rat brain. *Adv Biosci* 1985;53:283-288.

155. Niles LP. Melatonin and N-acetyl-5-methoxy-kynurenamine interaction with brain receptors and  $\gamma$ -aminobutyric acid and diazepam. *Chinese J Physiol Sci* 1988;4:261.

156. Niles LP, Peace CH. Allosteric modulation of t[35S]-butylbicyclophosphorothionate binding in rat brain by melatonin. *Brain Res Bull* 1990;24:635-638.

157. Niles LP, Pickering DS, Arciszweski MA. Effects of chronic melatonin administration on GABA and diazepam binding in rat brain. *J Neural Transm* 1987;70:117-124.

158. Niles LP, Pickering DS, Sayer BG. HPLC-Purified 2-125 I iodomelatonin labels multiple binding sites in hamster brain. *Biochim Biophys Res Commun* 1987;147:949-956.

159. Niles LP, Wong YW, Mishra RK, Brown GM. Melatonin receptors in brain. *Eur J Pharmacol* 1979;55:219-220.

160. Nir I, Behroozi K, Assael M, Ivriani I, Sulman FG. Changes in the electrical activity of the brain following pinealectomy. *Neuroendocrinology* 1968;4:122-127.

161. Novas ML, Wolfman C, Medina JH, De Robertis E. Proconvulsant and anxiogenic effects of n-butyl carboline-3- carboxylate, an endogenous

benzodiazepine binding from brain. *Pharmacol Biochem Behav* 1988;30:331-336.

162. Ohdo S, Nakano S, Ogawa N. Chronotoxicity of sodium valproate and its mechanisms in mice: Dose-concentration-response relationship. *Chronobiol Int* 1989;6:229-235.

163. Oksche A, Korf HW, Rodriguez E. Pinealocytes as photoneuroendocrine units of neuronal origin: concept and evidence. *Adv Pin Res* 1987;2:1-18.

164. Oliverio A, Castellano E, Puglisi-Allegra S. Opiate analgesia: Evidence for circadian rhythms in mice. *Brain Res* 1982;249:265-270.

165. Palmer JD. Contributions made to chronobiology by studies of fiddler crab rhythms. *Chronobiol Int* 1991;8:110-130.

166. Pang SF, Brown GM. Regional concentrations of melatonin in the rat brain in the light and dark period. *Life Sci* 1983; 33:1199-1204.

167. Pawlikowski M, Juszczak M, Karasek E, Muszynska B, Karasek M. Melatonin inhibits prostaglandin E release from the medial basal hypothalamus of pinealectomized rats. *J Pineal Res* 1984;1:317-321.

168. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985;14:149-167.

169. Petrie K, Conaglen JV, Thompson L, Chamberlain K. Effect of melatonin on jet lag after long haul flights. *Br Med J* 1989;298:705-707.

170. Pevet P. Environmental control of the annual reproductive cycle in mammals. Role of the pineal gland. *Comp Physiol Environm Adapt* 1987;3:82-100.

171. Philo R, Reiter PJ. Characterization of pinealectomy-induced convulsions in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Epilepsia* 1978;19:485-492.

172. Pittendrigh CS. Circadian systems: general perspective. In: Aschoff J, ed. *Handbook of behavioral neurobiology*. Vol 4: Biological rhythms. New York: Plenum Press, 1981:57-80.

173. Pittendrigh CS, Daan S. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. I. The stability and lability of spontaneous frequency. *J Comp Physiol* 1976;106:223-252.

174. Ralph MR, Menaker M. Bicuculline blocks circadian phase delays but not advances. *Brain Res* 1985;325:362-365.

175. Ralph MR, Menaker M. Effects of diazepam on circadian phase advances and delays. *Brain Res* 1986;372:405-408.

176. Ralph MR, Menaker M. A mutation of the circadian system in Golden hamsters. *Science* 1988;241:1225-1227.

177. Ralph MR, Menaker M. GABA regulation of circadian responses to light. I. Involvement of GABA<sup>A</sup>-benzodiazepine and GABA<sup>B</sup> receptors. *J Neurosci* 1989;9:2858-2865.

178. Redman J, Armstrong SM, Ng KT. Free-running activity rhythms in the rat: Entrainment by melatonin. *Science* 1983; 219:1089-1091.

179. Reinberg A, Labreque G, Smolensky MH. *Chronobiologie et chronotherapeutique*. Flammarion, Paris, 1991; 201 pp.

180. Reinberg A, Smolensky MH. Circadian changes of drug disposition in man. *Clin Pharmacokinet* 1982;7:401-420.

181. Reiter RJ. Pineal gland: an intermediary between the environment and the endocrine system. *Psychoneuroendocrinology* 1983;8:31-40.

182. Reiter RJ. The melatonin message: Duration versus coincidence hypotheses. *Life Sci* 1987;40:2119-2131.

183. Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Rev* 1991;12:151-180.

184. Reppert SM, Weaver DR, Rivkees SA, Carlson LL. Melatonin: Receptors, G protein coupling and signal transduction. 71st Annu Meet Endocrine Soc 1989;8.

185. Reppert SM, Weaver DR, Rivkees SA, Stopa EG. Putative melatonin receptors in a human biological clock. *Science* 1988;242:78-81.

186. Rivkees SA, Carlson LL, Reppert SM. Guanine nucleotide-binding protein regulation of melatonin receptors in lizard brain. *Proc Nat Acad Sci USA* 1989;86:3882-3885.

187. Roberts E. What do GABA neurons really do? They make possible variability generation in relation to demand. *Exp Neurol* 1986;93:279-290.

188. Romijn H. The pineal, a tranquillizing organ? *Life Sci* 1978;23:2257-2274.

189. Rosbash M, Hall JC. The molecular biology of circadian rhythms. *Neuron* 1989;3:387-398.

190. Rosenstein RE, Cardinali DP. Melatonin increases in vivo GABA accumulation in rat hypothalamus, cerebellum, cerebral cortex and pineal gland. *Brain Res* 1986;398:403-406.

191. Rosenstein RE, Cardinali DP. Central gabaergic mechanisms as targets for melatonin activity in brain. *Neurochem Int* 1990;17:373-379.

192. Rosenstein RE, Chuluyan HE, Cardinali DP. Presynaptic activity of gamma-aminobutyric acid on norepinephrine release and uptake in rat pineal gland. *Journal of Neural Transmission-Gen. Sect.* 1990;82:131-140.

193. Rosenstein RE, Chuluyan HE, Diaz MC, Cardinali DP. Gaba as a presumptive paracrine signal in the pineal gland. Evidence on an intrapineal GABAergic system. *Brain Research Bulletin* 1990; 25:339-344.

194. Rosenstein RE, Chuluyan HE, Pereyra EN, Cardinali DP. Release and effect of gamma-aminobutyric acid on rat pineal melatonin production in vitro. *Cellular and Molecular Neurobiology* 1989;9:207-220.

195. Rosenstein RE, Estevez AG, Cardinali DP. Time-dependent effect of melatonin on glutamic acid decarboxylase activity and  $^{36}\text{Cl}^-$  influx in rat hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 1989; 1:443-447.

196. Rosenstein RE, Sanjurjo C, Cardinali DP. Gamma aminobutyric acid uptake, release and effect on  $^{36}\text{Cl}^-$  influx in bovine pineal gland. *Journal of Neural Transmission* 1989; 77:141-152.

197. Rudeen PK, Philo RC, Symmes SK. Antiepileptic effects of melatonin in the pinealectomized Mongolian gerbil. *Epilepsia*

1980;21:149-154.

198. Rudman D. Injection of melatonin into cisterna magna increases concentration of 3',5'-cyclic guanosine monophosphate in cerebrospinal fluid. *Neuroendocrinology* 1976;20:235-242.

199. Samel A, Wegmann HM, Vejvoda M, Maass H, Gundel A, Schutz M. Influence of melatonin treatment on human circadian rhythmicity before and after a simulated 9-hr time shift. *J Biol Rhythms* 1991;6:235-248.

200. Schmutz M, Baud J, Glatt A, Portet C, Baltzer V. Chronopharmacological investigations on tonic-clonic seizure in rats and their suppression by carbamazepine, oxcarbazepine and diazepam. In: Dreifuss FE, Meinardi H, Stefan H, eds. *Chronopharmacology in Therapy of the Epilepsies*. New York: Raven Press, 1990:145-154.

201. Shibata S, Cassone VM, Moore RY. Effects of melatonin on neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neurosci Lett* 1989;97:140-144.

202. Stankov B, Reiter RJ. Melatonin receptors: Current status, facts, and hypotheses. *Life Sci* 1990;46:971-982.

203. Stehle J, Vanecek J, Vollrath L. Effects of melatonin on spontaneous electrical activity of neurons in rat suprachiasmatic nuclei: An in vitro iontophoretic study. *J Neural Transm* 1989;78:167-177.

204. Stetson MH, Sarafidis E, Rollag MD. Sensitivity of adult male Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus sungorus*) to melatonin injections throughout the day: Effects on the reproductive system and the pineal. *Biol Reprod* 1986;35:618-623.

205. Stetson MH, Tay DE. Time-course of sensitivity of golden hamsters to melatonin injections throughout the day. *Biol Reprod* 1983;24:432-438.

206. Sugden AL, Sugden D, Klein DC.  $\alpha$ -Adrenoceptor activation elevates cytosolic calcium in rat pinealocytes by increasing net influx. *J Biol Chem* 1987;262:741-745.

207. Sugden D. Psychopharmacological effects of melatonin in mouse and rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1983;227:587-591.

208. Takahashi H, Shibata M, Ohkubo T, Saito K, Inoki R. Effect of neurotrophin on hyperalgesia induced by prostaglandin E<sub>2</sub>, naloxone, melatonin and dark condition in mice. *Japan J Pharmacol* 1987;43:441-444.

209. Takahashi JS, Zatz M. Regulation of circadian rhythmicity. *Science* 1982;217:1104-1111.

210. Tallman JF, Gallagher DW. The GABA-ergic system: a locus of benzodiazepine action. *Annu Rev Neurosci* 1985;8:21-44.

211. Tamarkin L, Vurtis B, Almeida OF. Melatonin: A coordinating signal for mammalian reproduction. *Science* 1985;27:714-720.

212. Taylor C P. How do seizures begin? Clues from hippocampal slices. *Trends Neurosci* 1988;11:375-378.

213. Turek FW, Losee-Olson S. A benzodiazepine used in the treatment of insomnia phase shifts the mammalian circadian clock. *Nature* 1986;321:167-168.

214. Turek FW, Van Reeth O. Altering the mammalian circadian clock with the short-acting benzodiazepine, triazolam. *Trends Neurosci* 1988;11:535-541.

215. Underwood H. The pineal and circadian rhythms. In: Reiter RJ, ed. *The pineal gland*. New York: Raven Press, 1984: 221-251.

216. Underwood H, Harless M. Entrainment of the circadian activity rhythms of a lizard to melatonin injections. *Physiol Behav* 1985;35:267-270.

217. Vacas MI, Berria MI, Cardinali DP, Lascano EF. Melatonin inhibits -adrenoceptor-stimulated cyclic AMP accumulation in rat astroglial cell cultures. *Neuroendocrinology* 1984;38:176-181.

218. Vacas MI, Cardinali DP. Diurnal changes in melatonin binding sites of hamster and rat brains: Correlation with neuroendocrine responsiveness to melatonin. *Neurosci Lett* 1979;15:259-263.

219. Vacas MI, Cardinali DP. Binding sites for melatonin in bovine pineal gland. *Hormone Res* 1980;13:121-131.

220. Vacas MI, Keller Sarmiento MI, Cardinali DP. Melatonin increases cGMP and decreases cAMP levels in rat medial basal hypothalamus in vitro. *Brain Res* 1981;225:207-211.

221. Vacas MI, Keller Sarmiento MI, Cardinali DP. Pineal methoxyindoles depress calcium uptake by rat brain synaptosomes. *Brain Res* 1984;294:176-181.

222. Vakkuri O, Tervo J, Luttinen R, Ruotsalainen H, Rahkamaa E, Leppaluoto JA. A cyclic isomer of 2-hydroxymelatonin: a novel metabolite of melatonin. *Endocrinology* 1987; 120: 2453-2459.

223. Van Reeth O, Hinch D, Tecco JM, Turek FW. The effects of short periods of immobilization on the hamster circadian clock. *Brain Res* 1991;545:208-214.

224. Van Reeth O, Turek FW. Adaptation of circadian rhythmicity to shift in light-dark cycle accelerated by a benzodiazepine. *Am J Physiol* 1987;253:R204-R207.

225. Van Reeth O, Vanderhaegen JJ, Turek FW. A benzodiazepine antagonist, Ro 151788, can block the phase-shifting effects of triazolam on the mammalian circadian clock. *Brain Res* 1988;444:333-339.

226. Vogel JR, Beer B, Clody DE. A simple and reliable conflict procedure for testing antianxiety agents. *Psychopharmacologia* 1971;21:1-7.

227. Vollrath L. The pineal organ. Berlin: Springer, 1981.

228. Vollrath L. Mammalian pinealocytes: ultrastructural aspects and innervation. In: Evered D, Clark S, eds. Photo-periodism, melatonin and the pineal. London: Pitman, 1985: 9-17.

229. Vollrath L, Schroder H. Neuronal properties of mammalian pinealocytes. In: Trentini GP, DeGaetani C, Pevet P, eds. Fundamentals and Clinics in Pineal Research. Raven, 3-23.

230. Vollrath L, Semm P, Gammel G. Sleep induction by intranasal application of melatonin. Birau N, Schloot W, eds. Melatonin: Current Status and Perspectives. Pergamon, 1981:327-329.

231. Waniewski R, Suria A. Alterations in gamma-aminobutyric acid content in the rat superior cervical ganglion and pineal gland. *Life Sci* 1977;21:1129-1142.

232. Waterhouse JM, Minors DS, Waterhouse ME. Your body clock. How to live with it not against it. Oxford: Oxford Univ Press, 1990.

233. Webley GE, Bohle A, Leidenberger FA. Positive relationship between the nocturnal concentrations of melatonin and prolactin, and a stimulation of prolactin after melatonin administration in young men. *J Pineal Res* 1988;5:19-33.

234. Wever R. The circadian system of man. Springer Verlag, Berlin, 1979.

235. White BH, Skura RD, Rollag MD. Pertussis toxin blocks melatonin-induced pigment aggregation in *Xenopus* dermal melanophores. *J Comp Physiol B* 1987; 157:153-159.

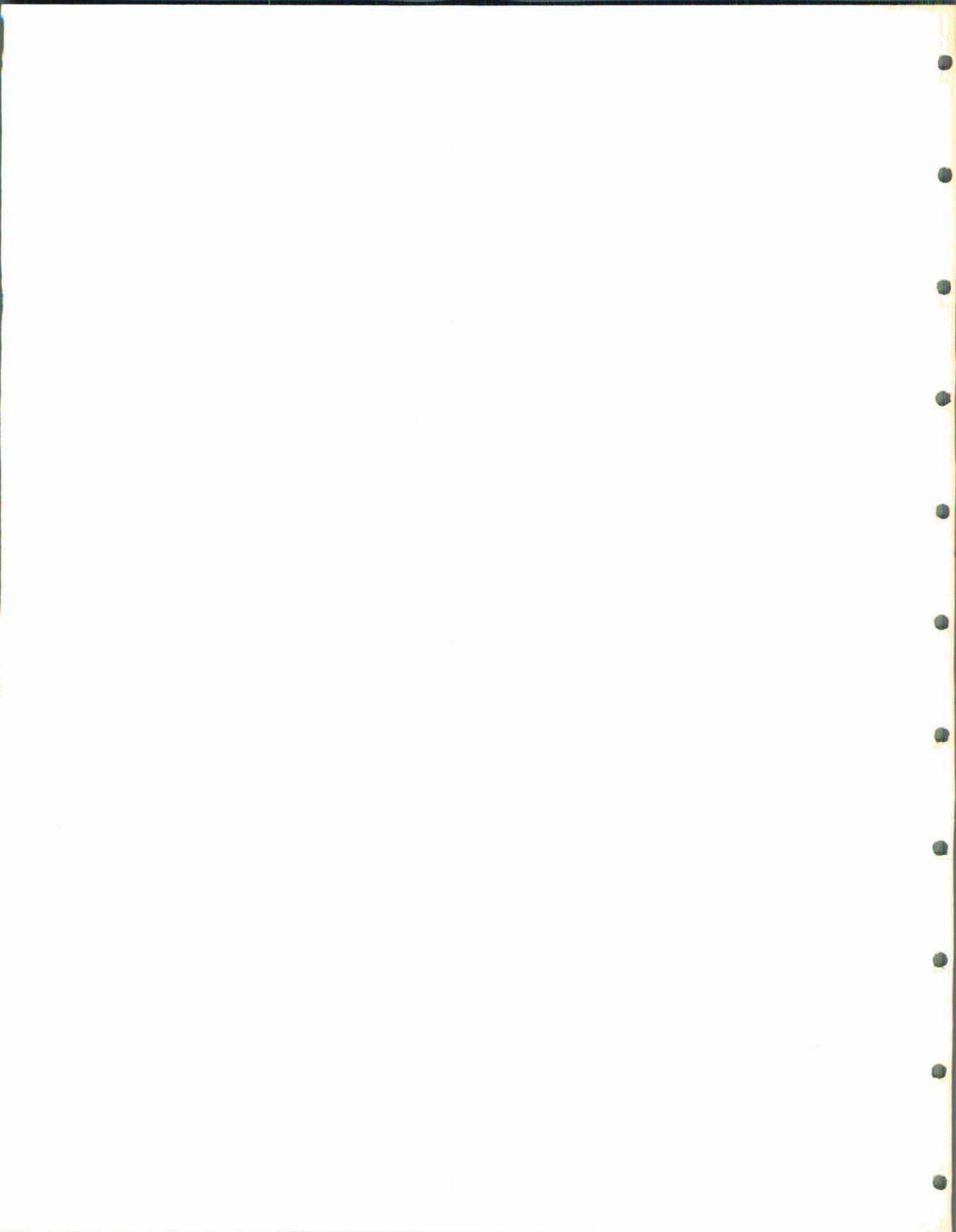
236. Wise SP. Co-localization of GABA and neuropeptides in the cerebral cortex. *Trends Neurosci* 1985;8:92-95.

237. Wurtman RJ, Lieberman HS. Melatonin secretion as a mediator of circadian variations in sleep and sleepiness. *J Pineal Res* 1985;1:301-303.

238. Zisapel N. Melatonin receptors revisited. *J Neural Transm* 1988;73:1-5.

239. Zisapel N, Laudon M. Inhibition by melatonin of dopamine release in rat hypothalamus: regulation of calcium entry. *Brain Res* 1983;272:378-381.

240. Zisapel N, Nir I, Laudon M. Circadian variations in melatonin-binding sites in discrete areas of the male rat brain. *FEBS Lett* 1988;232:172-176.

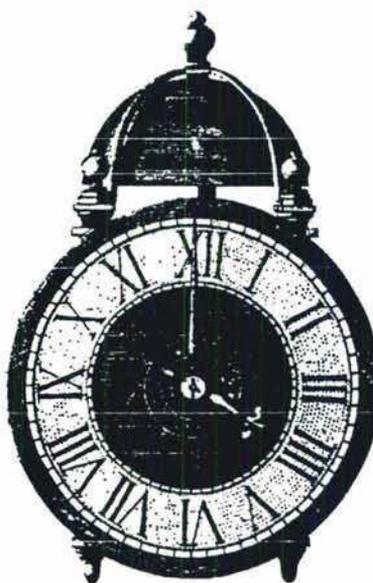


## CREDITOS

Los resultados de este trabajo de tesis han sido parcialmente volcados en los siguientes trabajos:

- Golombek, D.A.; Escolar, E.; Cardinali, D.P. Melatonin-induced depression of locomotor activity in hamsters: time dependency and inhibition by the central type benzodiazepine antagonist Ro 15-1788. *Physiol Behav* 49: 1091-1098, 1991.
- Golombek, D.A.; Escolar, E.; Burin, L.; Brito Sanchez, M.G.; Cardinali, D.P. Time-dependent melatonin analgesia in mice: inhibition by opiate or benzodiazepine antagonism. *Eur J Pharmacol* 194: 25-30, 1991
- Golombek, D.A.; Fernandez Duque, D.; Burin, L.; Brito Sanchez, M.G.; Cardinali, D.P. Time-dependent anticonvulsant activity of melatonin in hamsters. *Eur J Pharmacol* 210 (3): 253-258, 1992
- Golombek, D.A.; Escolar, E.; Burin, L.; Brito Sanchez, M.G.; Fernandez Duque, D.; Cardinali, D.P. Chronopharmacology of melatonin: inhibition by benzodiazepine antagonism. *Chronobiol Int* 9(2), 1992.
- Cardinali, D.P.; Golombek, D.A.; Bonnani Rey, R. Relojes y calendarios biologicos. Origen, implicancias e importancia en la salud y en la enfermedad. Fondo de Cultura Economica. Buenos Aires, en preparacion.

y otros trabajos enviados para su publicación



W. J. H. H.

Graduados  
8-5-92



Este trabajo fue  
fotocopiado y encuadernado  
en Mayo de 1992 en

LASER IMAGE CABILDO

Cabildo 711  
Buenos Aires





