

172  
1ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

EFFECTO PROTECTOR DE LA GLANDULA PINEAL EN LA  
PRESENTACION DE CRISIS CONVULSIVAS DURANTE  
LA ABSTINENCIA ETILICA EN LA RATA

TESIS PROFESIONAL QUE PRESENTA

GABRIEL ROLDAN ROLDAN

PARA OBTENER EL TITULO DE: BIOLOGO



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

I.	INTRODUCCION	
1.	Marco Teórico .....	1
2.	Aspectos Básicos de la Glándula Pineal .....	4
II.	ANTECEDENTES	
1.	La Glándula Pineal y su Relación con la Excitabilidad Cerebral .....	22
2.	Supresión Alcohólica y Actividad del Sistema Nervioso Central .....	26
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	
1.	Diseño Experimental .....	29
2.	Hipótesis .....	30
3.	Objetivos .....	31
IV.	MATERIAL Y METODO .....	32
V.	RESULTADOS .....	40
VI.	DISCUSION .....	56
VII.	REFERENCIAS .....	63

## I. INTRODUCCION

### 1. Marco Teórico:

El estudio de las ciencias biológicas puede visualizarse en general, desde dos perspectivas distintas: la biología observacional o descriptiva, en la cual no se tiene el control de las variables de un fenómeno determinado, y la experimental, donde sucede lo contrario.

Dentro de la biología experimental, una de las áreas que ha tenido un desarrollo más acelerado en el presente siglo son las llamadas neurociencias; el cúmulo de conocimiento generado en torno a ellas es impresionante. Básteme mencionar -sin discutir mayormente respecto a la legitimidad y lo que éste premio represente de los 74 Nobel en fisiología y medicina otorgados de 1904 a 1983, 22 corresponden a contribuciones en neurociencia, compartidos por 41 científicos de un total de 129. Entre ellos destacan investigadores mundialmente reconocidos como Pavlov, Ramón y Cajal, Camiló Golgi, Otto Loewi, Konrad Lorentz, etc. (50). En 1986 otro neurocientífico, Rita Levi-Montalcini, fue distinguido con este honor por sus contribuciones sobre factores del crecimiento neuronal.

Otro indicador bastante veraz de tal afirmación es la cantidad de revistas especializadas en esta área que se publican periódicamente a nivel mundial, la cual excede el número de publicaciones que hay en cualquier otra especialidad, al menos de biomedicina.

Quizá el desarrollo tan vigoroso en este campo se deba a que el estudio del sistema nervioso compete a investigadores de diversa formación profesional: biólogos, psicólogos, médicos, químicos, etc., a diferencia de disciplinas en donde solo los especialistas de una determinada área impulsan su avance.

De este modo, el estudio de la neurociencia se ha abordado desde varios puntos de vista, utilizando distintas estrategias y abarcando desde los aspectos básicos de la comunicación neuronal hasta los más integrativos que involucran funciones tan complejas

como el aprendizaje o los estados de conciencia.

Considerando lo anterior es natural suponer que el concimiento de cada estructura y cada función cerebral ha alcanzado un nivel de complejidad tan alto que actualmente existen especialistas dedicados a estudiar una pequeña porción de este conglomerado interdisciplinario que es la neurobiología.

Dentro de este panorama general se inscribe la investigación en torno a la glándula pineal. A pesar de ser uno de los  órganos que más pronto suscitó el interés de los naturalistas -a partir de los juicios de René Descartes quien supuso que en ella radicaba el sustrato anatómico del alma (146), elaborando toda una teoría (dióptrica) para explicar las funciones voluntarias en el hombre- su estudio se ha formalizado y sistematizado hasta fechas muy recientes.

Dentro de los últimos veinte años ha empezado a emerger un concepto coherente sobre el funcionamiento de ésta glándula, el cual está basado en estudios fisiológicos y bioquímicos principalmente.

Desde el punto de vista bioquímico, el aspecto más  importante consiste en que la pineal es la única que tiene la capacidad de sintetizar una hormona llamada melatonina en forma rítmica, a la cual se le han atribuido propiedades neuractivas .

Fisiológicamente hablando, éste órgano juega un papel  relevante en los cambios reproductivos inducidos por el fotoperiodo en los mamíferos. En este sentido, la pineal podría transmitir información acerca de las condiciones de luminosidad diaria hacia diversos sistemas hormonales.

Pese a que todavía no está claramente establecido, existe una creciente evidencia de que la producción de melatonina y los efectos de esta glándula sobre varias funciones están íntimamente relacionados. La convergencia conceptual entre la fisiología pineal y la melatonina se apoya en experimentos recientes, los cuales  demuestran que la administración de la hormona a tiempos precisos  provoca los mismos cambios que las alteraciones en el fotoperíodo

Aunque la producción cíclica de melatonina y la  reproducción estacional son dos de las características mas sobresalientes de la fisiología pineal, no son, con mucho, las únicas. La cantidad

de funciones que actualmente se sabe tienen relación con esta glándula es tan amplia y diversa que aparentemente estas funciones son inconexas y sùmamamente difíciles de integrar; Esto último es parcialmente cierto, sin embargo, existen mecanismos en común que han ayudado a establecer una idea general de esta estructura.

La presente tesis forma parte de una línea de investigación encaminada a dilucidar la relación que hay entre la fisiología de la glándula pineal y el mantenimiento o control del estado de excitación a nivel cerebral. Dentro de esta línea se han publicado suficientes evidencias como para proponer que dicho control neural es de tipo inhibitorio, aunque existe controversia respecto al mecanismo mediante el cual ejerce esta regulación sobre otras estructuras del SNC. Se ha propuesto que la melatonina está involucrada en dicho efecto e incluso se le atribuyen propiedades anticonvulsivas.

En el presente trabajo se abordan de manera preliminar estos problemas poniendo especial énfasis en el papel que desempeña la pineal y la melatonina en condiciones de hiperexcitabilidad nerviosa.

## 2. Aspectos Básicos de la Glándula Pineal.

### i) Filogenia:

La epiphysis cerebri es una estructura cuyo pasado evolutivo se remonta a los primeros cordados. Organismos ancestrales como los agnatos (lampreas) presentan ya un cuerpo pineal que funciona como fotorreceptor, de allí el nombre que se le ha dado de "tercer ojo" (77).

Esta estructura se encuentra presente tanto en los peces óseos (teleosteos) como en los cartilaginosos (condrictios) y aparentemente tiene funciones similares (77). Se ha reportado que en algunos actinopterigios como la carpa (Carasius auratus) este órgano interviene directamente en la capacidad del animal para subir a la superficie del agua. Al parecer esta respuesta tiene una integración cerebral compleja en donde la pineal participa mediante mecanismos de fotorrecepción y secreción endócrina (116). Es importante resaltar que esta función en los peces nectónicos determina su éxito alimenticio.

En los actinopterigios, la morfología de la pineal es muy variada (77), de acuerdo con la gran diversidad y radiación adaptativa que han alcanzado a través de la evolución.

En los anfibios se observa un desarrollo más claro del cuerpo pineal, convirtiéndose en un órgano ovoide con inervación periférica bien establecida. En estos animales se aprecia una transición de la función fotorreceptora a la endócrina (52), siendo más evidente ésta última en el orden anura (ranas y sapos) que en los urodeos (salamandras); no se han hecho estudios en ápodos, donde posiblemente la pineal esté atrofiada en vista del hábitat subterráneo de estos anfibios. Los anuros ya presentan toda la maquinaria biosintética de la melatonina (10).

La función secretora en los reptiles es primordial, aunque persisten reminiscencias de fotopercepción. En algunos lacértidos

se ha demostrado que este órgano juega un papel importante en la presentación y mantenimiento de ciertos ritmos biológicos (128,129) posiblemente mediante una regulación humoral.

Las aves presentan una pineal morfológicamente muy similar a la de los reptiles y queda inervada por el ganglio cervical superior, al igual que en los mamíferos; no obstante, a diferencia de éstos últimos, se convierte en un oscilador primario, esto es, en un marcapasos endógeno que genera la ritmicidad de algunas funciones biológicas; se ha sugerido que la melatonina está relacionada con dicha función (128,142), lo cual pone de manifiesto la actividad endocrina que tiene en estos vertebrados.

Finalmente, la glándula pineal en los mamíferos desempeña una variedad de funciones, muchas de las cuales aún no están suficientemente claras; sin embargo la participación de este órgano en los mismos es indudable.

Aparentemente, la regulación de estas funciones, de las cuales se habló someramente en la introducción, está supeditada a la capacidad endocrina de la pineal; no obstante, es importante resaltar que su funcionamiento puede ser dramáticamente alterado por las condiciones de luminosidad, debido a que en los mamíferos esta estructura es capaz de percibir o integrar la información lumínica mediante una vía neuronal conocida como el circuito no visual retino-hipotalámico-pineal.

## ii) Anatomía:

La situación anatómica de la epiphisis cerebri en la rata es similar a la del hombre; en ésta se encuentra descansando sobre los colículos superiores mesencefálicos, por encima del cuerpo calloso y cubierta por las meninges (104). Sobresale como un pequeño corpúsculo esférico de aproximadamente 1 a 1.5 mm de diámetro entre los lóbulos occipitales de la corteza cerebral y el cerebelo. Se encuentra unida mediante un pedúnculo de aproximadamente 0.2 mm de diámetro y 2.5 a 2.8 mm de largo al resto del encéfalo. Este pedúnculo emerge rostralmente a la comisura posterior, uniéndose a la comisura



habenular y al órgano subcomisural (142).

Su innervación es periférica a través del ganglio cervical superior, estableciendo la conexión final mediante los nervios coronarii (fig. 1) ejerciendo un control simpático noradrenérgico (142,107). A pesar de que una densa red de tejido conectivo forma una cápsula que recubre a la pineal, ésta recibe una irrigación muy profusa mediante los plexos corroideos formados a partir de las arterias cerebrales posteriores (37); otra característica sobresaliente es su carencia de barrera hematoencefálica, lo cual permite la entrada de diversas sustancias a los pinealocitos. También es conveniente señalar que aunque existe una tendencia de la pineal a calcificarse en muchos mamíferos superiores, este fenómeno no parece afectar su funcionamiento, aún en condiciones de calcificación grave (más del 70% del tejido parenquimatoso). Por el contrario, aparentemente esta calcificación es un proceso activo, no degenerativo, ya que se ha reportado una variación de la misma de acuerdo al estado fisiológico del animal (131,139).

El aspecto ultraestructural de los pinealocitos revela su gran capacidad metabólica, mostrando un elevado número de organelos, principalmente mitocondrias, además de un retículo endoplásmico y un aparato de Golgi muy desarrollados (104).

### iii) Fisiología:

Básicamente se ha especulado que la pineal desempeña el papel de un transductor neuroendócrino en los mamíferos (11,143). esto es, que tiene la capacidad de recibir un estímulo proveniente del medio ambiente a través de ciertas estructuras del sistema nervioso central y desencadenar una respuesta humoral provocando una variedad de consecuencias.

La gran diversidad de los eventos fisiológicos en los que se encuentra involucrada esta estructura dificulta el definir una función precisa para la misma; además, no se ha encontrado una correlación clara entre la función pineal y la melatonina, ni se conoce con certeza el mecanismo de acción de ésta última, lo cual hace aún

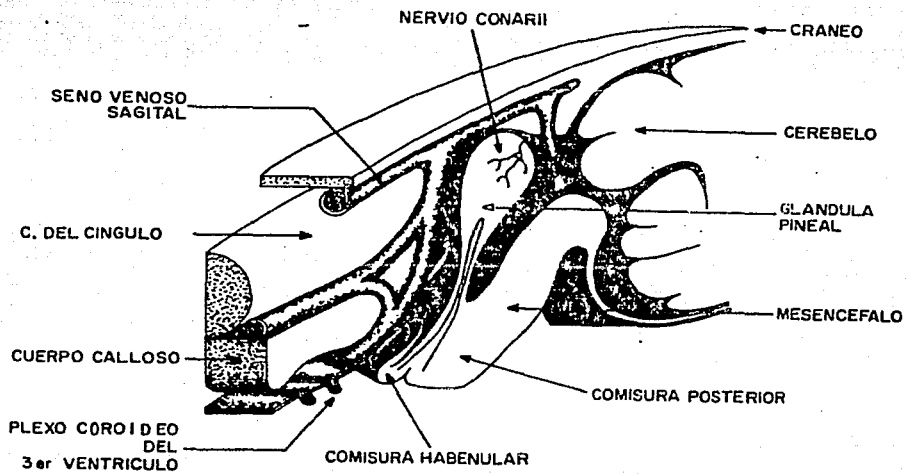


FIG. 1. Esquema de un corte sagital del cerebro de la rata en donde se muestra la situación anatómica de la glándula pineal en relación a otras estructuras del encéfalo.

más difícil establecer sus efectos como se ha hecho para otras glándulas.

No obstante, se han encontrado algunos elementos en común entre estas funciones que ayudan a esclarecer el panorama en este sentido. Quizá el más importante de ellos sea el hecho de que tanto la pineal como la melatonina se relacionan con fenómenos biológicos que describen un patrón rítmico en su presentación.

Entre las funciones en las que destaca el papel de este órgano está el ciclo de actividad-reposo y el sueño. En 1963 Reiss y cols. (105) encontraron que la pinealectomía neonatal resultaba en un incremento en los períodos de actividad espontánea, que se revertía por inyecciones de extracto de pineal. Recientemente se han publicado diversos artículos que confirman este hallazgo inicial en otros mamíferos (76,109), aves (78) y reptiles (127).

Asimismo, la melatonina interviene en este proceso sirviendo como una señal para acoplar o sincronizar la ritmicidad de la actividad al fotoperíodo e incluso puede "entrenar" un ritmo en condiciones de obscuridad constante (99,27).

En la década de los 60 Marczyński y su grupo (74) publicaron el primer estudio sobre inducción de sueño por medio de cristales de melatonina depositados en la corteza cerebral. Posteriormente se ha comprobado este mismo efecto de la indolamina, administrada en varias dosis y por distintas vías, en muchas otras especies animales como el ratón (13) el pollo (85), la rata (44,74) e incluso el hombre (32, 2).

Entre otros hallazgos interesantes que se provocan por la inyección de la hormona, están el incremento en el tiempo de sueño de ondas lentas (32,44) y la modulación de la aparición del sueño de movimientos oculares rápidos (88,75), mientras que la pinealectomía desacopla el ritmo ultradiano de la presentación de esta fase del sueño (75,82).

Otra función bastante estudiada es el control que ejerce la glándula pineal sobre el umbral al dolor y la analgesia. En este sentido se ha observado que la pinealectomía provoca una dis-

minución en el umbral analgésico endógeno durante la noche ( 64 ), además de abolir el ritmo diurno de analgesia inducida por morfina ( 53,64 ), posiblemente a través de la alteración en los niveles de los péptidos opioides ( 54,62 ) y en la funcionalidad de sus receptores ( 83 ). Por otro lado, la melatonina tiene un efecto analgésico en dosis farmacológicas ( 64 ). La interpretación más interesante, en términos evolutivos, que puede hacerse del fenómeno antedicho, es que la pineal modula la presentación circadiana de un ritmo de analgesia endógeno en los mamíferos, el cual pudiera tener relevancia ecológica y adaptativa.

Existe una serie de trabajos que ponen de manifiesto la actividad de este órgano epifisiario en la regulación de los patrones de ingesta alimenticia ( 54 ). En esta función también tiene gran relevancia la participación de los péptidos opioides ( 54,98 ); más aún, algunos péptidos gastrointestinales clásicamente involucrados en los fenómenos de alimentación y saciedad, pueden jugar algún papel en esta acción de la pineal ( 130 ) .

La regulación de la temperatura corporal, que es también un fenómeno rítmico en las aves y los mamíferos, puede ser alterada drásticamente por manipulaciones de esta glándula ( 19, 97 ).

En algunos roedores la pérdida de la pineal resulta en disfunciones no solo de la termoregulación sino también de los patrones de hibernación ( 91 ).

Las relaciones que guarda la epífisis cerebri con el estatus hormonal general de los mamíferos es un área muy bien documentada. La disfunción de esta glándula incrementa crónicamente la secreción de varias hormonas como la aldosterona y la corticosterona ( 110 ), las cuales a su vez pueden llegar a provocar, hipertensión arterial . Por otro lado, la administración de melatonina en dosis farmacológica aumenta los niveles de hormona del crecimiento ( GH ) en la sangre ( 122 ) y puede ejercer un efecto directo en el crecimiento tisular ( 141 ). Estos reportes contrastan con la idea general de que la pineal tiene una influencia inhibitoria sobre el crecimiento; sin embargo, otras publicaciones apoyan este planteamiento. Relkin y cols. ( 106 ) mostraron que al fomentar la función

pineal por varios métodos, se inhibía la síntesis y liberación de GH; Otros investigadores han encontrado que no solo reduce el crecimiento en tejido sano sino también en el tumoral ( 23,20), probablemente por un factor inhibidor de la proliferación celular (16). En este sentido, se han llevado a cabo un gran número de investigaciones tendientes a encontrar alguna relación de este órgano con las enfermedades neoplásicas ( 20,23).

Su influencia sobre la función tiroidea es bastante evidente; la actividad pineal reduce el peso de la tiroides y su capacidad secretora, particularmente aboliendo los niveles de  $T_4$  ( 135, 136); la melatonina tiene el mismo efecto sobre los niveles plasmáticos de  $T_4$  y la hormona estimulante de la tiroides (14,134) a través de un mecanismo inhibitorio de la síntesis y liberación de hormona liberadora de la tiotropina ( 136 ). Por último, se ha encontrado que la melatonina es capaz de reducir la secreción de insulina in vitro (110)

La función más estudiada de la glándula pineal es su participación en la fisiología reproductiva (103,104) sobre todo en animales con ciclo estacional ( 126). En este sentido, se ha propuesto, que este órgano epitalámico ejerza un control inhibitorio nuevamente; Así, la ablación de la pineal provoca un incremento en el tamaño de las gónadas y la actividad sexual, y su disfunción induce pubertad precoz (43,103 ), mientras que la administración de melatonina en horas precisas del día causa regresión gonadal y revierte la actividad sexual ( 125 ). Se ha observado que esta glándula está asociada no solo al inicio de la pubertad, sino también al de la menopausia en varios mamíferos, incluyendo el hombre (56,67). Es posible que dichos efectos estén mediados por la acción de la melatonina sobre las hormonas sexuales, ya que se ha demostrado que ésta puede modificar inhibitoriamente la secreción de hormona luteinizante (137), folículo estimulante, prolactina y hormonas esteroides (115, 121, 140).

Finalmente, se sabe que la pineal tiene un papel relevante en la organización cronobiológica de muchos vertebrados, más importante en los tetrápodos inferiores, donde funciona como un

marcapasos endógeno, que en los mamíferos (129). En estos últimos influencia tanto los ritmos circadianos (con un período de 24 hrs) como los ultradianos (menores a 24 horas) y naturalmente los infradianos entre los cuales se encuentran los ritmos mensuales, estacionales y anuales ( 95). La interrelación de la pineal con el fotoperíodo es determinante para su control sobre los bioritmos ( 6 ). Una vez más, es posible que parte de este aspecto fisiológico de la pineal lo regule la melatonina, en vista de que tiene la propiedad de acoplar o poner en fase ciertos ciclos biológicos ( 99).

En el devenir evolutivo de los cordados la epiphisis cerebri ha pasado de ser un órgano fotosensible a ser uno neuroendocrino. Probablemente durante esta transformación paulatina se haya ido modificando el mecanismo mediante el cual esta estructura organiza varios ritmos biológicos, presumiblemente por el incremento en el impacto de la melatonina y otras sustancias pineales sobre el SNC ( 95 ).

Del análisis de los efectos que tiene la pineal sobre las funciones anteriormente descritas se desprende el otro mecanismo de acción común que presenta: la modulación inhibitoria que ejerce sobre todas ellas, en algunos casos mediante la acción de la melatonina. Por esta característica se le ha propuesto como un órgano "tranquilizante" o estabilizador ( 110).

## iv) Bioquímica

La característica bioquímica más sobresaliente de la glándula pineal es la producción de melatonina en forma cíclica. La síntesis de esta hormona se divide convencionalmente en dos etapas (Fig. 2); la primera parte, la síntesis de serotonina, depende de la biodisponibilidad del aminoácido esencial triptofano. Este aminoácido que se encuentra en la circulación, es capturado por los pinealocitos y posteriormente se hidroxila formando 5-hidroxitriptofano (5-HTP) por medio de una enzima llamada hidroxilasa del triptofano; una vez que esto sucede, el 5-HTP se descarboxila por acción de la descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos y se convierte en 5-hidroxitriptamina o serotonina (71,72). Los altos niveles de las dos enzimas mencionadas y su cofactor, la biotina, son responsables de la enorme concentración de serotonina que se encuentra en la glándula, la cual supera a cualquier otro tejido corporal (71,114).

La segunda parte es la conversión de serotonina a melatonina; la enzima N-acetiltransferasa (NAT) utiliza como sustrato a la serotonina y la transforma en N-acetilserotonina. La última etapa ocurre cuando este derivado indólico experimenta una metilación por medio de la Hidroxindol--metiltransferasa (HIOMT) y la adenosilmetionina que actúa como donador del grupo metilo (9). La HIOMT se encuentra en una alta concentración dentro del citoplasma de los pinealocitos y reconoce como sustrato a cualquier indol hidroxilado en la posición 5, por lo cual esta enzima es capaz de metilar al 5-hidroxitriptofano y a la serotonina convirtiéndolos en 5-metoxitriptofano y 5-metoxitriptamina respectivamente. En la segunda etapa biosintética la HIOMT actúa sobre el ácido 5-hidroxi-indolacético, el 5-hidroxitriptofol y la N-acetil-5-hidroxitriptamina, y los transforma en ácido 5-metoxiindolacético, 5-metoxitriptofol y melatonina respectivamente (ver Fig. 3). Es conveniente resaltar que todos los metoxiindoles mencionados tienen actividad biológica, e incluso algunos de ellos son más poten-

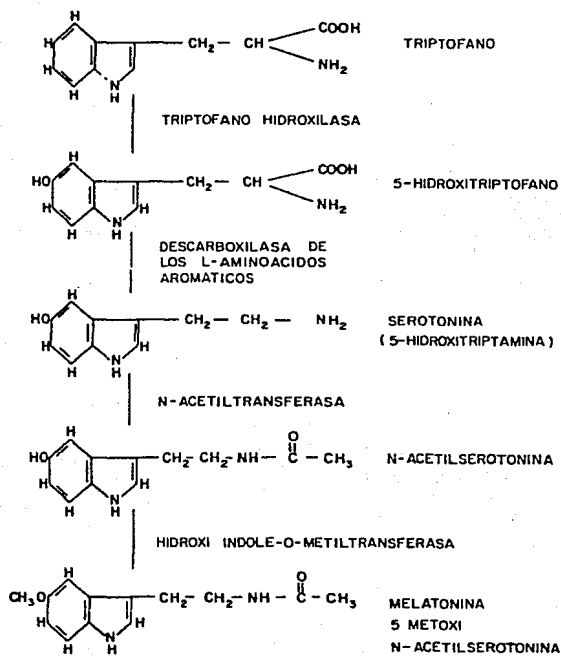


FIG. 2. Biosíntesis de la melatonina a partir del amino-ácido triptofano. En el esquema se muestran las dos etapas metabólicas. (ver texto) .



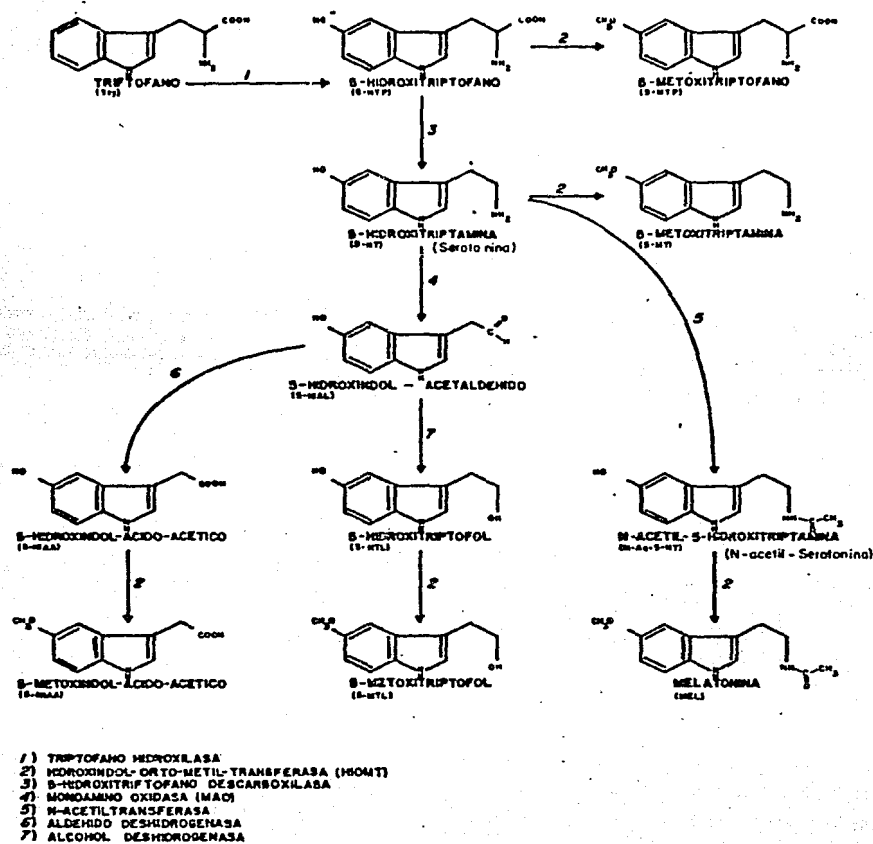


FIG. 3. Representación de las vías alternas de síntesis de metoxiindoles que ocurren en la glándula pineal.

tes que la misma melatonina, como es el caso del 5-metoxitriptofol.

Una vez sintetizada, la melatonina se libera hacia la sangre principalmente y en una pequeña proporción al líquido cefalorraquídeo; sin embargo, los niveles cerebrales de la hormona son hasta 8 veces más altos que en el suero (86), lo cual sugiere que existen mecanismos de captura en el SNC. La mayoría de los otros indoles también difunden hacia el torrente sanguíneo, aunque se conoce poco sobre su papel fisiológico.

La melatonina tiene una vida media muy corta. Se han hecho estudios usando melatonina marcada radiactivamente que indican la rápida desaparición de la circulación a causa de su metabolismo (61,63). Durante este lapso, la hormona actúa en diversos órganos blanco a través de un mecanismo aún desconocido, que probablemente involucra receptores específicos (145). La mayor parte de la melatonina se metaboliza en los microsomas hepáticos por un proceso de hidroxilación en la posición 6, seguido de una conjugación con ácido glucorónico o sulfato (61,63). Una vía metabólica alternativa fue reportada por Hirata y cols (41), la cual da como producto final a la N-metoxikinurenamina, mediante la participación de dos enzimas que rompen el anillo indólico y descarboxilan un nitrógeno adyacente a éste (Fig. 4). Otro mecanismo de eliminación de la melatonina es por vía renal (20% aproximadamente), pasando a la orina sin ninguna modificación.

Por último cabe resaltar que ninguno de los metabolitos mencionados tiene igual o mayor potencia biológica que la melatonina lo que indica que dicha hormona no se ve activada por las rutas metabólicas que se acaban de describir.

La síntesis de melatonina a partir de serotonina se encuentra bajo un mecanismo de control neural que se ha estudiado considerablemente en los últimos 10 años. Así, esta tasa metabólica muestra un ritmo diario; la relación que hay entre la luz ambiental y este ritmo se observa en la figura 5 : Durante el día, los niveles de serotonina en la pineal están elevados y la actividad de la

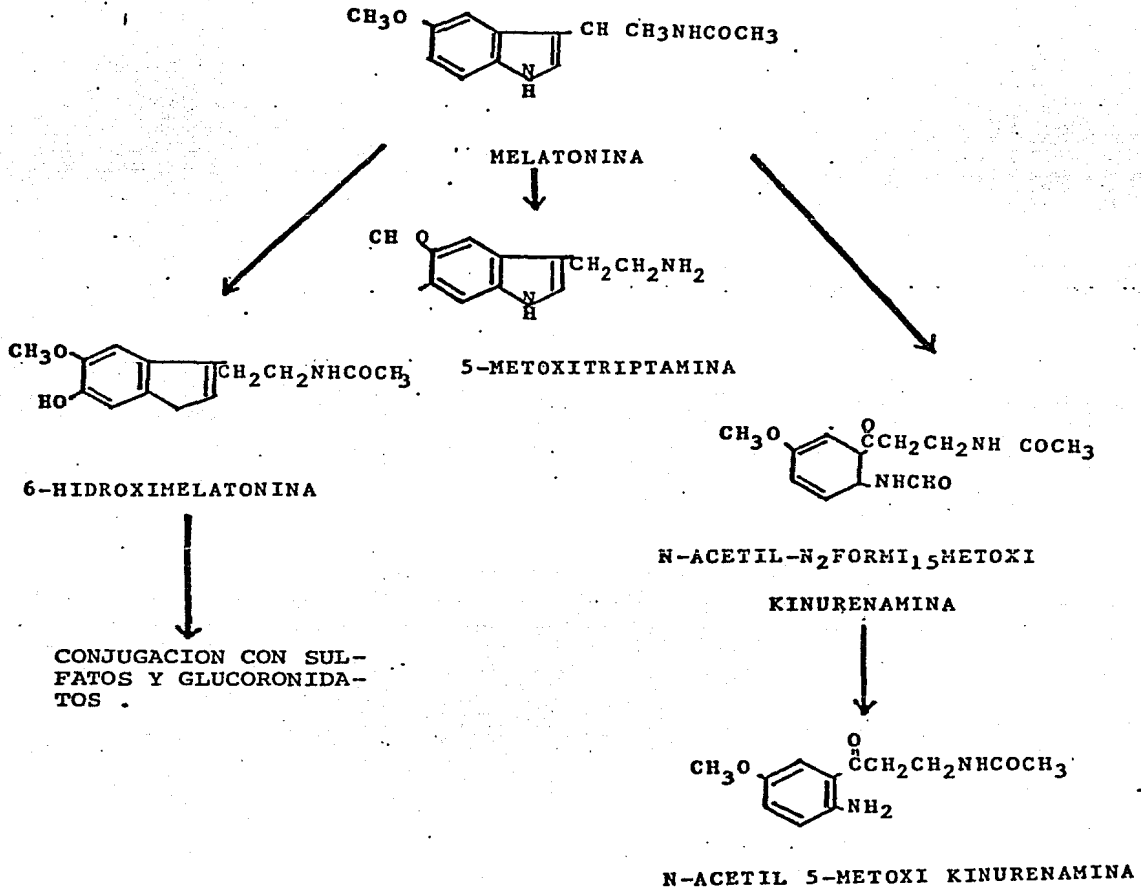


FIG. 4. Catabolismo de la melatonina. Se ilustran las dos vías metabólicas descritas hasta la fecha y un derivado metoxilado. (ver texto).

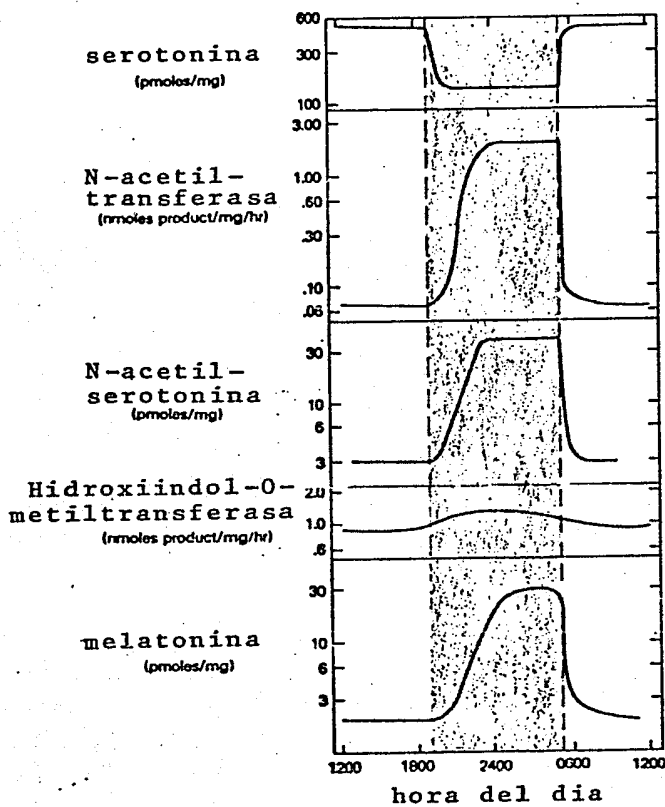


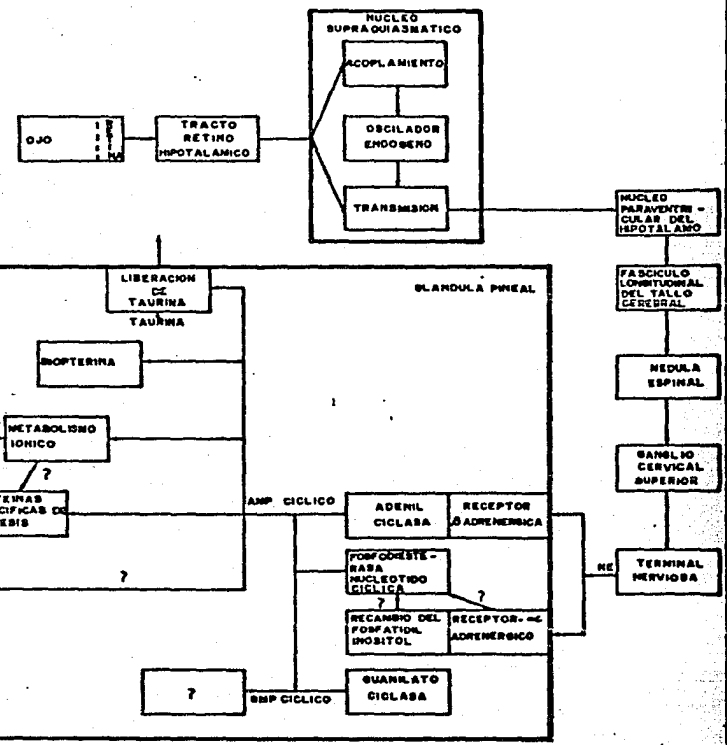
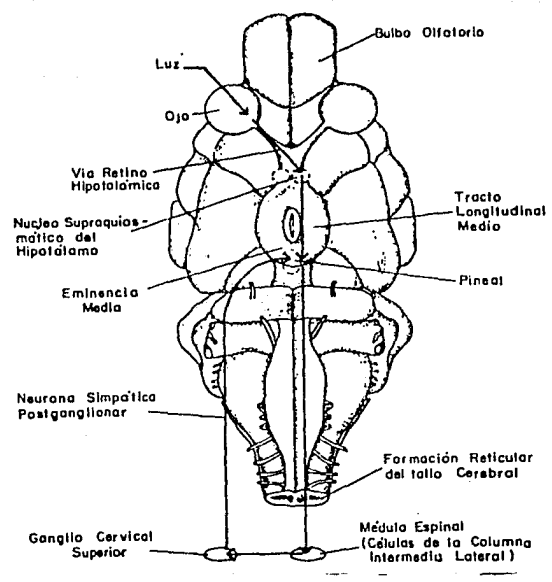
FIG. 5. Ritmo del metabolismo indólico en la glándula pineal. El esquema muestra las variaciones diarias en las concentraciones de los metabolitos y la actividad de las enzimas.

enzima NAT es mínima. A partir del inicio del escotoperíodo se observa un incremento gradual muy alto (50-100 veces) de la actividad de dicha enzima, causando una disminución de serotonina y un aumento concomitante de N-acetil serotonina ( 59 ), que finalmente resutla en un incremento de la síntesis de melatonina através de un efecto de acción de masas por disponibilidad del sustrato, ya que la HIOMT solo muestra una elevación mínima en su actividad durante la noche ( 57 ). Cuando reinicia el periodo de luz, la actividad de la NAT declina, la serotonina regresa a sus altos valores diurnos y los niveles de melatonina nuevamente decrecen a concentraciones bajas ( 58 ). Este mecanismo regulador opera en todos los organismos que se han estudiado.

La variación circadiana en la melatonina se ha detectado en la pineal, la sangre, la orina y el líquido cefalorraquídeo de muchos mamíferos incluyendo el hombre y es independiente del hábito de vida diurno o nocturno del animal en cuestión. La estrecha correlación que guardan las concentraciones de esta hormona en la pineal y en todos los líquidos corporales se debe a que, al parecer, esta glándula no tiene mecanismos de almacenamiento y liberación de la misma; de esta manera, la velocidad de producción y el flujo sanguíneo determinan la cantidad de melatonina circulante ( 25 ).

Como hemos visto, las condiciones de iluminación gobiernan el ritmo de actividad pineal; en vista de que en los mamíferos esta estructura carece de fotorreceptores propios, la única manera en que puede obtener información fótica es a través de un circuito neuronal.

En efecto, se ha logrado mapear una vía no visual que une a la retina con la pineal (Figs. 6 y 7 ); ésta se origina en la -capa ganglionar retiniana de la cual emergen un conjunto de fibras amielínicas que forman el tracto retino-hipotalámico. Dicho tracto se dirige hacia el núcleo supraquiasmático del hipotálamo anterior (NSQ), donde establece una sinapsis; de allí, se proyecta caudalmente atravezando la región tuberal hipotalámica y la formación



FIGS. 6 y 7. Representaciones anatómica y esquemática de la vía neural responsable de la generación del ritmo de síntesis y secreción de la melatonina. Las flechas marcadas con interrogación (?) indican las hipótesis no comprobadas. (Tomado de Reppert y Klein, 1980).

reticular mesencefálica hasta alcanzar los cuerpos neuronales de la columna intermedio lateral a nivel torácico superior. De este sitio se originan las fibras preganglionares que inervan el ganglio cervical superior. Algunas células postganglionares emiten axones que ascienden por el foramen magno y la tienda del cerebelo formando los nervi coronarii que llegan hasta la pineal (52,60,81). Se han identificado terminaciones noradrenérgicas a este nivel que ultraestructuralmente simulan sinápsis ('90); cabe señalar que en algunos mamíferos como el conejo existe una inervación parasimpática colinérgica además de la ya descrita, pero no se sabe que función desempeña.

Las lesiones del circuito retino-pineal a distintos niveles provocan diferentes alteraciones. De este modo, la coagulación electrolítica del NSQ o del haz retroquiasmático y la sección del ganglio cervical superior resultan en una eliminación de la síntesis de melatonina, mientras que la ceguera por enucleación de los ojos y el corte al nivel del tracto retino-hipotalámico no modifican mayormente su producción. Por otro lado, la alteración del fotoperíodo manteniendo un ciclo de luz continua o la estimulación con pulsos luminosos a lo largo de la noche, provocan la abolición del ritmo de formación de esta hormona, en tanto que las condiciones de oscuridad constante solo provocan un ligero corrimiento en este ciclo circadiano conocido como oscilación libre o "free running", manteniéndose intacta la amplitud del pico de secreción de melatonina (80).

Estos datos indican que la funcionalidad de la glándula pineal está gobernada por el NSQ, el cual se ha propuesto en innumerables trabajos como un oscilador endógeno primario o "reloj biológico", es decir, que tiene la capacidad de generar y mantener una rítmicidad en su actividad independientemente de las señales externas (107).

Finalmente, es importante señalar que la epifisis cerebral además del metabolismo indólico, produce y secreta una serie de compuestos activos de naturaleza proteínica. Algunos péptidos

## 1. La Glándula Pineal y su Relación con la Excitabilidad Cerebral.

Numerosas publicaciones sugieren que la glándula pineal y su principal producto de síntesis y secreción, la melatonina, están involucradas en la regulación de la excitabilidad del sistema nervioso central. En los trabajos iniciales se utilizaron extractos acuosos de glándula pineal de bovinos para observar su efecto en el patrón electroencefalográfico del gato. Así, Roldán y cols. en 1964 (111) realizaron la primera aproximación en esta línea administrando 5 mg del extracto mencionado mediante una inyección intravenosa a gatos en preparación de "encefalo aislado" encontrando una desincronización escalonada en varias regiones del cerebro, y concluyendo que las sustancias activas de la infusión tuvieron un efecto estabilizador. Posteriormente, Bindoni y Rizzo (17) observaron un patrón epileptiforme hipocampal cuando se estimuló el hipocampo contralateral en conejos pinealectomizados; no se observó tal alteración en los animales íntegros. En 1968, se reportó un estudio en el cual se mostraba claramente una disminución de la actividad convulsiva inducida por estimulación eléctrica y química en gatos después de una infusión i.v. de 2 a 5 mg de extracto de pineal (112). La pinealectomía provoca una sincronización con descargas paroxísticas esporádicas similares a los que se encuentran durante las crisis convulsivas en la rata (84). Igualmente, se ha reportado que la pinealectomía practicada a ratas jóvenes a los cuales se les hizo una paratiroidectomía parcial previamente, desarrollan crisis convulsivas intermitentes que frecuentemente conducen al animal a la muerte (101,102). Esta actividad tuvo un pico de incidencia a las 8 horas manteniéndose hasta por 2 días; la aplicación de varios agentes anticonvulsivos no modificó sustancialmente el efecto de la cirugía (102). Estos hallazgos se hicieron extensivos a los gerbos (Meriones unguiculatus) en los cuales se observó actividad convulsiva con una latencia menor y con una incidencia del 100% después de la pinealectomía únicamente; en estos roedores, la denervación del ganglio cervical superior, maniobra que provoca la pérdida de la capacidad para sintetizar melatonina, no desencadenó convulsiones, pero la pinealectomía subsecuente sí, en tanto que



solo se encuentran en esta glándula, como la treonilserinilisina, la antigonadotropina pineal y la arginina vasotocina, mientras que otros como la vasopresina, la oxitocina, el factor inhibidor de los melanocitos y la hormona estimulante de los melanocitos, además de la  $\beta$ -endorfina, la hormona liberadora de la tirotrona, el factor liberador de la hormona luteinizante, la angiotensina II y la somatostatina, también se localizan en otras partes del cuerpo. En torno a las hormonas peptídicas de la pineal se ha acumulado suficiente información que pone de manifiesto su participación en las diversas funciones que están relacionadas con esta estructura epifisiaria ( 130,138 ).

la administración de extractos de pineal no evitó dicha actividad ( 92 ). Más recientemente, Stockmeier y Blask (123) confirmaron estos resultados.

A partir de los primeros estudios conductuales en los que se mostró que la pinealectomía, inmediatamente después del nacimiento, resultaba en un incremento de la actividad motora en la rata y que esta actividad incrementada podía reducirse en forma dosis-dependiente por inyecciones de extractos de pineal (Reiss y cols., 1963), se especuló sobre la posibilidad de que alguna sustancia disuelta en él fuera responsable de dichos efectos. Unos años antes, Lerner y cols. (68,69) aislaron y caracterizaron una sustancia activa a partir de glándulas pineales de bovino, la N-acetil-5-metoxitriptamina o melatonina, pero no se probó su actividad se dante sino hasta 1964 cuando Arutyunyan y cols. ( 7 ) mostraron algunos de sus efectos farmacológicos; esta indolamina de la pineal fue capaz de reducir los efectos estimulantes de la anfetami na y potenciar los hipnóticos de los barbitúricos y el hidrato de cloral en el ratón (33, 13 ). En relación a éste último efecto, se ha reportado que la melatonina induce la posición de reposo y somnolencia en pollos (13 ) además de una actividad electroencefalográfica similar al sueño de ondas lentas en esta especie (42 ); un efecto semejante se encontró también en el humano ( 5 ).

Pelham ( 89 ) y Pang y cols. (85 ) observaron una pérdida total de melatonina después de la pinealectomía en el pollo y posteriormente reportaron una desincronización en el EEG provocada por la maniobra, la cual se revertía por la administración de esta hormona (85 ); sin embargo estos autores juzgaron prematuro el concluir que el efecto observado después de la ablación de la pineal se debiera exclusivamente a la ausencia de melatonina, ya que esta glándula elabora otras sustancias tanto indólicas como peptídicas que pudieran mediar este efecto.

La actividad anticonvulsiva de la melatonina en forma aguda sobre la aplicación tópica de varios agentes epileptogénicos a nivel cortical y subcortical fue estudiada por Fariello y Bubenik (1976); estos autores encontraron una pequeña modificación en la actividad focal epileptiforme además de una supresión de la actividad

sensorial evocada a partir del foco inicial (29): Un año más tarde, el mismo grupo encontró una evidencia indirecta acerca de la importancia que tiene la melatonina en el mantenimiento de la estabilidad eléctrica del cerebro. Utilizando un anticuerpo contra esta indolamina, observaron el desarrollo de anomalías epileptiformes transitorias y crisis convulsivas ocasionales después de una inyección intracerebro-ventricular del mismo, mientras que la inyección de suero no provocó ningún cambio (30). Tomando en conjunto estos reportes y algunos otros, Ramijn publicó una revisión, en la cual propuso que la pineal tiene un papel tranquilizante, en el SNC, (110).

El efecto protector de la administración central de melatonina sobre las convulsiones inducidas extracerebralmente en la rata fue reportado desde 1973 (49). En un estudio posterior se mostró que esta hormona en dosis farmacológicas (50 mg/kg) provoca una ligera modificación en el patrón electroencefalográfico y en la latencia a las descargas epilépticas inducidas por estimulación fólica en el babuino se negalés Papio papio (21).

Albertson y cols., (1) reportaron un estudio completo sobre las propiedades anticonvulsivas de la melatonina, utilizando un modelo experimental de epilepsia conocido como fenómeno "Kindling" o encendido; estos autores trabajaron con el Kindling amigdalino y el químico. El primero consiste básicamente en la estimulación eléctrica de alta frecuencia y baja intensidad (subumbral) aplicada en la amígdala del lóbulo temporal; el segundo, en la administración sistémica y reiterativa de pentilentetrazol (PTZ) en dosis subconvulsivas.

Ambos modelos provocan una evolución progresiva de crisis cada vez más fuertes hasta producir un estado epiléptico (estatus epilepticus) en el cual un estímulo único desencadena la respuesta máxima aún después de que el animal no haya sido estimulado en un periodo de tiempo considerable.

Después de lograr el estatus epilepticus estos investigadores evaluaron la acción protectora de la melatonina en dosis de 50 a 200 mg/kg, encontrando un efecto parecido al de algunos anticonvulsivos conocidos, pero solo con dosis muy altas de melatonina cuya aplicación provocó ataxia y sedación.

Recientemente se han reportado evidencias directas del papel inhibitor de la melatonina. Reyes-Vázquez y cols. (108) encontraron que

la inyección i.p. de esta indolamina en dosis menores a 1 mg/kg disminuye la frecuencia de descarga de grupos neuronales registrados en diversas zonas del cerebro. De manera similar, Bubenik (24) logró reducir el patrón de contracción espontánea del ileo aislado de rata después de la infusión de la hormona en el medio de perfusión. Sin embargo la aplicación de otras sustancias, como la N-acetilserotonina, provocaron una respuesta similar en ambos estudios.

Estos trabajos tienen un gran importancia, ya que muestran que la melatonina ejerce una modulación inhibitoria aún en dosis fisiológicas y, por otro lado, que existen otras sustancias también secretadas por la glándula pineal que provocan efectos similares a esta indolamina, lo cual pudiera sugerir que las alteraciones provocadas por la pinealectomía no se deban a la ausencia de melatonina exclusivamente, como ya se había hipotetizado previamente (85). Así mismo, estas sustancias de la pineal provocan un efecto sobre la actividad neuronal en estado basal, lo cual no implica que necesariamente tengan actividad anticonvulsiva sino solamente sedante cuando se aplican a estas dosis.

## 2 . Supresión Alcohólica y Actividad del Sistema Nervioso Central.

La ingesta crónica de alcohol etílico provoca, tanto en el hombre como en animales de experimentación, la adquisición de tolerancia hacia sus efectos y la dependencia física de éste. Es precisamente esta última consecuencia la que induce la presentación del síndrome de abstinencia alcohólica cuando, después de una intoxicación prolongada, se suprime el suministro de etanol o disminuyen sus niveles en la sangre.

Diversos estudios han demostrado que la abstinencia etílica tiene una variedad de efectos sobre el sistema nervioso central, que provocan fundamentalmente un aumento en la excitabilidad cerebral y pueden tener distintos grados de severidad, desde el tremor leve (119) hasta alucinaciones (132), delirium tremens (133) y convulsiones espontáneas ( 34,133).

A partir de que Isbell y cols. ( 47 ) demostraron que el síndrome de abstinencia etílica puede inducirse en el hombre bajo condiciones controladas de laboratorio, se desarrollaron trabajos tendientes a implementar un modelo animal que permitiera estudiar las alteraciones cerebrales provocadas por la supresión de etanol.

Freund (34) mostró una sucesión de cuatro estadios conductuales característicos durante la abstinencia en el ratón: 1) hiperactividad espontánea e inducida, con episodios de tremor generalizado; 2) respiración acelerada con sacudidas repetidas del cuerpo; 3) convulsiones tonicoclónicas recurrentes y carreras súbitas, y 4) muerte durante la convulsión.

En un trabajo posterior, el mismo autor encontró que era posible inducir convulsiones entre las primeras 7 a 25 horas de suprimido el etanol, mediante la estimulación auditiva, sugiriendo que el síndrome de abstinencia es un estado de hiperexcitabilidad cerebral parcialmente latente que sucede a la depresión provocada por el alcohol (35).

Se han propuesto algunas hipótesis para explicar el mecanismo convulsivo que ocurre durante la supresión, no solo de etanol sino de varias drogas adictivas. Una de ellas es que se produce una hiperirritabilidad del SNC después de un período de depresión funcional por efecto de la droga; esto resulta en una disminución del umbral convulsivo (79) el cual tiene una correlación electroencefalográfica similar para muchos sedantes (12). En investigaciones recientes se han encontrado anomalías en el EEG de estructuras subcorticales y límbicas durante la supresión (39) en varias especies animales de manera similar. Dichas alteraciones consisten básicamente en que la actividad lenta se reemplaza por espigas epileptiformes aisladas, las cuales incrementan su frecuencia y magnitud organizándose en descargas paroxísticas. Estos patrones de hiperactividad se han observado en registros de diversas zonas como el hipocampo y la amígdala, además del tálamo, el septum y la corteza. Dichas anomalías electrográficas tienen lugar un poco antes o simultáneamente al inicio de los signos conductuales.

Los cambios corticales y subcorticales en la supresión son del mismo tipo, localización y dispersión anatómica que en el modelo de epilepsia experimental llamado "Kindling", en el cual se utiliza la estimulación subumbral, ya sea eléctrica o química, en forma reiterativa que finalmente resulta en una alteración permanente del estado de excitación cerebral; más aún, cuando se suprime al animal repetidamente el umbral convulsivo se alcanza con mayor facilidad y las crisis se vuelven más intensas. Esto llevó a Ballenger y Post (12) a sugerir que el Kindling es un estado análogo al síndrome de abstinencia etílica, proponiendo que la hiperirritabilidad límbica que ocurre con cada supresión provoca con el tiempo un incremento en la tendencia de estas estructuras subcorticales y del sistema nigroestriatal a activarse o "encenderse"; esta activación electrofisiológica progresiva de los sistemas límbico y nigroestriatal está relacionada con el avance de los síntomas de abstinencia, desde ligeros como el temblor hasta graves como las convulsiones o el delirium tremens.

Posteriormente, Carrington y cols. (26) comprobaron esta hipótesis encontrando que el Kindling se acelera en animales suprimidos que llegaron a tener niveles sanguíneos de etanol entre 300 y 500 mg/dl. Igualmente, algunas drogas convulsivógenas como el pentilentetrazol (PTZ) se han utilizado para evidenciar el síndrome de abstinencia en dosis subconvulsivas, precipitando así los eventos conductuales de la supresión (45).

Aunque no se conoce con certeza el mecanismo bioquímico responsable de la tolerancia, la dependencia física y el estado de supresión provocado por el alcohol, se acepta generalmente que su administración prolongada induce alteraciones en la composición lipídica y fluidez de la membrana celular. En el SNC, esta alteración membranar hace menos excitable a las neuronas disminuyendo su capacidad de respuesta ante diversos tipos de estimulación.

De manera inversa, durante la supresión la membrana neuronal se hace súmamente sensitiva, disminuyendo su umbral de disparo (40).

En suma, el síndrome de abstinencia etílica es un evento que se presenta como consecuencia de una hiperexcitabilidad generalizada a nivel cerebral, la cual tiene una correlación electrofisiológica y conductual muy bien establecida.

### III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

#### 1. Diseño Experimental.

La relación que hay entre la glándula pineal y el estado de excitación cerebrales un hecho que se basa en múltiples publicaciones, la mayoría de los cuales han centrado su interés en el efecto facilitador que tiene la pinealectomía sobre el desarrollo de crisis convulsivas inducidas por diversos métodos y, por otro lado, en la capacidad de la melatonina administrada en dosis farmacológicas para controlar la actividad epiléptica.

Racine en 1972 (96) mostró que el patrón electroencefalográfico del Kindling tiene una estrecha correlación conductual, y propusieron una escala de evaluación de cinco estadios. Por otra parte, se ha propuesto que el síndrome de abstinencia etílica es un estado análogo al Kindling (12) y es susceptible a ser modificado, tanto incrementando su severidad como disminuyendo la misma, mediante maniobras fisiológicas y farmacológicas. Además, estas modificaciones también pueden valorarse conductualmente (8).

En el presente trabajo se decidió utilizar la supresión etílica como modelo de hiperexcitabilidad neuronal para probar el papel inhibitorio que juega la glándula pineal en la aparición de convulsiones y la severidad de las mismas, y mostrar si dicho efecto está mediado por la melatonina.

De este modo se diseñó un método de supresión que provocara un estado de excitación moderada, el cual permitiera ver cambios por maniobras contrarias. Una vez implementando, se procedió a la manipulación de la pineal utilizando tres estrategias:

En la primera se observó el efecto que tiene la pinealectomía, con la cual no solo se consigue suprimir la melatonina circulante sino también todas las demás sustancias que sintetiza y secreta la pineal; así mismo, se eliminan los procesos fisiológicos que pudieran mediarse por esta estructura. En el siguiente paradigma experimental



se administró la hormona en dosis fisiológicas bajo esquemas de tratamiento agudo y crónico, con los que se pretendió observar sus propiedades sedantes y probablemente anticonvulsivas.

Finalmente, se evaluó el efecto de la ausencia de melatonina exclusivamente. Para ello se colocaron a los animales en luz constante, lo que provoca la inhibición de las enzimas que sintetizan esta hormona dejando íntegra a la pineal. Bajo estas condiciones se suministró la indolamina, en un esquema de inyección que ha probado tener eficacia en otros modelos experimentales, con el fin de mostrar una reversión del efecto provocado por la iluminación continua.

## 2. Hipótesis.

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados anteriormente, se propone una hipótesis para cada maniobra experimental:

- Los animales en abstinencia tendrán un mayor estado de excitación cerebral evidenciado por la disminución en el umbral convulsivo.
- La pinealectomía potenciará el efecto de la abstinencia etílica.
- La administración de melatonina tendrá una acción inhibidora en la presentación y magnitud de crisis convulsivas.
- La iluminación constante provocará el desarrollo de convulsiones más intensas, las cuales pudieran reducirse en intensidad por el tratamiento con melatonina.

### 3. OBJETIVOS

#### i) Generales:

El objeto central del presente trabajo consiste en mostrar el papel inhibitorio que desempeña la glándula pineal sobre la actividad convulsiva inducida farmacológicamente durante la abstinencia etílica. Así mismo, discernir si dicha acción es mediada por la melatonina o por alguna otra sustancia de esta estructura.

#### ii) Específicos:

Diseñar un modelo de abstinencia etílica que permita observar cambios en el nivel de excitación neuronal por maniobras opuestas mediante parámetros conductuales.

Observar el efecto que tiene la pinealectomía sobre la actividad convulsiva durante el estado de abstinencia alcohólica.

Evaluar la acción de la administración exógena de melatonina en dosis fisiológicas sobre el patrón convulsivo, y comparar su eficacia utilizando tratamientos agudos y crónicos.

Mostrar si el efecto de la depleción de melatonina por luz constante es comparable al de la pinealectomía y ver si es posible revertirlo por el tratamiento prolongado con la hormona.

## IV MATERIAL Y METODO

## 1. Generalidades:

Para el desarrollo del estudio se utilizaron ratas albinas macho de la cepa Wistar, con un peso de 250 a 300 gramos al inicio de cada experimento. Todos los animales fueron habituados durante dos semanas como mínimo a las condiciones del bioterio: temperatura de  $21 \pm 2^\circ \text{C}$ , ciclo Luz-Obscuridad 12:12, con inicio del fotoperíodo a las 06:00 horas y teniendo acceso a agua y comida (purina chow) ad libitum. Bajo estas condiciones se formaron grupos de 6 a 10 ratas, utilizándose por separado para cada maniobra experimental; en ningún caso se usó un mismo grupo para distintos experimentos. Las soluciones alcohólicas se hicieron con etanol absoluto (Baker), y se renovaron diariamente. Los fármacos y vehículos usados se describen en los experimentos.

## 2. Modelo de Abstinencia Etílica:

Con el fin de encontrar un método de abstinencia etílica que provocara un estado de hiperexcitación cerebral susceptible de ser valorado mediante cambios conductuales se hicieron una serie de experimentos piloto (no se muestran los resultados) en los cuales se varió tanto la concentración de etanol y el periodo de intoxicación al que se expusieron los animales, como el tiempo de abstinencia al cual se hizo la evaluación conductual. Se han reportado algunos criterios conductuales que evidencian el estado de supresión alcohólica, como la piloerección, la hiperactividad motora y una conducta esterotipada conocida como "wet dog shake behavior" (WDS) o "Sacudida de perro mojado" que el animal repite frecuentemente. Sin embargo estos parámetros no fueron consistentes y por lo tanto fue imposible hacerlos objetivos y cuantitativos, por lo cual se decidió administrar una dosis subconvulsiva de pentilentetrazol y evaluar la respuesta provocada.

Se utilizaron 3 grupos de ratas: Grupo en abstinencia etílica (AE),  $n = 10$ ; sin abstinencia etílica (SAE),  $n = 8$  y Control (CONT),  $n = 10$ . Los dos primeros se sometieron a una ingesta

forzada de etanol (ETOH) al 5%  $V/V$  durante 15 días, incrementando la concentración del mismo al 10%  $V/V$  durante los 15 subsecuentes. El volumen del líquido se midió diariamente con el fin de obtener la cantidad aproximada de ETOH ingerida por grupo. El grupo CONT permaneció intacto.

Una vez pasado el periodo de intoxicación etílica, se substituyó el ETOH por agua en el grupo AE, mientras que el SAE continuó tomando la solución de alcohol, con el objeto de restringir el efecto a la supresión. Después de 24 y 48 hrs. se determinó el estado de excitación cerebral provocado por la abstinencia, inyectando una dosis subconvulsiva de PTZ (30 mg/kg de peso) disuelto en solución salina fisiológica, por vía intraperitoneal (i.p.). Finalmente, se registró la actividad convulsiva de cada animal por separado en cajas transparentes de polipropileno durante 30 minutos. Se determinó la latencia desde la inyección al inicio de cada componente convulsivo, así como el tipo de convulsión de acuerdo a la escala de Ito y cols. (48):

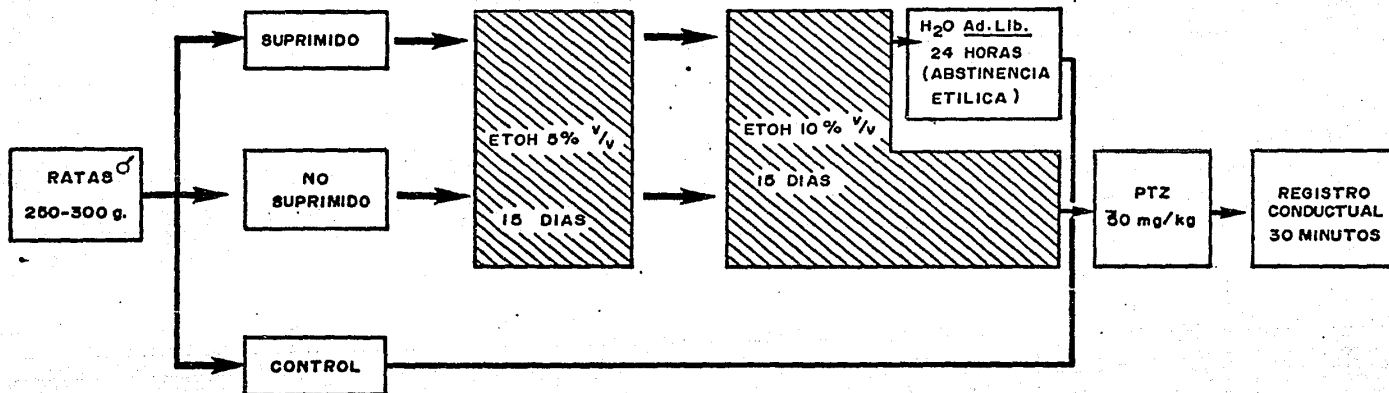
Estadio I, sin respuesta convulsiva; II, mioclonias faciales, del cuello y de los miembros anteriores; III, Extensión tonicoclónica con torcedura del cuello y la porción anterior del cuerpo, y mioclonias unilaterales de los miembros anteriores; IV, levantamiento del cuerpo con mioclonias continuas bilaterales, hasta quedar apoyado en los miembros posteriores y la cola en "posición de canguro", y V, crisis convulsiva generalizada con extensión tonicoclónica sostenida de todo el cuerpo. Si viene del estadio IV, pérdida del equilibrio y caída violenta hacia atrás.

El registro se hizo entre las 12:00 y las 14:00 hrs. en todos los casos. (Fig. 8 ).

### 3. Pinealectomía y Falsa operación:

Se formaron 3 grupos de 10 ratas cada uno: Pinealectomizado (Px), falsamente pinealectomizado (FPx) y sin operación (SO). La pinealectomía se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Hoffman y Reiter (43b) que consiste básicamente en tomar la glándula con unas pinzas oftalmológicas haciendo cuidadosamente a un

Fig. 8 MODELO DE SUPRESION ETILICA



lado el seno venoso longitudinal de la duramadre. Los animales fueron preparados previamente para la cirugía, anestesiándolos con pentobarbital monosódico y montándolos en un aparato estereotáxico.

El trépano se hizo 1 mm. posterior a la sutura Lambda y se aspiró el exceso de sangre mediante una trampa de vacío. Solo los animales a los que se les extrajo la pineal completa se incluyeron para el análisis estadístico.

Los animales FPx siguieron la misma rutina descrita anteriormente, con excepción de que una vez hecho el trépano se puso esponja estéril (Gelfoam), para contener la hemorragia y se procedió a saturar. El grupo SO no sufrió ninguna manipulación quirúrgica. Después de 2 semanas de recuperación, los tres grupos se sometieron al modelo de abstinencia alcohólica descrito en el inciso 2 y se evaluaron del mismo modo, con la salvedad de que solo se hizo a las 24 horas de supresión, debido a que en los experimentos previos no se observó ninguna modificación conductual a las 48 horas (Fig. 9). Posteriormente, los animales Px y FPx fueron sacrificados para hacer un control anatómico de la pinealectomía.

#### 4. Tratamiento con Melatonina:

Cuatro grupos de ratas estuvieron bajo el esquema de abstinencia etílica mencionado anteriormente y se distribuyeron de la siguiente manera: Melatonina crónica (MC), el cual recibió 250 µg de esta indolamina al día por vía subcutánea (s.c.) a las 12:00 hrs; Vehículo crónico (VC), recibió 0.15 ml de ETOH al 1% en solución salina a la misma hora y por la misma vía que la melatonina; ambos grupos tuvieron una n = 6 y se trataron durante los 15 días previos a la evaluación. Los grupos Melatonina aguda (MA) y Vehículo agudo (VA), recibieron respectivamente 10 mg/kg de melatonina o ETOH al 1% s.c. disueltos en solución salina fisiológica con un volumen final de 0.15 ml, 30 minutos antes de la inyección de PTZ (Fig. 10).

Fig. 9 PINEALECTOMIA Y FALSA OPERACION

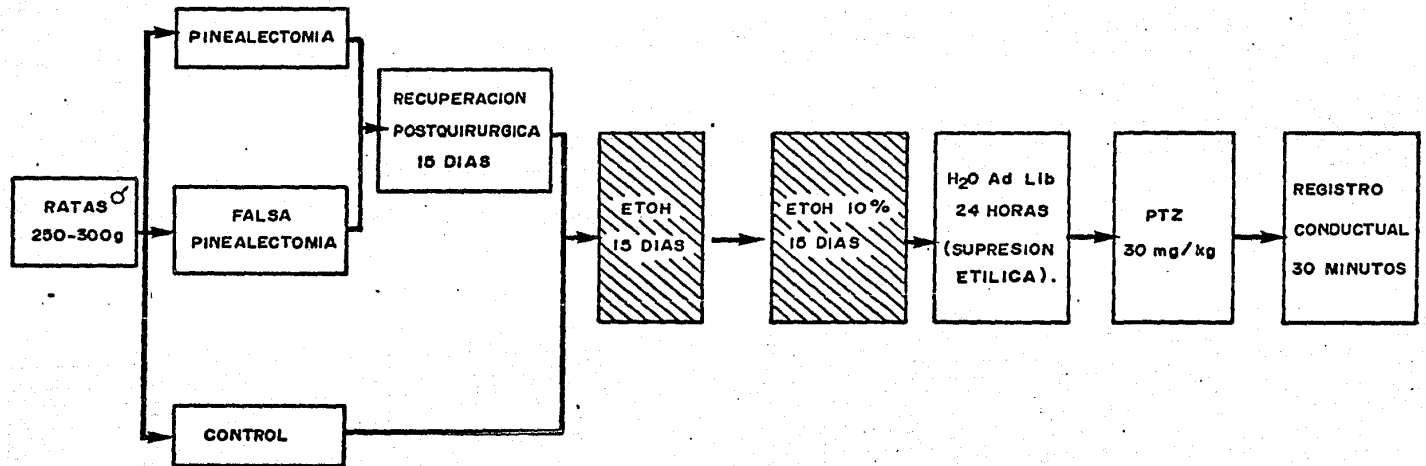
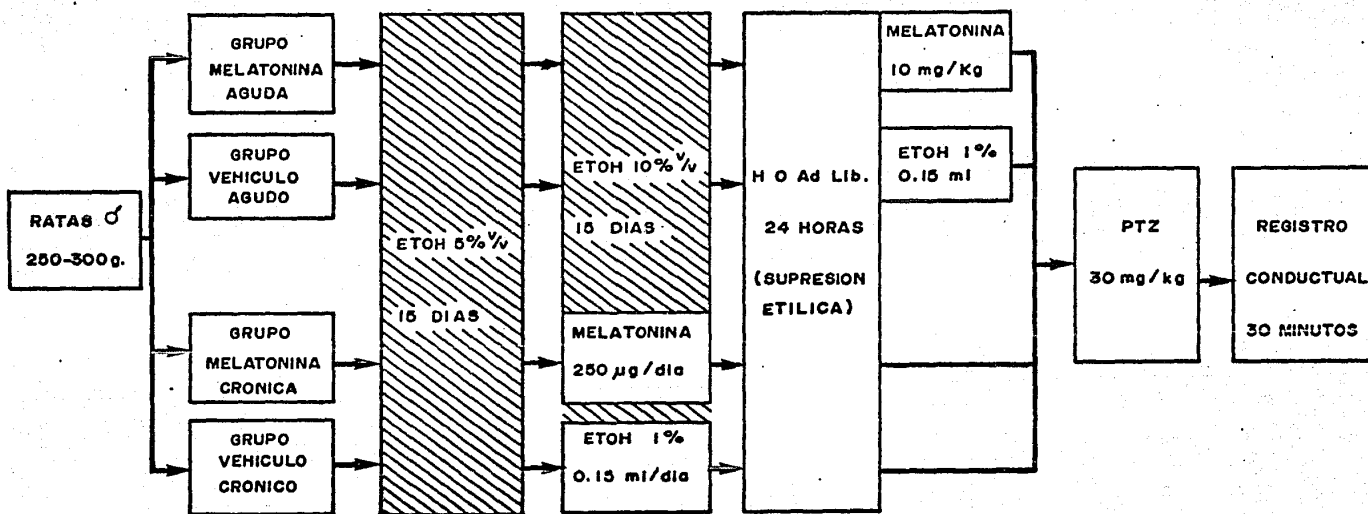


Fig.10 ADMINISTRACION AGUDA Y CRONICA DE MELATONINA





## 5. Experimentos en Luz Continua:

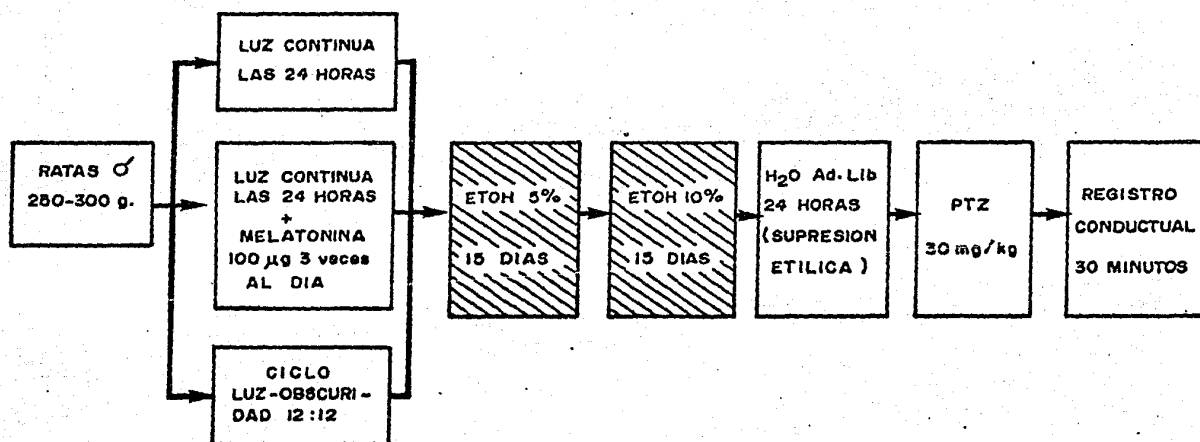
Se formaron tres grupos de 8 ratas cada uno, el grupo Luz-Obscuridad (L-O), Luz constante (L-C) y Luz Constante mas Melatonina (L-C + MEL), los cuales estuvieron respectivamente bajo las siguientes condiciones: Un ciclo Luz-Obscuridad 12:12 con inicio del fotoperiodo a las 06:00 hrs.; Iluminación constante las 24 horas, e iluminación constante mas la administración de melatonina por vía subcutánea en pulsos de 100  $\mu$ g, tres veces al día (10:00, 14:00 y 18:00 Hrs.), durante todo el experimento. Los tres grupos se sujetaron al mismo modelo de abstinencia y evaluación de los experimentos anteriores (Fig. 11).

## 6. Estadística:

El análisis de los datos se hizo utilizando medidas de tendencia central y pruebas estadísticas paramétricas y no paramétricas. El coeficiente de significancia se determinó en las tablas de probabilidades correspondientes (120).

- i) Paramétricas: Se utilizó la prueba de t pareada para el análisis de consumo de etanol durante las dos fases de intoxicación, y la prueba de t de Student para grupos independientes, en el caso de las latencias a la presentación de los parámetros convulsivos.
- ii) No paramétricas: El estadio convulsivo promedio se analizó por prueba de U de Mann-Whitney; La incidencia de animales (expresada en porcentaje) que mostraron algún parámetro determinado se hizo mediante prueba exacta de Fisher.

Fig. II ILUMINACION CONTINUA



## V RESULTADOS

La excitación del SNC inducida por la abstinencia alcohólica se hizo patente en los parámetros conductuales mencionados: La piloerección así como la aparición de WDS fueron las conductas más claras, sin embargo se presentaron en forma aleatoria y esporádica, sin mostrar ninguna correlación con algún tratamiento en particular (TABLA I).

No se observó hiperactividad en forma consistente en ninguno de los animales sometidos a los distintos tratamientos, aunque algunos se mostraron agresivos.

El modelo de supresión alcohólica utilizado fue idóneo para evaluar los cambios provocados por la manipulación de la pineal, ya que la excitación neural que provoca permitió observar modificaciones conductuales en ambos sentidos, en otras palabras, un aumento de la actividad convulsiva o una disminución de la misma medida por maniobras diferentes.

Por otra parte, la ingesta forzada de ETOH utilizando una dilución al 5%  $V/V$  (0.04 g/ml) en la fase inicial, resulta en una intoxicación del animal sin provocar la deshidratación del mismo, reflejada en su peso corporal; después de 15 días bajo estas condiciones, las ratas aparentemente no resienten el aumento al 10% en la concentración de la solución alcohólica, ya que su ingesta de líquido es muy similar mientras que la cantidad de ETOH por kg de peso se incrementa significativamente (TABLA II).

Como se señaló en el capítulo precedente fue necesaria la administración de una dosis subumbral del agente convulsivo PTZ para evidenciar, desde el punto de vista conductual, el efecto que tuvo, tanto la supresión alcohólica como las distintas manipulaciones de la glándula pineal.

#### 1. Efecto de la Abstinencia Etílica:

La supresión de la solución de etanol durante 24 y 48 horas provocó los siguientes efectos:

TABLA I. PORCENTAJE DE INCIDENCIA DE CONDUCTAS ESTEREOTIPADAS PROVOCADAS POR LA ABSTINENCIA ETILICA.

G r u p o	"Sacudida de perro mojado" (WDS)		Piloerección	
	Proporción*	%	Proporción* %	
Control	(0/10)	0	(0/10)	0
Sin abstinencia	(0/ 8)	0	(0/ 8)	0
En abstinencia	(3/10)	30	(2/10)	20
Sin operación	(1/10)	10	(1/10)	10
Falsa pinealectomía	(2/10)	20	(0/10)	0
Pinealectomizado	(4/10)	40	(0/10)	0
Melatonina aguda	(1/ 7)	14	(0/ 7)	0
Vehículo agudo	(3/ 8)	37	(2/ 8)	25
Melatonina crónica	(0/ 6)	0	(2/ 6)	33
Vehículo crónico	(1/ 6)	16	(1/ 6)	16
Luz-obscuridad	(2/ 8)	28	(1/ 8)	14
Luz constante	(1/ 8)	12	(0/ 8)	0
Luz constante mas melatonina	(0/ 8)	0	(2/ 8)	25

Los datos se presentan agrupados de acuerdo a la manobra experimental a la que estuvieron sujetos los animales. No se encontró ninguna tendencia clara a la presentación de algún componente conductual en particular.

\* Se refiere al número de animales que presentaron la conducta sobre el total del grupo.

TABLA II. CONSUMO DE ETANOL DURANTE LA INGESTA FORZADA

Grupo	n	Consumo en solución al 5% (ml/animal/día)	Ingesta neta de ETOH (g/Kg/día)	Consumo en solución al 10% (ml/animal/día)	Ingesta neta de ETOH (g/Kg/día)
Control	10	45.6 ± 3.6	---	44.4 ± 2.8	---
Sin abstinencia	8	54.1 ± 2.6	6.3 ± 0.30	47.8 ± 2.0	9.9 ± 0.49****
En abstinencia	10	43.2 ± 4.0	6.0 ± 0.62	37.3 ± 1.7	8.5 ± 0.28***
Sin operación	10	39.9 ± 2.4	5.9 ± 0.42	34.7 ± 1.5	7.4 ± 0.32**
Falsa pinealectomía	10	44.4 ± 3.2	5.6 ± 0.54	40.1 ± 2.0	8.1 ± 0.40***
Pinealectomía	9	40.2 ± 2.9	5.4 ± 0.32	32.3 ± 2.8*	7.2 ± 0.56**
Melatonina aguda	7	51.5 ± 4.3	5.5 ± 0.43	39.2 ± 2.0*	8.47 ± 0.54***
Vehículo agudo	8	36.7 ± 3.2	5.1 ± 0.49	26.1 ± 1.5**	7.17 ± 0.41**
Melatonina crónica	6	38.0 ± 2.0	5.8 ± 0.23	31.2 ± 2.5*	7.9 ± 0.60**
Vehículo crónico	6	48.0 ± 1.4	5.4 ± 0.17	38.8 ± 1.3*	8.7 ± 0.31***
Luz-obscuridad	8	46.3 ± 2.5	6.1 ± 0.29	37.0 ± 1.8*	8.2 ± 0.29****
Luz constante	8	36.7 ± 3.3	5.2 ± 0.68	32.7 ± 2.2	8.8 ± 0.35****
Luz constante mas melatonina	8	45.5 ± 1.4	5.5 ± 0.19	36.1 ± 1.3*	8.1 ± 0.23****

Los datos expresan la  $\bar{X} \pm E.E.$  de la ingesta de la solución etílica durante los primeros 15 días (ETOH 5%) y los 15 días finales (ETOH 10%); las cantidades se presentan agrupadas de acuerdo al diseño experimental en el que estuvieron los animales. El grupo control (CONT) sólo consumió agua y se presenta con fines de comparación. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.02$ ; \*\*\*  $p < 0.01$ , y \*\*\*\*  $p < 0.001$ , por prueba de t pareada.

- i) Un aumento significativo en el estadio convulsivo promedio alcanzado por el grupo en abstinencia etflica ( $\bar{x} \pm E.E. = 2.4 \pm 0.16$ ) en comparación con el control ( $1.3 \pm 0.15$ ,  $P < 0.002$ ) y con el grupo sin abstinencia ( $1.5 \pm 0.32$ ,  $P < 0.02$ ) no encontrándose ninguna diferencia entre los dos últimos grupos (Fig. 12).
- ii) Un incremento en el porcentaje de animales que presentaron algún parámetro convulsivo, i.e. estadio II y III, en el grupo en abstinencia al compararlo con el control y sin abstinencia (Fig. 13).
- iii) La latencia a mioclonias o convulsiones, en los animales que las presentaron, no se vio alterada en ninguno de los grupos experimentales (TABLA III).
- iv) No se encontró diferencia alguna entre los tres grupos en cuanto al estadio convulsivo y el porcentaje de animales que presentaron convulsiones, después de 48 horas de abstinencia. (Fig. 12).

## 2. Efecto de la Pinealectomía:

La extirpación de la glándula pineal 45 días antes de la evaluación tuvo los siguientes resultados:

- i) El estadio promedio de actividad convulsiva en el grupo pinealectomizado (Px) fue de 4.6, mientras que en el que sufrió falsa pinealectomía (FPx) y el grupo sin operar (SO) fue de 2.2 y 2.3 respectivamente. Al comparar el primer grupo con los dos últimos se encontró una diferencia significativa de  $P < 0.002$  por "U" de Mann Whitney (Fig. 14).
- ii) El porcentaje de animales que presentaron convulsiones también fue significativamente mayor en el grupo Px (100%) en comparación con el grupo FPx (20%) y el SO (40%); (Fig. 15).
- iii) Se encontró una incidencia muy elevada (77%) de convulsiones generalizadas (estadio V) en los animales pinealectomizados. Así mismo se observó un alto índice de mortalidad en este grupo en contraste con las ratas falsamente operadas e intactas.

TABLA III. EFECTO DE LA ABSTINENCIA ETILICA SOBRE LA LATENCIA DE APARICION DE MIOCLONIAS Y CONVULSIONES.

GRUPO	MIOCLONIAS		CONVULSIONES	
	Proporción*	Latencia	Proporción*	Latencia
CONTROL	3/10	1.1 ± 0.24	0/10	-
SIN ABSTINENCIA	0/8	-	2/8	3.25 ± 0.85
EN ABSTINENCIA	6/10	1.35 ± 0.38	4/10	4.66 ± 1.37

Los datos se muestran en  $\bar{X} \pm E.E.$

\* Se refiere al número de animales que presentaron la conducta sobre el total del grupo.

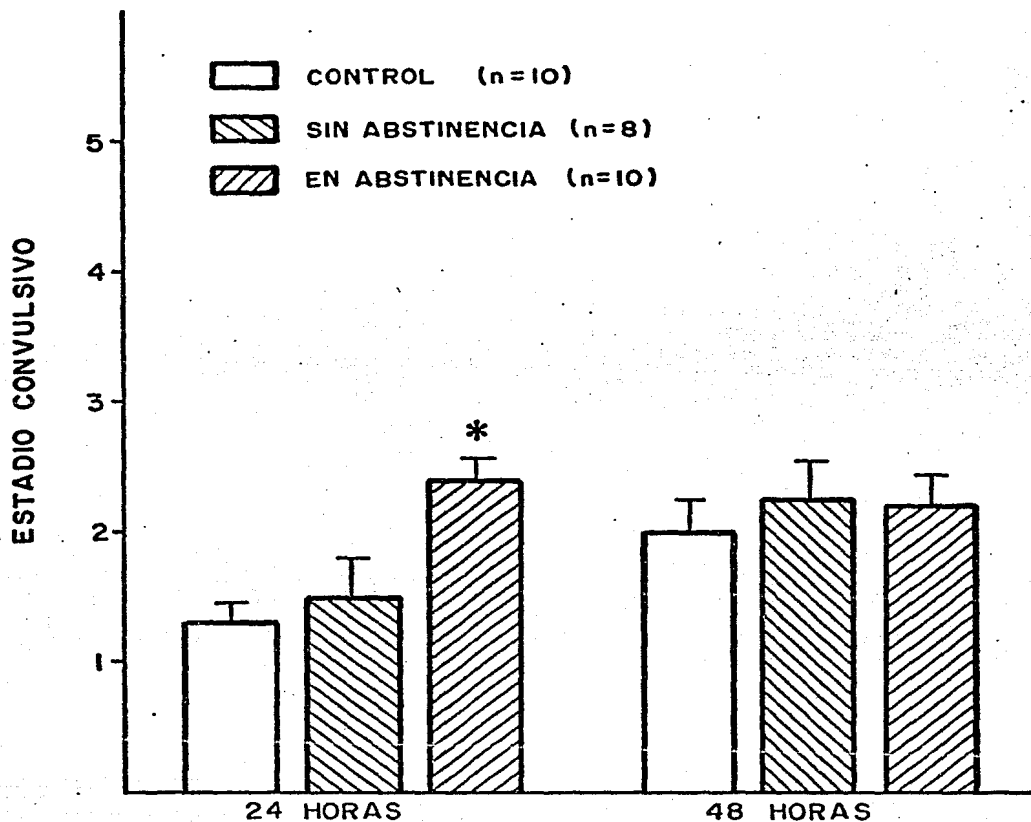
**EFFECTO DE LA ABSTINENCIA ETILICA SOBRE LA ACTIVIDAD CONVULSIVA.**

Fig. 12. Efecto de la abstinencia etílica durante 24 y 48 horas sobre la actividad convulsiva. Los datos se expresan en  $\bar{X} \pm E.E.$

\*  $P < 0.002$  v.s. Control y  $P < 0.02$  v.s. Sin Abstinencia.



PORCENTAJE DE INCIDENCIA DE ACTIVIDAD  
CONVULSIVA PROVOCADA POR LA ABSTINENCIA  
ETILICA.

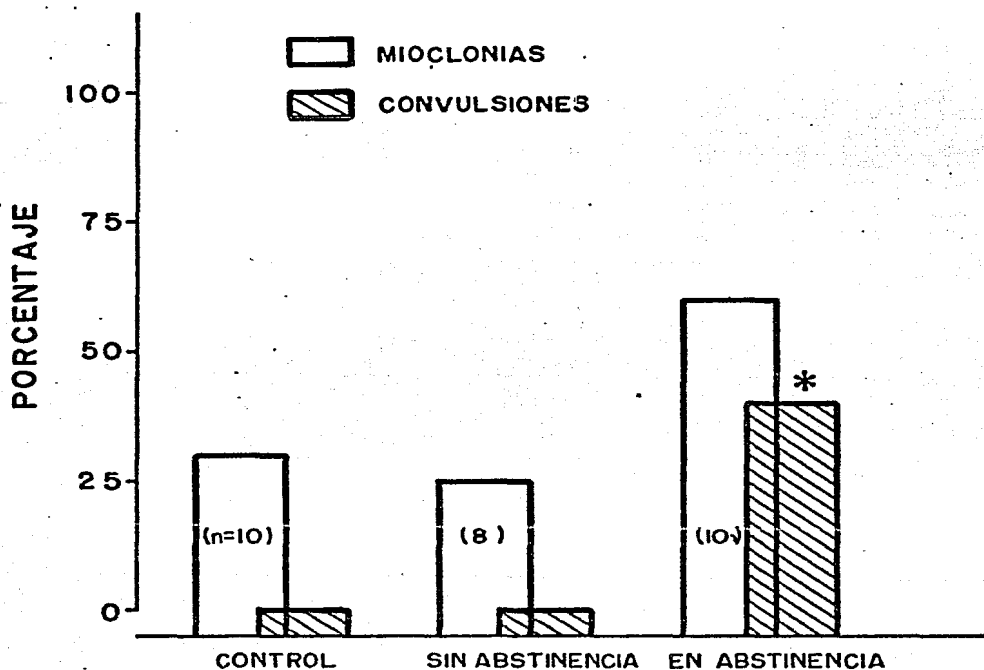


Fig. 13. Efecto de la abstinencia etílica sobre el porcentaje de incidencia de mioclonias y convulsiones.

\*  $P < 0.025$  v.s. los grupos Sin Abstinencia y Control.

EFFECTO DE LA PINEALECTOMIA SOBRE LA ACTIVIDAD CONVULSIVA DURANTE LA ABSTINENCIA ETILICA.

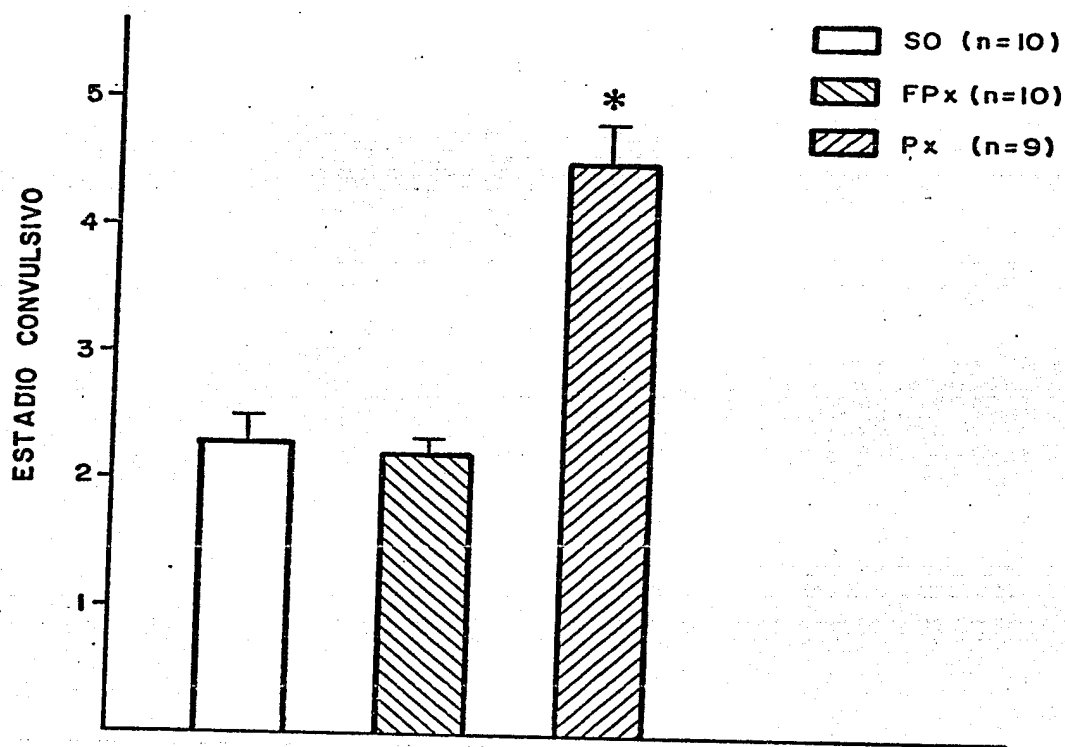


Fig. 14. Efecto de la pinealectomía sobre la actividad convulsiva durante la abstinencia etílica.

Los datos se expresan en  $\bar{X} \pm$  E.E.

\*  $P < 0.002$  con respecto al grupo Sin Operación (SO) y el grupo Falsamente Pinealectomizado (FPx);

EFFECTO DE LA PINEALECTOMIA SOBRE EL PORCENTAJE DE INCIDENCIA DE CONVULSIONES DURANTE LA ABSTINENCIA ETILICA.

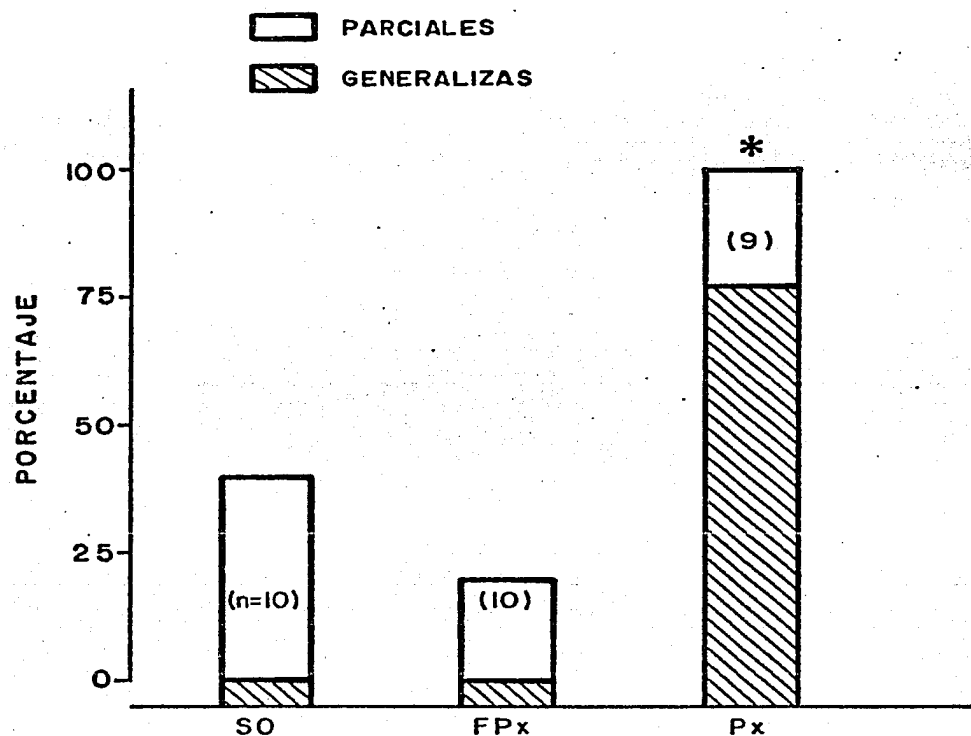


Fig. 15. Efecto de la pinealectomía sobre el porcentaje de incidencia de convulsiones parciales (estadio III) y generalizadas (estadio V) durante la abstinencia etílica.

\*  $P < 0.005$ , v.s. los grupos Falsa Pinealectomía (FPx) y sin operar (SO).

EFFECTO DE LA PINEALECTOMIA SOBRE EL PORCENTAJE DE  
INCIDENCIA DE CONVULSIONES GENERALIZADAS Y MORTALIDAD.

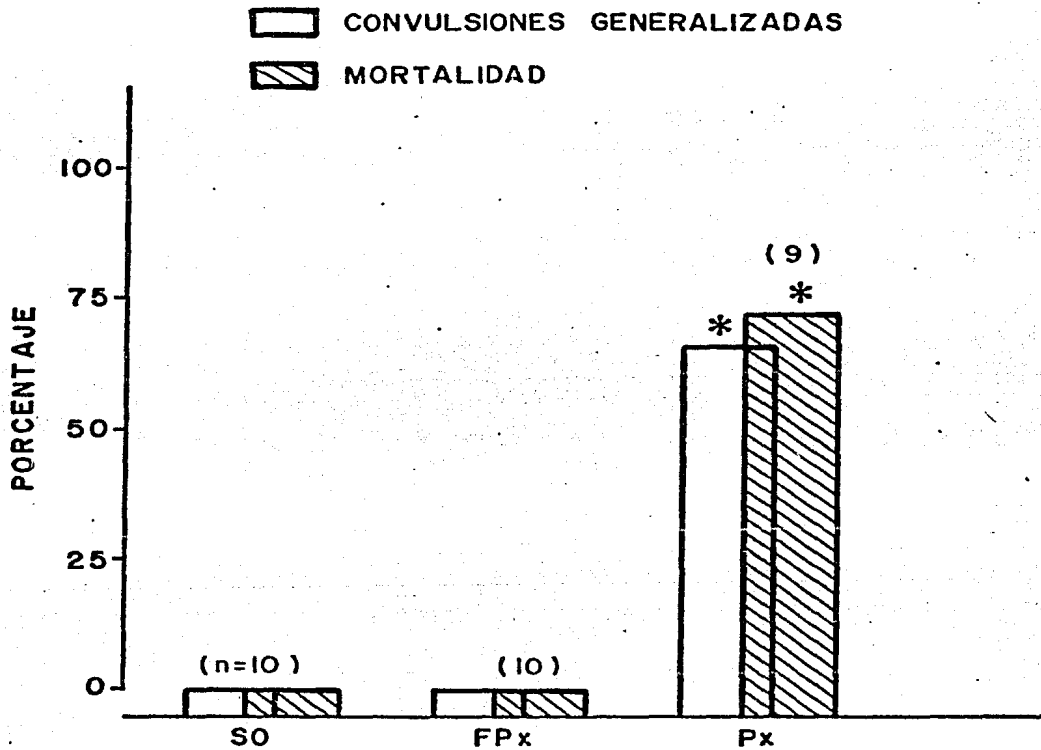


Fig. 16. Efecto de la pinealectomía sobre el índice de convulsiones generalizadas y mortalidad durante la abstinencia etílica.

\*  $P < 0.005$ , en comparación con los grupos Falsa Pinealectomía (FPx) y Sin Operación (SO).

Estas diferencias alcanzaron una significancia de  $P < 0.005$  en el porcentaje de convulsiones y en el índice de mortalidad, las cuales se muestran en la figura 16 .

- iv) Finalmente, hubo una reducción en la latencia a la presentación de convulsiones en el grupo pinealectomizado en relación a los otros dos (Fig. 17.).

El control anatómico de la cirugía reveló que uno de los animales al que se le practicó la pinealectomía, aún tenía parte de la glándula, por lo cual fue eliminado. Por otro lado, se observó la pineal intacta en todas las ratas con falsa operación.

### 3. Efecto del Tratamiento con Melatonina:

El incremento de los niveles de melatonina circulante mediado por la administración exógena de esta hormona, tanto en forma aguda - como crónica, no tuvo efecto alguno en cuanto al porcentaje de animales que presentaron convulsiones ni sobre el estadio convulsivo promedio. Sin embargo, la latencia al inicio de las convulsiones fue mayor en las ratas que recibieron melatonina en forma aguda. En todos los casos se compararon los grupos tratados con melatonina contra el vehículo respectivo (TABLA IV).

Por otro lado, se ha reportado que la melatonina altera los patrones de ingesta de etanol en la rata ( 36 , 100 , 113 ) provocando un incremento de la misma; no obstante, no se encontró ninguna diferencia en el consumo de la solución entre los animales inyectados con la indolamina o el vehículo crónicamente. (TABLA II, Fig.18).

### 4. Efecto de la Luz Continua:

- i) Al comparar los grupos que estuvieron bajo condiciones de luz-obscuridad, luz continua y luz continua mas melatonina, no se observó ninguna diferencia en el promedio del estadio convulsivo alcanzado

EFFECTO DE LA PINEALÉCTOMIA SOBRE LA LATENCIA A LA APARICION DE CONVULSIONES DURANTE LA ABSTINENCIA ETILICA.

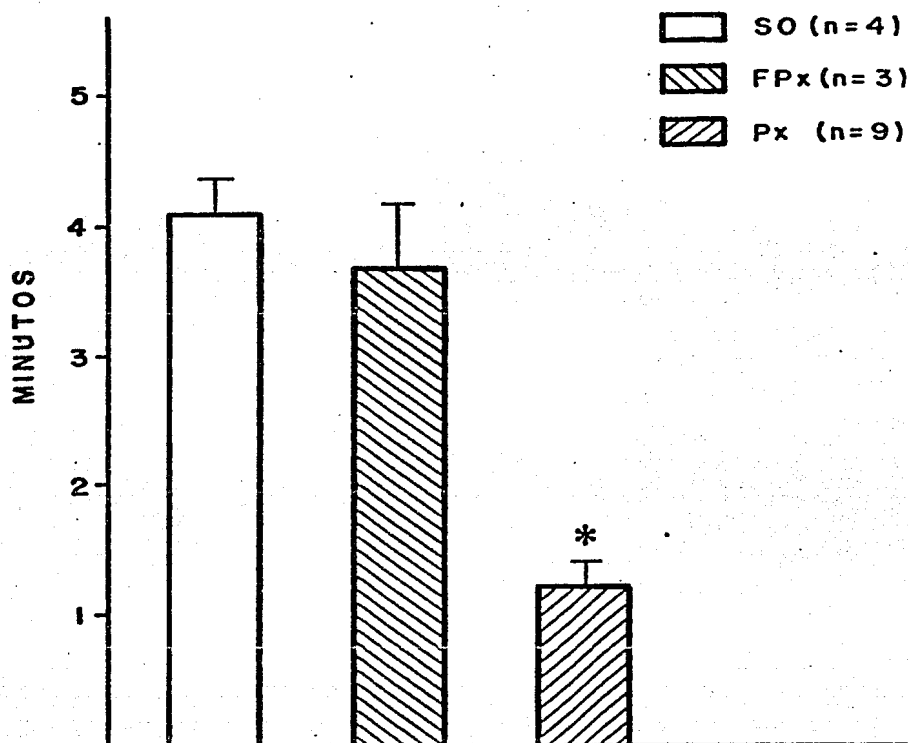


Fig. 17. Efecto de la pinealectomía sobre la latencia a la aparición de convulsiones durante la abstinencia etílica.

Los datos se expresan en  $\bar{X} \pm$  E.E.

\*  $P < 0.005$  con respecto a los grupos Falsamente Pinealectomizado (FPx) y Sin Operación (SO).

TABLA IV. EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE MELATONINA SOBRE LA ACTIVIDAD CONVULSIVA DURANTE LA ABSTINENCIA ETILICA.

G r u p o	n	Estadio Convulsivo Promedio	Incidencia (%)			Latencia a Convulsiones (min.)
			M	CP	C G	
Melatonina Aguda	8	2.4 + 0.29	28	57	0	5.48 + 0.39*
Vehículo Agudo	7	2.5 + 0.18	50	50	0	3.81 + 0.55
Melatonina Crónica	6	2.3 + 0.33	33	50	0	3.55 + 0.70
Vehículo Crónico	6	2.8 + 0.44	50	33	16	4.3 + 0.48

Los datos se muestran en  $\bar{X} \pm E.E.$  El análisis se hizo entre los grupos tratados con melatonina contra sus respectivos vehículos. Las iniciales M, CP y C G significan Mioclonias, Convulsiones Parciales y Convulsiones Generalizadas, respectivamente.

\*  $p < 0.02$  por prueba de t pareada.

EFFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA ACTIVIDAD CONVULSIVA DURANTE LA ABSTINENCIA ETILICA .

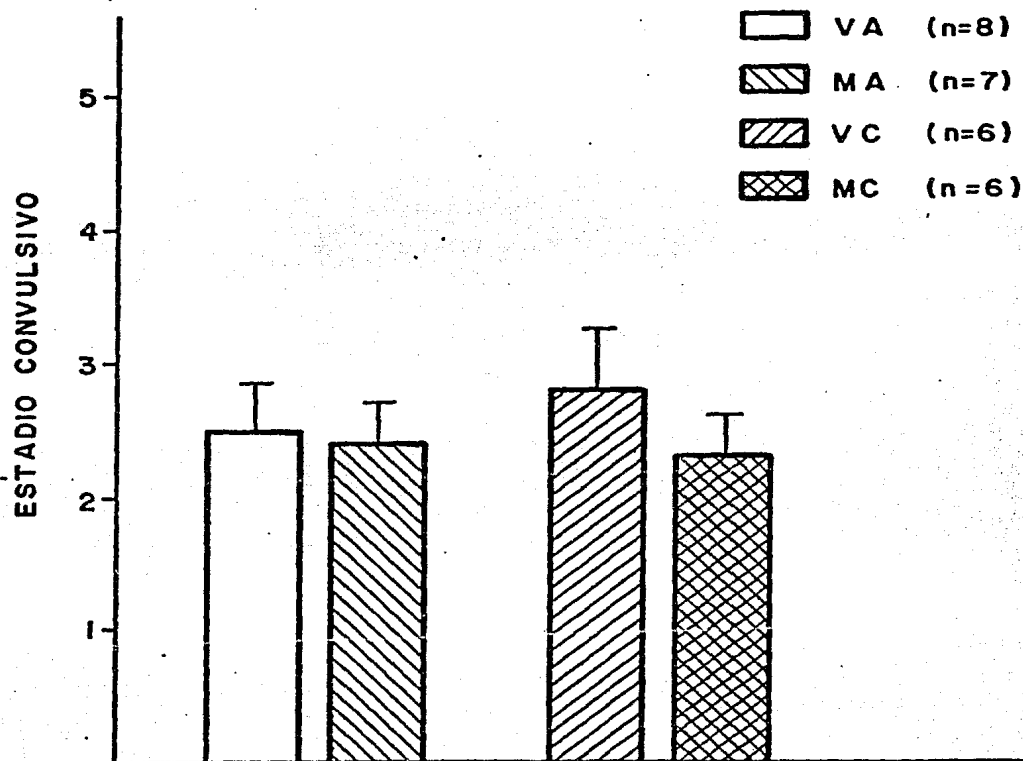


Fig. 18 . Efecto de la administración de melatonina en forma aguda y crónica sobre la actividad convulsiva durante la abstinencia etílica. Los datos se expresan en  $\bar{X} \pm$  E.E. Vehículo Agudo (VA) v.s. Melatonina Aguda (MA),  $P = ns$ ; Vehículo Crónico (VC) v.s. Melatonina Crónica (MC),  $P = n.s.$



por cada uno, ni en el porcentaje de incidencia de convulsiones (TABLA V).

- ii) La latencia a la presentación de crisis convulsivas parciales fue considerablemente mas larga en los animales que recibieron melatonina, pero la incidencia de los mismos fue tan baja que no llegó a ser significativa (TABLA V).

TABLA V. EFECTO DE LA ILUMINACION CONTINUA SOBRE LA ACTIVIDAD CONVULSIVA DURANTE LA ABSTINENCIA ETILICA.

GRUPO	n	Estadio convulsivo	Incidencia de convulsiones (%)	Latencia a convulsiones (min)
L - 0	8	2.4 ± 0.2	43	3.65 ± 0.4
LC	7	2.1 ± 0.2	25	3.45 ± 0.28
LC ± M	8	2.0 ± 0.3	25	5.7 ± 0.44

Los datos se expresan en  $\bar{X} \pm E.E.$  No se encontraron diferencias significativas al comparar el grupo que permaneci6 bajo condiciones de luz-obscuridad (L-0) con los grupos en luz continua (LC) y luz continua mas melatonina (LC + M)

## VI DISCUSION

## i) Abstinencia etílica

La supresión de etanol durante 24 horas resultó en un claro descenso en el umbral convulsivo; sin embargo no llegó a ser tan severa como para provocar crisis espontáneas o un estado convulsivo máximo después de la estimulación con PTZ. No se encontró tal efecto en los animales forzados a beber etanol, pero que no fueron suprimidos, los cuales se comportaron de manera similar al control.

Estos hallazgos confirman que la ingesta prolongada de alcohol no facilita la presentación de convulsiones sino por el contrario, que es la supresión del mismo, como se ha reportado ampliamente. Cabe resaltar el hecho de que en la mayor parte de los trabajos conductuales se utilizan esquemas de alcoholismo mucho más agudos que afectan una variedad de parámetros además de la excitabilidad del SNC durante la abstinencia (34,46). En el presente estudio se usó un modelo de intoxicación alcohólica similar a aquellos que provocan alteraciones bioquímicas a nivel central sin afectar mayormente otros órganos como el hígado (66,70); por tal motivo, este método podría tener gran utilidad en estudios posteriores tendientes a explorar los mecanismos subyacentes a la hiperactividad provocada por la supresión etílica.

Por otro lado, la abstinencia no provocó ningún cambio apreciable después de 48 horas. Esto indica que bajo nuestras condiciones el síndrome de supresión se manifiesta durante el primer día, a diferencia de lo que se ha reportado en los estudios clínicos (15), donde aumenta en severidad a las 48 e incluso a las 72 horas. No obstante, se han reportado resultados similares al nuestro en otras especies (35,39). Al parecer la manifestación conductual del síndrome guarda una estrecha relación con la concentración de etanol en sangre, ya que se tienen datos de que el alcohol circulante se metaboliza en las primeras 30 horas después de retirado, coincidiendo temporalmente con la fase aguda de la abstinencia.

El efecto de la pinealectomía fue el resultado más claro en este trabajo, observándose consistentemente un aumento de la actividad convulsiva, tanto en los parámetros de incidencia como de intensidad.

Dicha elevación en el estadio convulsivo, el porcentaje de crisis generalizadas y muerte a causa de éstas, así como el acortamiento en la latencia a su aparición, no se presentaron en el grupo falsamente pinealectomizado, el cual se comportó igual al control indicando que las alteraciones antedichas no se debieron al trauma quirúrgico, sino precisamente a la eliminación de la pineal, en contraste con otras publicaciones (101). Esta disminución dramática del umbral convulsivo coincide con numerosos reportes previos de la literatura (110,1) y sugiere que la presencia de esta estructura es necesaria para mantener cierto control en la excitación a nivel central, sobre todo en estados de hiperactividad neural.

Sin embargo, la mayor parte de los estudios en este sentido refieren que las alteraciones que induce la pinealectomía son pasajeras y se suscitan en un período agudo de unos cuantos días, posterior al cual se revierten; no se sabe como sucede tal reversión, aunque podría especularse que estuviera asociada a un cambio en ciertos neurotransmisores de naturaleza indolamínica (124). Los datos presentados en este trabajo difieren de la observación anterior, ya que los animales tuvieron al menos un mes y medio de recuperación antes de evaluar la abstinencia. Dicho resultado podría sugerir que, aunque las modificaciones más aparentes surgen en forma aguda, la pérdida de la pineal provoca un desequilibrio permanente en el cerebro, que se hace más evidente durante estados de hiperexcitabilidad cerebral generalizada.

El mecanismo celular subyacente a la actividad convulsiva provocada por la pinealectomía permanece obscuro; no obstante, se han hecho algunas aproximaciones en este sentido. Usando un modelo de convulsiones desencadenadas por la paratiroidectomía seguida de la pinealectomía, Reiter y cols. (101,102) propusieron que la hipocalcemia provocada por la eliminación de la glándula paratiroides podría contribuir a la aparición de convulsiones, pero desafortunadamente las inyecciones de grandes cantidades de lactato de calcio no previnieron la inci-

dencia de las crisis (101). Cabe resaltar que el reemplazo de algunas sustancias de la pineal tales como la melatonina,  $\beta$ -carbolina, taurina e incluso extractos de ésta glándula no tuvieron ninguna influencia anticonvulsiva tanto en ratas (93) como en gerbos (92). Estos datos tomados en conjunto sustentan la hipótesis de que es indispensable la integridad de dicha estructura epitalámica para mantener su función estabilizadora sobre el SNC.

Por otro lado, Quey mostró que la pinealectomía disminuye la capacidad de mantener los niveles de potasio en el cerebro de la rata (94). Este hallazgo podría tener relevancia en la interpretación de nuestros resultados, ya que el potasio juega un papel prominente en el mantenimiento de la excitabilidad de la membrana neuronal; así, es posible que los cambios en el potasio cerebral causados por la pinealectomía contibuyeran a la generación de convulsiones durante el estado de abstinencia

Una explicación adicional podría ser la siguiente: se sabe que al extirpar la pineal disminuye la disponibilidad de norepinefrina en varias regiones del cerebro (124), lo cual aumenta la respuesta convulsiva bajo ciertas condiciones de activación neural como el estrés (123) y posiblemente la abstinencia.

Finalmente, algunas drogas antiepilépticas ampliamente utilizadas en la experimentación y la clínica tienen distintos efectos sobre la actividad convulsiva inducida por la pinealectomía; por ejemplo la difenilhidantoína es ineficaz para controlarla, mientras que el clordiazepoxido y el diazepam son capaces de hacerlo (101), probablemente a través de un mecanismo que involucra a las aminas cerebrales (31,118). Estos mismos fármacos inhiben las convulsiones asociados a la supresión etilica en varias especies (38), lo cual pudiera sugerir que el sinergismo en la intensidad de las crisis que provoca la pinealectomía durante la abstinencia, tiene un mecanismo aminérgico común. Además, si consideramos que en este estudio, el estímulo que precipita la conducta convulsiva es la aplicación de una dosis subumbral de PTZ, la hipótesis mencionada se ve fortalecida, ya que, aunque no se conoce con certeza el mecanismo de acción de esta droga, se ha reportado que tanto la dopamina y la norepinefrina como la serotonina suprimen

el desarrollo de crisis inducidas por su administración (28,65,144), en tanto que la depleción de norepinefrina y los niveles bajos de serotonina incrementan la duración e intensidad de las mismas (55,73).

En vista de que la pineal no establece innervaciones con ninguna estructura que pudiera estar involucrada en la generación de crisis durante la abstinencia (87), es obvio suponer que el descenso en el umbral convulsivo se debe a la falta de su influencia humoral en la homeostasis del cerebro. Empero, esta manipulación no permite saber si es la carencia de melatonina el factor responsable de dicho decremento, o si se trata de otras sustancias neuroactivas también secretadas por esta glándula.

En lo referente a la administración de melatonina, no se observó ninguna modificación de los parámetros conductuales, excepto un moderado retardo en la latencia a la presentación de crisis con la inyección aguda.

Aparentemente, la melatonina aplicada en estas dosis tanto en forma crónica como aguda carece de efecto anticonvulsivo, aunque se observa una tendencia a mostrar cierta acción sedante (ver figura 18). Estos resultados contrastan con la hipótesis planteada, sin embargo, no son sorprendentes, ya que la hormona ha probado su eficacia antiépiléptica solo utilizando dosis farmacológicas, las cuales en algunos casos exceden los niveles endógenos hasta en tres órdenes de magnitud; asimismo, los modelos en los que la melatonina tiene actividad depresora sobre el SNC son de tipo fisiológico, es decir, no involucran la administración de ninguna otra droga, por lo que la actividad neuronal se encuentra en niveles basales (24,108).

Para el caso del tratamiento crónico, pudiera ser que las modificaciones provocadas por esta indolamina, tanto en los niveles de neurotransmisores principalmente GABA y serotonina (3,4), como en la sensibilidad de receptores, no haya sido suficiente para observar algún resultado conductual.

También cabe la posibilidad de que los efectos inespecíficos que provoca el etanol interfieran con la melatonina, en vista

el desarrollo de crisis inducidas por su administración (28,65,144), en tanto que la depleción de norepinefrina y los niveles bajos de serotonina incrementan la duración e intensidad de las mismas (55,73).

En vista de que la pineal no establece innervaciones con ninguna estructura que pudiera estar involucrada en la generación de crisis durante la abstinencia (87), es obvio suponer que el descenso en el umbral convulsivo se debe a la falta de su influencia humoral en la homeostasis del cerebro. Empero, esta manipulación no permite saber si es la carencia de melatonina el factor responsable de dicho decremento, o si se trata de otras sustancias neuroactivas también secretadas por esta glándula.

En lo referente a la administración de melatonina, no se observó ninguna modificación de los parámetros conductuales, excepto un moderado retardo en la latencia a la presentación de crisis con la inyección aguda.

Aparentemente, la melatonina aplicada en estas dosis tanto en forma crónica como aguda carece de efecto anticonvulsivo, aunque se observa una tendencia a mostrar cierta acción sedante (ver figura 18). Estos resultados contrastan con la hipótesis planteada, sin embargo, no son sorprendentes, ya que la hormona ha probado su eficacia antiepiléptica solo utilizando dosis farmacológicas, las cuales en algunos casos exceden los niveles endógenos hasta en tres órdenes de magnitud; asimismo, los modelos en los que la melatonina tiene actividad depresora sobre el SNC son de tipo fisiológico, es decir, no involucran la administración de ninguna otra droga, por lo que la actividad neuronal se encuentra en niveles basales (24,108).

Para el caso del tratamiento crónico, pudiera ser que las modificaciones provocadas por esta indolamina, tanto en los niveles de neurotransmisores principalmente GABA y serotonina (3,4), como en la sensibilidad de receptores, no haya sido suficiente para observar algún resultado conductual.

También cabe la posibilidad de que los efectos inespecíficos que provoca el etanol interfieran con la melatonina, en vista

de que la fase más aguda de intoxicación alcohólica fue simultánea a la administración de la hormona. Este inconveniente se consideró en el diseño del experimento, sin embargo, no hubo forma de salvarlo, constituyendo una de las limitaciones del presente trabajo.

En el caso del tratamiento agudo, se usó una cantidad de melatonina (10 mg/kg) que supera sus niveles endógenos, pero se encuentra dentro de la dosis farmacológica más pequeñas que se han utilizado. Cabe señalar que la aplicación se hizo por vía intraperitoneal, lo que provoca que una gran cantidad de la hormona se metabolice rápidamente en el hígado. (61).

En este esquema se observó el único resultado significativo, que consistió en la prolongación de la latencia a convulsiones. Este parámetro resultó muy constante a lo largo del experimento, aunque es difícil de interpretar; en varios artículos se ha propuesto que tiene un significado inhibitorio (21).

En suma, el efecto prácticamente nulo de esta maniobra se explica principalmente por el rango de dosis que se administró; dichas dosis nunca se habían utilizado en esquemas de convulsiones inducidas. En segundo término, se puede especular con respecto al "enmascaramiento" del efecto de la indolamina debido a la ingesta de etanol. Finalmente, cabe la posibilidad de que el modelo de abstinencia no sea lo suficientemente sensible para valorar los cambios que tienen lugar después del tratamiento con esta hormona, que conforme a lo reportado, son relativamente sutiles ( 2 ).

La pérdida de la capacidad para sintetizar melatonina que causa la luz constante no resultó en ninguno de los efectos observados por la pinealectomía; estos hallazgos indican que la depleción de melatonina por sí misma no provoca ningún efecto consistente en el umbral convulsivo, en contraste con lo reportado por Fariello y cols. en 1977, quienes encontraron anormalidades epileptiformes después de inyectar un anticuerpo contra esta hormona (30). Dicha diferencia podría deberse al distinto abordaje metodológico empleado en este trabajo. No obs



tante, nuestros resultados son congruentes con muchas otras publicaciones que demuestran la incapacidad de la melatonina para revertir el efecto de la pinealectomía sobre la actividad epiléptica.

Una manera de explicar esta falta de efecto es que se haya dado un mecanismo compensatorio que en última instancia condujera al mantenimiento de la actividad eléctrica cerebral en niveles normales, aunque no exista evidencia directa de este hecho. Por otro lado, es natural suponer que no solo la producción de melatonina se ve alterada por esta maniobra. Muchas otras funciones fisiológicas y endócrinas describen un patrón circadiano en su presentación, e igualmente se modifican por la carencia de un factor externo que acople dicho ritmo, en este caso el ciclo luz-oscuridad. De ellos se puede citar el ritmo de susceptibilidad a convulsiones inducidas de diversas formas incluso por PTZ, el cual depende de la luz (117), también se ha descrito un circadio en la oscilación de los niveles de varios neurotransmisores aminérgicos y peptídicos que pudieran ser relevantes en el control de la excitación nerviosa (62,118).

Por último, en vista de que no se encontró ningún cambio sustancial por efecto de la luz constante, es difícil interpretar el incremento en la latencia convulsiva observado después del tratamiento crónico con melatonina, que aunque no fue significativo, pudiera indicar que la aplicación de la hormona en pulsos espaciados a lo largo del día tiene mayor influencia que la inyección individual diaria.

Puntualizando los resultados más relevantes de este estudio podemos decir que:

- La supresión etílica facilita la actividad convulsiva inducida por la aplicación subumbral de PTZ.
- La pinealectomía provoca un dramático descenso del umbral convulsivo durante la abstinencia etílica.
- El tratamiento con melatonina tanto en forma crónica como aguda no previenen la aparición de conductas convulsivas provocadas por la abstinencia de etanol.

- La luz continua no tiene la misma influencia que la ablación de la glándula pineal sobre la presentación de crisis.

En resumen, los resultados reportados en esta tesis concuerdan con la idea general que se tiene en torno a la influencia inhibitoria de la glándula pineal sobre el estado de excitación en el SNC.

VII REFERENCIAS

1. - Alberton T., Peterson S., Stark L., Lakin M. y Winters W. "The anticonvulsion properties of melatonin on kindled seizures in rats" Neuropharmacology 20:61-66, 1981.
2. - Antón-Tay F. "Melatonin: Effects on brain function" Adv Biochem Psychopharmac 11:315-24, 1974.
3. - Antón-Tay F. "Pineal-Brain relationships. En: The Pineal Gland" Wolstenholme G.E. y Knight J. Eds. London, 1971.
4. - Antón-Tay F., Chuan C., Antón S y Wurtman R.J. "Brain Serotonin concentration: Elevation following intraperitoneal administration of melatonin" Science 162:277 -78, 1968.
5. - Antón-Tay F., Días J y Fernández Guardiola A. " On the effects of Melatonin upon the human brain. Its possible therapeutic implications" Life Sci 10:841-50, 1971
6. - Arendt J. " Mamalian Pineal Rhythms" En : Pineal Res Rev 3:161-213 1985.
7. - Arotyunyan G., Mashkowskii M.y Roshina L. " Pharmacological properties of melatonin. " Fedn. Proc. Trans, 23:1330-1332, 1964.
8. - Ashton D. y Waukier A. "Behavioral analysis of the effect of 15 anticonvulsivants in the amigdaloid kindled rats" Psychopharmacology 65:7-13, 1979.
9. - Axelrod J. y Weissbach H. "Enzymatic O-metilation of N-acetylserotonin to melatonin". Science 134: 1312-1313, 1960.

- 10.- Axelrod J., Quay W.B. y Baker P.C. "Enzymatic sunthesis of the skin-lightering agent melatonin in amphibians". Nature 208: 386, 1965.
- 11.- Axelrod J. "The pineal gland : Aneurochemical transducer". Science 184: 1341-1348, 1974.
- 12.- Ballenger J.G. y Poast R.M. "Kindling as a model for alcohol withdrawal syndromes". Brit. J. Psychiat. 133: 1-14, 1978.
- 13.- Barchas J., Da Costa F. y Spector S. "Acute pharmacology of melatonin". Nature 214: 919-920.
- 14.- Bascheri L., De Luca F., Cramorosa L., De Marino C., Oliverio A. y Negri M. "Modification of thyroid activity by melatonin". Experientia 19: 15-17, 1965.
- 15.- Begleiter H. y Palatz A, "The effects of alcohol on the central nervous system in humans". En: The Biology of Alcoholism, Vol II, Kissin B y Begleiter H. eds. Pelnum Press, N.Y., 1972.
- 16.- Bindoni M., Jutisz M. y Ribot G. "Characterization and partial purification of a substantial in the pineal gland which inhibits ceel multiplication in vitro". Biochem Biophys. Acta 437:577-588, 1976.
- 17.- Bindoni M. y Rizzo R. "Hippocampal evoked potentials and convulsive activity after electrolytic lesions of the pineal body in chronic experiments on rabbits". Archs. Sci. Biol 49: 223-233, 1965.
- 18.- Binkley S.A. "Circadian rhythms of pineal function in rat". Endocrine Rev. 4: 255-270, 1983.
- 19.- Binkley S.A., Klut E. y Manaker M. "Pineal function in sparrows: Circadian rhythm and body temperature". Science 174: 311-314, 1971.

20. - Blask D.A. "The pineal : An Oncostatic Gland?". En: The Pineal Gland, 253-284, Reiter R.J. ed., 1984.
21. - Brailowsky S. "Effects of melatonin on the photosensitive epilepsy of the baboon". *Papio papio*. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 41:314-319, 1976.
22. - Brownstein M y Zatz M. "The Suprachiasmatic Nucleus : A mammalian Clock. En: Cellular Pace markers". 2:217-226, Carpenter D ed. John Wiley & Sons, Inc. N.Y., 1982.
23. - Boswell, R.S. "The pineal and neoplasia". *Lancet* 1: 34-35, 1975.
24. - Bubenik G.A. "The effect of serotonin, N-acetylserotonin and melatonin on spontaneous contractions of isolated rat intestine". *J. Pineal Res.* 3: 41-54, 1986.
25. - Cardinali D.P. Melatonin: A Mammalian Pineal Hormone. *Endocrine Rev.*, 2: 327-343, 1981.
26. - Carrington C., Ellingwood Jr. E. y Kishiman R. "Effects of single and repeated alcohol withdrawal on kindling". *Biological Psychiatry*. 19: 525-537, 1984.
27. - Cassone V., Chesworth M. y Armstrong S. "Entrainment of rat circadian rhythm by daily injection of melatonin depends upon the hypothalamic suprachiasmatic nuclei". *Physiol. Behav.* 36: 1111-1121, 1986.
28. - Dadkar M., Dahanukav S. y Sheth, N. "Role of dopaminergic and noradrenergic mechanisms in metrazol convulsions in mice". *Indian J. Med. Res.* 70: 492-494, 1979.
29. - Fariello R. y Bubenik G. "Melatonin-induced changes in the sensory activation of acute epileptic foci". *Neurosci. Lett* 3: 151-155, 1976.
30. - Fariello R., Bubenik G., Brown G. y Grota L. "Epileptogenic activation of intraventricularly injected antimelatonin activity".

Neurology 27:567-570, 1977.

31. - Feighner J., Lao L., King L. y Ross W. "Brain serotonin and norepinephrine after convulsions and reserpine". J. Neurochem. 19:905-907, 1972.
32. - Fernández-Guardiola A. y Antón-Tay F. "Modulation of subcortical inhibitory mechanism by melatonin". Adv. Behav. Biol. 10: 273-276, 1974.
33. - Fraschini F. y Martin L. "Thythmic phenomena and pineal principals. En: Hypothalamus 529-549, Martin L., Motta M. y Fraschini F. eds., Academic Press, N.Y, 1970.
34. - Freund G. "Alcohol withdrawal syndrom in mice". Arch. Neurol. 21: 315-320, 1969.
35. - Freund G. y Walker D. "Sound-induced seizures during ethanol withdrawal in mice". Psychopharmacologia 22: 45-49, 1971.
36. - Geller, I. "Ethanol preference in the rat as a function of photoperiod". Science 173; 456-459, 1971.
37. - Goldman H. y Wurtman R.J. "Flow of blood to the pineal body of the rat. Nature 203: 87-88, 1964.
38. - Goldstein D.B. "An animal model for testing effects of drugs on alcohol withdrawal reactions". J. Pharmacol. Exp. therap. 1973.
39. - Guerrero-Figueroa R., Rye M., Gallant D.y Bishop m. "Electrographic and behavioral effects of diazepam during alcohol withdrawal stage in cats". Neural and Behavioral Correlates. Pharmacol Biochem. Behav. 1: 719-725, 1973.
40. - Greneell R. "Effects of alcohol on the neuron. En: The Biology of alcoholism. Vol. II. 1-17, Kissin B. y Begletier H. eds., 1972.

- 41.- Hirata F., Hayaishi O., Tokoyama T. y Serioh S. "In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin". J. Biol. Chem. 249: 1611-1616, 1974.
- 42.- Hishikawa Y., Cramer H. y Kuhlo W. "Natural and melatonin induced sleep in young chickens- a behavioral and electrographic study". Exp. Brain Res. 7: 84-94, 1969.
- 43.- Hoffman R.A. y Reiter R.J. "Pineal gland: Influence on gonads of male Hamsters". Science 148: 1609-1611, 1965.
- 43b.- Hoffman R.A. y Reiter R.J. "Rapid pinealectomy: in hamsters and other small rodents". Anat. Rec. 153: 19-22, 1965.
- 44.- Holmes S.W. y Sjudgen D. "Effects of melatonin on sleep and neurochemistry in the rat". Bri. J. Pharmacol. 76: 95-101, 1982.
- 45.- Hunt W.A. "Changes in the neuroexcitability of alcohol dependent rats undergoing withdrawal as measured by pentylenetetrazole siexure threshold". Neuropharmacology 12:1097-1102, 1973.
- 46.- Hunter B.E., Boast C., Walker D. y Zornetzer S. "Alcohol withdrawal syndrom in rats". Neural and behavioral correlates". Pharmacol. Biochem. Behav. 1: 719-725, 1973.
- 47.- Isbell H., Fraser H., Wikler A., Belleville R. y Eisenman A., "An experimental study of etiology of rumfits and delirium tremens". Quart. J. Stud. Alcohol 1-33, 1955.
- 48.- Ito T., Hori, M., Yohida K. y Shimozi M. "Effect of anticonvulsants on seizures developing in the course of daily administration of pentetrazole to rats". Eur. J. Pharmac. 45: 165-172, 1977.
- 49.- Izumi K., Donaldson J., Minnich J. y Barveu A. "Outbrain-induced seizures in rats: modification by melatonin and melanocyte-stimulating hormone". Can J. Physiol. Pharmacol. 51: 572-573, 1973.

- 50.- Jospers H., Sourlues T. Nobel Laureates in Neuroscience: 1904-1981 Ann Rev. Neurosci. 6:1-42, 1983.
- 51.- Kappers J.A. "The pineal Organ. An Introduction. En: "The Pineal Gland, 3-25. Wolstenholme G.E. y Knight J. eds. Churchill Livingstone, London, 1971.
- 52.- Kappers J.A. "The development, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat". Z.Zellforsch. 52: 163-215, 1960.
- 53.- Kavaliers M., Hirst M. y Teskey C. "Agins, opioid analgesia and the pineal gland". Life Sci. 32: 2279-2287, 1983.
- 54.- Kavaliers M., Hirst M. y Teskey C. "Nocturnal feeding in the mouse apiate and pineal influences". Life Sci 36: 973-980, 985.
- 55.- Kilian M. y Frey H\_H. "Central monoamines and convulsive thresholds in mice and rats". Neuropharmacology 12: 681-692, 1973.
- 56.- Kitay I. "Pineal lesions and precocius puberty". J. Clin. Endocrinol. Metab. 14:622-625, 1954.
- 57.- Klain D.C. y Lines S.V. "Pineal hydroxyindole-O-methyltransferase activity in the growing rat". Endocrinology 89: 1523-1525, 1969.
- 58.- Klain D.C. y Waller J.L. "Indole methabolism in the pineal gland: A circadian rhythm in N-acetyltransferase". Science 169: 1093-1095, 1970.
- 59.- Klain D.C., Waller J.L. y Morre R.Y. "Melatonin metabolism: Neural regulation of pineal serotonin N-acetyltransferase activity". Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 68:3107-3110, 1971.



ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 60.- Klain D.C. y Moore R.Y. Pineal N-acetyltransferase and hydroxy indole - O - methyltransferase: Control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. Brain Res. 174: 245-262, 1979.
- 61.- Koplín J.I., Pare C., Axelrod J. & Weissbach H. The fate of melatonin in animals. J. Biol. Chem. 236:3072-3075, 1961.
- 62.- Kumar M., Chen L., Sharp D., Liu J., Karla P. & Karla P. Diurnal fluctuations in methionine - enkefalin levels in the hypothalamus and preoptic area of the male rat: Effects of pinealectomy. Neuroendocrinology 35:28-31, 1982.
- 63.- Kvader S. & McIsaac W.M. The metabolism of melatonin (N-acetyl 5-methoxy tryptamine) and 5-methoxytryptamine. J. Biol. Chem. 236:3214-3220, 1961.
- 64.- Lakin M.L., Miller C., Scott M. y Winters W. Involvement of the pineal gland and melatonin in murine analgesia. Life Sci. 29:2543-2551, 1981.
- 65.- Lazarova M.B. & Roussinov K.S. On certain effects of dopaminergic agents in pentylenetetrazol convulsions. Bolg. Acad. Sci. 50-55, 1978.
- 66.- Lee H., Hosein E. & Rovinski B. Effect of chronic alcohol feeding and withdrawal on the liver plasma membrane structure and function: a study of H<sup>3</sup> prazosin to the membrane bound 1 adrenergic receptor. Biochem. Pharmacol. 32:1321-1323, 1983.
- 67.- Lehner S. Puberty and menopause in the human: Possible relation to gonadotropin releasing hormone pulse frequency and the pineal gland. Pineal Res. Rev. 3:237-257, 1985.

- 68.- Lerner A., Case J., Takahashi Y., Lee T. & Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. J. Am. Chem. Soc. 80:2587, 1958.
- 69.- Lerner A., Case J. & Takahashi Y. Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. J. Biol. Chem. 235:19991-19997, 1960.
- 70.- Littleton J.M. Synaptosomal membrane lipids in mice during continuous exposure to ethanol. J. Pharm. Pharmac. 29:579-581, 1977.
- 71.- Lovenberg W., Jaguier E. & Sjoerdsma S. Tryptophan hydroxylation: Measurements in pineal gland, brain stem and carcinoid tumor. Science 155:217-218, 1967.
- 72.- Lovenberg W., Weissbach H. & Udenfriend S. Aromatic L-amino acid decarboxylase. J. Biol. Chem. 237:89-92, 1962.
- 73.- Mason S. & Gorcoran M. Forebrain noradrenaline and metrazol-induced seizures. Life Sci. 123:167-172, 1978.
- 74.- Marczyński T., Yamaguchi N., Ling G. & Godzinska. Sleep induced by administration of melatonin to the hypothalamus in unrestrained cats. Experientia 20, 435-437, 1964.
- 75.- Martin J.V., Salin-Pascual R.J., Tamarkin L. & Mendelson W. Pinealectomy increases REM sleep during the early light phase of the diurnal cycle of the rats. In Soc. Neuroscience Abstracts, Texas II:1282, 1985.
- 76.- Martinet L. & Zuker I. Role of pineal gland in circadian organization of diurnal ground squirrels. Physiol. Behav. 34:799-803, 1985.
- 77.- McNulty J.A. Functional morphology of the pineal complex in the cyclostomes, elasmobranchs and bony fishes. In Pineal Res. Rev. 2:1-40, 1984.

- 78.- Menaker M. & Zimmerman N. Role of the pineal in the circadian system of birds. *Am. J. Zool.* 16:45-55, 1976.
- 79.- Mendelson J.H. Biological concomitants of alcoholism. *New England J. Med.* 283:24-32, 1970.
- 80.- Moore, R.Y. & Klain D.C. Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Brain Res.* 71:17-33, 1974.
- 81.- Moore R.Y. The innervation of the pineal gland. *Prog. Reprod. Biol.* 4:1-29, 1978.
- 82.- Mouret J., Coindet J. & Chouvet G. Effect de la pinéalectomie sur les états et rythmes de sommeil du rat male. *Brain Res.* 87:97-105, 1974.
- 83.- Naber D., Wirz-Justice A. & Kafka M. Circadian rhythm in the rat brain opiate receptor. *Neurosci Lett.* 21:45-50, 1981.
- 84.- Nir I., Behrooz K., Assad M., Ivriani I. & Sulman F. Changes in electrical activity of the brain following pinealectomy. *Neuroendocrinol.* 4:122-127, 1969.
- 85.- Pang S., Ralph C. & Petrozza J. Effects of melatonin administration and pinealectomy on the electroencephalogram of the chicken (Gallus domesticus). *Life Sci.* 18:961-966, 1976.
- 86.- Pang S. Melatonin concentrations in blood and pineal gland. *Pineal Res. Rev.* 3:115-159, 1985.
- 87.- Patrikson J.W. & Smith E.S. Innervation of the pineal gland in the rat: an HRP study. *Exp. Neurol.* 95:207-215, 1987.
- 88.- Pavel S., Goldstein R., Petrescu M. & Popa M. Melatonin, vasotocin and REM sleep in prepuberal boys. In: *Melatonin: Current status and perspectives* 343-347, 1981.

- 89.- Pelham R. A serum melatonin rhythm in chickens and its abolition by pinealectomy. *Endocrinology* 96:543-546, 1975.
- 90.- Pellegrino de Iraldi A. & Zienher L. Noradrenaline and dopamine content of normal, decentralized and denervated pineal gland of the rat. *Life Sci.* 5:149-154, 1966.
- 91.- Phillips J.A. & Harlow H. Long-term effects of pinealectomy on the annual cycle of golden-mantled ground squirrels, Spermophilus Lateralis. *J. Comp. Physiol.* 146:501-505, 1982.
- 92.- Philo R. & Reiter R.J. Characterization of pinealectomy induced convulsions in the mongolian gerbil (Meriones unguiculatus) *Epilepsia* 19:485-492, 1978.
- 93.- Philo R. & Reiter R.J. Brain amines and convulsions in four strains of parathyroidectomized, pinealectomized rat. *Epilepsia* 19:133-137, 1978.
- 94.- Quag W.B. Experimental evidence for pineal participation in homeostasis of brain composition. *Prog. Brain Res.* 19:646-653, 1965.
- 95.- Quag W.B. Pineal and Biorhythms. *Pineal Res. Rev.* 4:183-197, 1986.
- 96.- Racine R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation II: motor seizure. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 32:281-294, 1972.
- 97.- Ralph C.H. Pineal bodies and thermoregulation. In *The Pineal Gland*, 193-219, Reiter R.J. ed., 1984.
- 98.- Reid L., Konecka A., Przelocki R., Millan M.H., Millan M.J. & Herz A. Endogenous opioids, circadian rhythms, nutrient deprivation, eating and drinking. *Life Sci.* 31:1829-1832, 1982.

- 99.- Redman J., Arstrang S. & Ng K. Free running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science* 219:1089-1091, 1983.
- 100.- Reiter R.J., Blum K., Wallace J. & Merritt J. Pineal gland: Evidence for an influence on ethanol preference in the male syrian hamster. *Comp. Biochem. Physiol.* 47 A:11-16, 1974.
- 101.- Reiter R.J. & Morgan W.W. Attempts to characterize the convulsive response of parathyroidectomized rats to pineal gland removal. *Physiol. Behav.* 9:203-208, 1973.
- 102.- Reiter R.J., Blask D., Taibot J. & Barnett M. Nature and time course of seizures associated with surgical removal of the pineal gland of parathyroidectomized rats. *Exp. Neurol.* 38:386-387, 1973.
- 103.- Reiter R.J. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocrin. Rev.* 1:109-131, 1980.
- 104.- Reiter R.J. The mammalian pineal: Structure and function. *Amer. J. Anat.* 162:287-313, 1981.
- 105.- Reiss M., Davis R., Sideman M. & Plichta E. Pineal gland and spontaneous activity of rats. *J. Endocrin.* 28:127-128, 1963.
- 106.- Relkin R. Effects of pinealectomy constant light and darkness in GH levels in the pituitary gland and plasma of the rat. *J. Endocrinol.* 53:289-293, 1972.
- 107.- Reppert S.M. y Klain D.C. Mammalian pineal gland: Basic and clinical aspects. In: *The endocrine functions of the brain* 327-371, Motta M. ed., 1980.

- 108.- Reyes-Vázquez C. & Dafny N. Interaction of norepinephrine and superior cervical ganglion in put in the rat pineal body. *Exp. Neurol.* 90:223-231, 1985.
- 109.- Rivest R. & Wurtman R. Relationship between light intensity and the melatonin on drinking rhythms of rats. *Neuroendocrinology* 37:155-160, 1983.
- 110.- Romijn H.J. The pineal, a tranquilizing organ?. *Life Sci.* 23:2257-2274, 1978.
- 111.- Roldán E., Antón-Tay F. & Escobar A. Estudios on the pineal gland IV: The effect of pineal extract on the electroencephalogram. *Boln. Ins. Estud. Med. Biol. Mex.* 22:145-156, 1964.
- 112.- Roldán E. & Antón-Tay F. EEG and convulsive threshold changes produced by pineal extract administration. *Brain Res* 11:238-245, 1968.
- 113.- Rodeen K. & Symmers S. Pineal gland and melatonin influence on chronic alcohol consumption by hamsters. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 14:143-147, 1980.
- 114.- Saavedra J.M., Brownstein M. y Axelrod J. A specific and sensitive enzymatic isotopic microassay for serotonin in tissues. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 186:508-515, 1973.
- 115.- Sackman J., Little J., Ruden P., Warging P. & Reiter R.J. The effects of pineal indoles given late in the light period on reproductive organs and pituitary prolactin levels in the male golden hamsters. *Horm. Res.* 8:84-92, 1980.
- 116.- Satake N. Effect of melatonin and methionine-enkephalin in surfacing responses in gold fish. *Physiol. Behav.* 23:995-999, 1979.

- 117.- Schreiber R. & Schlesinger K. Circadian rhythms and seizure susceptibility: Relation to brain serotonin and norepinephrine in mice. *Physiol. Behav.* 6:635-640, 1971.
- 118.- Schreiber R. & Schlesinger K. Circadian rhythms and seizure susceptibility: Effects of manipulations of light cycles on susceptibility to audiogenic seizures and on levels of 5-hydroxytryptamine and norepinephrine in brain. *Physiol. Behav.* 8:699-703, 1972.
- 119.- Segal B., Kushnarer V. & Urakov J. Alcoholism and disruptions of activity of deep cerebral structures. *Quart. J. Stud. Alcohol* 31:587-591, 1970.
- 120.- Siegel S. *Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta.* Trillas, Mex. 346 pp., 1980.
- 121.- Sisk C. & Turek F. Daily melatonin injections mimic the short day-induced increase in negative feedback effects of testosterone and gonadotropin secretion in hamsters. *Biol. Reprod.* 27:602-608, 1982.
- 122.- Smythe G.A. & Lazarus L. Growth hormone responses to melatonin in man. *Science* 184:1373-1374, 1974.
- 123.- Stockmeier C.A. & Blask D.E. Effects of grouping and isolation on pinealectomy induced seizures in rats. *Physiol. Behav.* 30:651-652, 1983.
- 124.- Sudgen D., Morris R. Changes in regional brain levels of tryptophan, 5-hydroxytryptamine, 5-hydroxyindolacetic acid, dopamine and noradrenaline after pinealectomy in the rat. *J. Neurochem.* 32:1593-1595, 1979.
- 125.- Tamarkin L., Westrom W., Hamill A. & Goldman B.D. Effect of the melatonin on the reproductive systems in male and female syrian hamster: A diurnal rhythm in sensitivity to melatonin. *Endocrinology* 99:1534-1541, 1976.

- 126.- Tamarkin L., Curtis J.B. & Almeida O.F. Melatonin: A coordinating signal for mammalian reproduction? *Science* 227:714-720, 1985.
- 127.- Underwood H. Circadian organization in lizards: The role of pineal organ. *Science*, 195:587-589, 1977.
- 128.- Underwood H. Vertebrate circadian rhythms: retinal and extra retinal fotoreception. *Experientia* 38:1013-1021, 1982.
- 129.- Underwood H. The pineal and circadian rhythms. In: *The Pineal Gland* 221-251, Reiter R.J. ed., 1984.
- 130.- Vaughan M.K. Pineal peptides: An overview. In: *The Pineal Gland* 39-83, Reiter R.J. ed., 1984.
- 131.- Vaughan M.K., Spanel-Bronawski K., Karasek M., Champney T. & Reiter R.J. Actions of subcutaneous implants or injections of melatonin on reproductive and metabolic variables and pineal concretions in male gerbils. *Biomed. Res.* 4:329-336, 1983.
- 132.- Victor M. The alcohol withdrawal syndrome. *Postgrad. Med.* 47:68-72, 1970.
- 133.- Victor M. & Brawsch J. The role of alcohol abstinence in the genesis of alcoholic epilepsy. *Epilepsia* 8:1-6, 1967.
- 134.- Vriend J. The pineal and melatonin in the regulation of pituitary-thyroid axis. *Life Sci.* 29:1929-1936, 1981.
- 135.- Vriend J. Evidence for pineal gland modulation of the neuro-endocrine thyroid axis. *Neuroendocrinology* 36:68-78, 1983.
- 136.- Vriend J. Pineal-thyroid interactions. *Pineal Res. Rev.* 1:183-206, 1983.



- 137.- Walker R., McCarmant S. & Timiras P. Melatonin and the influence of the pineal gland on timing of LH surge in rats. *Neuroendocrinology* 35:37-42, 1982.
- 138.- Webb S., Lewinski A., Reiter R.J. Somatostatin: Its possible relevance to pineal function. *Pineal Res. Rev.* 3:215-237, 1985.
- 139.- Welsh M. Pineal calcification: Structural and functional aspects. *Pineal Res. Rev.* 3:41-69, 1985.
- 140.- Wun W., Jackson F., Preslock J. & Berkowitz A. Effect of melatonin in vivo upon FSH and LH release from hamster pituitary glands. *Mol. Cel. Endocrinol.* 46:227-234, 1986.
- 141.- Weichselbaum R., Patel M. & DasGupta T. *Nature* 244, 230-231, 1973.
- 142.- Wurtman R.J., Axelrod J. & Kelly D.F. *The Pineal*. Academic Press, N.Y. 1-58, 1968.
- 143.- Wurtman R.J. The pineal as a neuroendocrine transducer. In: *Neuroendocrinology* 102, Krieger D. and Hughes J. eds., 1980.
- 144.- Yokoi I., Yamamoto M., Fujikawa N., Shirasu A. & Mori A. Determination of neurotransmitter release into the caudate nucleus during convulsions induced by pentylenetetrazole using in vivo diferential pulse voltametry. *Brain Res.* 385: 212-218, 1986.
- 145.- Zisapel N. & Laudon M. Characterization of central melatonin receptors using  $^{125}\text{I}$ - melatonin. *F B E S* 197:9-12, 1986.

146.- Zrenner C. Theories of pineal function from classical antiquity to 1900: A History. Pineal Res. Rev. 3:1-40, 1985.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA