

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE MEDICINA

MODULACION DEL COMPLEJO RECEPTOR GABA-BNZ EN LA CORTEZA  
CEREBRAL DE LA RATA POR LA GLANDULA PINEAL: ESTUDIO DEL RECEPTOR  
DE BNZ.

M<sup>a</sup> Dolores Gomar Aragón

Tesis presentada para optar al grado de  
Doctor por la Universidad de Granada  
Granada, Marzo de 1992



UNIVERSIDAD DE GRANADA

COMISION DE DOCTORADO

Curso de 19 91 a 1992.....

Referencia 250.....

ACTA DE GRADO DE DOCTOR

DOCTORANDO D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> DOLORES GOMAR ARAGON .....  
LICENCIADO EN MEDICINA Y CIRUGIA ..... por la Universidad de GRANADA .....  
PRCGRAMA DE DOCTORADO BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR .....

DEPARTAMENTO RESPONSABLE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR .....  
TITULO DE LA TESIS "MODULACION DEL COMPLEJO RECEPTOR GABA-BNZ EN LA CORTEZA .....  
CEREBRAL DE LA RATA POR LA GLANDULA PINEAL: ESTUDIO DEL RECEPTOR DE BNZ .....

DIRECTOR/ES DR. D. DARIO ACUÑA CASTROVIEJO

TUTOR DR. D. DARIO ACUÑA CASTROVIEJO

TRIBUNAL

PRESIDENTE Jose Antonio Gomez Capilla

VOCALES Fco Vives Montero

Juan M Guerrero Montavez

Carmen Osuna Fernández

SECRETARIO Jose Manuel Baeyens Cabrera

Reunido el día de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D.<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Dolores Gomar Aragón ..... éste procede al acto de mantenimiento y defensa de la Tesis Doctoral

Terminado dicho acto y contestadas las objeciones formuladas por el Tribunal, éste le calificó de Apto "cum laude"

EL PRESIDENTE,

Fdo.: J.A. Gomez Capilla

EL VOCAL,

F. Vives

Fdo.: Francisco Vives Montero

30 JUN 1992  
EL VOCAL,  
C. Osuna

Fdo.: Carmen Osuna Fernández

Granada

29 de mayo de 1992

El Secretario del Tribunal.

José M. Baeyens

EL VOCAL,

Juan Miguel Guerrero Montavez

Fdo.: Juan Miguel Guerrero Montavez

D. Dario Acuña Castroviejo, Profesor Titular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

CERTIFICA: Que Dña. M<sup>a</sup> Dolores Gomar Aragón, Licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo mi dirección el presente trabajo de investigación, objeto de su Tesis Doctoral, sobre el tema: ***"Modulación del Complejo Receptor GABA-BNZ en la Corteza Cerebral de la Rata por la Glándula Pineal: Estudio del Receptor de BNZ"***, que ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo sido leída y revisada la presente y estando conforme con su presentación para ser juzgada.

*D. Acuña*

Granada, Marzo de 1992.

## SUBVENCIONES

El presente Trabajo de Investigación ha sido subvencionado por los siguientes organismos:

- 1.- Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica  
Proyecto: GC86-0168  
Director: Dario Acuña Castroviejo
- 2.- Hospital Universitario San Cecilio (Granada).  
Ayuda concedida a través de la Comisión de Investigación del Hospital Universitario.  
Director: Dario Acuña Castroviejo
- 3.- Consejería de Educación y Ciencia (Junta de Andalucía)  
Grupo de Investigación: 3002  
Responsable: Dario Acuña Castroviejo.

#### PUBLICACIONES REALIZADAS (Del presente Trabajo de Investigación)

- 1.- Gomar, M.D.; Fernández, B.; Del Aguila, C.M.; Ferrón, F.; Acuña, D.: The pituitary-adrenal axis as modulator of benzodiazepine (BNZ) receptors in rat cerebral cortex. *J. Endocrinol. Invest.*, 12: 121, 1989.
- 2.- Acuña, D.; Fernández, B.; Gomar, M.D.; Del Aguila, C.M.; Castillo, J.L.: Influence of the pituitary-adrenal axis on benzodiazepine receptor binding to rat cerebral cortex. *Neuroendocrinology*, 51: 97-103, 1990.
- 3.- Acuña, D.; Fernández, B.; Del Aguila, C.M.; Gomar, M.D.; Castillo, J.L.: La glándula pineal y los mecanismos de inhibición en el SNC. En: *Aspectos Morfofuncionales y Fisiopatológicos de la Glándula Pineal en el Niño*, 1992 (en prensa).

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento:

A mis padres, Niceto y María Dolores, a quienes debo todo.

A mi marido, que supo comprender el tiempo del que le privé.

A Carmen María y Jose Luis con los que he compartido muchas horas y en los que siempre he encontrado simpatía y afecto.

Al Dr. D. Darío Acuña Castroviejo, mi director, que me ha dedicado muchas horas de su valioso tiempo y cuya inteligencia y capacidad de trabajo siempre me han servido de ejemplo.

A los compañeros del Departamento que en cualquier momento me han aconsejado, ayudado ó simplemente sonreído. Ellos han hecho mas agradable el trabajo.

A todos aquellos que directa ó indirectamente han hecho posible la realización de esta Tesis.

A mis padres

A mi marido

---

**INDICE**

---

## I- GLANDULA PINEAL Y ACTIVIDAD DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

<b>A.- RECUERDO ANATOMO-FISIOLOGICO DE LA G. PINEAL</b> .....	1
1.-Anatomía .....	1
2.-Síntesis de Indoles .....	2
3.-Regulación de la Actividad Pineal .....	3
4.-Funciones de la G. Pineal .....	6
a.-Control de la Reproducción .....	6
b.-Control de los Ritmos Biológicos .....	7
c.-Control de la Actividad del SNC .....	7
d.-Otras Funciones .....	7
<b>B.- G. PINEAL Y MODULACION DE LA ACTIVIDAD CEREBRAL</b> .....	8
1.-Pineal y Actividad Cerebral .....	8
a.-Efectos Metabólicos .....	8
b.-Efectos Conductuales .....	8
c.-Efectos Terapéuticos .....	9
2.-Las Convulsiones Inducidas por Pinelectomía .....	9
<b>II- MECANISMO DE ACCION DE LA aMT</b>	
<b>A.- PROPUESTAS PARA UN MECANISMO DE ACCION CENTRAL DE LA aMT</b> .....	12
<b>B.- ESTRUCTURA Y FUNCION DEL COMPLEJO RECEPTOR GABA-BNZ</b> .....	13
1.-EL GABA .....	13
a.-Bioquímica del GABA .....	13
b.-Organización Estructural de la Sinápsis GABAérgica .....	14
c.-El Complejo Receptor GABA-BNZ: EL Receptor GABA <sub>A</sub> .....	15
2.-Las benzodiazepinas (BNZ) .....	17
a.-Mecanismos de Acción de las BNZ .....	17
b.-Tipos y Características de los Receptores de BNZ .....	18
c.-Función Moduladora Alostérica de las BNZ .....	18

	Página
<b>C.- LA G. PINEAL Y EL COMPLEJO RECEPTOR GABA-BNZ</b> .....	21
1.-El Sistema GABA-BNZ Pineal .....	21
2.-La G. Pineal y el Complejo GABA-BNZ en la Corteza Cerebral de la Rata .....	22
a.-La aMT y el Receptor GABA <sub>A</sub> del Córtex Cerebral de la Rata .....	22
<b>D.- G. PINEAL Y MECANISMOS IONICOS DE MEMBRANA</b> .....	25
1.-La Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPasa Cerebral .....	25
2.-G. Pineal, aMT y el Receptor de Alta Afinidad de la Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPasa Cerebral .....	25
3.-¿La aMT como modulador alostérico de la Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPasa Cerebral? .....	26
<b>E.- G. PINEAL Y PEPTIDOS HIPOFISARIOS</b> .....	27
1.-Introducción .....	27
2.-Acciones Centrales de ACTH y Péptidos Análogos .....	28
a.-ACTH y Convulsiones .....	28
b.-Hipofisectomía y Epilepsia .....	30
c.-Efecto de la G. Pineal sobre los niveles de ACTH .....	31
3.-Síntesis y Liberación de Péptidos Opiáceos .....	32
a.-Receptores Opiáceos .....	33
b.-Significado Fisiológico de los Péptidos Opiáceos .....	34
c.-Péptido Opiáceos en la Integración Neuroendocrina .....	35
d.-Péptidos Opiáceos y Analgesia .....	38
e.-Péptidos Opiáceos y G. Pineal .....	39
<b>F.- EL EJE PINEAL/H-H-SUPRARRENAL Y EL COMPLEJO RECEPTOR GABA-BNZ</b> .	40
<b>OBJETIVOS</b> .....	43

INDICE

**MATERIALES Y METODOS**

**Página**

**L- INSTRUMENTAL, REACTIVOS Y ANIMALES DE EXPERIMENTACION**

**A.- INSTRUMENTAL** ..... 45

**B.- REACTIVOS** ..... 45

    1.-Soluciones y Tampones Utilizados ..... 45

    2.-Líquido de Centelleo ..... 45

    3.-Drogas y Radioligando ..... 45

    4.-Determinación de Proteínas ..... 45

**C.- ANIMALES DE EXPERIMENTACION** ..... 46

**II- MANIPULACIONES EXPERIMENTALES**

**A.- PINEALECTOMIA** ..... 47

**B.- HIPOFISECTOMIA** ..... 47

**C.- EXTIRPACION DEL GANGLIO CERVICAL SUPERIOR** ..... 48

**D.- EXTIRPACION DE LAS GLANDULAS SUPRARRENALES** ..... 48

**E.- IMPLANTACION INTRACEREBROVENTRICULAR DE UNA CANULA** ..... 49

**F.- ADMINISTRACION DE DROGAS** ..... 49

III.-METODOS BIOQUIMICOS EMPLEADOS

Página

A.- PREPARACION DE MEMBRANAS ..... 50

B.- DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS ..... 50

C.- REALIZACION DEL ENSAYO DE UNION CON [<sup>3</sup>H]-FNZ ..... 51

    1.-Estudios de Saturación ..... 51

    2.-Estudios de Competición ..... 53

IV.-ANALISIS MATEMATICO

A.- ANALISIS DE LOS DATOS DE UNION DROGA-RECEPTOR ..... 54

    1.-Introducción ..... 54

    2.-Experimentos de Saturación ..... 54

    3.-Análisis de Scatchard ..... 55

    4.-Análisis de Hill ..... 57

    5.-Experimentos de Inhibición del Enlace ..... 58

B.- ANALISIS DE LOS DATOS DEL ESTUDIO DE RECEPTORES ..... 59

C.- ANALISIS ESTADISTICO ..... 61

RESULTADOS

I.- DE LAS MANIPULACIONES DE LOS EJES PINEAL-SUPRARRENAL E HIPOTALAMO-HIPOFISARIO-SUPRARRENAL SOBRE LA CINETICA DEL RECEPTOR CENTRAL DE ALTA AFINIDAD DE FNZ

A.-EFECTOS DE LA MANIPULACION PINEAL ..... 63

B.-EFECTOS DE LA MANIPULACION SUPRARRENAL ..... 66

INDICE

---

II- DE LA ADMINISTRACION INTRACEREBROVENTRICULAR Página  
DE  $\alpha$ MT Y PEPTIDOS HIPOFISARIOS SOBRE LA CINETICA  
DEL RECEPTOR CENTRAL DE ALTA AFINIDAD DE FNZ

A.-EFECTOS DE LA MANIPULACION PINEAL ..... 69

B.-EFECTOS DE LA MANIPULACION DEL EJE H-H-SUPRARRENAL ..... 71

C.-MODULACION DE LA ACCION DE LA  $\alpha$ MT POR LOS PEPTIDOS HIPOFISARIOS 73

DISCUSION

I-DE LAS POSIBLES VIAS DE ACCION DE LA  $\alpha$ MT ..... 77

II-DE LOS EFECTOS PERIFERICOS DE LA  $\alpha$ MT

A-LA G. PINEAL COMO MODULADORA DEL RECEPTOR CENTRAL DE BNZ ..... 79

B.-MEDIACION DEL EJE PINEAL-SUPRARRENAL ..... 82

III-SOBRE LOS EFECTOS CENTRALES DE LA  $\alpha$ MT

A.-DE LA MANIPULACION DE LA G. PINEAL ..... 86

B.-DE LA MANIPULACION DEL EJE H-H-SUPRARRENAL ..... 90

C.-DE LA MODULACION DE LA ACCION DE LA  $\alpha$ MT POR LOS NEUROPEPTIDOS . 92

CONCLUSIONES ..... 95

BIBLIOGRAFIA ..... 97

---

***ABREVIATURAS***

---

## ABREVIATURAS

---

ADx:	Adrenalectomía
ACTH:	Hormona Adrenocorticotropa ó Corticotropina
aMT:	Melatonina
$\beta$ -End:	$\beta$ -Endorfina
BNZ:	Benzodiazepinas
B/F:	Cociente del ligando unido frente al libre
B/T:	Cociente del ligando unido frente al total
$\beta$ -LPH:	$\beta$ -Lipotropina
Bmax:	nº máximo de sitios receptores
Ca <sup>++</sup> :	Calcio
Cl:	Cloro
CRF:	Factor liberador de Corticotropina
DT $\gamma$ E:	Des-Tyrosina-Gamma-Endorfina
ELISA:	Immunoensayo Enzimático
FNZ:	Flunitrazepan
GABA:	Ac. $\gamma$ -aminobutírico
GABA-T:	GABA-Aminotransferasa
GAD:	Glutamato Descarboxilasa
GCSx:	Gangliectomía
5-HIAA:	5-Hidroxiindolacético
HIOMT:	Hidroxi-indol-O-metil-transferasa
HPx:	Hipofisectomía
5-HTP:	5-Hidroxitriptófano
I:	Concentración de droga competidora no marcada
IC <sub>50</sub> :	Concentración que inhibe un 50% de los enlaces
K <sup>+</sup> :	Potasio
K <sub>D</sub> :	Constante de disociación (afinidad)
K <sub>i</sub> :	Constante de inhibición
L:	Concentración de radioligando libre
L <sub>T</sub> :	Concentración total de ligando
MAO:	Mono-amino-oxidasa
MSH:	Hormona Melanocitoestimulante
NAT:	N-acetil-transferasa
NM:	Neuromodulador
NT:	Neurotransmisor
POMC:	Pro-opio-melanocortina

**TESIS DOCTORAL**

---

Px: Pinealectomía  
R: Concentración de sitios de enlace libres  
R<sub>1</sub> y R<sub>L</sub>: Concentración de receptor unido a cada ligando  
SADx: Sham Adrenalectomía  
SGCSx: Sham Gangliectomía  
SHPx: Sham Hipofisectomía  
SNC: Sistema Nervioso Central  
SPx: Sham Pinealectomía  
Vmax: Velocidad máxima

---

**INTRODUCCION**

---

I.-GLANDULA PINEAL Y ACTIVIDAD DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

A.- RECUERDO ANATOMO-FISIOLOGICO DE LA GLANDULA PINEAL

1.-Anatomía: La glándula pineal es una pequeña estructura que emerge de la porción pósterosuperior del diencefalo y que se encuentra apoyada sobre la lámina cuadrigémina. Está rodeada de una rica red vasculo-nerviosa y fuertemente adherida a las meninges, formando parte de los órganos circunventriculares. Está situada en la depresión existente entre los tubérculos cuadrigéminos anteriores, unida al cerebro por medio de un pedúnculo que se divide en una cintilla inferior, que comprende la comisura posterior y una cintilla superior que incorpora la comisura habenuar. La mayor parte de la glándula está cubierta por los plexos coroideos. El tercer ventrículo penetra en la glándula formando el denominado receso pineal (Vollrath, 1979).

En la pineal, se encuentran dos tipos de fibras nerviosas: aferentes, las propiamente cerebrales, de procedencia aparentemente comisural (fibras comisurales) y las vegetativas (simpáticas y parasimpáticas). Se han descrito también fibras de carácter eferente, cuyo origen estaría en las neuronas del ganglio intrapineal (Kappers, 1960).

La inervación simpática la proporciona la vía retino-hipotalámico-epifisaria, que es el eje sobre el que se organiza desde el punto de vista neural la relación de la glándula pineal con el propio

organismo y con el exterior (Figura 1). Está constituida en su parte inicial por un tracto de fibras amielínicas que se originan en la capa ganglionar de la retina. Realiza su primera sinápsis en el núcleo supraquiasmático, de donde se proyecta un haz de fibras que conecta con el área periventricular de la región tuberal ventral del hipotálamo (Swanson y cols., 1975). Las neuronas de este área conectan con las del núcleo hipotalámico lateral; éste a su vez proyecta fibras que hacen sinápsis con el asta intermedio-lateral de la médula cervical, de cuyas neuronas parten fibras hacia el ganglio simpático cervical superior. La mayoría de la fibras postganglionares de este ganglio, se dirigen a la glándula pineal directamente, constituyendo el nervio coronario, y el resto lo hace a través de los vasos de la pía que la irrigan (Kappers, 1960).

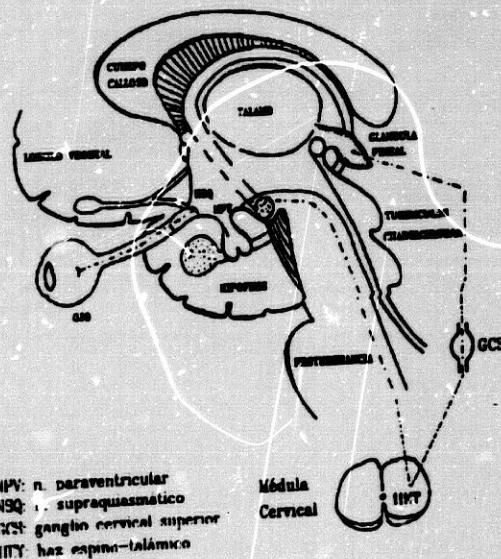


Figura 1: Vía retino-hipotalámico-epifisaria.

Las llamadas fibras centrales o intercomisurales, proceden de puntos no conocidos del sistema nervioso central y penetran en la glándula a través de las comisuras habenular y caudal.

La célula principal de la glándula pineal es el pinealocito, que representa el 82% del total glandular, rodeado de elementos gliales. Presenta una forma característica con una o varias prolongaciones que se originan en el cuerpo celular, terminando en el espacio perivascular y ocasionalmente entre los pinealocitos (Wolfe, 1965).

Se distinguen dos tipos de pinealocitos (Pevet, 1947):

- 1).- Pinealocito claro o tipo I: con vesículas granulares que probablemente son la representación morfológica del producto de secreción de la glándula. Presenta las características propias de cualquier célula.
- 2).- Pinealocito oscuro o tipo II: no posee gránulos, pero presenta también algún material de secreción.

Además del pinealocito y de las células gliales, en la pineal aparecen también células nerviosas, ependimocitos y un número indeterminado de linfocitos, plasmocitos, mastocitos, melanóforos, fibroblastos y fibrocitos.

**2.- Síntesis de Indoles** : Hoy se reconoce que la bioquímica moderna de la glándula pineal tuvo su origen tras el aislamiento de la N-acetil-5-metoxi-triptamina por Lerner y cols., (1958, 1960). Posteriormente se encontró que la pineal contenía los enzimas necesarios para la síntesis de melatonina a partir de la serotonina (Axelrod y cols., 1960), y poco después se estableció que

el ciclo luz-oscuridad era un importante factor que determinaba la actividad bioquímica de la pineal (Quay, 1964).

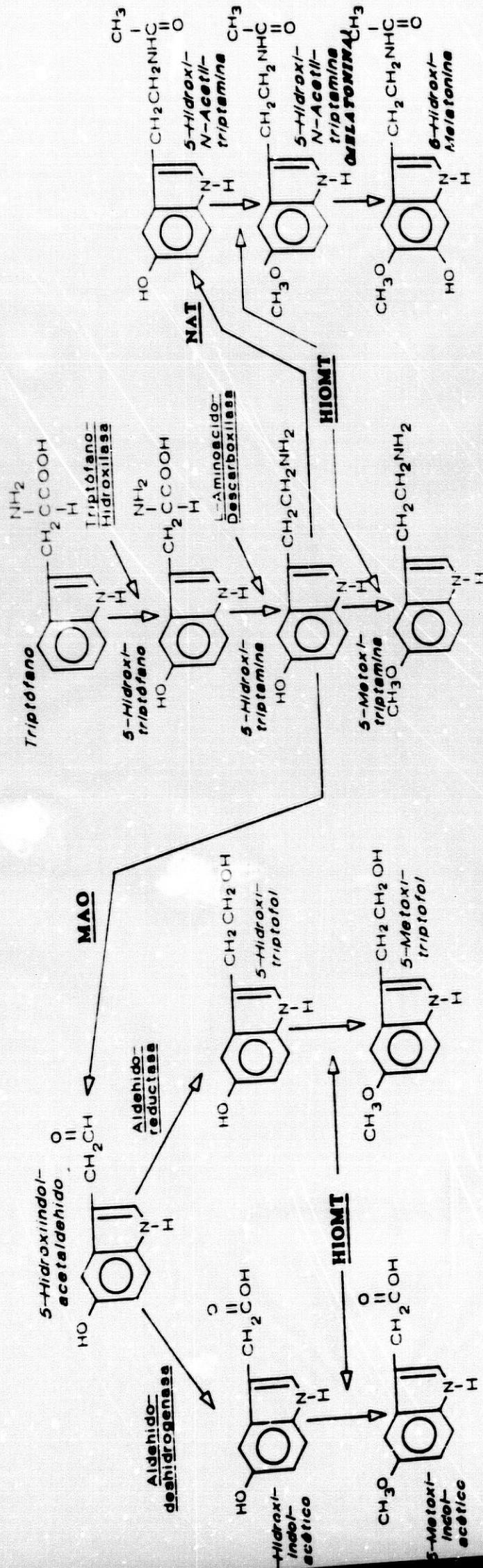
La síntesis de melatonina se realiza a partir del triptófano (*Figura 2*). La capacidad de la pineal para producir metoxiindoles es debida, al menos parcialmente, a los altos niveles de triptófano-hidroxilasa dentro de la glándula. Después de la captación del aminoácido por el pinealocito, el enzima hidroxilante lo convierte en 5-hidroxi-triptófano. Tras este paso, el 5-hidroxi-triptófano es descarboxilado por la L-aromático-aminoácido-descarboxilasa, enzima que está ampliamente distribuida en el organismo. Esta reacción da como resultado la formación de serotonina; el contenido de esta amina es mayor en la glándula pineal que en ningún otro órgano del cuerpo.

La serotonina es el precursor común de numerosos indoles formados dentro de la glándula pineal. En una segunda etapa la serotonina es convertida en melatonina. En primer lugar la serotonina es acetilada por el enzima N-acetil-transferasa (NAT), el producto de esta reacción es la N-acetil-serotonina. Este paso requiere un grupo acetilo proporcionado por el acetyl-CoA. La síntesis de melatonina a partir de la N-acetil-serotonina está catalizada por el enzima hidroxindol-O-metil-transferasa (HIOMT). Durante esta conversión la S-adenosil-metionina proporciona el grupo metilo.

La serotonina sintetizada por la epífisis sirve como sustrato para la formación de otros indoles pineales. Así la mono-amino-oxidasa (MAO) convierte a la serotonina en 5-hidroxi-indol-acetaldehído, un intermediario inestable que o

FIGURA 2

Vías metabólicas en la glándula pineal



bién es oxidado a 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) o reducido a 5-hidroxi-triptofol. Por acción de la HIOMT el 5-HIAA es convertido en 5-metoxi-indolacético, mientras que el 5-hidroxi-triptofol se transforma en 5-metoxi-triptofol (Cardinali, 1981). Este último indol muestra un ritmo en sus niveles tanto en la glándula pineal como en el plasma de la rata semejante al que ha sido descrito para la melatonina, y por ello se le ha considerado como un producto hormonal pineal importante (Ebadi, 1984).

Además de los indoles, en la pineal están presentes otra serie de productos de gran importancia funcional, como es el caso de los péptidos pineales que para muchos autores serían los responsables directos de muchos de los efectos hormonales de la pineal; entre estos péptidos cabe destacar la arginina-vasotocina, un nonapéptido que se ha mostrado que posee un efecto inhibitorio sobre el sistema reproductor (inhibiendo principalmente a la secreción hipotalámica de LH) ejercido a través de su influencia sobre el eje hipotálamo-hipofisario (Pavel, 1978).

**3.-Regulación de la actividad pineal:** La conversión de serotonina en melatonina está bajo el control del ciclo luz-oscuridad al cual los animales están expuestos tanto en condiciones naturales como en el laboratorio (Figura 3). De forma característica los períodos de luz se asocian con altos niveles pineales de serotonina y baja actividad de NAT. Por el contrario, durante el período diario de oscuridad disminuye la cantidad de serotonina probablemente por que es convertida en N-acetil-serotonina por la alta actividad de la enzima acetiladora. La magnitud de este cambio día-noche en la actividad de la NAT varía entre

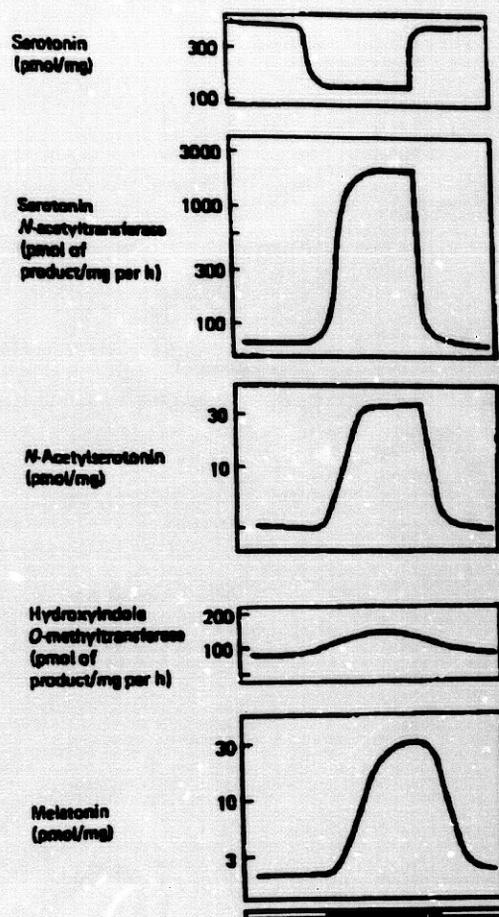


Figura 3: Ritmos circadianos de algunos compuestos pineales.

las distintas especies; sin embargo, uniformemente la oscuridad se asocia con una elevación en la actividad de esta enzima. Como consecuencia de la actividad incrementada de la NAT durante la noche los niveles pineales de N-acetil-serotonina están también aumentados. Debido a la amplitud del ritmo que muestra el enzima acetilador a través del ciclo de 24 horas, se ha propuesto que la NAT sea el enzima limitante en la producción de melatonina (Klein y cols., 1973).

La estimulación de la pineal durante la noche tiene como consecuencia un gran aumento de la concentración de melatonina dentro de la glándula. En las especies en las que se han

medido los niveles de melatonina, la oscuridad se asocia con grandes elevaciones de esta hormona pineal (Reiter y cols., 1971); siendo esta elevación independiente de si el animal es activo por la noche o durante el día (Reiter, 1981).

El camino por el que la luz llega a la pineal lo proporciona la inervación simpática que llega hasta la glándula, y que como se dijo anteriormente está constituida principalmente por el haz retino-hipotalámico-epifisario. El efecto que la luz y la oscuridad producen en la pineal se lleva a cabo a través de la noradrenalina de las terminaciones simpáticas. Este neurotransmisor actúa sobre los pinealocitos a través de los  $\beta$ -receptores ( $\beta_1$ ) de su membrana modificando su número y/o sensibilidad a lo largo del ciclo de 24 horas (Semm y cols., 1981) (*Figura 4*).

Como resultado de la interacción noradrenalina-receptor se va a producir un aumento brusco en la producción de AMPc debido al incremento en la actividad de la adenilciclase; esta elevación del AMPc media todos los efectos de la noradrenalina incluyendo el aumento de la actividad de la NAT, disminución de la serotonina y aumento de la N-acetil-serotonina y melatonina durante la noche; a su vez el AMPc determina una elevación de la NAT, a través de uno o varios de los siguientes mecanismos: incrementando el RNAm necesario para su síntesis y/o aumentando la síntesis de una proteína necesaria para que la NAT aumente su actividad (Cardinali y cols., 1985).

Durante el día la luz va a provocar que a nivel de las terminaciones simpáticas no se libere noradrenalina; por tanto, durante el día hay una caída en los niveles de AMPc y una inactivación

de la NAT, y como consecuencia se produce un descenso en la producción de melatonina.

El mecanismo por el cual la luz inhibe la liberación de noradrenalina en la glándula pineal parece ser el bloqueo de la información que sale del núcleo supraquiasmático hacia el ganglio cervical superior. Por la noche, al faltar la luz, se desinhibe esa salida del núcleo supraquiasmático, que pasa información al ganglio cervical superior, el cual a su vez estimula las fibras postganglionares simpáticas que terminan en el pinealocito, liberando noradrenalina.

Aparte de esta regulación ambiental, la pineal está bajo una regulación central dependiente de comunicaciones directas entre cerebro y pineal (Guerillot y cols., 1979; Ronneljiew y cols., 1980). Se piensa que el ácido glutámico y el GABA podrían jugar un papel importante en los citados mecanismos centrales (*Figura 4*).

Junto a estos dos tipos de regulación, la pineal está influenciada por múltiples productos hormonales. Parece claro que la pineal es una glándula en la que se desarrollan a la vez mecanismos de transducción neuroendocrina y endocrina-endocrina, así como endocrina-neural (*Figura 4*). Hasta hace poco el interés residía en conocer como influyen las gonadotropinas y los esteroides gonadales en el metabolismo pineal, poniendo de manifiesto todos estos estudios la existencia de un eje pineal-gonadal. Debido a eso hay mucha menos información disponible sobre otras posibles señales hormonales que afecten a la función pineal y viceversa, habiéndose descrito otros ejes endocrinos importantes, como el eje pineal-suprarrenal (Acuña y cols., 1982; Acuña y cols., 1984).

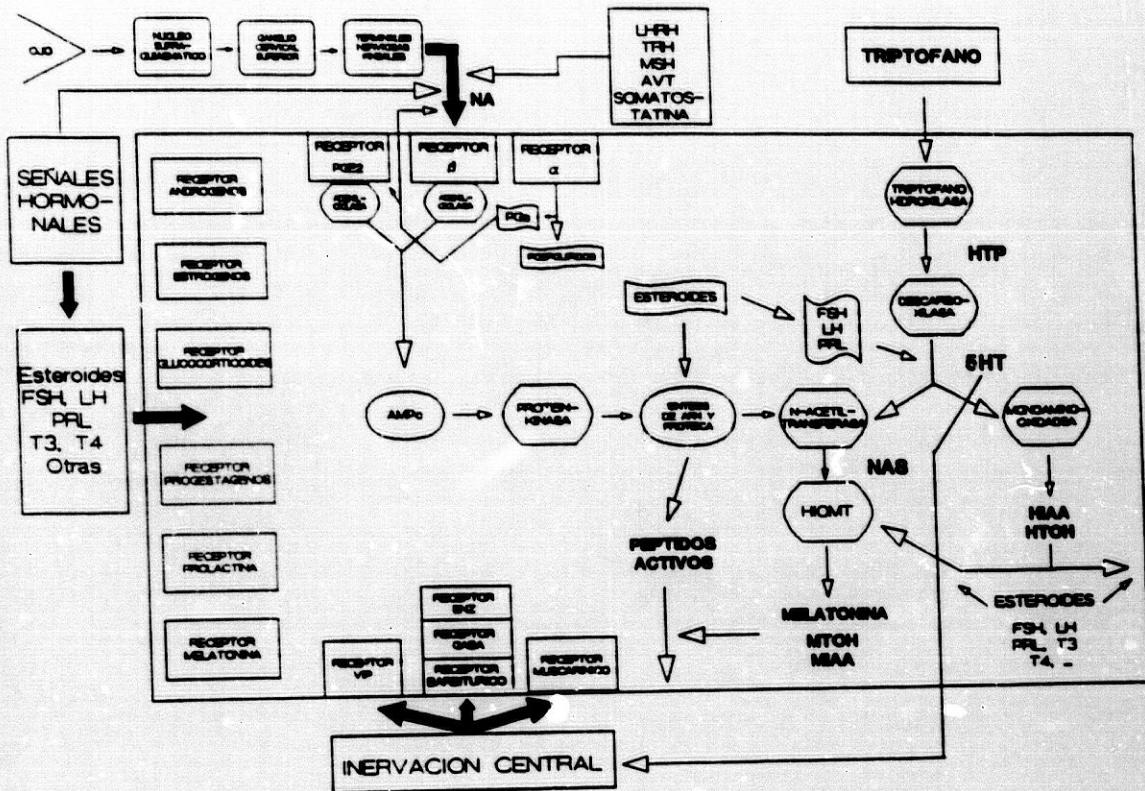


Figura 4: Mecanismos neurohumorales de regulación de la glándula pineal.

La mayoría de los estudios se han realizado sobre la actividad de dos enzimas importantes en el metabolismo de los indoles de la pineal como son la HIOMT y la NAT. Los estudios hechos midiendo la actividad de la NAT han sido desalentadores, pues se comprobó que si bien esta enzima era directamente dependiente del período de luz, apenas se modificaba en función de la fase del ciclo estrogénico (Weiss y cols., 1970). Respecto a la HIOMT, si bien el pico nocturno se modifica en distintos momentos del ciclo, la actividad media que presenta no varía demasiado. En mujeres hay que señalar que la melatonina sérica y urinaria se muestra como una función del ciclo reproductivo (Wetterberg y cols., 1976; Fernández y cols., 1988; Fernández y cols., 1990); y así, los niveles de melatonina sanguínea

aparecen bajos en los días anteriores a la ovulación y altos en la menstruación.

Se ha demostrado la existencia en el pinealocito de receptores para algunos esteroides y hormonas peptídicas como son: estradiol, testosterona, dihidrotestosterona, progesterona y prolactina (Cardinali y cols., 1987), a través de los cuales podrían llevar a cabo su control sobre la pineal. Una propiedad muy interesante del control ejercido por las hormonas reproductoras sobre la pineal es que podrían modificar la actividad neural de los nervios aferentes: teóricamente la hormona puede actuar a cualquier nivel de la vía neural, desde el núcleo supraquiasmático, pasando por el ganglio cervical superior, hasta la vía postganglionar simpática que llega hasta la pineal (Cardinali y cols., 1987). Otro

mecanismo para el control de la actividad pineal sería el producido por la reducción de una segunda hormona, por ejemplo la vasotocina (Cardinali y colbs., 1987).

De todos los esteroides gonadales, el más estudiado hasta ahora ha sido el estradiol, el cual actúa a nivel del metabolismo pineal modificando el contenido pineal de HIOMT y la liberación de melatonina. La integridad de la conexión simpática pineal es necesaria para mantener un adecuado nivel de receptores pineales para el estradiol: ello sería una indicación de la existencia en el sistema neuroendocrino de un receptor de hormona controlado por un neurotransmisor, a través de eventos iniciados por la interacción de moléculas transmisoras con los receptores beta-adrenérgicos (Cardinali y colbs. 1987).

El estradiol afecta a la actividad de la HIOMT pineal de tal manera que un descenso del estradiol provoca una estimulación de la misma y un aumento del estradiol provoca su inhibición (Nagle y colbs., 1972). Ello lo hace de forma directa, si bien, existen algunas evidencias que hacen pensar que estos efectos sean mediados por cambios en los niveles de FSH o LH, o bien a través de cambios en los impulsos nerviosos aferentes que llegan a la pineal (Cardinali y colbs., 1987). La actividad de la NAT parece insensible a los efectos del estradiol y del ciclo ovárico (Illnerova, 1975).

Se ha comprobado que la actividad metabólica de la pineal se modifica ante la administración de testosterona. Se piensa que el efecto de esta hormona sobre la pineal podría tener lugar a través de su paso a estradiol, lo cual es posible ya que existe en la pineal la vía metabólica por la

cual los andrógenos se transforman en estrógenos mediante aromatización (Cardinali y colbs., 1974). Independientemente de esta posibilidad, la testosterona tiene sus propios receptores en el pinealocito (Cardinali, y colbs., 1987).

En la pineal aparecen receptores específicos para la progesterona. La epífisis puede ser la única estructura neuroendocrina en la que la progesterona tendría la habilidad de producir cambios en su función en ausencia de la administración de estradiol, presentando un efecto predominantemente estimulante (Cardinali y colbs., 1974).

En cuanto a la prolactina, existen evidencias sobre la existencia de receptores de alta afinidad para esta hormona a nivel de la pineal, comprobándose además que la prolactina conduce a un incremento en la actividad HIOMT (Cardinali y colbs., 1976). La pineal controla a su vez la secreción hipotalámica de prolactina por un mecanismo doble, dependiente e independiente del núcleo supraquiasmático (Acuña y colbs., 1989).

**4.-Funciones de la glándula pineal:** Se puede decir que las secreciones de la pineal participan en múltiples mecanismos neurales y neuroendocrinos, entre ellos control de la función gonadal, adrenal y tiroides, del ciclo sueño-vigilia, y de varios ritmos biológicos.

*a.- Control de la reproducción:* El primer estudio relacionando la pineal y la melatonina con la reproducción fue el de Wurtman y colbs., (1961). Estos autores encuentran que la inyección de melatonina en ratas hembras podía suprimir el crecimiento y la actividad funcional del ovario. Junto a esto también se ha visto que la melatoni-

na es capaz de alterar la funcionalidad del testículo (Reiter y colbs., 1975) y alterar la secreción normal de gonadotrofinas (Martin y colbs., 1977; Moguilevsky y colbs., 1976).

Todas estas acciones que la pineal ejerce sobre los órganos y hormonas reproductores se traducen en dos efectos fundamentales:

- 1.- Juega un papel fundamental en el inicio de la pubertad. En efecto, se ha podido comprobar que el inicio de la pubertad viene marcado por un descenso en los niveles de melatonina que va paralelo al aumento de gonadotrofinas (Silman y colbs., 1979).
- 2.- Va a desarrollar una importante función en los animales con ciclo reproductivo anual (Reiter y colbs., 1981).

*b.-Control de los ritmos biológicos:* La pineal de los mamíferos carece de ritmicidad endógena, el reloj que conduce los ritmos pineales se sitúa en el núcleo supraquiasmático. La actividad bioquímica de la pineal está estrechamente ligada a la luz ambiental, ya que el fotoperiodo marca el ritmo de oscilación del reloj biológico (núcleo supraquiasmático) y este a su vez genera impulsos que llegan a la pineal.

Es en esta glándula en donde, por medio de la secreción de melatonina, se sincroniza el resto del sistema neuroendocrino (Wurtman y colbs., 1961), así como se regulan otras funciones superiores del sistema nervioso central.

Esta sincronización no se restringe al sistema reproductivo. En efecto, los productos secretorios de la pineal ajustan la totalidad de la fisiología del organismo según ritmos circadianos, circas-

tacionales y circanuales, asegurando que el animal esté fisiológicamente preparado para los diversos cambios ambientales que tienen lugar a lo largo del año (Reiter y colbs., 1987).

*c.-Control de la actividad del Sistema Nervioso Central:* La pineal parece controlar la actividad eléctrica cerebral; prueba de ello es que la pinelectomía da lugar a convulsiones y muerte en animales de experimentación, (Reiter y colbs., 1972) mientras que la administración de melatonina se ve seguida de sedación y somnolencia (Anton-Tay, 1971).

*d.-Otras funciones:* La pineal es capaz además, de controlar el funcionamiento de otras glándulas tales como tiroides (Nir y colbs., 1978), suprarrenales (Motta y colbs., 1971; Ogle y colbs., 1978; Acuña y colbs., 1982; Acuña y colbs., 1984) y páncreas (Bailey y colbs., 1974). Incluso va a ser responsable de controlar su propia función a través de sus productos de secreción que, como la melatonina, presentan receptores específicos en el pinealocito (Fiskie y colbs., 1968).

Otra función de la pineal, que empieza a reconocerse ahora como de gran importancia, es la relacionada con la regulación del sistema inmune por la melatonina, lo que se conoce como neuroinmunología. En este sentido, parece que la melatonina es capaz de estimular la actividad de las células NK del sistema inmune, así como estimular la capacidad de síntesis de anticuerpos por el linfocito T (Maestroni y colbs., 1989 b).

Asimismo, se ha reconocido la existencia de un eje pineal-sistema opioide, por medio del cual los péptidos opiáceos como la  $\beta$ -endorfina controlarían la función pineal (Gaffori y colbs., 1983;

Kumar, y colbs., 1984; Maestroni y colbs., 1989 a). A su vez, parecer ser que una de las vías por las que la melatonina ejerce sus efectos, como los que presenta sobre el sistema inmune, sería a través de los receptores opiáceos, por medio de la  $\beta$ -endorfina (Lissoni y colbs., 1985).

## B.- GLANDULA PINEAL Y MODULACION DE LA ACTIVIDAD CEREBRAL

1.- **Pineal y actividad cerebral:** Se sabe desde hace algún tiempo que la pineal controla el funcionamiento del Sistema Nervioso Central. Prueba de ello es que en animales sometidos a pinealectomía (Px) aparece una marcada tendencia a sufrir convulsiones (Reiter y colbs., 1973) y que la administración de melatonina en animales de experimentación y en el hombre da lugar a sedación e hipnosis (Anton-Tay y colbs., 1974).

Los primeros estudios que intentaron relacionar glándula pineal y cerebro se centraron en el estudio de los efectos que la Px tenía sobre el sistema nervioso central. Los distintos estudios mostraron que la Px daba lugar en muchos casos, a convulsión y muerte (Reiter y colbs., 1972). Además existen datos que indican que la Px altera la actividad eléctrica cerebral de conejos y ratas, y esto puede hacer a estos animales más sensibles a sufrir convulsiones (Bindoni y colbs., 1965).

Estudios posteriores mostraron que la administración de melatonina tanto en animales de experimentación como en el hombre, daba lugar a diversos efectos importantes sobre la

actividad del sistema nervioso central, como son:

**a.-Efectos metabólicos:** Entre los que cabe señalar un aumento en los niveles de GABA en hipotálamo (Anton-Tay, 1971), aumento de los niveles de serotonina en el cerebro de rata (Anton-Tay y colbs., 1968) y aumento de la actividad piridoxal fosfoquinasa cerebral (Anton-Tay y colbs., 1970). Estos tres efectos ocurren paralelamente, y es muy posible que el aumento observado tanto en los niveles de GABA como de serotonina sean un reflejo del aumento de la actividad piridoxal fosfoquinasa, ya que este enzima va dar lugar a la formación de fosfato de piridoxal que es un grupo prostético de la L-aminoácido-descarboxilasa y de la ácido glutámico descarboxilasa; enzimas que intervienen en la síntesis de serotonina y GABA respectivamente.

En trabajos recientes (Lissoni y colbs., 1985) se ha visto además, que la administración de melatonina da lugar a un descenso en los niveles de  $\beta$ -endorfinas, mientras que estas últimas son capaces de aumentar la síntesis del indol pineal, por lo que se puede pensar que muchos de los efectos de los opiáceos pueden estar mediados por la melatonina.

Todos estos datos dejan claro que la melatonina presenta un importante efecto inhibitorio sobre la actividad eléctrica cerebral.

**b.-Efectos conductuales:** Se ha comprobado que la administración de melatonina a animales de experimentación se traduce por la aparición de sueño y sedación (Mendelson y colbs., 1980; Satake, 1979), mientras que en el hombre aparece sedación, somnolencia y sensación de bienestar y confort (Anton-Tay y colbs., 1971; Papavasiliou y colbs., 1973). Se ha podido comprobar

que la melatonina no sólo ejerce estos efectos por sí misma, sino que además media los efectos sedantes de otros productos como la serotonina (Satake, 1979)

*c.-Efectos terapéuticos:* En los últimos años se han hecho múltiples estudios que han intentado relacionar la glándula pineal con distintos síndromes neurológicos y desórdenes afectivos. Los resultados por el momento son alentadores.

En este sentido, los estudios realizados en pacientes con enfermedad de Parkinson han puesto de manifiesto que la administración continua de melatonina a estos pacientes da lugar a un control del tremor y a somnolencia (Cotzias y colbs., 1971) así como a una mejora para la realización de sus actividades de la vida diaria (Anton-Tay y colbs., 1971).

Ciertos enfermos depresivos presentan un ritmo anormal de melatonina a lo largo de las 24 horas, con desaparición del pico nocturno del indol pineal (Menscewicz y colbs. 1979). Parece, por tanto, que la melatonina podría estar en relación con la patogenia de ciertos síndromes depresivos. Apoya esta idea la observación de que cuanto más bajos son los niveles de melatonina en suero y orina, mucho más pronunciados son los síntomas de estos pacientes (Almay y colbs., 1987).

Un gran número de psicotropos, como los antidepresivos y los neurolepticos, afectan tanto a la síntesis como al turnover de melatonina tanto "in vivo" como "in vitro". Y así, la administración de antidepresivos tricíclicos es capaz de adelantar la aparición del pico nocturno de melatonina (Moyer y colbs., 1979) y de aumentar la secreción diaria de este indol (Thompson y

colbs., 1983). Por estos motivos, se puede pensar que el efecto terapéutico que estos fármacos tienen en los pacientes depresivos puede ser llevado a cabo a través de la melatonina.

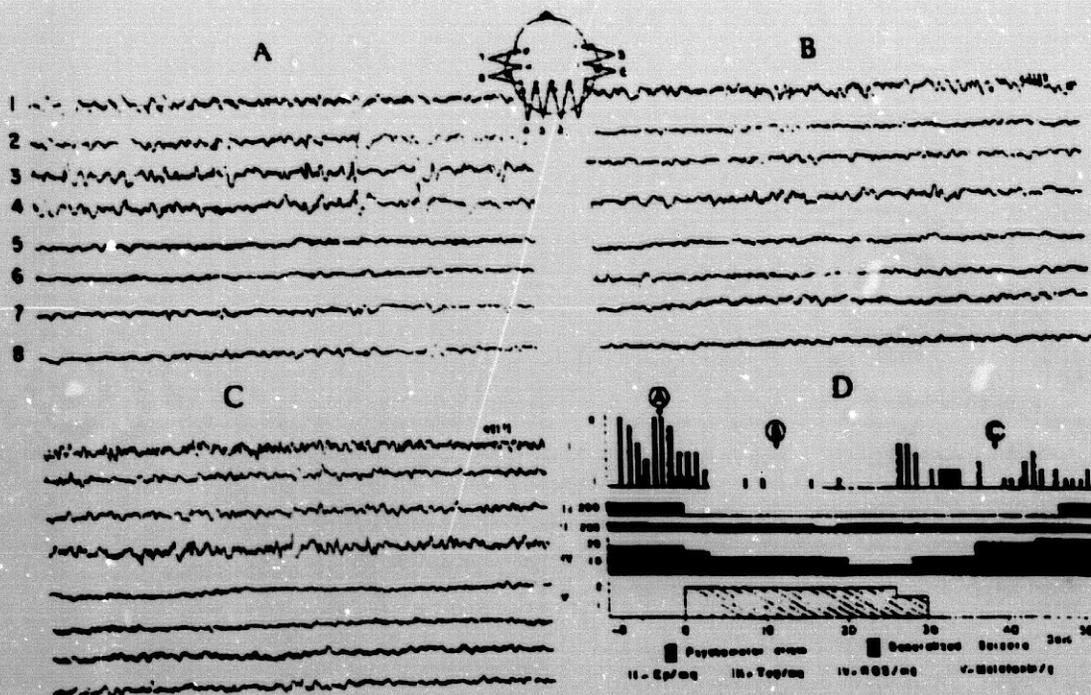
La administración a humanos de melatonina se traduce en la aparición de cambios electroencefalográficos (Anton-Tay, 1971), con un aumento en la magnitud del ritmo  $\alpha$ . Además, estos sujetos refieren sensación de bienestar y confort.

Otros autores (Brueske y colbs., 1980) cuantificaron la actividad eléctrica de niños con convulsiones, observando que durante la administración de aMT en infusión continua, esta actividad disminuía para aumentar de nuevo 30 minutos después de terminada la infusión.

De igual manera se comprueba que en pacientes epilépticos la administración de aMT se corresponde con un aplanamiento de su EEG y una disminución de la actividad eléctrica del lóbulo cerebral afectado (Anton-Tay, 1971) (Figura 5). Todos estos datos dejan claro que la aMT presenta un importante efecto inhibitor sobre la actividad eléctrica cerebral.

Se ha comprobado que la administración de aMT a animales de experimentación se traduce por la aparición de sueño y sedación (Mendelson y colbs., 1980; Satake, 1979), mientras que en el hombre aparece sedación, somnolencia y sensación de bienestar y confort (Anton-Tay, 1971; Papavasilov y colbs., 1972). Se ha podido comprobar que la aMT no sólo ejerce estos efectos por sí misma, sino que además media los efectos sedantes de otros productos como la serotonina (Satake, 1979).

**2.-Las convulsiones inducidas por la pinealectomía:** La asociación de la pineal con actividad



Effects of melatonin on the EEG and seizure activity of an epileptic patient. Illustrated EEG records were taken as follows: A, 4 days before the administration of melatonin; B, the 11th day of administration; and C, 9 days after withdrawal of the hormone. D shows the number of seizures per day (II): the dosage of diphenylhydantoinate: (III); carbamazepine: (III); PhS-4023 (IV); and melatonin (V). The patient was a chronic temporal lobe epileptic with intractable generalized seizures (3 to 8 per day). During his habitual treatment the EEG (A) showed a parietotemporal left focus of repetitive spikes. When melatonin was given (2 g daily) diphenylhydantoinate was discontinued and the dose of PhS-4023 reduced. During this period, the number of seizures decreased and the EEG showed diffuse theta activity and decrease of paroxysmal graphic elements. (B) After melatonin was discontinued, the number of seizures increased and the EEG recordings again showed a similar pattern of spiking to that before melatonin treatment.

Figura 5: Efectos de la administración de aMT en un paciente epiléptico.

convulsiva fué demostrada primeramente en 1938, cuando se observó que la extirpación de la glándula aumentaba la sensibilidad de los animales a convulsivantes como el benzoato sódico de cafeína, picrotoxin y cardiazol (Kitay y Altschule, 1954). Como se ha mencionado anteriormente, otros estudios mostraron que la Px daba lugar en muchos casos, a convulsión y muerte (Reiter y Morgan, 1972; Reiter y colbs., 1973). El mecanismo por el que la Px da lugar a estos efectos no está aún claro. Se ha visto que los animales pinealectomizados presentan un aumento de la excitabilidad neuronal (Quay, 1965) ya que las ratas pinealectomizadas y sometidas a una dieta deficiente en sodio, tienen dificultades para mantener unos niveles adecuados del potasio

cerebral. Esto puede conducir a una disminución del potencial de membrana con la consiguiente caída del umbral de activación neural (Bindoni y Rizzo, 1965; Nir y colbs., 1969).

Se ha observado que la tiroparatiroidectomía realizada en ratas pinealectomizadas produce severas contracciones tónico-clónicas de la musculatura del tronco y extremidades, y causa la muerte a los animales en unas 12 horas (Reiter y colbs., 1972). La causa de la muerte se debe posiblemente a asfixia por espasmo laríngeo y de músculos torácicos. La pinealectomía sólo no produce ataques convulsivos como los descritos aquí. Esta condición no es restrictiva a ratas, ya que otros animales experimentan similares efectos tras ambas extirpaciones. Se produce una

Maria Dolores Gomar Aragón

caída de los niveles plasmáticos de calcio tras la paratiroidectomía, que no se afecta por la pinealectomía posterior. Esto sugiere que los espasmos no se deben a tetania por calcio bajo. Los niveles de potasio se elevan tras la pinealectomía independientemente del estado de las glándulas tiroparatiroides. Sin embargo, este aumento de potasio no explica tampoco un aumento de excitabilidad muscular y espasmo. Asimismo, los niveles de magnesio (cuya deficiencia puede también inducir episodios de tetania) no varían significativamente (Reiter y cols., 1972). Posiblemente, la falta de aMT pueda influir sobre los flujos neuronales iónicos, la excitabilidad neuromuscular o la transmisión sináptica a ciertos niveles.

Poco después de estos trabajos, se comprobó que el modelo convulsivo en la rata, de Px+paratiroidectomía producía cambios en las aminas cerebrales asociados a convulsiones (Herrera y cols., 1975). Debido a la complejidad de este modelo, se encontró otro, el gerbil (*Meriones unguiculatus*), que convulsiona poco después de la Px sólo, manifestando actividad epileptoide. En este modelo se ha demostrado que la depresión de noradrenalina tras la Px facilita las convulsiones, mientras que la serotonina es de menor importancia (Philo y Reiter, 1981). Además existen datos que indican que la Px altera la actividad eléctrica cerebral de conejos y ratas, y esto puede hacer a estos animales más sensibles a sufrir convulsiones (Bindoni y Rizzo, 1965).

Se sabe que la serotonina tiene un profundo efecto en la inducción de sueño en mamíferos y aves (Mantegazzini, 1966), efecto que es comparado por uno de sus productos metabólicos, la

aMT. Este efecto de la aMT sobre la sedación se explicó en base a que la aMT aumenta la concentración de serotonina (Cramer y cols., 1974). Esta hipótesis puede ser razonable, ya que la aMT inhibe la MAO, lo que a su vez disminuye la catabolización de la serotonina (Ellis, 1976). El aumento de la concentración cerebral de serotonina está regulada por la ingesta diaria y los aminoácidos plasmáticos neutros (Fernstrom y Wurtman, 1972). En el pez (*Carassius auratus*), la administración de un inhibidor de la síntesis de aMT, la escotofobina, interfiere con el efecto sedante de la serotonina. El efecto de la escotofobina no se debe a un efecto directo sobre la respuesta motora, y parece ser que la serotonina causa sedación debido al aumento de la síntesis de aMT que su administración conlleva (Satake, 1979).

Las drogas anticonvulsivantes, como las hidantoínas y barbitúricos, inhiben la aldehído reductasa cerebral, y se ha visto que el triptofol, un metabolito neutro de la serotonina, suprime las convulsiones inducidas por el 1,5-pentilentrazol, y que este efecto es inhibido por pretratamiento con inhibidores de la aldehído-reductasa cerebral (Sato y cols., 1979). Estos efectos sugieren que no sólo la serotonina, sino sus metabolitos están implicados en el control del umbral de las convulsiones.

Anticonvulsivantes como las BNZ aumentan los niveles cerebrales de serotonina y 5-HIAA (Chadwick y cols., 1978). El tratamiento con  $\mu$ -clorofenilalanina ( $\mu$ CpA), inhibidor de la triptófano hidroxilasa, no cambia la severidad de las convulsiones, lo que concuerda con el hecho de

que la deplección de serotonina cerebral por pCpA no altera el umbral para el componente clónico de la convulsión por pentilentetrazol (PTZ) en el ratón. En conclusión, la acción anticonvulsivante del triptofol es mediada directamente por su metabolito activo IAAld, y la alteración del metabolismo endógeno de serotonina tras el triptofol es un efecto secundario (Fukumori y colbs., 1980).

Se reconoce a la glándula pineal un papel importante en la regulación y estabilización de la actividad eléctrica del SNC, así como del sistema endocrino (Romijn, 1978). Extractos de pineal evocan desincronización generalizada en el EEG de gato (Roldán y Anton-Tay, 1968), y elevan el umbral cortical de la estimulación eléctrica cerebral. Otros estudios han demostrado que las ratas pinealectomizadas justo después del nacimiento tienen significativamente mayor actividad motora que los otros, lo que puede reducirse de una forma dosis-dependiente por extractos de

pineal (Albertson y colbs., 1981).

En las convulsiones inducidas por manipulaciones de la amígdala, la aMT significativamente reduce la duración de la postdescarga, siendo este efecto más significativo cuando las convulsiones epilépticas se deben a la administración de pentilentetrazol (Albertson y colbs., 1981).

Los estudios para determinar la distribución de la aMT tras su inyección intraventricular o intravenosa indican que los niveles más altos se alcanzan en las estructuras del mesencéfalo, hipotálamo, hipocampo y protuberancia-bulbo. El córtex tiene los niveles más bajos de aMT (Anton-Tay, 1971). Las limitaciones de la actividad anticonvulsivante de la aMT pueden entonces deberse a las limitaciones regionales así como a su afinidad de sus receptores. La naloxona, que revierte la catatonía inducida por ketamina y la analgesia inducida por aMT, es incapaz de revertir los efectos sedantes y anticonvulsivantes de ésta (Winters y Lakin, 1980).

## II-MECANISMO DE ACCION DE LA MELATONINA

### A- PROPUESTAS PARA UN MECANISMO DE ACCION CENTRAL DE LA aMT

Hoy se acepta que el GABA es el mayor neurotransmisor inhibitor del Sistema Nervioso Central (Olsen, 1982). Su acción la lleva a cabo a través de su receptor específico; ya que la unión del neurotransmisor al receptor origina un incremento en la conductancia del cloro en la

neurona. El complejo receptor GABA contiene además receptores asociados para benzodiazepinas (BNZ) y barbitúricos, que van a modular la respuesta del GABA, potenciándola (Harrison y Simmonds, 1983).

La principal función de dicho complejo receptor es mediar la conductancia al cloro a través de la membrana neuronal en respuesta a la liberación de GABA en las terminaciones

nerviosas. En ausencia de GABA los canales del cloro están cerrados; cuando hay GABA unido al receptor se abre el canal y el cloro pasa a su través a favor de un gradiente de concentración y dependiendo del potencial de membrana existente. El influjo de cloro condiciona la hiperpolarización de la membrana (aumenta el potencial de transmembrana) y el flujo la despolariza (disminuye el potencial de membrana). Estos cambios son la base de acción del GABA a través de su receptor (concretamente, a través del subtipo GABA<sub>A</sub>) (Olsen, 1982).

Por su lado, las benzodiazepinas se unen a un receptor específico en el complejo receptor GABA-BNZ, potenciando la unión del GABA y favoreciendo la inhibición postsináptica (Haefely, 1988). Debido a que los efectos de la administración de aMT, tanto en animales de experimentación como en humanos, se asemejan a los producidos por la administración de BNZ, se propuso a la aMT como ligando endógeno del receptor central de BNZ, aunque hoy en día se ha descartado. Por estos motivos, se ha propuesto que los efectos que la aMT y la glándula pineal tienen sobre el sistema nervioso central podrían estar mediados por el complejo receptor GABA-BNZ, potenciando su acción inhibitoria. Asimismo, no se descarta una acción de la aMT sobre la taurina, un aminoácido inhibitorio, que potencia al GABA, y cuya concentración en pineal y bulbo olfatorio es muy elevada.

Otro lugar de acción de la aMT sería sobre los mecanismos iónicos de membrana (bomba de sodio), alterando su potencial de reposo (hiperpolarizándola), para así ejercer sus efectos inhibidores centrales.

## B.- ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL COMPLEJO RECEPTOR GABA-BNZ.

1.-El GABA: El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es el aminoácido neurotransmisor mejor conocido. Su presencia en el SNC fue descubierta en 1950 (Mandel y cols., 1981), aunque su función como un factor inhibitorio se estableció unos años después por su acción inhibitoria postsináptica en neuronas corticales (Krnjevic y Schwartz, 1967).

*a.-Bioquímica del GABA:* El GABA se produce principalmente de la glucosa, aunque el piruvato y otros aminoácidos son también precursores. Su metabolismo está íntimamente ligado al del glutamato y la glutamina (Figura 6).

El GABA se origina a partir del ciclo de Krebs, donde el  $\alpha$ -cetoglutarato es transaminado a glutamato, el cual es descarboxilado por el enzima glutamato descarboxilasa (GAD) para producir GABA. Este a su vez es transaminado por la GABA aminotransferasa (GABA-T) a semialdehído succínico, que es rápidamente oxidado a ácido succínico por la SSA dehidrogenasa (SSADH), y vuelve al ciclo de Krebs. En la transaminación de GABA a SSAD, el  $\alpha$ -cetoglutarato es el aceptor del grupo amino produciendo glutamato, cerrando así el shunt del GABA y manteniendo el aporte de este precursor de GABA (De Robertis, 1985).

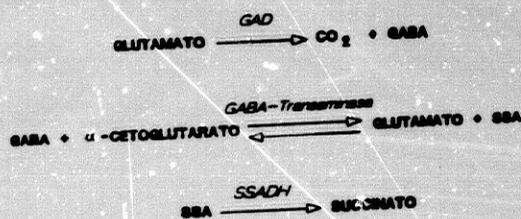


Figura 6: Metabolismo del GABA.

La concentración de GABA en la terminal nerviosa es de 50 a 150 mM, la mayor parte unida a las vesículas. El nivel extracelular de GABA (en LCR) es bajo, probablemente debido a la existencia de unos buenos sistemas de captación. El GABA en el LCR se conjuga en su mayor parte en forma de homocarnosina (Hamburger y cols., 1981).

**b.-Organización estructural de la sinápsis GABAérgica:** El GABA, sintetizado desde su precursor glutámico, y almacenado en las vesículas sinápticas, es liberado por un mecanismo calcio-dependiente en respuesta a los potenciales de acción que llegan a la terminal nerviosa. Una vez en la sinapsis, el GABA interacciona con los receptores en la membrana sináptica (del cuerpo celular, dendritas o axon) de la neurona. Estos receptores se clasifican farmacológicamente en dos tipos, GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> (Tabla I).

El receptor GABA<sub>A</sub> está directamente acoplado a (y realmente forma parte de él) un canal de cloro que está en su conformación cerrada, es decir, impermeable a los iones, en ausencia de GABA. Cuando el GABA se une a su sitio receptor en el complejo receptor-canal de cloro (probablemente es necesario que dos moléculas de GABA se unan a dos sitios separados), la conformación (la estructura tridimensional) del receptor del GABA y del canal de cloro se altera, dando lugar a la apertura de dicho canal. Los aniones Cl<sup>-</sup> pueden ahora atravesar el canal; la conductancia al cloro se eleva a través de la membrana. La dirección del flujo de los iones de cloro está determinada por el gradiente de concentración de cloro entre el espacio extracelular y el citoplasma, así como por el potencial

TABLA I  
Clasificación farmacológica de los receptores de GABA

Aspecto Farmacológico	Receptores GABA <sub>A</sub>	Receptores GABA <sub>B</sub>
Agonista común	GABA	GABA
Agonista selectivo	Muscimol	Baclofén
Antagonista selectivo	Bicucullina	Acido $\gamma$ -amino valérico
Efecto	Canal de Cl <sup>-</sup>	Canal de Ca <sup>2+</sup> ↓ Adenilato ciclasa↓ Canal de K <sup>+</sup> ↑
Modulación alostérica	Benzodiazepinas Barbitúricos Algunos convulsivantes	?

de membrana en ese momento.

Generalmente, la activación del receptor GABA<sub>A</sub> induce un influjo de iones Cl<sup>-</sup> al interior de la célula, quedando la negatividad dentro e hiperpolarizando la célula. El influjo de Cl<sup>-</sup> desplaza el potencial de membrana más allá del nivel crítico al cual puede generarse un potencial de acción, lo que hace a la célula menos sensible a las señales excitadoras despolarizantes que llegan a la sinapsis (Haefely, 1990). En algunas células, el potencial de equilibrio del cloro (el potencial al cual no hay flujo neto de cloro) es menos negativo que el potencial de membrana, forzando los iones cloro a dejar la célula durante la activación del receptor GABA<sub>A</sub>. Esto induce una ligera despolarización. Independientemente de esto, la conductancia de cloro inducida por el GABA, sea hiper o despolarizante, suprime la excitabilidad de membrana.

Un segundo tipo de receptores de GABA son los llamados GABA<sub>B</sub> (Tabla I). Este tipo de receptor de GABA no está acoplado a ningún

canal aniónico, sino a un canal de potasio (al cual activa), así como a un canal de calcio y de adenilato ciclasa, a los que inhibe. El receptor GABA<sub>B</sub> juega un papel menos importante en la mediación de los efectos del GABA y no está modulado por las benzodiazepinas (Haefely, 1990).

*c.-El complejo receptor GABA-BNZ: El receptor GABA<sub>A</sub>:* Los receptores de benzodiazepinas (BNZ) unen BNZ y otros ligandos con alta afinidad y especificidad, lo que puede estudiarse por medio de ligandos marcados radioactivamente. Los radioligandos permiten estudiar la afinidad de cada uno de ellos, así como el número de sitios de unión en una cantidad dada de tejido (Hantraye y cols., 1988). Los receptores de BNZ se colocan bastante exactamente junto a los receptores GABA<sub>A</sub> marcados con un agonista selectivo GABA<sub>A</sub>, como el muscimol. A su vez, los receptores de BNZ pueden unirse covalentemente a radioligandos específicos, como el <sup>3</sup>H-flunitrazepan, por medio de luz ultravioleta del inicialmente reversible complejo receptor-ligando. Este marcaje por fotoafinidad fué muy útil para la purificación de la molécula receptora. La proteína receptora, una vez purificada, se une a BNZ y a muscimol. Los análisis de este material revelan la presencia de al menos dos subunidades proteicas diferentes,  $\alpha$  y  $\beta$ , las cuales no están unidas covalentemente entre ellas, y que forman un complejo hetero-oligomérico (tetra o pentamérico) conteniendo sitios de unión para GABA y BNZ, y acopladas de tal forma que proporcionan un canal de cloro activable por el GABA. La presencia de dos sitios de unión diferentes en el mismo complejo fué arduamente sugerido al

principio por el hecho de que el GABA aumenta la unión de las BNZ y que las BNZ aumentan la unión del GABA. Esta interacción de dos sitios de unión diferentes en un complejo proteico se llama alostérica (Haefely, 1988).

Mediante técnicas de genética molecular (Schofield y cols., 1987) han demostrado que el complejo receptor-canal totalmente activo y funcionando contiene las subunidades  $\alpha$  (50 kD) y  $\beta$  (55 kD) en una estequiometría probable  $\alpha_2\beta_2$ . La estructura primaria muestra esas dos subunidades como proteínas de membrana, ancladas en la bicapa lipídica, pero con las cadenas acompañadas por cuatro prolongaciones peptídicas con una cadena larga N-terminal extracelular y una más pequeña citoplasmática. La estructura terciaria y cuaternaria del complejo recuerda a la de otro receptor-regulador de canales iónicos, como el nicotínico y el de glicina, que pertenecen a la superfamilia de receptores/canales.

Estudios de varios laboratorios han demostrado que la situación del complejo GABA<sub>A</sub> no es tan simple como parece. En primer lugar, se han encontrado varias subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que difieren ligeramente en su estructura primaria en el cerebro de vaca, rata y humano. En segundo lugar, la expresión de varias de esas subunidades proporcionan resultados discrepantes en relación a la conductancia del canal, cinética de la activación de GABA y modulación alostérica por los ligandos de BNZ. Parece que la población de receptores de GABA<sub>A</sub> en el SNC consiste en variantes constituidas de combinaciones de subunidades (sobre todo  $\alpha$ ) ligeramente diferentes codificadas por distintos genes (Schwartz, 1988). A pesar de ello, el modelo de la *Figura 7*

debe ser suficiente para explicar su función.

El modelo muestra el acoplamiento aproximado de 4 subunidades. La subunidad  $\beta$ , según este modelo, lleva el sitio de unión de GABA. En esta unidad también existirían sitios alostéricos moduladores para los orbitúricos, ciertos esteroides y otros agentes, así como para los agentes proconvulsivantes, como la picrotoxina. La subunidad  $\alpha$  lleva los sitios de unión de las BNZ y análogos. La función principal del complejo es formar un canal abierto para aniones tras la activación por el GABA. El efecto del GABA es bloqueado por antagonistas competitivos del GABA, como la bicucullina, que se une al sitio de GABA (Hamberger y cols., 1981). La función del GABA como puerta del canal del cloro puede modularse alostéricamente por ligandos que se unen a otros sitios. Esos moduladores alostéricos facilitan (moduladores positivos) o inhiben (moduladores negativos) dicha función bien alterando la afinidad del GABA a su receptor o bien alterando la conformación durante la transición del canal de la forma cerrada a la abierta. Como veremos, el receptor de BNZ puede mediar tanto la modulación positiva como la negativa (Haefely, 1990).

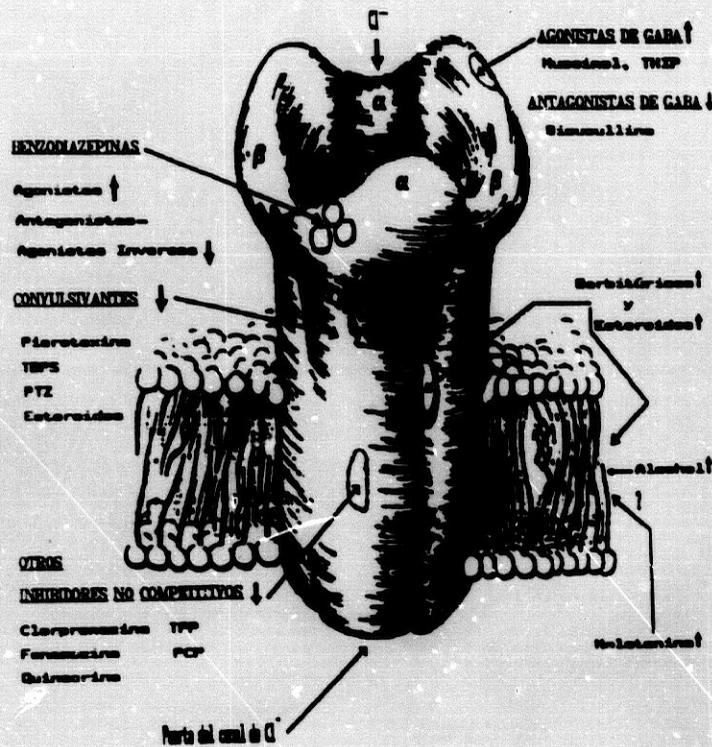


Figura 7: Modelo del complejo receptor GABA<sub>A</sub>-Benzodiazepinas

Además de los barbitúricos y las BNZ, gran número de otros compuestos modulan el receptor de GABA<sub>A</sub>. Así, el alcohol y los anestésicos volátiles (Huidobro-Toro y cols., 1987) estimulan el flujo de cloro. La alfaxalona, un esteroide anestésico, también aumenta las acciones inhibitoras del GABA (Harrison y cols., 1987). De forma similar, los metabolitos naturales de la desoxicorticosterona y progesterona estimulan el flujo de cloro directamente, potenciando la inhibición del GABA (Morrow y cols., 1987). Otros autores refieren al sulfato de pregnenolona como inhibidor del flujo de cloro mediado por GABA (Majewska y Schwartz, 1987).

2.-Las Benzodiazepinas (BNZ): El término benzodiazepinas (BNZ) frecuentemente se usa de forma muy amplia. Los derivados de BNZ se refieren a los compuestos estructuralmente relacionados con la estructura básica benzo-1,4-diazepina (Haefely, 1988) (Figura 8).

Para su clasificación los dividiremos en agonistas, cuando producen el efecto clásico de las BNZ, agonistas inversos, cuando tienen los efectos opuestos, y antagonistas cuando bloquean cualquiera de los dos efectos anteriores (Tabla II). Entre estos tres grupos de ligandos posibles del receptor de BNZ, existen diversos compuestos con afinidades intermedias.

*a.-Mecanismo de acción de las BNZ:* Sobre 1958, se sintetizó un compuesto, llamado clordiazepóxido (Librium®), que se comprobó tenía interesantes efectos biológicos. Fue introducido en terapéutica en 1960, y aparecieron poco después otros derivados más potentes (diazepam y oxazepam). Hoy en día existen al menos unas 50 BNZ con diferentes propiedades farmacológicas, con efectos ansiolíticos, anticonvulsivantes, sedantes, estabilizantes autonómicos y relajantes musculares centrales (Haefely y cols., 1985).

Su estudio comenzó desde el momento en que, alrededor de 1970, se identificó al GABA como el neurotransmisor inhibitor principal en el SNC. En 1974 se presentó evidencia que proponía la facilitación de la neurotransmisión GABAérgica por las BNZ (Costa y cols., 1975). En 1977, se describieron los sitios receptores en la membrana a los que las BNZ se unían para producir sus efectos (Squires y Braestrup, 1977), encontrándose que su distribución se correlacionaba con los del GABA.

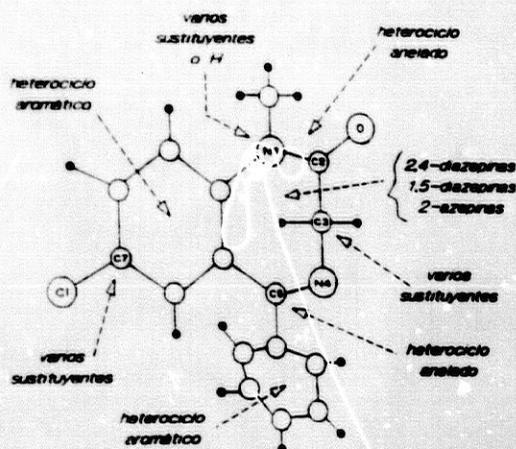


Figura 8: Estructura básica de las benzo-1,4-diazepinas.

En 1979, dentro de una serie de nuevos derivados de BNZ, se encontraron compuestos con alta afinidad para el receptor de BNZ, pero sin el efecto tranquilizante. El análisis de todos estos datos llevó al descubrimiento del primer antagonista específico, el flumazenil (Haefely y Hunkeler, 1988). Por esas fechas, se aisló un derivado, la  $\beta$ -carbolina-3-carboxilato, como un artefacto en el producto de extracción de orina humana (Braestrup y cols., 1980). Algunas  $\beta$ -carbolicinas no sólo bloquean los efectos tranquilizantes de las BNZ, actuando como antagonistas de las BNZ, sino que ellas mismas producen efectos que son la imagen especular de las BNZ, y pueden ser bloqueados por el flumazenil. Estos hechos demostraron que los receptores de BNZ pueden mediar los efectos opuestos, acuñándose los términos de agonista y agonista inverso (Pol y cols., 1982).

Gran número de observaciones han demostrado que los sitios de unión para GABA y BNZ están íntimamente conectados funcional y físicamente, constituyendo un complejo macromolecular (Haefely y cols., 1985). En 1987 se determi-

TABLA II  
 Clasificación de los ligandos de BNZ

Propiedad	Agonista	Antagonista	Agonista Inverso
Perfil farmacológico	Tranquilizante, anticonvulsivante	Sin actividad intrínseca; bloque los efectos del agonista y del agonista inverso	Ansiogénico, convulsivante, estimulante
Efecto sobre el GABA	Potenciación	Ninguno; bloque los efectos de agonistas y antagonistas	Depresión
Unión al receptor en presencia de GABA	Aumenta	No afecta	Reduce

nó la estructura primaria del complejo receptor GABA<sub>A</sub>-BNZ-canal de Cl<sup>-</sup> por medio de técnicas de genética molecular (Schofield y colbs., 1987).

**b.-Tipos y características de los receptores de BNZ:**

La caracterización farmacológica de los receptores de BNZ ha permitido el reconocimiento de la existencia de varios subtipos de receptores. Dos tipos, BNZ<sub>1</sub> y BNZ<sub>2</sub>, llamados ahora  $\omega_1$  y  $\omega_2$  (Langer y Arbilla, 1988) están presentes en el cerebro y son responsables de las propiedades neurofarmacológicas de las BNZ. Además, existe un tercer tipo, el  $\omega_3$ , muy abundante en tejidos periféricos (llamado también receptor periférico), aunque también se ha localizado en el SNC (Dubois y colbs., 1988). Este sitio de unión de BNZ no está relacionado con el complejo receptor GABA<sub>A</sub>.

Los tipos  $\omega_1$  y  $\omega_2$  se definieron inicialmente por su afinidad alta y baja a la triazolopiridazina CL 218.872 y a la  $\beta$ -carbolina etil- $\beta$ -carbolina, respectivamente (Klepner y colbs., 1979). Estudios posteriores han establecido que, en la rata y el hombre, la distribución relativa de los tipos  $\omega_1$  y  $\omega_2$  varía en el SNC: el cerebelo es rico en el tipo 1, mientras el hipocampo es rico en tipo 2 (Niddam y colbs., 1987). Esos dos tipos parecen representar distintas entidades moleculares (quizá

diferencias en la glicosilación proteica), y tienen diferente ontogenia (Watanabe y colbs., 1985).

Recientemente se ha caracterizado su distribución en el cerebro humano, encontrándose que el tipo  $\omega_1$  se localiza preferencialmente en las regiones sensoriomotoras, y el tipo  $\omega_2$  en las áreas límbicas, sugiriendo que estos dos sitios pueden estar asociados, respectivamente, con las propiedades de los agonistas de BNZ hipnóticas-sedantes y ansiolíticas-anticonvulsivantes (Dennis y colbs., 1988)

**c.-Función moduladora alostérica de las BNZ:** El receptor de BNZ en la subunidad  $\alpha$  del receptor de GABA<sub>A</sub> modula la función del receptor de GABA<sub>A</sub> sobre el canal de cloro. Ya que los sitios de unión de GABA y BNZ son diferentes zonas del mismo complejo receptor, esta modulación se llama alostérica. Así como el GABA aumenta la unión de los agonistas de BNZ, éstos también aumentan la unión del GABA a su receptor.

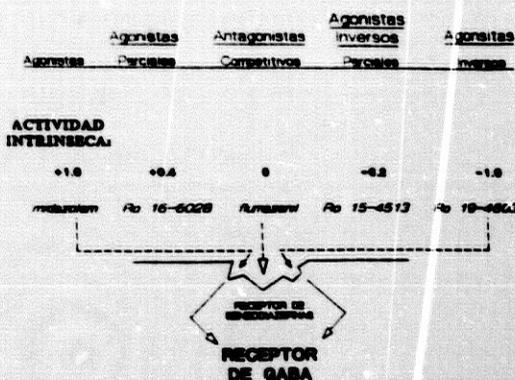
En la *Figura 7* representábamos un modelo hipotético del complejo receptor GABA<sub>A</sub>. El sitio de unión de GABA se localiza en la subunidad  $\beta$ , mientras que los de BNZ se localizan en la  $\alpha$  (tres círculos abiertos). La ocupación del sitio de GABA por GABA induce un cambio

conformacional que lleva a la apertura y estado conductor del canal de cloro. Los ligandos de BNZ pueden alostéricamente modular la afinidad del GABA y así afectar a la transición del canal del estado cerrado al abierto (Haefely, 1988).

El receptor de BNZ es único por su capacidad de mediar dos efectos opuestos (Mendelson y cols., 1980). La *Figura 9* esquemáticamente representa esta situación. Tres clases de ligandos interaccionan con el receptor de BNZ. Los agonistas facilitan el receptor GABA<sub>A</sub> en una manera positiva; presentan una eficacia intrínseca de +1. Los agonistas de BNZ potencian el efecto del GABA sobre la conductancia del cloro. Así, en presencia de un agonista de BNZ, la curva logarítmica dosis-respuesta del GABA para la conductancia del cloro es desplazada a la izquierda (aumenta la potencia del GABA), sin aumentar la conductancia máxima al cloro. El desplazamiento máximo de esta curva hacia la izquierda es una medida de su eficacia intrínseca. A nivel de un sólo canal, el efecto de un agonista de BNZ se ve como el aumento de la probabilidad de abrirse el canal en respuesta a una concentración dada de GABA.

Los agonistas inversos reducen la función del receptor GABA<sub>A</sub> actuando como moduladores alostéricos negativos. Su eficacia intrínseca es de -1 para los agonistas inversos puros. La curva dosis-respuesta del GABA es desplazada a la derecha, y la conductancia máxima al cloro es reducida. El máximo desplazamiento a la derecha mide la eficacia intrínseca negativa. La probabilidad de que un canal de cloro se abra en respuesta al GABA se reduce.

Los antagonistas de BNZ son ligandos que



*Figura 9: Ligandos del receptor de BNZ con diferente eficacia intrínseca.*

se unen al receptor de BNZ sin alterar la función del receptor de GABA<sub>A</sub>. Actúan, por tanto, con una eficacia intrínseca de cero. Sin embargo, los antagonistas bloquean el efecto de ambos agonistas y agonistas inversos en una manera competitiva. Los ligandos con una eficacia intrínseca entre +1 y 0 se llaman agonistas parciales. Producen un desplazamiento de la curva menor. Aunque recuerdan a los agonistas puros en algunos de sus efectos en el SNC intacto cuando se administran solos, son también capaces de antagonizar otros de sus efectos, por lo que actúan como agonistas-antagonistas. Los ligandos con eficacia intrínseca entre -1 y 0 se llaman agonistas inversos parciales. Disminuyen los efectos del GABA ligeramente, y antagonizan los efectos de agonistas puros y parciales (Haefely, 1988).

Hay dos formas de explicar la función del receptor de BNZ (Kellog, 1988). En primer lugar, se puede asumir que los agonistas inducen una clase de conformación (conformación agonista) que aumenta la función del receptor GABA<sub>A</sub>; que los agonistas inversos induzca una conformación diferente (conformación agonista inverso) que induce una inhibición del receptor GABA<sub>A</sub>.

y que los antagonistas no alteran la conformación de reposo o inactiva del receptor de BNZ. Alternativamente, el receptor de BNZ puede existir en dos conformaciones interconvertibles: agonista y agonista inversa. El equilibrio entre esas dos puede definirse como el punto de reposo para la función del receptor de GABA<sub>A</sub>. En este modelo, los agonistas de BNZ tienen afinidad preferente por el estado agonista. Estabilizando el receptor de BNZ en esta conformación, pueden desplazar el equilibrio hacia el estado agonista. De forma similar actuarían los agonistas inversos. Los antagonistas pueden unirse a ambas conformaciones de forma similar, y no desplazan el equilibrio hacia ningún lado.

Se ha sugerido la existencia de receptores en dos estados interconvertibles así como la existencia de ligandos con eficacia intrínseca negativa y que producen efectos opuestos a los agonistas (Thorn, 1973), lo que se debe probablemente al hecho de que el receptor de BNZ no es un receptor primario (sus ligandos no producen cambios en el estado del canal en ausencia de GABA), sino que es un receptor secundario, que modula alostéricamente al primario, que es el de GABA<sub>A</sub>.

*Ligandos endógenos de las BNZ:* A pesar de los esfuerzos realizados, no se ha encontrado todavía un compuesto endógeno cuya función sea claramente la de actuar como un ligando fisiológico o patológico en el receptor de BNZ (Haefely, 1988). En principio, tal ligando endógeno podría tener eficacia intrínseca positiva o negativa y actuar según esto como un anticonvulsivante endógeno ansiolítico-sedante, o como un proconvulsivante endógeno ansiogénico-excitante. En el SNC y tejidos periféricos se ha descrito la existencia de un péptido inhibidor de la unión de diazepam (DBI, diazepam-binding inhibitor) (Costa y Guidotti, 1986). Sin embargo, no está claro si está presente en el compartimento extracelular

para actuar en el receptor de BNZ. Hay alguna evidencia que, en la insuficiencia hepática experimental, el receptor de BNZ está en la conformación agonista. Es posible que la severa alteración metabólica en la insuficiencia hepática produzca una acumulación de un compuesto con propiedades agonistas. En última instancia, se podría pensar que puede existir el receptor de BNZ sin necesidad de ligando endógeno, pero este punto no tiene sentido (Haefely, 1988). Se ha sugerido que las BNZ podrían ser de origen natural, y por tanto, ser ingeridas y/o sintetizadas por el organismo, por lo que estarían actuando antes de su descubrimiento y síntesis de laboratorio (Unselid, 1989), y podrían ser entonces los auténticos ligandos endógenos del receptor de BNZ.

El receptor de BNZ no es el único sitio modulador en el complejo receptor de GABA<sub>A</sub>. Varios convulsivantes (picrotoxina, pentetrazol, penicilina, y similares) tanto como los barbitúricos y otros hipnótico-sedantes actúan en un todavía mal definido sitio receptor para aumentar o inhibir respectivamente, la función del GABA<sub>A</sub>. El receptor de barbitúricos es de interés, ya que media algunos de los muchos efectos de estas drogas. A concentraciones bajas, estas drogas aumentan el promedio de vida media de apertura del canal de cloro por el GABA, efecto básicamente diferente al de los agonistas de BNZ, que no afectan al tiempo de apertura sino su probabilidad de abrirse (Haefely y Polc, 1986). Además, en contraste con las BNZ, altas concentraciones de barbitúricos pueden abrir el canal de cloro en ausencia de GABA. Los convulsivantes actúan en un sitio en algún modo relacionado con el de los barbitúricos, con efectos opuestos. No está claro si los barbitúricos sedantes-anticonvulsivantes actúan como agonistas y agonistas inversos, respectivamente, sobre un receptor común.

Los ligandos de BNZ y barbitúricos pueden interactuar en muchos niveles en el SNC a nivel del complejo GABA<sub>A</sub>. El aumento del promedio de apertura del canal de cloro, junto al aumento de la probabilidad de su apertura produce un efecto aditivo. Por otro lado los agonistas inversos de las BNZ reducen, en algún grado, los efectos de los barbitúricos (posiblemente por disminuir la probabilidad de apertura) (Polc y colts., 1982).

### C.- LA GLANDULA PINEAL Y EL COMPLEJO RECEPTOR GABA-BNZ.

1.-El sistema GABA-BNZ pineal: En la glándula pineal existe un proceso de síntesis activa de GABA, así como de su metabolismo (Ebadi y Chan, 1980). Asimismo, se ha demostrado la existencia de un mecanismo de captación de GABA Na-dependiente, similar al existente en otras áreas del SNC. Con el uso de  $^3\text{H}$ -GABA como radioligando, se han descrito dos sitios, de alta ( $K_d = 16 \text{ nM}$ ) y de baja ( $K_d = 0.6 \mu\text{M}$ ) afinidad en la pineal bovina (Ebadi y Chan, 1980). En la rata, el GABA tiene un efecto ligeramente estimulante sobre la N-acetiltransferasa (NAT) pineal *in vitro*, enzima que juega un papel crucial en la síntesis de aMT (Schon y cols., 1975; Ebadi y cols., 1982). El GABA no altera los niveles basales de GMPc, pero bloquea el acúmulo de GMPc inducido por la NA (Klein, Auerbach y Weller, 1981). Basados en la localización autorradiográfica del  $^3\text{H}$ -GABA y en que la captación de  $^3\text{H}$ -GABA en pineales de animales controles y gangliectomizados es similar, se ha propuesto que las células gliales son el sitio primario de la síntesis y captación de GABA en la pineal. El contenido pineal de GABA permanece inalterado hasta 8 semanas tras la gangliectomía cervical superior (GCSx) en la rata (Waniewski y Suria, 1980).

Al contrario de lo que ocurre en la rata, se ha observado que el GABA inhibe de forma significativa la estimulación por NA de la NAT en la pineal de otras especies animales (Ebadi y Chan, 1980; Schon y cols., 1975). Este efecto

inhibitorio del GABA es bloqueado por bicuculina y no se ve en un medio libre de  $\text{Cl}^-$ .

De los dos tipos de receptores de BNZ, el central y el periférico, este último se ha descrito en la pineal, al igual que en otros órganos circunventriculares como el plexo coroideo, y en otras estructuras como el bulbo olfatorio (Matthew y cols., 1984). Se ha descrito también un mecanismo de captación de BNZ muy activo en la glándula pineal ( $K_m = 1.8 \mu\text{M}$ ,  $V_{max} = 1.3 \text{ pmol/min/mg}$ ), en estudios *in vitro* en explantes de pineal, con una capacidad de concentración de alrededor de 12, que no es alterado por la gangliectomía cervical superior (GCSx) (Lowenstein, González Solveyra y Cardinali, 1983).

La pineal de la rata contiene exclusivamente sitios receptores de tipo periférico de BNZ, según se ha demostrado por autorradiografía con  $^3\text{H}$ -Ro5-4864 (agonista periférico) y por estudios de ligando (Matthew y cols., 1984). Por medio de  $^3\text{H}$ -FNZ se ha caracterizado un sólo sitio receptor en homogenados de pineal (sobrenadante de 3000 g), con una  $K_d = 97\text{-}102 \text{ nM}$  y  $B_{max} = 6.5\text{-}9 \text{ fmol/mg prot.}$  Asimismo, el orden de afinidad de diferentes BNZ demuestra que se trata de un sitio receptor periférico.

Tras la GCSx, la unión de BNZ a la pineal disminuye un 30-60%, dependiendo del método (autorradiografía o ligando), así como del radioligando empleado. Esos resultados sugieren que los sitios de unión de BNZ están bajo control, al menos parcial, de los nervios simpáticos pineales. En ratas, la administración *i.p.* de 20 mg/kg de diazepam, un agonista inespecífico (central y periférico), bloquea la elevación nocturna, aunque no el aumento inducido por isoproterenol,

de la NAT pineal (Matthew y cols., 1984). Este dato, que indica un efecto presináptico de las BNZ, se ha ampliado a observaciones recientes que muestran que el Ro5-4864 disminuye la liberación de NA pineal a concentraciones submicromoleculares ( $0.1 \mu\text{M}$ ), mientras que el clonazepan no tiene efecto significativo. Posiblemente, el efecto observado está relacionado al bloqueo del canal de  $\text{Ca}^{++}$  activado por voltaje asociado a sitios periféricos de BNZ. A mayor concentración, las BNZ aumentan la síntesis pineal de aMT, y solamente el efecto del Ro5-4864 es detectable en pineales de ratas GCSx.

A diferencia de la rata, en la pineal bovina y humana existe una significativa población de sitios receptores centrales de BNZ (Lowenstein y cols., 1985). En la pineal bovina, se localiza un sólo sitio receptor para BNZ, con una  $K_d = 3.1 \pm 0.5 \text{ nM}$  y  $B_{\text{max}} = 60 \text{ fmol/mg prot.}$  El GABA y el pentobarbital estimulan la unión de BNZ a este sitio. Asimismo, se ha encontrado un sitio receptor para las carbolinas (que tienen un efecto opuesto a las BNZ, actúan como agonistas inversos), mediante el uso del éster de  $^3\text{H}$ -etil- $\beta$ -carbolina-3-carboxilato como ligando, proporcionando una constante de disociación,  $K_d = 1 \pm 0.1 \text{ nM}$  y  $B_{\text{max}} = 20 \text{ fmol/mg prot.}$  (Lowenstein y Cardinali, 1983).

De esta forma, se ha propuesto la clasificación de las pineales en dos tipos, según su población de receptores de BNZ (Lowenstein y cols., 1985): tipo I, con receptores de BNZ centrales y un mecanismo inhibidor de GABA (bovina, ovina y humana), y tipo II, con un receptor de tipo periférico de BNZ, y sin mecanismo inhibidor GABAérgico (rata).

**2.-La glándula pineal y el complejo GABA-BNZ en la corteza cerebral de la rata:** En un intento de averiguar si las manifestaciones convulsivas de los animales pinealectomizados se debían a algún efecto de la pineal y/o la aMT u otros supuestos pineales sobre los mecanismos de inhibición centrales, se hicieron una serie de estudios bioquímicos para comprobar si el complejo receptor GABA-BNZ se alteraba por manipulaciones de la pineal, y en caso positivo, cuál o cuales serían los mecanismos por los que la aMT podría producir esta modulación de la neurotransmisión inhibidora central.

**a.-La aMT y el receptor  $\text{GABA}_A$  del córtex cerebral de la rata:** Como se ha dicho, la pineal es una estructura homeostática que controla la excitabilidad del SNC (Reiter, Sorrentino y Hoffman, 1972; ; Kramer y cols., 1974; Chadwick y cols., 1978; Romijn, 1978; Satake, 1979; Winters y Lakin, 1980; Albertson y cols., 1981; Philo y Reiter, 1981). Ya que la inhibición del sistema GABAérgico del SNC induce convulsiones en mamíferos y la Px disminuye los niveles de GABA en el cerebro (Anton-Tay, 1974), se ha examinado la relación entre los receptores de GABA en la corteza cerebral de la rata y la glándula pineal.

El estudio de los receptores de GABA se realizó usando  $^3\text{H}$ -GABA como ligando en preparaciones de membranas (sinaptosomas) de corteza cerebral de ratas mantenidas en un ritmo de luz:oscuridad de 12:12 h (Acuña y cols., 1986). Ya que los efectos de la pinealectomía son tiempo-dependientes, se hicieron estudios a diferentes intervalos de tiempo tras los procedimientos experimentales. Asimismo, ya que una

de las características de las funciones del organismo vivo es su ritmicidad, que en gran parte está determinada por la actividad de la pineal, se han estudiado los ritmos circadianos de los receptores de GABA y su alteración en diferentes situaciones experimentales. El receptor estudiado es el GABA<sub>A</sub>, ya que se realizó en un medio libre de sodio (eliminando así los sitios de captación) y libre de cationes divalentes (necesarios para el estudio del receptor de GABA<sub>B</sub> (sitio baclofén-sensible) (Enna y Möhler, 1987).

Para el estudio del ritmo circadiano de receptores de GABA, se hicieron varios grupos de ratas normales que se sacrificaron a intervalos de 6 horas a lo largo del ciclo de 24 h. En ratas controles, y en el rango de concentración de GABA usado (16-210 nM), se encontró sólo un sitio de unión, con una  $K_D = 20-50$  nM y  $B_{max} = 200-500$  fmol/mg prot., compatible con el sitio receptor de alta afinidad descrito para el GABA (Greenlee, Van Ness y Glsen, 1978; Guidotti y colbs., 1979), mientras que no aparece el sitio de baja afinidad también descrito, posiblemente porque nosotros usamos membranas preparadas y tratadas con Tritón X-100, un detergente que potencia el sitio de alta afinidad (Olsen, 1982). El estudio del ritmo indica (Figura 10) un mínimo en la  $B_{max}$  por la noche, aumentando por el día. Asimismo se observa un descenso significativo de la afinidad por la mañana.

El efecto de la Px se observa también en la Figura 10. Puede demostrarse que la Px incrementa la  $B_{max}$  del GABA en todos los puntos horarios, alterando su ritmo normal, de forma que durante la noche no sólo anula el mínimo en la  $B_{max}$  sino que produce la aparición de un pico

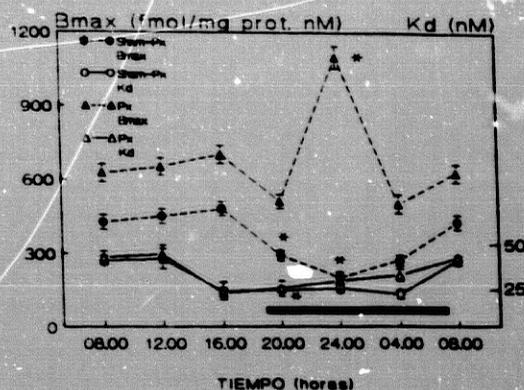


Figura 10: Efecto de la pinealectomía (Px) sobre el ritmo circadiano del receptor de GABA.

con un máximo en la  $B_{max}$ . La afinidad del GABA descende de forma significativa hacia el final de la fase nocturna y primeras horas de la mañana. Estos efectos son similares en las ratas Px y con operación simulada.

En la Tabla III se representan los datos obtenidos en ratas sometidas a Px, gangliectomía cervical superior (GCSx) y sus controles respectivos. La  $B_{max}$  (fmol/mg prot. nM) de la unión del GABA, medida al mediodía, alcanza los valores máximos a los 5-10 días tras la Px, descendiendo ligeramente 5 días después. Los animales con operación simulada exhiben sólo un aumento transitorio en la  $B_{max}$  hasta los 10 días de la operación, volviendo a sus valores normales a los 15 días. No se encuentran cambios significativos en la  $K_D$ . Sin embargo, la GCSx, que no afecta a la  $B_{max}$  del GABA durante este tiempo, aumenta en todos los casos significativamente la afinidad de la unión del GABA a su receptor. Con el fin de observar si estos efectos de la Px eran debidos a la falta de aMT, se inyectó aMT a diferentes dosis en animales Px, observándose que una dosis de 25  $\mu$ g/kg de peso ya es efectiva para contrarrestar el aumento inducido por la Px.

TABLA III  
Efectos de diversas manipulaciones sobre los receptores cerebrales de GABA

Grupo	Tiempo transcurrido tras la operación					
	5 días		10 días		15 días	
Cinética	$B_{max}$	$K_D$	$B_{max}$	$K_D$	$B_{max}$	$K_D$
Pinelectomía	997 ± 51	38.6 ± 4.8	1.043 ± 67	43.6 ± 4.7	739 ± 55	42.6 ± 4.2
Sham-Px	729 ± 60	37.0 ± 4.9	818 ± 61	33.6 ± 4.6	562 ± 36	34.6 ± 2.0
GCSx	522 ± 40	17.0 ± 1.2	428 ± 28	6.0 ± 0.5	555 ± 40	10.5 ± 4.0
Sham-GCSx	437 ± 65	40.7 ± 5.2	496 ± 37	45.9 ± 4.0	512 ± 28	39.4 ± 4.1

Px: pinealectomía; GCSx: gangliectomía cervical superior. Los grupos Sham indican operación simulada (controles).

Sin embargo, estos efectos de la aMT no son dependientes de un efecto directo de esta hormona sobre el receptor de GABA, ya que hasta concentraciones tan elevadas como  $10^{-5}$  M, la aMT no interfiere con la unión del GABA a su receptor in vitro.

Estos resultados sugieren la existencia de un ritmo circadiano de receptores de GABA modulado por la glándula pineal y/o el ganglio cervical superior. A su vez, la aMT afecta al receptor de GABA, lo que sugiere un papel específico de esta hormona sobre los procesos dependientes del GABA, y así pueden explicarse hechos como el efecto protector del tratamiento con aMT contra las convulsiones inducidas por algunos fármacos, focos epilépticos, etc (Acuña y cols., 1986a).

Este estudio se realizó en ratas mantenidas en condiciones similares a las de los experimentos del GABA, estudiándose los receptores de BNZ por medio del  $^3\text{H-FNZ}$ , ligando específico del receptor central de BNZ, en preparaciones de membranas ligeramente purificadas (Acuña y cols., 1986b).

Los resultados obtenidos demuestran tam-

bién la presencia de un ritmo circadiano de receptores de BNZ en la corteza cerebral de la rata (Figura 10). A diferencia del ritmo de GABA, se observa un máximo en la  $B_{max}$  a medianoche, mientras que en el resto del día los valores son más bajos. La afinidad no varía en función del momento del día. La Px (Figura 11) anula completamente el ritmo circadiano de BNZ, mostrando además una depresión en la  $B_{max}$  a mediodía. Tampoco en este caso se observan cambios significativos en la afinidad en ningún momento.

Las constantes cinéticas encontradas para el receptor de BNZ fueron:  $K_D = 1.9 \pm 0.2$  nM, y  $B_{max} = 384 \pm 43$  fmol/mg prot., que concuerdan con las del receptor central de alta afinidad de BNZ en el SNC.

La administración de aMT a ratas Px, en dosis de 10-800  $\mu\text{g/kg}$  3 horas antes del sacrificio (a mediodía) indican que ya a dosis de 25  $\mu\text{g/kg}$  la aMT revierte los efectos de la Px, sin variar la afinidad. Sin embargo, tampoco la aMT compite in vitro con el FNZ por el sitio receptor de las BNZ, de nuevo indicando que posiblemente los efectos de la pineal y la aMT sobre el complejo

GABA-BNZ se produzcan por otra vía. Estos efectos de la Px se mantienen al menos hasta los 15 días de la operación, de forma similar a lo que ocurría con el GABA.

Estos resultados implican a la glándula pineal y su hormona aMT en la modulación del principal sistema neurotransmisor inhibitorio en el SNC de la rata, pudiendo estar implicados en la regulación de diversos mecanismos centrales de homeostasis frente a agentes convulsivantes.

#### D.- GLANDULA PINEAL Y MECANISMOS IONICOS DE MEMBRANA

1.-La  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa Cerebral: La  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa posee una gran actividad en el Sistema Nervioso Central. La interacción de la ouabaina con su receptor ocasiona alteraciones en muchas funciones que son controladas por este sistema enzimático, como son:

a.-La actividad eléctrica de las neuronas se modifica cuando se produce una inhibición de la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa ya que el aumento de sodio a nivel intracelular da lugar a la despolarización de la membrana celular (Lichtstein, 1982).

b.-Se produce liberación de neurotransmisores de las sinapsis neuronales centrales y periféricas (Gillis y Quest, 1980). Aunque este efecto fue descrito por primera vez hace veinte años (Birks, 1963) el mecanismo por el cual la inhibición de la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa por los digitálicos produce esta respuesta sigue sin conocerse completamente. Se demostró (Raiteri y colbs., 1979) a nivel hipotalámico una liberación de dopamina y

noradrenalina mediante un sistema transportador  $\text{Ca}^{++}$  dependiente que se produce cuando la bomba de sodio es inhibida por la ouabaina. El  $\text{Ca}^{++}$  juega un papel fundamental en este proceso ya que su ausencia en el medio evita totalmente la acción estimuladora de la liberación de neurotransmisores que produce la ouabaina (Tagliatela y colbs., 1988).

c.-Modifica los efectos que producen algunos neurotransmisores. Por ejemplo, la ouabaina inhibe la estimulación adrenérgica que aumenta la actividad de la N-acetiltransferasa (NAT) a nivel de la glándula pineal. Como consecuencia se altera el metabolismo del triptófano y no se produce aMT que es su principal hormona. Este efecto es de gran interés ya que indicaría que la inducción de muchas enzimas que son reguladas por neurotransmisores en el Sistema Nervioso Central, requieren la existencia de un cierto grado de hiperpolarización el cual se dificulta si hay un bloqueo de la bomba de sodio causado por la ouabaina (González García, Ceña y Klein, 1987).

d.-Alteración en la composición iónica del líquido intersticial cerebral y en la síntesis de LCR ya que los receptores de ouabaina se encuentran en las células endoteliales de los capilares cerebrales y en el plexo coroideo (Harik, Doull y Dick, 1985).

2.-Glándula pineal, aMT, y el receptor de alta afinidad de la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa cerebral: Recientemente, se ha podido comprobar que la pineal y la aMT son capaces de alterar las características del receptor de ouabaina cerebral. Así, (Del Aguila, 1990; Del Aguila y colbs., 1990) se ha visto que la Px en la rata modifica los parámetros

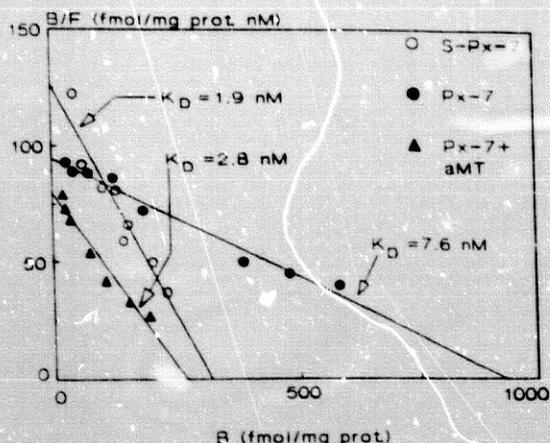


Figura 11: Efecto de la Px sobre el receptor de ouabaina.

de  $K_D$  y  $B_{max}$  del receptor, provocando un aumento significativo de ambos a los 7 días de la operación; este efecto es revertido por la administración de aMT en dosis de 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Figura 11) (Acuña y cols., 1992a).

El efecto encontrado, sin embargo, no parece deberse a una acción directa de la aMT sobre el receptor, ya que este indol pineal no fue capaz de desplazar a la  $^3\text{H}$ -ouabaina de su receptor. En cualquier caso, los resultados demuestran que existe una relación entre el receptor de ouabaina de la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa cerebral y la pineal, por lo que podría pensarse que los efectos que la pineal tiene sobre el sistema nervioso central pueden estar mediados por este complejo enzimático.

En un intento de estudiar si la pineal tiene algo que ver con los receptores de ouabaina, en nuestro laboratorio se han hecho recientemente unos estudios que apuntan hacia un papel de la pineal en la modulación de los receptores de ouabaina. Así, hemos observado la existencia de un ritmo circadiano de los receptores de ouabaina en la corteza cerebral de la rata, con un mínimo a las 4 de la tarde, y un máximo a las 4 de la mañana (Figura 12).

La pinealectomía altera este ritmo, haciendo desaparecer el mínimo diurno, y elevando la  $B_{max}$  en todos los puntos horarios, con un mayor incremento del pico nocturno (Figura 12). Los efectos de la pinealectomía son neutralizados por la administración de aMT, que con dosis de sólo 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso, s.c., es capaz de revertir y normalizar los valores de  $B_{max}$  (Acuña y cols., 1992b).

3.-¿La aMT como modulador alostérico de la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa cerebral?: La aMT no compete in vitro con el receptor de ouabaina, por lo que su sitio de acción debe ser otro. Sin embargo, cuando se incubaba ouabaina en presencia de aMT, ésta es capaz de estimular la afinidad de la unión de la ouabaina por su receptor, potenciando así el efecto inhibitor de la droga sobre la bomba de sodio. Este efecto simula perfectamente un mecanismo de regulación alostérica, y la representación de Lineweaver-Burk así lo indica (Acuña y cols., 1991).

Para comprobar más precisamente este punto, se hicieron otros experimentos para determinar cinéticamente la función de la bomba de sodio durante su actividad normal.

En este estudio se han utilizado hematies humanas precargadas con sodio lo que permite,

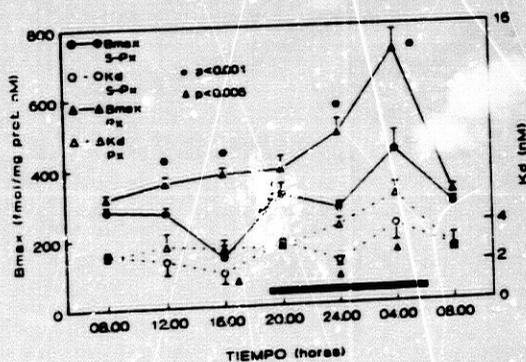


Figura 12: Efecto de la Px sobre el ritmo circadiano del receptor de ouabaina.

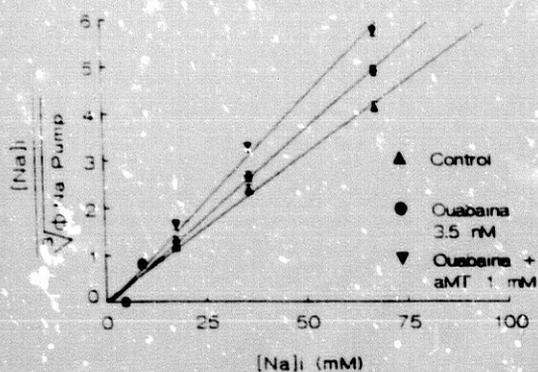


Figura 13: Efecto de la aMT sobre la actividad de la bomba de sodio.

tras su incubación posterior en un medio adecuado, el cálculo de los parámetros cinéticos que definen la actividad de dicha bomba (velocidad máxima,  $V_{max}$ , y  $K_m$ ) (Figura 13). Los hematíes se incuban en presencia y ausencia de ouabaina. Una concentración máxima de ouabaina bloquea totalmente la bomba de sodio y nos sirve para determinar la actividad residual. Si añadimos al medio de incubación ouabaina suficiente para inhibir la actividad de la bomba de sodio a la mitad ( $IC_{50}$ ), la adición posterior de aMT potencia el efecto bloqueante de la ouabaina, inhibiendo aún más la actividad enzimática. Este efecto de la aMT parece ser dosis-dependiente, y estos resultados sugieren una vez más que la  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPasa cerebral puede tener un sitio receptor para la aMT, de forma que ésta pueda actuar alostéricamente sobre la unión de la ouabaina a su receptor. Esta hipótesis se refuerza con el hecho de que la administración de aMT, tanto en los experimentos *in vitro* como en los de los hematíes, sin la presencia de ouabaina, carece de efecto. Indudablemente, no se puede descartar un efecto de la aMT a través de otros canales iónicos de membrana (Acuña y cols., 1992a).

## D.- GLANDULA PINEAL Y PEPTIDOS HIPOFISARIOS

**1.-Introducción:** Durante las últimas décadas se han presentado muchas evidencias que indican la intervención de hormonas de diferentes lugares (incluyendo la hipófisis) en la regulación de las funciones del cerebro y en el comportamiento. En particular, se ha estudiado ACTH y sus péptidos análogos comprobándose que afectan profundamente el comportamiento adaptativo en los animales y en el hombre (De Wied y Jolles, 1982).

La ACTH es un neuropéptido endógeno derivado de una gran molécula precursora denominada pro-opiomelanocortina (POMC), de la cual también pueden ser generados enzimáticamente otros neuropéptidos ( $\alpha$ -MSH,  $\beta$ -LPH, endorfinas) (Mains y cols., 1977) (Figura 14).

Hay células en el cerebro que sintetizan estos péptidos y son completamente distintas de las células de la hipófisis que sintetizan los mismos péptidos (Watson y cols., 1978b). Estas células están localizadas en el hipotálamo ventral (núcleo arcuato), contienen  $\beta$ -LPH,  $\beta$ -endorfinas y ACTH y constituyen un sistema neuronal con proyecciones difusas a través del cerebro (Watson y Akil, 1981). De este modo, los neuropéptidos análogos a la ACTH pueden ser producidos y liberados por neuronas para actuar como neurotransmisores o neuromoduladores. Tales péptidos alteran el metabolismo de ácidos nucleicos, proteínas y aminas biógenas en el SNC tanto *in vitro* como *in vivo* (Dunn y Gispen, 1977). Estos neuropéptidos transfieren información a sus células diana

y por tanto cambian el metabolismo celular y en definitiva alteran el comportamiento del organismo.

**2.-Acciones Centrales de la ACTH y péptidos análogos:** Después del descubrimiento de los péptidos endógenos y exógenos, de los receptores opiáceos y de la indiscutible demostración del sistema peptidérgico neuronal en el cerebro, con sus implicaciones farmacológicas y fisiopatológicas, el interés de ACTH y MSH como neuropéptidos se ha elevado considerablemente. Sin

embargo surgen problemas, tales como si las acciones centrales de la melanocortina están mediadas por la misma configuración molecular ó si las diferentes respuestas están mediadas por diferentes configuraciones químicas activas presentes en la molécula; si las diferencias en la respuesta dependen de diferente población neuronal estimulada, ó de la dificultad del péptido para alcanzar diferentes lugares de acción (De Wied 1986). De hecho, ACTH y MSH no solamente influyen la memoria y los procesos de aprendizaje y atención (De Wied y cols. 1966) sino que también inducen crecimiento, modificaciones de la función sexual en ratas macho y hembras, disminuye el umbral para el dolor (Bertolini y cols. 1986), antagoniza diferentes

respuestas a la morfina e interfiere con la dependencia a la morfina (Stewart, 1986; Bertolini y cols., 1986), influencia marcadamente el mecanismo de amplitud sueño-despertar (Rubin, 1975; Stewart, 1986) y produce cambios típicos en la posición y en la locomoción (Jacquet, 1978).

**$\alpha$ -ACTH y Convulsiones:** Las acciones anticonvulsivantes de ACTH y corticosteroides en el tratamiento de los espasmos infantiles han sido documentadas durante los pasados 34 años, pero el mecanismo principal de su acción terapéutica es desconocido. Datos clínicos concernientes a sus efectos, lugar y modo de acción, actividad neuroquímica sobre el cerebro y LCR son todavía controvertidos. La causa de los espasmos infantiles parece ser un disturbio en la regulación

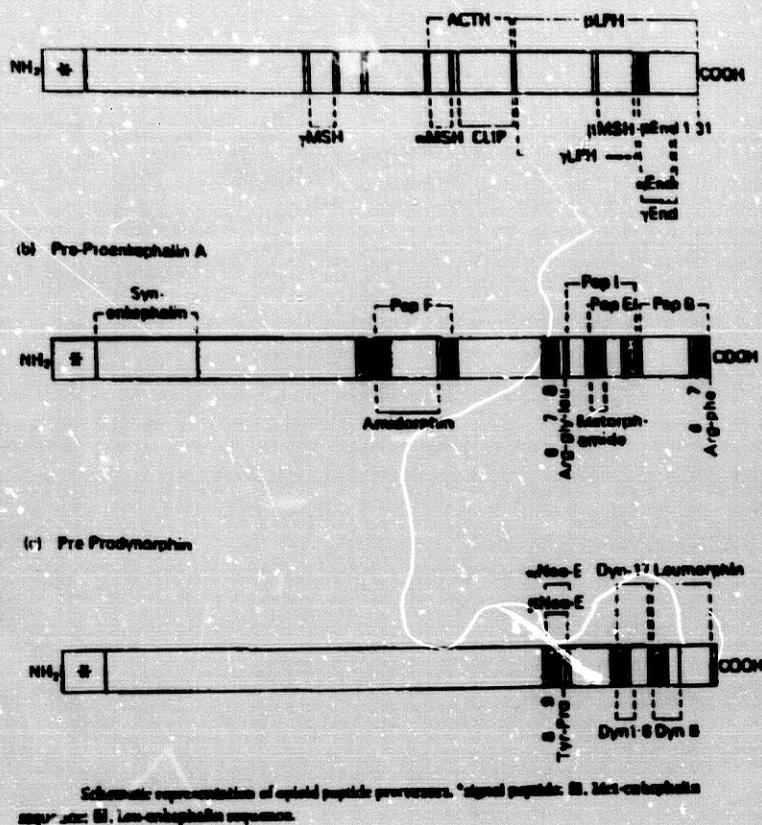


Figura 14: Péptidos de rivados de la POMC.

de la neurotransmisión neural central en una fase específica del desarrollo del cerebro (Riikonen, 1987).

Estudios en animales usando antisuero para ACTH sugieren que las neuronas de ACTH se originan en el hipotálamo (núcleo arcuato) y viajan a numerosas áreas: región de la comisura anterior, tálamo y tallo del cerebro. Los péptidos análogos a ACTH también se encuentran en otros tejidos además de en la hipófisis, por ejemplo tracto gastrointestinal, placenta y cerebro (Krieger, 1980). El efecto de ACTH sobre el cerebro puede ser mediado indirectamente (mediante estimulación de hormonas adrenocorticales) ó directamente. Los efectos directos han sido estudiados en niños con insuficiencia adrenal congénita ó yatrogénica (Lagenstein, Willing, y Kuehne, 1979) y mediante el uso de fragmentos de ACTH (Reith, Schotman, y Gispén, 1974; Fehm, y cols. 1981).

Algunos mecanismos acción de la ACTH sobre el cerebro pueden ser los siguientes:

1.- Los espasmos infantiles están muy directamente relacionados con la edad y tienden a desaparecer conforme ésta avanza. La ACTH acelera muchos procesos fisiológicos: actúa como inductor de muchas enzimas del cerebro (Arnaud, Nobili, y Boyer, 1981), estimula la síntesis de RNA/DNA (Ardeleanu, y Sterescu, 1975), acelera la formación de mielina (Palo, y Savolainen, 1974) y en los cultivos celulares los glucocorticoides aceleran el crecimiento de neuroblastos (Kahri, Salmempera, y Voutilainen, 1979). Así pues, mediante terapia con ACTH, muchos de estos procesos fisiológicos sucederían en un estado más temprano del desarrollo del

cerebro. Esta es la teoría más aceptada (Riikonen, 1987).

2.- En la etapa cronológica en que se desarrollan los espasmos infantiles, para el desarrollo del cerebro se requiere gran cantidad de energía. Se ha demostrado en animales de experimentación, que durante una actividad convulsiva prolongada, el nivel de glucosa cerebral descende significativamente (Wasterlain y Duffy, 1986) y también se produce cetonemia (Thurston y cols. 1978).

Sin embargo, recientes estudios en el desarrollo de animales han mostrado que los corticosteroides incrementan el contenido de glucosa cerebral y la reserva de energía (Thurston, y cols. 1978); también es bien conocido el valor de una dieta cetónica en el control de las convulsiones infantiles (Huttenlocher, Willbourne, y Signore, 1971).

3.- Los glucocorticoides hiperpolarizan la membrana de la célula nerviosa descendiendo por tanto, la probabilidad de descarga neuronal (Haynes y Larrer, 1977).

4.- La ACTH actúa como neuroregulador (Dunn y Schotman, 1981). Existe un desbalance en los niveles de ciertas aminas biógenas en sangre y LCR de niños con espasmos infantiles. Las alteraciones en el metabolismo de la serotonina pueden jugar algún papel en la fisiopatología de los espasmos infantiles:

-Niños con trisomía 21 tratados con 5-HTP triptófano (precursor de la serotonina), desarrollaron espasmos infantiles (Coleman, 1971; Airaksinen, 1974).

-Se encontraron niveles elevados de serotonina en sangre de niños con espasmos infantiles (Coleman, 1977).

-En un modelo animal, las convulsiones fueron reproducidas por 5-HTP y abolidas enteramente por esteroides y antagonistas de la serotonina (Nausieda, Carvey, y Braun, 1982).

-Las neuronas serotoninérgicas del cerebro están concentradas cerca de la línea media (región del rafe) y en la parte superior del tallo cerebral. Estudios en animales y en humanos (Leini y cols., 1980) hablan en favor de una sobreproducción central de serotonina.

Estudios posteriores han determinado algunas concentraciones de metabolitos en LCR de niños con espasmos infantiles, encontrándose una disminución del 5-HIAA y GABA (Loscher y Siemens, 1985). Los bajos niveles de GABA no se correlacionan con la actividad convulsiva, la cual se debe probablemente a daño difuso en el cerebro. El tratamiento con ACTH redujo significativamente los niveles de ácido homovanílico (HVA) y detuvo el estado epiléptico (Ito y cols., 1980), debido a un descenso de la actividad dopaminérgica. La ACTH tuvo un menor efecto sobre GABA (Ito, Mikawa, y Taniguchi, 1984).

Se ha demostrado que la ACTH causa un incremento en la unión de GABA a su receptor en el cerebro medio y cuerpo estriado (Kendall, McEwen y Enna, 1982). Esto podría explicar el descenso en la concentración de GABA en LCR después de la terapia con ACTH.

En otro estudio, se encontraron en LCR de niños con espasmos infantiles, bajos niveles de ACTH pero normales de  $\beta$ -endorfinas (péptido opiáceo que ha demostrado tener un componente epileptógeno en animales de experimentación), lo que sugiere deficiencia de ACTH a nivel central y/o desbalance en la formación de neuropéptidos (Facchinetti y cols., 1985). Asimismo, la seroto-

nina y acetilcolina tienen un efecto estimulante, mientras que la dopamina, noradrenalina y el GABA poseen un efecto inhibitorio sobre CRH y ACTH (Lancranjan, 1980).

La ACTH actúa como un neuroregulador afectando el metabolismo de varios neurotransmisores (NT). Tres posibles modos de acción son: como NT propiamente dicho, como modulador de la neurotransmisión alterando el efecto de los NT clásicos, ó como hormona trófica (vía cambios en la síntesis de proteínas, formación de nuevas sinápsis ó cambios de los contactos ya existentes). Se han obtenido evidencias de estos tres modelos en estudios citoquímicos en animales y humanos (Dunn y Schotman, 1981).

*b.-HPx y Epilepsia:* Para verificar el papel de la adenohipófisis en la inducción, se desarrollaron estados convulsivos por estimulaciones inducidas en grupos de ratas intactas e hipofisectomizadas, obteniéndose diferente respuesta a la inducción de la epilepsia en ambos grupos. Las ratas hipofisectomizadas no alcanzaron nunca el estadio 5 de convulsión, no mostraron un desarrollo normal (gradual) en la aparición de las convulsiones sino que éstas se desarrollaron tardíamente. Otra diferencia en la respuesta de ambos grupos atañe al porcentaje de estimulaciones, ya que los animales hipofisectomizados con mucha más frecuencia no respondieron a la estimulación respecto a las ratas normales (Rogers y Jackson, 1987).

Se ha demostrado que la hipofisectomía altera el comportamiento normal y la respuesta electrocardiográfica a la estimulación. Sin embargo ¿qué sustancias de la hipófisis son críticas en este proceso de inducción? Para averiguar ésto se

implantó una canula en el ventriculo lateral izquierdo de cada animal del experimento anterior y se inyectaron diferentes péptidos de ACTH en ambos grupos (ratas normales e hipofisectomizadas) comprobándose que en ratas hipofisectomizadas los patrones normales de inducción fueron restaurados al nivel de las ratas controles a las 2-4 semanas siguientes a la hipofisectomía por administración de ACTH<sub>1-10</sub>, ACTH<sub>4-10</sub> y ACTH<sub>4,7</sub> (De Wied, 1973). El grupo inyectado con ACTH<sub>1-24</sub> alcanzó las convulsiones más tardíamente, pero la amplitud de la convulsión fué más elevada. En este experimento se ha constatado la capacidad de los péptidos derivados de ACTH para restaurar el comportamiento y los cambios electrocardiográficos de la estimulación tras HPx. Pero una limitación de este experimento es que no fueron examinados los efectos de la ACTH en ratas controles. Sin embargo, los estudios previos indican que la cortisona y la ACTH generalmente elevan la excitabilidad neuronal (Woodbury, 1954). De este modo, parece improbable que los efectos de estos péptidos derivados de ACTH sean debidos a una acción no específica. Asimismo, ya que los péptidos derivados de ACTH se asocian con poca ó ninguna actividad esteroideogénica, los datos del presente estudio indican que el efecto de ACTH es independiente de la liberación de corticosteroides. Aunque estos péptidos son plenamente efectivos en la restauración del comportamiento provocado por hipofisectomía, carecen esencialmente de acción adrenocorticotropa y no mejoran la salud ó condiciones generales de los sujetos hipofisectomizados (Rogers y Jackson, 1987).

Para descubrir qué lugar del cerebro mediaba la restauración de la epilepsia inducida tras tratamiento con ACTH, se utilizaron ratas hipofisectomizadas a las que, además de implantación de electrodos y canulación intracerebroventricular, se les produjeron lesiones bilaterales en el nucleo parafascicular del tálamo (animales tomados como control se lesionaron en la corteza directamente encima del nucleo parafascicular). Se comprobó de esta forma que, lesiones bilaterales del tálamo medio posterior bloquearon la restauración de la epilepsia inducida por infusión de ACTH<sub>4-10</sub> en ratas hipofisectomizadas. Estos resultados indican que la acción de la ACTH depende en parte de mecanismos que radican en el tálamo. Todas estas posibilidades representan mecanismos importantes en los fenómenos de inducción de determinados comportamientos, pero el hecho de que la ACTH, actuando a través de mecanismos centrales, sea importante para ambos, resulta incuestionable.

*c.-Efecto de la Glándula Pineal sobre los niveles de ACTH:* La glandula pineal controla de algún modo los niveles de ACTH (Motta, y cols., 1971; Vaughan y cols., 1972), atribuyéndose el control de su secrecion a los órganos sensoriales y a la glandula pineal.

La glándula pineal puede controlar la función suprarrenal, y la administración de melatonina inhibe la liberación de corticosterona por la suprarrenal de la rata (Acuña y cols., 1982). Se ha demostrado que la pinealectomía induce un aumento significativo de la ACTH paralelamente al aumento de corticosterona (Acuña y cols., 1984). Además, resultados de otros estudios indican que la melatonina juega un papel impor-

tante en la regulación hormonal central especialmente en el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal, y que tiene efectos inhibitorios a este nivel (Ogle y Kitay, 1978; Vaughan y cols., 1972). No está claro el lugar en el cual la melatonina ejerce esta acción. La melatonina, a dosis fisiológicas, no tuvo efecto significativo sobre la liberación de ACTH (tanto de la basal como de la estimulada por CRF) en cultivos celulares de la hipófisis de la rata (Rosenthal y Strasman., 1988). Sin embargo, a dosis farmacológicas, la melatonina incrementó significativamente la liberación de ACTH estimulada por CRF y este efecto no fué más significativo al aumentar la dosis de CRF, lo que indica que existe cierta actividad agonista intrínseca entre melatonina y CRF pero no está claro un efecto aditivo. Así pues, podemos decir que la melatonina ejerce un efecto inhibitorio sobre el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal, y que este efecto no se produce a nivel hipofisario (Rosenthal y Strassman, 1988).

La escasa influencia del eje hipófisis-suprarrenal sobre el contenido de melatonina de la glándula pineal de la rata está constatado por Mark y cols., 1989, demostrando que un aumento en la densidad de los receptores de glucocorticoides en el SNC no altera la producción nocturna de melatonina por la pineal.

En base a todo lo anterior podemos concluir que los órganos sensoriales intactos y la glándula pineal son capaces independientemente de limitar la elevación en los niveles de ACTH que aparece en ratas suprarrenalectomizadas pero juntos potencian su efecto ya que se ha demostrado que hubo un mayor incremento en los niveles de ACTH de ratas suprarrenalectomi-

zadas sometidas a privación sensorial y a extirpación pineal que el obtenido en ratas controles, solo pinealectomizadas o solo sensorialmente privadas (Vaughan y cols., 1980).

**3.- Síntesis y Liberación de Péptidos Opiáceos:** Se han identificado tres familias de péptidos opiáceos endógenos: encefalinas, endorfinas y dinorfinas. Cada familia deriva de un polipéptido precursor genéticamente distinto y tiene su distribución anatómica característica. En la actualidad, a estos precursores se los suele designar como proencefalina (también proencefalina A), proopiomelanocortina (POMC) y prodinorfina (también proencefalina B). Cada uno de estos precursores contiene una cantidad de péptidos biológicamente activos, opiáceos y no opiáceos, que se detectaron en la sangre y diversos tejidos. Así, la POMC contiene la secuencia de aminoácidos de la hormona melanocitoestimulante ( $\gamma$ -MSH), adrenocorticotropina (ACTH) y  $\beta$ -lipotropina ( $\beta$ -LPH); en la secuencia de 91 aminoácidos de la  $\beta$ -lipotropina están la  $\beta$ -endorfina y la  $\beta$ -MSH.

La POMC solamente produce un péptido mayor (Nakanishi y cols., 1979), llamado  $\beta$ -endorfina, que es la secuencia C-terminal del aminoácido 31 de  $\beta$ -lipotropina, pero también contiene las hormonas hipofisarias ACTH y MSH. Otros productos identificados como derivados de POMC y de significado incierto son:  $\alpha$ -endorfina,  $\gamma$ -endorfina, la secuencia terminal 1-16 de  $\beta$ -endorfina y la secuencia N-terminal 1-17 de  $\beta$ -endorfina. Las concentraciones más altas de los péptidos derivados de la POMC están presentes en la hipófisis. También se encuentran en el hipotálamo, cerebro, tiroides, timo, intestino,

médula adrenal, páncreas, macrófagos del bazo, placenta, testículos y ovario, y parece ser sintetizada por la mayoría de ellos (Krieger, 1982; Loliat y cols., 1984; Imura, 1985).

En las células corticotropas de la hipófisis anterior, el principal producto del procesamiento de POMC es  $\beta$ -LPH (con su producto opioide primario  $\beta$ -endorfina), ACTH y el polipéptido aminoterminal N-POMC 1-76.

Mains y Eipper (1981) encontraron que la liberación basal de peptidos opiáceos de células de la hipófisis del ratón, incluye cantidades equimolares de ACTH,  $\gamma$ -LPH y  $\beta$ -endorfina. La noradrenalina estimuló la liberación Ca-dependiente de estos péptidos y no se encontró autoinhibición de los péptidos para su liberación.

Varios autores han estudiado la liberación de ACTH y endorfinas. Allen y cols. (1978) mostraron que un extracto hipotalámico que contenía CRF, estimuló significativamente la liberación de péptidos en una línea celular del ratón así como en cultivos primarios de la hipófisis anterior. Esta liberación fue inhibida por dexametaxona. Posteriormente, Przewlocki, Holet y Herz, (1980), observaron que  $\beta$ -endorfina es liberada de la hipófisis anterior en respuesta a K y a Ca y que esta liberación se incrementa tras administración de extractos hipotalámicos que contienen CRF ó de lisina-vasopresina. Corticosterona inhibió la liberación estimulada pero no la basal.

Vemer y cols. (1980), también estudiaron in vitro la liberación de  $\beta$ -endorfina y  $\beta$ -lipotropina de la hipófisis de la rata. Descubrieron que el material liberado de la hipófisis anterior no estimulada era 70%  $\beta$ -LPH y 30%  $\beta$ -endorfina.

Extractos hipotalámicos y lisina-vasopresina incrementaron en 3-4 veces la liberación de ambos péptidos. Por el contrario, en el lóbulo intermedio, el 97% del material liberado era  $\beta$ -endorfina. La isoprenalina incrementó en 3-4 veces la estimulación de la secreción espontánea de  $\beta$ -endorfina, y dopamina la inhibió. Así pues, los esteroides adrenales y los extractos hipotalámicos tienen poco efecto en el lóbulo intermedio, aunque sí lo tienen en la hipófisis anterior.

En el cerebro, las concentraciones de  $\beta$ -endorfina no se afectan por hormonas esteroideas ó stress (Rossier y cols., 1979). La administración crónica de opiáceos hace descender la concentración de  $\beta$ -endorfina en la hipófisis y en el cerebro (Holt y cols., 1978b).

***a-Receptores Opiáceos:*** Los estudios farmacológicos que utilizan una gama de ligandos opiáceos indican que dichos receptores se presentan en múltiples formas. Martin y cols. (1976), originalmente propuso la existencia de tres tipos distintos del receptor opiáceo, pero en los años recientes se han obtenido evidencias de la existencia de un gran número de tipos adicionales. El significado fisiológico del receptor opiáceo múltiple no está claro, porque no se sabe si los tipos de receptor supuestos son estructuras independientes o simplemente, diferentes lugares de unión de un complejo receptor opiáceo. Sin embargo, el concepto de receptores múltiples es de gran interés ya que diferentes receptores pueden mediar específicamente ciertos procesos fisiológicos, y por tanto, pueden ser activados o bloqueados selectivamente por agentes terapéuticos diseñados apropiadamente. En el campo de la neuroendocrinología, emergen estudios que

sugieren que el efecto de los péptidos opiáceos sobre sistemas endocrinos diferentes, está mediado por diferentes tipos del receptor; por la especificidad de sus efectos, parece que algún grado de selectividad les ha de ser conferida. Sin embargo, todos los ligandos opioides conocidos poseen alguna capacidad para unirse a los tipos de receptor identificados.

La clasificación de Martin de los receptores opiáceos múltiples incluyó un receptor  $\mu$  o receptor de morfina, un  $\kappa$  o receptor de ketozylazocina y un  $\sigma$  o receptor de N-alilnormetazocina. Después fueron postulados un encefalino receptor  $\delta$  y un  $\beta$ -endorfin o receptor  $\epsilon$ . Resultados de estudios recientes apoyan el concepto de múltiples tipos de receptor (o al menos lugares de unión múltiples); sin embargo, en términos de respuesta funcional y afinidad de unión solamente pueden distinguirse tres tipos de receptor ( $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$ ). El tipo  $\mu$  es el clásico receptor para morfina y es considerablemente más sensible al antagonismo por naloxona. El tipo  $\delta$  puede no ser verdaderamente opiáceo, ya que no presenta la actividad estereoespecífica de los otros tipos de receptor opiáceo. Además, no todos los efectos mediados por esta clase de receptor son naloxona reversibles, y por tanto parece que el receptor posee características opioides y no opioides.

El aislamiento de varios péptidos opiáceos y su clasificación en familias permite catalogar los tipos de receptor en asociaciones selectivas, y han sido identificados péptidos con selectividad relativa para  $\delta$  (encefalinas) y  $\kappa$  (dinorfinas) pero no para el receptor  $\mu$ . Sin embargo, ninguno de los péptidos opiáceos presenta especificidad por

el receptor y exhiben grados variables de selectividad. Ya que los péptidos opiáceos contienen la secuencia Met-encefalina o Lcu-encefalina, es muy probable que la selectividad sea conferida al receptor por la adición de residuos a los fragmentos C-terminales de estos pentapéptidos.  $\beta$ -endorfina es un potente agonista de ambos receptores,  $\mu$  y  $\delta$ , con una ligera preferencia por  $\delta$ , al menos in vitro; no presenta actividad potente para los receptores  $\kappa$ . Todas las encefalinas son potentes  $\delta$  agonistas y las dinorfinas  $\kappa$  agonistas.

Los descubrimientos anteriores enfatizan el importante papel que el procesamiento post-translacional pudiera jugar en la modulación de la actividad de los péptidos opiáceos.

La existencia de tipos y subtipos de receptor no definidos es otro factor a estudiar ya que se ha demostrado que la dinorfina (1-8) actúa en ciertas preparaciones en otro receptor diferente a los tipos  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$  (Carter y Lightman, 1986).

*b.-Significado Fisiológico de los Péptidos Opiáceos:*  
Dado el estado dinámico de la investigación en torno a los péptidos opiáceos, es difícil unificar conceptos de su función fisiológica. Sin embargo, su distribución anatómica en el sistema neuroendocrino pone de manifiesto su crucial contribución en el mantenimiento de la homeostasis. Actualmente se cree que los péptidos opiáceos ejercen su efecto neuroendocrino por medio del cerebro (principalmente del hipotálamo) y no a través de una acción directa sobre la hipófisis; sus efectos a través del hipotálamo están íntimamente asociados con el sistema aminérgico. Esta asociación también se extiende al sistema nervioso autónomo y a las áreas centrales que regulan

las funciones autonómicas (tales como el núcleo del tracto solitario) ya que poseen inmunoreactividad a los péptidos opiáceos y a los receptores para ellos (Carter y Lightman, 1986).

Algunas consideraciones, tales como la distribución de los péptidos opiáceos en el hipotálamo, hipófisis y médula adrenal; el hecho de que las  $\beta$ -endorfinas plasmáticas se originen de las células corticotropas de la hipófisis en cosecreción con ACTH y en respuesta a CRF y a arginina-vasopresina (Owens y cols., 1984; Imura, 1985), nos lleva a la conclusión de que las tres familias de péptidos opiáceos participan en el sistema que regula la respuesta fisiológica al stress, modulando los sistemas hormonales hipofisarios anterior y posterior (Carter y Lightman, 1986).

Una teoría habla en favor de que estos péptidos, para ejercer su acción en la analgesia asociada al stress han de alcanzar los receptores opiáceos del SNC a través del LCR (Gerner y cols., 1982). Algunas experiencias apoyan esta teoría. Así se ha comprobado que la hipofisectomía produce una caída de  $\beta$ -endorfinas en plasma y LCR (Schlachter y cols., 1983); la inyección intravenosa de  $\beta$ -endorfina a conejos produce su acumulación en LCR (Houghten y cols., 1980).

Otra teoría referente a como ejercen los péptidos opiáceos su influencia ante el stress apoya que estos péptidos se segregan dentro del cerebro durante el stress agudo y rápidamente se metabolizan o se reabsorben sin alterar significativamente sus concentraciones en LCR. Así, el stress inducido en monos incrementa las concentraciones plasmáticas de ACTH y  $\beta$ -endorfinas, pero no altera las concentraciones de estos

péptidos en el LCR (Kalin y cols., 1985). De igual modo se comprobó que el stress por inmovilización no tuvo efecto significativo sobre las concentraciones de ACTH y  $\beta$ -endorfinas en el LCR de ratas con la cisterna magna canulada (Kiser y cols., 1983).

Entre otras posibles acciones de los péptidos opiáceos se incluyen el control de la secreción de gonadotropinas (Everitt y Keverne, 1986), la regulación de la glucosa sanguínea (Reid y Yen, 1981) y la activación del sistema inmune (Blalock y cols., 1985). Pueden ejercer un efecto importante sobre otros sistemas funcionales, por ejemplo sobre la respiración (Florez y cols., 1980; Pokorski y cols., 1981), comportamiento sexual (Meyerson y Terenius, 1977), regulación neuroendocrina (Meites y cols., 1979), fenómenos cardiovasculares (Holaday y Faden, 1978; Carter y Lightman, 1986), actividad ansiolítica (Duka y cols., 1982), actividad convulsiva y anti-convulsiva (Frenk y cols., 1978), digestión (Konurek, 1978) y anestesia (Stoelting, 1980), la cual puede cambiar e incluso revertir el efecto producido por opiáceos exógenos (Carter y Lightman, 1986).

*c.-Péptidos Opiáceos en la Integración Neuroendocrina:* Desde que se conoce la distribución de los péptidos opiáceos y de sus receptores en el hipotálamo y en la hipófisis, podemos decir que el sistema opioide forma parte integral del eje neuroendocrino. Los péptidos opiáceos pueden ejercer su control hipofisario a tres niveles: actuando como neurotransmisores/neuromoduladores (NT/NM) en el cerebro y en la neurohipófisis, como factores reguladores transportados por el sistema sanguíneo portahipofisario ó como

factores paracrinicos en el interior de la hipófisis.

1.-*Péptidos opiáceos como NT/NM*: Una sustancia funciona como NT si ejerce su efecto sobre la actividad neuronal después de la activación de receptores neuronales (Frederickson, 1977; Duggan, 1980). En base a esto y a otros criterios las encefalinas fueron consideradas como sustancias neurotransmisoras casi desde su descubrimiento (Frederickson, 1977; Snyder, 1980).

La acción predominante de los péptidos opiáceos se basa en una depresión de la actividad espontánea en la mayoría, si no en todas las neuronas cerebrales. Los mecanismos iónicos de esta inhibición pueden variar según los diferentes tipos de receptor. De este modo, en unos casos interviene un incremento en la conductancia al potasio (receptor  $\mu$ ), mientras otros ejercen su efecto reduciendo la entrada de calcio en las terminales nerviosas (receptor  $\kappa$ ) y finalmente, cada tipo participa en un sistema diferente de segundos mensajeros (Carter y Lightman, 1986).

En contraste con sus acciones inhibitorias sobre la mayoría de las neuronas, se ha comprobado que los péptidos opiáceos estimulan las células piramidales del hipocampo. Esto se ha atribuido más a una desinhibición que a una estimulación directa, ya que resulta de una inhibición de las interneuronas GABAérgicas (Lee y colbs., 1980; Gahwiler, 1980). Nicoll y colbs. (1980) demostraron una acción similar de los péptidos opiáceos en otros circuitos neuronales y sugirieron que esta desinhibición puede ser un importante mecanismo de acción de los péptidos opiáceos en el SNC, y que las interneuronas inhibitorias GABAérgicas son los primeros

lugares de intercambio de los sistemas encefalinérgicos. En estudios posteriores se han encontrado conexiones entre el sistema opioide y los sistemas GABA-érgico y dopaminérgico, comprobándose que morfina y  $\beta$ -endorfinas modulan la actividad de las neuronas dopaminérgicas (Kamata, 1987).

Los estudios de Hokfelt y colbs. (1980) revelaron la coexistencia en una misma neurona de péptidos como met-enkefalina o sustancia P y norepinefrina o serotonina. Una de estas sustancias actuaría como NT y la otra como NM; en este caso, según Costa y colbs. (1981), el modulador es el péptido. En el caso de las  $\beta$ -endorfinas, su poca susceptibilidad a la degradación enzimática, su acción de larga duración y la estratégica localización de sus cuerpos celulares y terminales para su liberación al interior del sistema ventricular, son circunstancias que implican su papel neurohormonal. Además, su papel como NT no puede ser discutido (Frederickson y Geary, 1982). Más tarde, Carter y Lightman (1986), se postularon a favor de que quizás sea necesario un cocktail de péptidos opiáceos para aumentar apropiadamente una respuesta postsináptica. Uno de estos co-transmisores podría actuar como modulador postsináptico (terminando la respuesta del transmisor primario) o presináptico (inhibiendo la liberación de otros péptidos opiáceos). Así pues, el mecanismo de acción de los péptidos opiáceos en otros lugares del cerebro puede resultar de una interacción con el sistema de aminas biógenas. Como resultado de esta interacción, los péptidos opiáceos pueden modular la actividad hipotalámica o afectar directamente la secreción de factores hipofisiotropos. Tras algu-

nos estudios se ha sugerido que tales mecanismos moduladores se localizan en el nucleo arcuato y en el nucleo del tracto solitario (Carter y Lightman, 1986). Pero el principal mecanismo por el cual los péptidos opiáceos controlan la función hipofisaria parece ser una acción moduladora pre-terminal sobre las neuronas neurosecretoras. A nivel de la hipófisis anterior, probablemente actúan los opiáceos modulando la secreción de factores hipotalámico-hipofisarios (ya que se encuentran péptidos opioides y receptores para ellos en la eminencia media y en la neurohipófisis), aunque también es posible un efecto directo sobre sus células (Carter y Lightman, 1986).

*2.-Efectos Paracrinicos de los Péptidos Opiáceos:* Que los péptidos opiáceos hipofisarios puedan ejercer efectos locales o paracrinicos sobre la secreción hormonal aún está por demostrar. Sin embargo, se han obtenido pruebas experimentales que apoyan el papel de las  $\beta$ -endorfinas del lóbulo intermedio (y posiblemente del anterior) en la regulación de la liberación de AVP de la hipófisis posterior. Los bajos niveles de encefalinas y dinorfinas en la hipófisis anterior pueden ser funcionalmente relevantes en este contexto (Carter y Lightman, 1986).

*3.-Papel de los Péptidos Opiáceos en el control de la Hipófisis:* Pechnick y cols. (1985a,b) han mostrado que los cambios inducidos por los opiáceos en la liberación hormonal de la hipófisis anterior están mediados por múltiples receptores opiáceos y que en la secreción de ciertas hormonas puede participar más de un tipo de receptor. Los péptidos opiáceos ejercen su efecto modificando la liberación de CRF hipotalámico; así pues, se ha comprobado que las concentraciones

sistémicas de morfina producen cambios en el contenido hipotalámico de CRF, y que morfina estimula la secreción de CRF de islotes hipotalámicos (Buckingham, 1982).

Se ha demostrado que la administración crónica a ratas de agonistas opiáceos provoca una supresión del eje hipófisis-adrenal; por el contrario, el tratamiento con naloxona estimula la secreción de ACTH (Grossman y Rees, 1983).

Lamberts y cols. (1983) postulan que la hipófisis es un posible lugar de acción de esta supresión en la secreción de ACTH causada por opiáceos; sin embargo, los experimentos realizados *in vitro* aportan resultados contradictorios (Carter y Lightman, 1986). También hay pruebas de una modulación opioide directa sobre la corteza suprarrenal, pero no son del todo convincentes (De Souza y Van Loon, 1982).

Siegel y cols. (1982) comprobaron que en ratas tratadas con naloxona se potencia la secreción de ACTH inducida por stress, y que el tratamiento con dexametasona bloquea ambas respuestas. Estos autores piensan que la regulación por los péptidos opiáceos de la liberación de ACTH inducida por stress se produce a través del eje hipotalámico-hipófisis, ya que demostraron que cambios o diferenciaciones hipotalámicas no modifican significativamente el efecto de naloxona. Otras teorías proponen una interacción entre péptidos opiáceos y actividad noradrenérgica en la secreción de ACTH ligada al stress (Szafarczyk y cols., 1983).

Así pues, muchas evidencias indican una participación de los péptidos opiáceos en la liberación de ACTH durante el stress, pero los mecanismos implicados no se conocen.

Stubbs y cols. (1978) y Volavka y cols. (1979) comprobaron que la administración de agonistas opiáceos conlleva una disminución en los niveles circulantes de ACTH y cortisol; si por el contrario, damos antagonistas opiáceos, aumentan ACTH y cortisol.

El naloxone potencia la respuesta secretora de cortisol ante el stress inducido por gastroscopia (Morley y cols., 1980), mientras que morfina inhibe la elevación de cortisol durante la cirugía (Reir y cols., 1973).

La elevación de cortisol inducida por naloxone, puede ser bloqueada administrando previamente antagonistas  $\alpha$ -adrenérgicos, lo que sugiere que los péptidos opiáceos inhiben el eje hipófisis-suprarrenal en humanos, a través del sistema noradrenérgico (Grossman y Besser, 1982).

Los péptidos opiáceos pueden actuar disminuyendo la secreción de TRH o bloqueando el efecto de TRH a nivel hipofisario (Judd y Hedge, 1982). También descienden los niveles plasmáticos de PRL (Kiss y cols., 1985).

Sobre la hipófisis posterior, las evidencias indican que los péptidos opiáceos ejercen un efecto regulador de la liberación de vasopresina en relación con la respuesta ante el stress (Carter y cols., 1985). También se ha comprobado que la encefalina bloquea la estimulación de la liberación de AVP producida por angiotensina II. Asimismo, los péptidos opiáceos suprimen la respuesta de oxitocina en la lactación (Clarke y cols., 1979).

**d-Péptidos Opiáceos y Analgesia:** Parece ser que el circuito de acción de la analgesia inducida por stress y de la estimulación opioide empieza en la sustancia gris periacueductal (PAG). La microin-

yección de opiáceos en esta región produce analgesia que puede ser bloqueada por naloxone (Mayer y Price, 1976; Yaksh y Rudy, 1978). La estimulación eléctrica de esta zona también produce analgesia que puede ser, al menos parcialmente, antagonizada por naloxone (Abums, 1976; Hosobuchi y cols., 1979). Estos resultados son sorprendentes ya que los péptidos opiáceos generalmente tienen efectos inhibitorios sobre neuronas aisladas, incluidas las del área gris periacueductal (Frederickson y Norris, 1978; Wolstencroft y cols., 1978). Sin embargo, otros

estudios demuestran que los péptidos opiáceos localizados en el PAG causan un incremento en su actividad (Urca y cols., 1977). Los hallazgos anteriores podrían explicarse si los péptidos opiáceos tuvieran una acción desinhibidora en el PAG, y esto también ha sido postulado (Frederickson y Norris, 1978; Zieglansberger, 1979).

Así pues, el circuito sería el siguiente: cualquier estímulo doloroso o una estimulación eléctrica produce una activación de las neuronas encefalinérgicas del PAG, ésta a su vez inhibe la actividad tónica de la interneurona inhibidora GABA-érgica y como resultado de esta desinhibición se activa un sistema descendente espinal cuya primera conexión es el núcleo del rafe magnus (NRM). Existen datos anatómicos (Gallager y Peit, 1978; Abols y Basbaum, 1979) y electrofisiológicos (Shah y Dostrovsky, 1980) de la existencia de una conexión directa entre el PAG y el NRM. La estimulación del PAG (Fields y Anderson, 1978), la inyección sistémica de morfina (Oleson y Liebeskind, 1975) o la microinyección de morfina en el PAG (Behbehani y Pomeroy, 1978) estimulan las neuronas del

NRM. La estimulación de estas neuronas provoca inhibición de las neuronas espinotalámicas (Giesler y cols., 1981) y causa analgesia (Oliveiras y cols., 1975).

Este sistema descendente dorsal de la médula espinal parece ser, al menos parcialmente serotoninérgico. Se ha comprobado que la deplección de serotonina en el NRM redujo la analgesia inducida por estimulación (Akil y y Liebeskind, 1975) y por microinyección de morfina (Mohrland y Gebhart, 1980) en el PAG. Además, la administración sistémica o intratecal de antagonistas de serotonina, pero no en el PAG, redujeron la analgesia inducida por administración de morfina en el PAG (Yaksh, 1979b) o por estimulación del PAG (Hayes y cols., 1977).

Esta analgesia puede mantenerse durante periodos de actividad continua (como tras estimulación eléctrica del PAG) pero no por las encefalinas liberadas que se inactivan rápidamente después de que cese el estímulo). Sin embargo, algunas formas de analgesia tienen mayor duración que el estímulo original. Es probable que tal analgesia sea resultado de una liberación de  $\beta$ -endorfinas al LCR desde donde alcanzan los receptores en el PAG y se activa el circuito para largos periodos de tiempo, ya que las  $\beta$ -endorfinas son muy resistentes a la degradación enzimática (Marks y cols., 1977). Pero éste no es el único sistema capaz de producir analgesia, hay otros lugares del cerebro además del PAG a través de los cuales puede actuar la morfina para producir tal respuesta (Sato y cols., 1980; Millan y cols., 1980).

Como ya se ha dicho anteriormente, los

péptidos opiáceos actúan modulando los procesos nociceptivos. De tal modo reaccionan en la analgesia producida por acupuntura o por estimulación eléctrica (Chiang y cols., 1973; Mayer y Price, 1976). Para probar esto se ha estudiado la interferencia en la actividad del sistema opioide endógeno mediante el antagonista narcótico naloxone, que es capaz de bloquear tal analgesia (Willer y cols., 1981; Chiang y cols., 1973) y de producir hiperalgia en roedores (Jacobs y cols., 1974) y en humanos (Lasagna, 1965; Levine y cols., 1978b).

Para estudiar mejor este bloqueo en la actividad analgésica de los péptidos opiáceos producido por naloxone, se han administrado intracerebral o intraventricularmente encefalinas (Frederickson, 1977) y  $\beta$ -endorfinas (Pert, 1976; Frederickson, 1977), demostrándose que producen analgesia. Más tarde se comprobó que esta analgesia pudo ser bloqueada por naloxone, lo que indica una acción sobre los receptores opiáceos (Frederickson y Geary, 1982).

*e.-Péptidos Opiáceos y Glándula Pineal:* No hay ninguna duda acerca de la existencia de opioides en la glándula pineal. Mediante estudios inmunohistoquímicos se ha verificado que pequeñas neuronas localizadas en el septo y a lo largo de la cápsula de la glándula, presentan inmunoreactividad a la encefalina. Estas neuronas se localizan principalmente en zonas vasculares pero pueden alcanzar los lobulillos de la glándula y extenderse entre las células parenquimatosas (Moore y Sibony, 1988).

Se ha investigado en ratas el efecto de des-Tyr- $\gamma$ -endorfina (DT y E) (administrando 2  $\mu$ g de forma crónica o en una dosis aguda de 0,3

$\mu$ gr) sobre el contenido pineal de melatonina. Comparado con los controles, DT y E elevó significativamente el contenido pineal de melatonina y el máximo incremento se produjo con la dosis aguda (King y cols., 1981).

En animales de edad avanzada disminuyen los niveles de varios neuropéptidos (incluidos  $\beta$ -endorfinas y encefalinas) en áreas específicas del cerebro (Pradhan, 1980). La actividad biosintética de la glándula pineal también declina con la edad (Reiter y cols., 1981) y se reduce el pico nocturno de melatonina en animales y humanos (Touitou y cols., 1981; Iguchi, Kato e Ibayashi, 1982).

Se ha demostrado que también el efecto analgésico opioide es menor conforme avanza la edad, tanto en niveles absolutos como rítmicos (Spratto y Dorio, 1978). Si a ratones de tres grupos diferentes de edad administramos melatonina, aumenta el efecto analgésico opioide en los tres grupos durante el día y revierte el descenso nocturno producido en el grupo de mayor edad (Kavaliers, Hirst y Teskey, 1983). Sin embargo, un bloqueo en la actividad de la glándula minimiza la dependencia entre anaestesia opioide y edad, lo que indica que la glándula pineal modula el efecto analgésico de los péptidos opiáceos y también juega un papel importante en la respuesta a los opioides dependiente de la edad (Kavaliers, Hirst y Teskey, 1983).

#### F.- EL EJE PINEAL/H-H-SUPRARRENAL Y EL COMPLEJO RECEPTOR GABA-BNZ

La glándula pineal puede controlar la función suprarrenal, y así, la administración de aMT

inhibe la liberación de corticosterona por la suprarrenal de la rata, ya que estimula la 5- $\alpha$ -reductasa, enzima que cataboliza el esteroide a dihidro y tetrahidroderivados inactivos. Este efecto, primeramente observado en ratas hembra (Acuña y cols., 1982), llevó a postular la hipótesis de que la aMT, al inhibir la esteroidogénesis ovárica, disminuye los esteroides sexuales que, como el estradiol, inhiben la 5- $\alpha$ -reductasa, por lo que el efecto de la administración de la hormona pineal era mediado por la función ovárica. Sin embargo, estudios posteriores han demostrado un efecto similar en la rata macho, lo que llevó a la postulación de la existencia de un eje pineal-suprarrenal, en el que la aMT está directamente involucrada en la regulación de la función suprarrenal (Acuña y cols., 1984). La pinealectomía también induce un aumento significativo del ACTH paralelamente al aumento de corticosterona (Acuña y cols., 1984), aunque no se sabe si este aumento del ACTH se debe a un efecto primario de la aMT.

Por otro lado, hay evidencia que indica que las hormonas de la suprarrenal (y de la hipófisis) pueden influenciar la actividad del SNC (McEwen y cols., 1979). La corticosterona y otros glucocorticoides afectan cierto tipo de conductas en roedores y humanos (Bohus, 1979), que se acompañan de un descenso de noradrenalina y un aumento de serotonina en el cerebro (Fuxe y cols., 1970). A su vez, los esteroides suprarrenales regulan los receptores de BNZ en el cerebro del ratón (Miller y cols., 1988), mientras la ACTH regula los receptores de GABA en ratas (Kendall, McEwen y Enna, 1982). Todos estos hechos pueden implicar a la existencia de un me-

canismo periférico, dependiente de los corticoides suprarrenales, mediante el cual la aMT podría ejercer sus efectos sobre el complejo receptor GABA-BNZ en la corteza cerebral de la rata.

En este sentido, recientemente hemos comprobado que la adrenalectomía bilateral induce un aumento significativo en la  $B_{max}$  de los receptores de BNZ en la corteza cerebral de la rata a lo largo de las 24 horas de su ritmo circadiano, con un mayor incremento que se presenta a medianoche (Acuña y cols., 1990), mientras que

la hipofisectomía sólo tiene un efecto mucho menos notable. La hipofisectomía realizada en ratas adrenalectomizadas no modifica el efecto de ésta. La administración de corticosterona (5 mg i.p.) 24 h antes del sacrificio, normaliza los valores de  $B_{max}$  en ratas adrenalectomizadas. Este efecto de la corticosterona no se realiza sobre los sitios receptores de BNZ, ya que en los experimentos realizados in vitro, no se ha visto competencia entre el esteroide y el ligando usado para caracterizar el receptor de BNZ ( $^3H$ -flunitrazepan).

---

**OBJETIVOS**

---

## OBJETIVOS

Si bien los resultados anteriores implican a la pineal y su hormona aMT en la modulación del complejo GABA-BNZ de la corteza cerebral de la rata, el mecanismo de acción por el cual la aMT ejerce este efecto no está aún aclarado. Hay que tener en cuenta que los efectos centrales de la aMT pueden estar mediados por otros compuestos, como los péptidos opiáceos (Schroeder y cols., 1988), mientras que no puede descartarse un mecanismo en el que intervengan hormonas periféricas, como los corticoides suprarrenales o la ACTH y péptidos derivados (Acuña y cols., 1982; Acuña y cols., 1984; Acuña y cols., 1990).

En este sentido podemos indicar que la suprarrenal puede modificar los receptores de BNZ en la corteza cerebral de la rata, con la corticosterona como efector principal, y que en todo este mecanismo puede existir la integración del eje pineal-suprarrenal para modular la neurotransmisión inhibitoria central. El papel que pueda jugar la hipófisis, a través de la secreción de ACTH está menos claro, aunque no se puede descartar que derivados del ACTH, como los péptidos ACTH<sub>1-10</sub> y ACTH<sub>4-10</sub>, que presentan

importantes efectos conductuales a nivel del sistema nervioso central, pero pocos o ningún efecto corticotropo, puedan tener algo que ver con estos efectos. En consecuencia, nos hemos planteado como objetivo principal de este trabajo que se presenta como Tesis Doctoral, el estudio de los mecanismos centrales de acción de la melatonina sobre el receptor de benzodiazepinas en la corteza cerebral de la rata, mediante el análisis de dicho receptor por medio de las técnicas clásicas de unión de ligando radioactivo, utilizando para ello el [<sup>3</sup>H]-flunitrazepán, un agonista del receptor central de alta afinidad de las benzodiazepinas, que nos permite caracterizar muy precisamente dicho receptor. En este estudio pretendemos comprender si el efecto modulador de la aMT (y la glándula pineal) sobre dicho receptor central de BNZ es mediado por un mecanismo periférico (a través del eje pineal-suprarrenal, vía corticoides suprarrenales), o a través de un mecanismo central, en el que estén comprometidos algunos péptidos hipofisarios, como la ACTH y péptidos derivados, y los péptidos opiáceos.

---

**MATERIALES Y METODOS**

---

## I.- INSTRUMENTAL, REACTIVOS Y ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

### A.- INSTRUMENTAL.

- Material quirúrgico: pinzas, tijeras, bisturí, etc...
- Espongostan.
- Algodón
- Gasas estériles.
- Cemento dental y disolvente (Idopol).
- Arcón congelador (-20 °C).
- Congelador de -70 °C.
- Nitrógeno líquido.
- Estereotáxico Stoelting CO.
- Homogenizador Polytron (Kinematica, Suiza).
- Centrífuga refrigerada Damon/IEC B-20A.
- Contador de centelleo Betamatic (Kontron).
- Viales de contaje (Pharmacia).
- Agitador de tubos Termoline-Maximix.
- Agitador magnético Agimat 243.
- Balanza de precisión Saiter 414.
- Balanza de precisión Sartorius R 200 D.
- PHmetro Crison 2001.
- Espectrofotómetro Bausch & Lomb.
- Harvester cell LKB-Wallac 1295-001.
- Sistema de filtración Harvester Millipore.
- Bomba de aspiración IPS-12 de Ismantex.
- Filtros de fibra de vidrio GF/B.
- Tubos de incubación.
- Placas de incubación tipo ELISA.
- Tubos de centrifugación Damon/IEC.
- Pipetas de vidrio.
- Micropipetas de vidrio.
- Pipetas automáticas de 10 a 1000  $\mu$ l.

### B.- REACTIVOS.

1.- **Soluciones y tampones utilizados:** Se han utilizado las siguientes soluciones:

- Disolución de sacarosa (Panreac): 0,32 M.
- Tampón de lavado TRIS-ClH: solución 50 mM de TRIS (Panreac), que se lleva a pH 7.4 a 4°C con ClH al 35%.

2.- **Líquido de centelleo:** Se utiliza un cocktail líquido ya preparado, biodegradable, no tóxico y no inflamable, que se obtiene comercialmente de LKB-Pharmacia con la denominación de Optiscint 'HiSafe'.

3.- **Drogas y radioligando:** Para los estudios de unión de ligando, se usó el [ $^3$ H]-flunitrazepán ([ $^3$ H]-FNZ) como radioligando, con una actividad específica de 83.00 Ci/mmol (56,7 dpm/fmol), suministrada por New England Nuclear (U.K.).

Las otras drogas que se han utilizado son:

- Flunitrazepan (FNZ) (Roche).
- ACTH<sub>1-10</sub>
- ACTH<sub>4-10</sub>
- $\beta$ -endorfina ( $\beta$ -END).
- $\beta$ -lipotropina ( $\beta$ -LIP).
- Melatonina (aMT).
- Naloxone.

Todas ellas, excepto el FNZ, han sido suministradas por Sigma Chemical Co., St Louis (M.O., USA).

4.- **Determinación de proteínas:** Se sigue el procedimiento de Lowry y cols. (1951), que utiliza los

siguientes reactivos:

*a.-Solución estándar de albúmina bovina:* Se realiza una solución madre diluyendo 1 mg de albúmina en 1 mililitro de agua destilada. A partir de ésta se construye una curva estándar de ocho puntos (entre 20 y 600  $\mu$ gr/ml).

*h.-Reactivo de Lowry.* Está compuesto por la mezcla de las siguientes soluciones, que se conservan a 4 °C en cámara fría.

(1).-Solución A: -Carbonato sódico al 2% (Panreac).

-Hidróxido sódico 0.1 N (Panreac).

(2).-Solución B: -Tartrato sódico potásico al 2% (Merck).

(3).-Solución C: -Sulfato de cobre al 1% (Merck).

Se prepara inmediatamente antes de su utilización, mezclando 50 partes de A con una parte de B y una parte de C.

*c.-Reactivo de Folin-Ciocalteus:* Se obtiene comercialmente de Merck y su composición es:

- Wolframato sódico: 100 gr.
- Molibdato sódico: 25 gr.
- Acido fosfórico al 85%: 50 ml.
- Sulfato de litio: 150 gr.
- Bromuro sódico: 1 gr.
- Acido clorhídrico 12 N: 100 ml.
- Agua destilada: 1 litro.

5.-Anestesia: todos los animales, excepto el grupo de ratas gangliectomizadas (que como se explica más adelante se anestesiaron con éter, por la corta duración de la operación) se han anestesia-

do con Equithesin, cuya composición es:

- 21.25 gr de hidrato de cloral (Merck), disueltos en 49 ml de etanol (Panreac).
- 4.86 gr de pentobarbital sódico (Sigma).
- 198 ml de propilen-glicol (Panreac).
- 10.636 gr de  $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (Merck) disuelto en agua destilada.
- Se agrega agua destilada hasta completar 500 ml.

### C.- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Se utilizaron ratas Wistar macho de 200-230 gr. de peso, que se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas, temperatura ambiente de  $22 \pm 2$  °C, y libre acceso a comida y agua. Las ratas recién operadas se colocan individualmente en jaulas de plástico transparente durante al menos los tres días siguientes a la cirugía, para evitar en lo posible las infecciones.

A las ratas hipofisectomizadas se les dió para beber una solución de sacarosa al 5% conteniendo, en mg/l:

- ClNa: 2.03
- ClK: 86
- $\text{Cl}_2\text{Ca}$ : 36
- $\text{Cl}_2\text{Mn}$ : 154
- $\text{Cl}_2\text{Zn}$ : 1.0
- $\text{Cl}_3\text{Fe}$ : 0.06
- $\text{Cl}_2\text{Mg}$ : 0.12.

## II.- MANIPULACIONES EXPERIMENTALES.

### A.- PINEALECTOMÍA.

Se siguió la técnica descrita inicialmente por Hoffman y Reiter (1965), que ha sido modificada por nosotros.

Se anestesia el animal con Equithesin a dosis de 0.2 ml/100 gr. de peso por vía peritoneal. Una vez anestesiado, se corta el pelo de la zona que recubre la calota. Sobre esta zona se dan unas pinceladas de povidona iodada y se practica una incisión longitudinal que deja al descubierto fascias y periostio los cuales son eliminados mediante un cuidadoso raspado.

Cuando el hueso queda totalmente limpio y al descubierto, se abre una ventana circular en la calota cuyo centro es el punto de unión de las suturas laterales con la longitudinal. Abierta dicha ventana y levantada la tapa del hueso, quedan al descubierto los senos venosos (longitudinal y laterales) y la duramadre (*Figura 15*).

La pineal queda situada bajo la intersección de los tres senos venosos (*Figura 16*). Para su extracción se abre un pequeño ojal transversal en la duramadre por el que se introducen unas pinzas curvas que se deslizan hacia delante bajo la misma, cerrándose cuando se encuentran justo bajo la confluencia de los senos venosos. En este momento, se retira suavemente hacia atrás, extrayéndose así la glándula.

Las ligeras hemorragias que se producen durante todo el proceso se coartan con espongos-

tan. Finalizada la operación se colocan unos pequeñas porciones de espongostán sobre el orificio abierto en el cráneo y se procede a suturar la piel y administrar a la rata 0.2 ml de gentamicina por vía intramuscular.

La principal modificación de esta técnica con respecto a la de Hoffman y Reiter (1965) consiste en que estos autores para extraer la pineal seccionan y ligan uno de los senos venosos, para posteriormente levantarlo y extraer la pineal por la zona descubierta, mientras que nosotros dejamos intactos los senos.

Como controles se utilizaron animales con operación simulada. En estos animales se realiza todo el procedimiento quirúrgico descrito, incluyendo la introducción de las pinzas por el ojal de la duramadre, pero sin llegar a cerrarlas para extirpar la glándula.

### B.- HIPOFISECTOMÍA.

Se utilizaron dos grupos de ratas : uno corresponde a animales ya hipofisectomizadas adquiridos a través de Panlab (Barcelona). El otro grupo fué hipofisectomizado por nosotros en ratas anestesiadas con equithesin (0.2 ml/100 gr. de peso, i.p.), siguiendo el procedimiento inicialmente descrito por Sato y Yoneda (1966), modificado por nosotros. Esencialmente, utilizamos un aparato estereotáxico Stoelting, que tiene la particularidad de poseer las fijaciones auriculares huecas longitudinalmente y reguladas por sendos tornillos micrométricos (*Figura 17*). De esta forma, una vez colocado el animal en posi-

ción estereotáxica, se introduce una aguja hipodérmica por una de las fijaciones auriculares, avanzando suavemente a lo largo del canal auditivo, hasta que un ruido característico (un chasquido seco) indica que se ha perforado la membrana timpánica. Se mueve entonces el tornillo micrométrico regulador de la fijación auricular hasta que dicha fijación (y la aguja que lleva introducida) forma un ángulo de 90° con el eje longitudinal de la rata. Se introduce entonces la aguja hacia delante hasta que el bisel (hacia abajo) queda sobre la hipófisis. Para conseguir esta posición, se realiza previamente en ratas de similar peso y edad una serie de pruebas conducentes a determinar la profundidad a la que hay que introducir la aguja para situarla sobre la glándula. Una vez medida esta distancia, se coloca un tope en la aguja, consistente en un anillo metálico con un tornillo, que nos marca exactamente la profundidad a la que la introduciremos en los animales de experimentación. Cuando dicha aguja está en posición, se adapta una jeringa a la aguja, y se aspira firmemente con suaves movimientos de a ambos lados, hasta aspirar la glándula entera. En la mayoría de los casos es posible extraer la glándula en una pieza. Sólo se incluyeron en los experimentos los animales en los cuales la hipofisectomía (HPx) fué completa (lo que se verifica por autopsia).

### **C.- EXTIRPACIÓN DEL GANGLIO CERVICAL SUPERIOR**

Se anestesia el animal introduciéndolo en un

recipiente cerrado herméticamente durante unos segundos, en donde colocamos unos algodones empapados en éter etílico.

Una vez anestesiado el animal, se hace una incisión longitudinal en el cuello, a ambos lados de la tráquea. La incisión descubre fascias y planos musculares que se separan cuidadosamente hasta encontrar la bifurcación carotídea.

El ganglio cervical superior queda situado justo en el lado interno de la bifurcación carotídea; para su extracción se utilizan unas pinzas curvas de punta muy fina con las que se tira de él hacia fuera lenta y progresivamente.

Las pequeñas hemorragias que se producen durante todo el proceso se coartan con bolitas de algodón muy pequeñas. Finalizada la operación se procede a suturar por planos.

Como controles se utilizan animales con operación simulada, a los que se les realizó todo el procedimiento quirúrgico descrito, pero sin llegar a extirpar el ganglio.

### **D.- EXTIRPACIÓN DE LAS GLANDULAS SUPRARRENALES.**

Se anestesia el animal con Equithesin a dosis de 0.2 ml/100 gr. de peso por vía peritoneal.

Una vez anestesiado, se corta el pelo de la zona dorsal que recubre el polo renal. Sobre esta zona se dan unas pinceladas de povidona yodada y se abre un ojal en la piel con unas tijeras. La incisión deja al descubierto fascias y músculos que también se cortan.

Abierto el orificio, se introducen unas pinzas

rectas de punta gruesa con las que se extrae el riñón para localizar las glándulas suprarrenales entre la grasa del polo apical renal, procediendo entonces a una cuidadosa extirpación de dichas glándulas. Se introduce de nuevo el riñón en el peritoneo, y se sutura por planos.

Se procede del mismo modo en el lado contralateral. Finalizada la operación se administran a la rata 0.2 ml de gentamicina por vía intramuscular. Como controles se utilizaron animales con operación simulada, a los que se realizó todo el procedimiento quirúrgico descrito, pero sin llegar a extirpar la glándula.

#### **E.- IMPLANTACIÓN INTRACEREBRO-VENTRICULAR DE UNA CÁNULA.**

Se anestesia la rata con Equithesin a una dosis de 0.2 ml/100 gr de peso por vía peritoneal. Una vez anestesiada, se corta el pelo de la zona que recubre la calota y se coloca al animal en el estereotáxico.

Sobre la zona a operar se dan unas pinceladas de povidona iodada y se incide longitudinalmente. La incisión deja al descubierto fascias y periostio que se eliminan mediante un cuidadoso raspado de las mismas.

Cuando el hueso queda totalmente limpio y al descubierto, se toma como punto de referencia la intersección de la sutura longitudinal con ambas suturas fronto-parietales. A un milímetro lateralmente de este punto de referencia, se abre un orificio puntual en la calota y se introduce una cánula de acero inoxidable (de 0.6 mm de

diámetro y 1 cm de longitud) a una profundidad de 3.5 mm a partir de la duramadre (*Figura 18*). La salida de LCR por la cánula, así como su obstrucción se evitan mediante la colocación de un fiador en la misma. Las pequeñas hemorragias que se producen durante el proceso se coartan con espongostan. Finalizada la operación, se fija la cánula mediante cemento dental, de forma que el reborde del cemento quede por encima del nivel de la cánula, para evitar que la rata se la arranque. Posteriormente se procede a suturar la piel y se administran a la rata 0.2 ml de gentamicina por vía intramuscular.

#### **F.- ADMINISTRACIÓN DE DROGAS.**

A los 3 días (y en estudios seriados a los 7 y 15 días también) del procedimiento quirúrgico, se procede a la administración de las diferentes hormonas ó drogas utilizadas (melatonina, corticosterona, ACTH<sub>1-10</sub>, ACTH<sub>4-10</sub>,  $\beta$ -endorfina,  $\beta$ -lipotropina, naloxone).

Las vías de administración fueron: a) sistémica (subcutánea o intramuscular), para ver efectos generales, y b) intracerebroventricular, para descartar los efectos periféricos (*Figura 18*). Las dosis utilizadas se calcularon para obtener unas concentraciones en plasma o cerebro equiparables a las concentraciones fisiológicas de cada una de las hormonas. En este sentido, las dosis de melatonina usadas por vía subcutánea fueron de 10-800  $\mu$ g/kg de peso, y las de corticosterona por vía intramuscular de 5-10 mg/kg de peso. En administración intracerebroventricular

se utilizaron dosis de 5-20 ng para cada una de las hormonas y drogas. La administración tuvo lugar siempre a la misma hora para cada grupo. Transcurrida una hora después de la inyección, las ratas se sacrifican por dislocación cervical para su estudio.

Como controles se utilizaron animales con cánula implantada y, en su caso, operación simulada, a los que se les inyectaron 5  $\mu$ l de solución salina estéril.

### III- METODOS BIOQUIMICOS EMPLEADOS.

#### A.- PREPARACIÓN DE MEMBRANAS.

El animal se sacrifica mediante dislocación cervical y, tras cortar el cráneo, se extrae el cerebro inmediatamente y se coloca en una placa de petri sobre hielo picado (0-4 °C). Se aísla la corteza cerebral, se disecciona cuidadosamente la sustancia blanca, y se homogeneiza la sustancia gris en 12 volúmenes de sacarosa 0.32 M en la posición 5 de un homogenizador Polytron durante tres periodos de 5 segundos cada uno. El homogeneizado se centrifuga a 3.000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante se centrifuga de nuevo a 17.000 rpm durante 30 minutos. El precipitado obtenido se resuspende en tampón Tris ClH pH 7.4, 50 mM y se centrifuga a 17.000 rpm durante otros 30 minutos. Este paso se repite una vez más. El precipitado resultante con los sinaptosomas, se

congela a -20 °C hasta el ensayo (*Figura 19*).

En estudios previos hemos comprobado que hasta 30 días la congelación no afecta significativamente a la cinética del enlace. De todas formas, los experimentos de enlace se realizaron normalmente entre 24-72 horas.

#### B.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEINAS.

1.-Principio: El método, descrito por Lowry y cols. (1951), es un procedimiento colorimétrico en el que el color final es resultado de la interacción de proteínas y cobre en el medio (reacción del biuret) y de la reducción del reactivo fosfomolibdico por la tirosina y el triptófano presentes en la muestra problema.

2.-Procedimiento: Para preparar la curva estándar de albúmina se toman 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 y 600  $\mu$ l de la solución madre de albúmina bovina (1 mg/ml), que se completa hasta un mililitro con agua destilada. De cada una de estas disoluciones se toman 50  $\mu$ l de muestra (que contienen 1, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 y 30  $\mu$ gr de proteína), por triplicado (Tabla IV). De la muestra también se toman 50  $\mu$ l por triplicado.

A continuación, añadimos 1 ml de reactivo de Lowry, recién preparado, a cada uno de los tubos. Se agitan y dejan incubar a temperatura ambiente. Pasados 30 minutos, la reacción ha terminado y el color es estable. La densidad óptica se mide en un espectrofotómetro. Este aparato es ajustado con los blancos (tubos que contienen todos los reactivos pero no proteínas)

a una longitud de onda de 750 nm.

Se hace una representación gráfica de los valores de absorbancia de los puntos de la curva estándar frente a sus concentraciones respectivas (Figura 20). Por extrapoliación se obtiene el contenido en proteínas de la solución problema.

*a.-Cálculo de la concentración de la muestra:* El punto que se representa en las líneas de puntos en la Figura 20 sirve como ejemplo para el cálculo de la concentración de proteínas en una muestra:

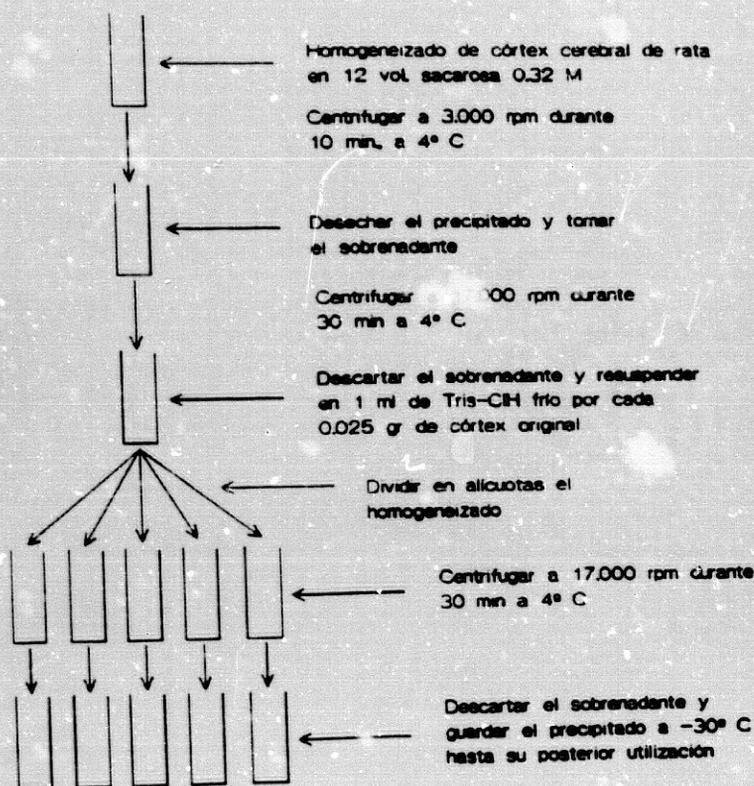


Figura 19: Esquema de la preparación de sinaptosomas.

$$[Prot.]_{ml} = \frac{[Prot.]_{50 \mu l} \times 1000 \mu l}{50 \mu l} = \frac{9.8 \mu l \times 1000}{50} = 196 \mu g/ml$$

TABLA IV

Preparación de la curva estándar de proteínas

Concentración (µg/ml)	Concentración (µg/ml)	Densidad Óptica
20	1	12
50	2.5	20
100	5	29
200	10	66
300	15	76
400	20	102
500	25	125
600	30	149

C.- REALIZACIÓN DEL ENSAYO DE UNIÓN CON <sup>3</sup>H-FLUNITRAZEPAN.

1.-Estudios de saturación: estos experimentos nos permiten, manteniendo la actividad específica

constante, estudiar la unión del ligando radiactivo a su receptor.

**a.-Principio:** la incubación de membranas plasmáticas de corteza cerebral de rata con concentraciones crecientes de [ $^3\text{H}$ ]-FNZ, en presencia y ausencia de un exceso de FNZ no radioactivo y la posterior medición de la radiactividad emitida por aquellas, nos permiten calcular la afinidad del radioligando para su receptor y extrapolar la concentración de receptores existentes en este tejido, mediante la transformación de Scatchard.

La radiactividad del [ $^3\text{H}$ ]-FNZ unido a las membranas en ausencia de FNZ frío (desplazador) representa a la totalidad de los sitios de unión existentes en las mismas. El radioligando no se une exclusivamente a sus receptores específicos, sino que también lo hace a otras proteínas de la membrana de forma inespecífica. La determinación de estos sitios de unión inespecíficos se realiza mediante la adición de una concentración saturadora de FNZ frío que compita con el radioligando por los sitios de unión específicos (receptores). La diferencia entre las uniones totales medidas en ausencia de FNZ frío y las que permanecen en presencia del desplazador representan las uniones al receptor específico.

**b.-Realización del ensayo:** a partir de la disolución comercial, que presenta una concentración de [ $^3\text{H}$ ]-FNZ de  $10.83 \mu\text{M}$ , se construye una curva estándar de  $^3\text{H}$ -FNZ de seis puntos con concentraciones finales en el medio de incubación comprendidas entre 0.5 y 6.5 nM (Tabla V). Las diluciones se realizan en etanol inmediatamente antes del ensayo y se mantienen a  $0-4^\circ\text{C}$ .

La solución desplazadora se prepara el

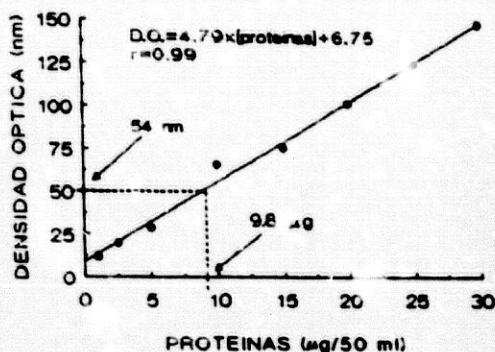


Figura 26: Curva de calibración de proteínas.

mismo día del ensayo mediante la disolución de flunitrazepam en etanol, para alcanzar una concentración final del ligando frío en el medio de incubación de  $10 \mu\text{M}$ .

Los sinaptosomas obtenidos del córtex cerebral se incuban con  $5 \mu\text{l}$  de [ $^3\text{H}$ ]-FNZ en concentraciones crecientes (0.5 a 6.5 nM, Tabla V), y  $10 \mu\text{l}$  de FNZ frío  $10 \mu\text{M}$ . Para ello resuspendemos las membranas (que teníamos congeladas a  $-20^\circ\text{C}$ ) en buffer de incubación Tris-ClH  $50 \text{ mM}$ , pH 7.4, tomando  $250 \mu\text{l}$  de esta suspensión que colocamos en los pocillos respectivos de una placa de ELISA, de  $400 \mu\text{l}$  de capacidad total cada uno. Las membranas se incuban por triplicado para cada concentración de [ $^3\text{H}$ ]-FNZ a  $0-4^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, la reacción se para por filtración rápida bajo presión negativa de las muestras incubadas, utilizando para ello un sistema de filtración tipo Harvester, y filtros de fibra de vidrio tipo GF/B. Los pocillos de la placa se lavan con un volumen total de 3 ml de buffer de lavado (cuya composición es idéntica a la del buffer de incubación). El tiempo transcurrido en todo el proceso de filtra-

TABLA V

Curva de [<sup>3</sup>H]-FNZ a partir de la solución comercial de 10.83 μM

Concentración en 1000 μl de volumen de incubación (nM)	Soluciones madre que preparamos (nM)	Modo de preparaci
6,5	1.300	18 μl de 10.83 μM + 130 μl etanol
4	800	100 μl de 1.300 nM + 60 μl etanol
3	600	100 μl de 800 nM + 30 μl etanol
2	400	80 μl de 600 nM + 40 μl etanol
1	200	60 μl de 400 nM + 60 μl etanol
0,5	100	60 μl de 200 nM + 60 μl etanol

do no excede de 5 segundos, lo que impide la disociación del radioligando de su receptor.

Los filtros se secan durante 1 hora a 80 °C en una estufa, se dejan enfriar, y se introducen en viales con cuatro mililitros de líquido de centelleo. Estos viales se dejan en oscuridad durante toda la noche, y se cuenta al día siguiente la radioactividad emitida durante cinco minutos en un contador de centelleo líquido.

Definimos entonces las uniones específicas (del radioligando con su receptor) a la cantidad de uniones totales que son desplazadas por un exceso de FNZ no radioactivo, y que en todos los casos fué mayor del 70% de las uniones totales. El número máximo de sitios de unión ( $B_{max}$ ), y la constante de disociación ( $K_D$ ), fueron calculadas por medio del Ligand-PC, un programa de software que nos proporcionó amablemente el Dr. P. J. Munson (Laboratory of Theoretical and Physical Biology, NIH, Bethesda, Md.), y cuyo fundamento más adelante se explica.

**2.-Estudios de competición:** en este caso determinamos la capacidad de unión del ligando variando la actividad específica.

**a.-Principio:** la incubación de membranas plasmáticas de corteza cerebral de rata con cantidades

fijas de [<sup>3</sup>H]-FNZ (1 nM) y concentraciones crecientes de FNZ frío (1-10 nM), y la posterior medición de la radioactividad emitida nos permiten calcular la afinidad del radioligando para su receptor, y extrapolar la concentración de receptores existentes en este tejido, mediante el recálculo de las actividades específicas.

La determinación de los sitios de unión específicos se hace de forma similar a los experimentos de saturación.

**b.-Realización del ensayo:** las membranas se incuban con cantidades fijas de [<sup>3</sup>H]-FNZ (1 nM) y 10 μl de FNZ no marcado en concentraciones crecientes (0.625 a 10 nM, Tabla VI). Las diluciones se realizan en etanol inmediatamente antes del ensayo y se mantienen a 0-4°C. En cada día de experimento se realiza una nueva curva de FNZ frío para evitar cualquier posible degradación de la droga.

En el momento de la incubación resuspendemos las preparaciones de membranas (que teníamos congeladas a -20 °C) en tampón de incubación y tomamos 250 μl de esta suspensión para cada pocillo de la placa de ELISA. La incubación de los sinaptosomas se realiza por triplicado para cada concentración de FNZ frío. Tras la incuba-

ción a 0-4°C durante 30 minutos se detiene la reacción mediante una rápida filtración del contenido de los pocillos de la placa bajo presión negativa a través de filtros de fibra de vidrio tipo GF/B, mediante un sistema de filtración tipo harvester, al igual que en el caso de los experimentos de saturación.

Asimismo, el medio de incubación y los procedimientos de contaje son similares a los de los experimentos de saturación. El número máximo de sitios de unión ( $B_{max}$ ), y la constante de disociación ( $K_D$ ), se calcularon igualmente mediante el programa de cálculo Ligand-PC, siendo la única diferencia con respecto al procedimiento de contaje por saturación la necesidad del recálculo de las actividades específicas, como se ha comentado.

#### IV.- ANÁLISIS MATEMÁTICO

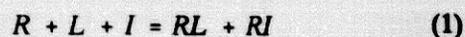
##### A.- ANÁLISIS DE LOS DATOS DE LA UNIÓN DRUGA-RECEPTOR

**1.-Introducción:** el objetivo de este capítulo es la exposición de los principales tipos de análisis matemáticos usados para transformar los datos obtenidos en los experimentos de unión a receptores, a parámetros más comprensibles y de mayor significado como constantes de afinidad, de disociación y densidad de receptores (Bylund, 1980).

Es necesario tener en cuenta que el modelo matemático así y las ecuaciones más usadas en el estudio del enlace droga-receptor equivalen a los

de la cinética enzimática.

Un experimento de unión de un ligando a su receptor, en el que es válida la Ley de Acción de Masas, puede representarse como sigue:



siendo:

$R$  = concentración de sitios de enlace libres

$L$  = concentración de radioligando libre

$I$  = concentración de droga competidora no marcada.

$RL$  y  $RI$  = concentración de receptor unido a cada ligando.  $RL$  son los enlaces específicos que medimos experimentalmente.

La concentración total de ligando ( $L_T$ ) es también conocida y está relacionada con la concentración de ligando libre mediante la expresión:

$$L_T = L + RL \quad (2)$$

En un sistema que siga la ecuación (1), pueden realizarse tres tipos de experimentos de unión:

**a.-Experimentos de saturación:** en los que se aumenta  $L_T$  de forma progresiva y se determina  $RL$  en el equilibrio ( $I = 0$ ).

**b.-Experimentos cinéticos:** en los que  $RL$  se determina en función del tiempo, permaneciendo  $L_T$  constante.

**c.-Experimentos de competición:** también llamados de inhibición ó de desplazamiento, en los que se determina  $RL$  en función de la concentración de droga fría permaneciendo  $L_T$  constante.

**2.-Experimentos de saturación:** en un experimento de saturación, la concentración de receptores permanece constante y  $RL$  se determina en el equilibrio en función de  $L$ . Por tanto la ecuación (1) se convierte en:

TABLA VI

Curva de FNZ frío (no radioactivo) a partir de una disolución 9.6  $\mu\text{M}$ 

Concentración en 265 $\mu\text{l}$ de volumen de incubación (nM)	Soluciones madre que preparamos (nM)	Modo de preparación
10	250	50 $\mu\text{l}$ de 9.6 $\mu\text{M}$ + 1870 $\mu\text{l}$ etanol
7.5	187.5	500 $\mu\text{l}$ de 250 nM + 166 $\mu\text{l}$ etanol
5	125	300 $\mu\text{l}$ de 187.5 nM + 150 $\mu\text{l}$ etanol
2.5	62.5	200 $\mu\text{l}$ de 125 nM + 200 $\mu\text{l}$ etanol
1.25	31.25	200 $\mu\text{l}$ de 62.5 nM + 200 $\mu\text{l}$ etanol
0.625	15.625	200 $\mu\text{l}$ de 31.25 nM + 200 $\mu\text{l}$ etanol

$$R + L = RL \quad (3)$$

Podemos definir la constante de disociación en el equilibrio ( $K_D$ ) como:

$$K_D = R \times \frac{L}{RL} \quad (4)$$

Como la concentración total de receptores  $R_T$  es la suma de las concentraciones de receptores ocupados y libres:

$$R_T = R + RL \quad (5)$$

combinando las ecuaciones (4) y (5) obtenemos como resultado:

$$RL \times K_D = (R_T \times L) - (RL \times L) \quad (6)$$

y despejando  $RL$ :

$$RL = R_T \times \frac{L}{K_D + L} \quad (7)$$

ecuación que describe una hipérbola rectangular y es matemáticamente equivalente a la ecuación

de Michaelis-Menten de una cinética enzimática (Figura 2I). Cuando  $L = K_D$  la ecuación (7) se transforma en:

$$RL = R_T \times \frac{L}{L + L} = \frac{1}{2} R_T \quad (8)$$

Por tanto, la constante de disociación en el equilibrio ( $K_D$ ) es igual a la concentración de ligando ( $L$ ) que ocupa el 50% del total de receptores.

**3.-Análisis de Scatchard (Rosenthal):** la ecuación (7) (Figura 2I) es una relación no lineal, por lo que  $R_T$  y  $K_D$  no se pueden determinar con facilidad mediante análisis gráfico. Sin embargo, esta ecuación puede transformarse de varias maneras para obtener una relación lineal. La transformación más comúnmente usada en los estudios de enlace a receptores es análoga a la desarrollada por Eadie (1942) y Hofstee (1952) para la cinética enzimática y fue propuesta por Scatchard (1949) para la interacción de proteínas con pequeñas moléculas.

En algunos estudios de enlace en los que se conocen la concentración y el peso molecular de la macromolécula es adecuado usar la representa-

ción y el análisis de Scatchard. Sin embargo, como en la mayoría de los estudios de enlace los dos parámetros anteriores son desconocidos, se usa la representación propuesta por Rosenthal (1967). Hay que tener en cuenta que estas tres transformaciones son matemáticamente equivalentes y, de hecho, la representación de Rosenthal se conoce rutinariamente como gráfica de Scatchard.

La ecuación de Rosenthal se deriva fácilmente de las ecuaciones (4) y (5), obteniéndose la siguiente expresión:

$$\frac{RL}{L} = \frac{R}{K_D} = -\frac{RL}{K_D} + \frac{R_T}{K_D} \quad (9)$$

Los parámetros de la ecuación anterior se representan por una serie de símbolos diferentes:  $RL = B$  (Bound);  $L = F$  (Free = libre), y  $R_T = B_{\max}$  (número máximo de sitios de enlace). Sustituyendo en la ecuación anterior (9):

$$\frac{B}{F} = -\frac{1}{K_D} \times B + \frac{B_{\max}}{K_D} \quad (10)$$

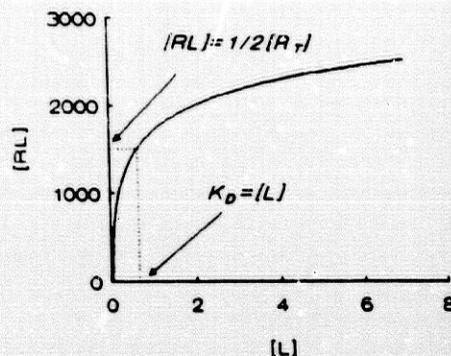


Figura 21: Curva de saturación del receptor.

Los datos obtenidos en un experimento típico de saturación con  $[^3\text{H}]$ -FNZ en sinaptosomas de corteza cerebral de rata se presentan en la Tabla VII, y nos permiten representar gráficamente la ecuación (10) (Figura 22). Las tres primeras columnas son las de los datos experimentales del ensayo. En la primera de ellas se listan las concentraciones teóricas del radioligando en el volumen final de incubación ( $5\mu\text{l}$  de  $[^3\text{H}]$ -FNZ en  $265\mu\text{l}$ ), y en la 2ª columna las concentraciones reales calculadas tras contar la radioactividad de la curva. Las columnas 3ª y 4ª

TABLA VII

Transformación de Scatchard de los datos obtenidos en un experimento de saturación con  $[^3\text{H}]$ -FNZ en sinaptosomas de corteza cerebral de rata (concentración de proteínas = 0.2 mg/ml; actividad específica del  $[^3\text{H}]$ -FNZ = 33.8 dpm/fmol)

$[^3\text{H}]$ -FNZ teórico (nM)	$[^3\text{H}]$ -FNZ real (nM)	dpm Total	dpm Inespec.	dpm Específico	$[^3\text{H}]$ -FNZ unido (fmol/ml)	B (fmol/mg prot.)	F (nM)	B/F (fmol/mg prot. nM)
0.5	0.43	1606	158	1448	42.84	214.20	0.39	549.23
1	0.88	2333	117	2216	65.56	327.80	0.81	404.69
2	1.53	3459	230	3229	95.53	477.65	1.44	331.70
3	2.70	4212	540	3672	108.64	543.20	2.59	209.73
4	3.86	4656	526	4130	122.19	610.95	3.74	163.36
6.5	6.49	5559	1397	4162	123.14	615.70	5.87	104.89

Mª Dolores Gomar Aragón

son las dpm totales e inespecíficas unidas (definidas por 10  $\mu$ M de FNZ frío), respectivamente.

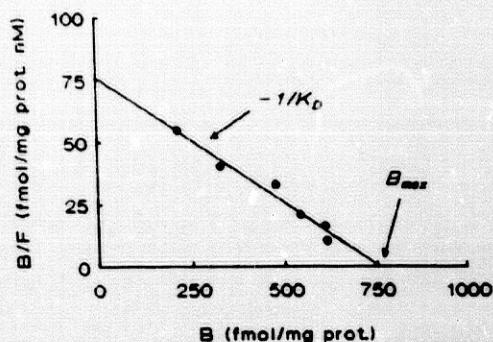
La 5ª columna lista las dpm específicamente unidas, esto es, la diferencia entre las columnas 3ª y 4ª. La 6ª columna es la concentración de radioligando unido, expresada en fmoles/ml, obtenida dividiendo las dpm específicamente unidas por la actividad específica del radioligando y por el volumen de incubación. La 7ª columna es la concentración de receptores (B), expresada en fmoles/mg de proteínas, para lo que se dividen los fmoles unidos entre los mg de proteínas presentes en la suspensión de membranas.

La concentración de radioligando libre (F, nM; columna 8ª), se calcula restando a la concentración total añadida (columna 2ª) la concentración unida específicamente (columna 6ª). En la columna 9ª se representa el cociente B/F.

En consecuencia, de la *Figura 22* podemos obtener los valores de la  $K_D$ , ya que ésta es numéricamente equivalente a la inversa negativa de la pendiente de la recta. Además, la intersección en el eje de abscisas (es decir, cuando el cociente B/F = 0) representa la concentración de sitios receptores, y es igual a  $B_{max}$ . Por lo tanto, es relativamente fácil calcular  $K_D$  y  $B_{max}$  bien gráficamente o por análisis de regresión lineal de B/F vs B.

4.-Análisis de Hill: la ecuación:

$$B = B_{max} \times \frac{F^n}{K_D^n + F^n} \quad (11)$$



*Figura 22:* Transformación de Scatchard de los datos representados en la Tabla IV.

es una forma generalizada de la ecuación (7), empleada por Hill (1909) para describir la unión del oxígeno a la hemoglobina. En este sistema, llamado de cooperatividad positiva, el enlace de cada molécula de ligando a la proteína favorece el enlace de la siguiente molécula. La ecuación de Hill es una transformación logarítmica de la ecuación anteriormente enunciada:

$$\log \frac{B}{B_{max} - B} = n \times \log F - \log K_D^n \quad (12)$$

La representación gráfica del  $\log \frac{B}{B_{max} - B}$

frente al  $\log F$ , da lugar a una recta cuya pendiente corresponde al llamado número ó coeficiente de Hill. Si la representación no es lineal,

$n_H$  es la pendiente cuando  $B = \frac{1}{2} B_{max}$ , es decir,

cuando  $\log \frac{B}{B_{max} - B} = 0$ .

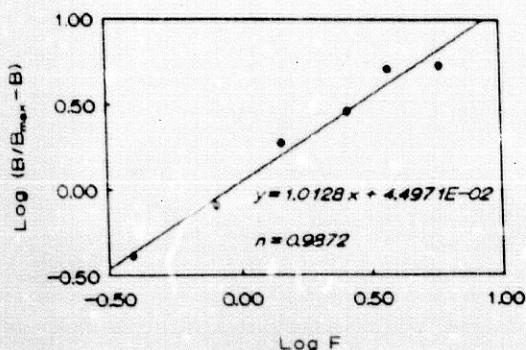


Figura 23: Representación gráfica de Hill

Para los sitios de unión con cooperatividad altamente positiva,  $n_H$  indica el número de sitios receptores. En el caso de sitios que no son altamente cooperativos, se obtienen valores de  $n_H$  no integrables, por lo que  $n_H$  nunca podrá exceder al número de sitios de enlace.

En la Tabla VIII se representan los valores obtenidos a partir de la transformación logarítmica de los datos obtenidos por el análisis de Scatchard del ejemplo anterior (Tabla VII y Figura 22), lo que nos permiten obtener la representación de Hill, que se refleja gráficamente en la Figura 23.

4. Experimentos de inhibición del enlace: el tercer tipo de experimentos basados en la ecuación (1), consiste en mantener  $R_T$  y  $RL$  constantes y variar la concentración del ligando no marcado. Como podemos observar en la ecuación (1), paralelo al aumento de  $I$ , se incrementará  $RI$ , a la vez que el descenso de  $R$  ocasionará una reducción de  $RL$ . Puesto que se trata de una inhibición competitiva, estos experimentos son llamados a menudo estudios de competición.

Para un sistema en el que sea válida la Ley de Acción de Masas, la siguiente ecuación puede derivarse a partir de la ecuación (1):

$$B = \frac{B_{max} \times F}{F + K_D \times (1 + \frac{I}{K_i})} \quad (13)$$

en donde  $K_i$  (constante de inhibición) es la constante de disociación en el equilibrio, definida

$$\text{como } K_i = R \times \frac{I}{RI} \quad . \text{ Cuando } I = 0,$$

la ecuación (13) se reduce a la ecuación (7). La utilidad de estos estudios radica en la fácil determinación de la potencia de cualquier droga para el sitio de enlace del radioligando.

TABLA VIII

Análisis de Hill a partir de los datos obtenidos en la transformación de Scatchard de la Tabla IV

$[^3H]$ -FNZ teórico (nM)	$[^3H]$ -FNZ real (nM)	B (fmol/mg prot.)	$B_{max}-B$ (fmol/mg prot.)	$B/(B_{max}-B)$	Log $B/(B_{max}-B)$	F (nM)	Log F
0.5	0.43	214.20	515.80	0.41	-0.387	0.39	-0.408
1	0.88	327.80	402.20	0.81	-0.091	0.81	-0.091
2	1.53	477.65	252.35	1.89	0.276	1.44	0.158
3	2.70	543.20	186.80	2.90	0.462	2.59	0.413
4	3.86	610.95	119.05	5.13	0.710	3.74	0.572
6.5	6.49	615.70	114.30	5.38	0.730	5.87	0.768

M<sup>a</sup> Dolores Gomar Aragón

La relación entre  $K_i$  e  $IC_{50}$  se puede derivar fácilmente. Por definición,  $IC_{50}$  es la concentración de competidor que inhibe el 50% de las uniones del radioligando. De la ecuación (13):

$$\frac{B_{\max} \times F}{F + K_D \times (1 + \frac{IC_{50}}{K_i})} = \frac{1}{2} \times \frac{B_{\max} \times F}{F + K_D}$$

$$2F + 2K_D = F + K_D \times (1 + \frac{IC_{50}}{K_i})$$

$$F + K_D = K_D \times (\frac{IC_{50}}{K_i})$$

$$K_i = K_D \times \frac{IC_{50}}{F + K_D}$$

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{F}{K_D}} \quad (14)$$

La ecuación (14) se emplea rutinariamente para calcular la  $K_i$  a partir del valor de  $IC_{50}$  hallado experimentalmente (ecuación de Cheng

y Prusoff, 1973).

**a.-Determinación del  $IC_{50}$ :** El método más simple para la determinación del  $IC_{50}$  de una droga determinada es la gráfica semilogarítmica dosis-respuesta. El logaritmo de la concentración (en abscisas) se representa frente al porcentaje de uniones específicas (en ordenadas).

La Tabla IX representa los datos obtenidos para un experimento de inhibición del enlace de [ $^3H$ ]-FNZ con diferentes concentraciones de FNZ no marcado. La concentración que inhibe un 50% de los enlaces ( $IC_{50}$ ) está comprendida entre 1.8 y 2.6 nM. Las uniones inespecíficas (294 dpm) se definen con una concentración de 10  $\mu$ M de FNZ frío.

#### B.- ANÁLISIS DE LOS DATOS DEL ESTUDIO DE RECEPTORES.

El programa Ligand-PC, desarrollado por Munson (1980-1984), es un sistema que permite el análisis y representación gráfica, según el modelo más adecuado (utilizando para ello un

TABLA IX

Datos experimentales de una curva de competición de [ $^3H$ ]-FNZ por FNZ frío ([ $^3H$ ]-FNZ = 1.61 nM; [prot.] = 1.08 mg actividad específica = 56.7 dpm/fmol).

[ $^3H$ ]-FNZ frío (nM)	Uniones Totales (dpm)	Uniones Específicas (dpm)	% Uniones Específicas	% Inhibición del Enlace
0	5385	5091	100	0
0.125	4435	4141	81.3	18.7
0.625	3626	3332	65.44	34.56
1.25	3224	2930	57.55	42.45
2.5	2748	2454	48.20	51.80
5	2308	2014	39.55	60.45
7.5	1374	1080	21.21	78.79
10	494	200	4.010	95.99
10000	294			

método de cálculo iterativo que realiza el mejor ajuste de los puntos a la recta correspondiente), de los datos obtenidos en los experimentos de unión a receptores; realizando una estimación de los parámetros cinéticos del receptor. Es muy simple de utilizar y no requiere el aprendizaje de ningún lenguaje de ordenador ya que se utilizan los datos experimentales sin transformar respondiendo a cuestiones sobre la concentración, peso molecular o actividad específica del ligando/s utilizados.

El Ligand-PC está estructurado en cuatro programas. Los dos primeros, *Scapre* y *Scahot*, están diseñados para transformar los datos obtenidos por el investigador en el formato requerido por el tercer programa, *Scafit*, para realizar su procesado. *Scrape* se usa para los experimentos de desplazamiento, permitiendo el uso de varios ligandos al mismo tiempo. Para los experimentos de saturación se usa *Scahot*. El cuarto programa, *Scgraf*, realiza la representación gráfica de los datos, permitiendo al usuario observar la bondad de los mismos y si siguen el modelo propuesto. Realiza dos tipos de representaciones gráficas: desplazamiento (B/T vs T, y la representación de Scatchard (B/F vs F).

En la mayoría de nuestros experimentos, hemos utilizado el procedimiento de competición para el análisis cinético del receptor de alta afinidad de FNZ, ya que este tipo de experimentos permite un ahorro importante de radioactivo, con el consiguiente (e importante) ahorro económico. El Ligand-PC, a partir de los datos obtenidos por inhibición, traza una curva de competición y obtiene el  $IC_{50}$ . Esta curva se representa

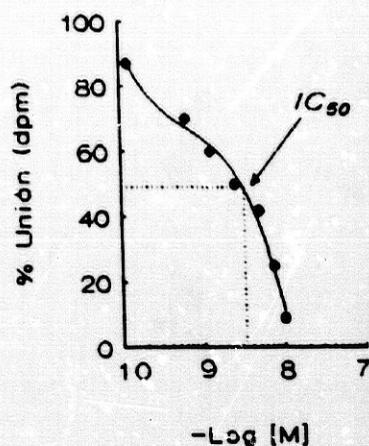


Figura 24: Curva de competición. Datos de la Tabla VI.

en la **Figura 24**, obtenida a partir de los datos de la **Tabla IX**.

Por otro lado, el Ligand-PC mediante el recálculo de las actividades específicas de cada uno de los puntos usados en el experimento, realiza la transformación de Scatchard de esa curva de competición, lo que hace más fácil la determinación de los parámetros cinéticos de interés ( $K_D$  y  $B_{max}$ ).

En síntesis, el recálculo de las actividades específicas es necesario puesto que al utilizar una concentración constante y pequeña de ligando radioactivo (alrededor de 1 nM) en el medio de incubación, al que se añaden cantidades crecientes y mayores de la misma droga no radioactiva (1-10 nM), se diluye progresivamente la actividad específica original. Por tanto, para una correcta cuantificación del ligando necesitamos hacer esta corrección, siguiendo la siguiente fórmula:

$$\frac{[C_T]}{[C^*]} = f \quad , \quad \frac{A_{e^*}}{f} = A_e \quad (15)$$

donde,

$[C_T]$  = concentración total (radioactivo más frío) de la droga en el medio de incubación.

$[C^*]$  = concentración del radioactivo en el medio de incubación.

$A_e$  = actividad específica del radioligando usada en los experimentos.

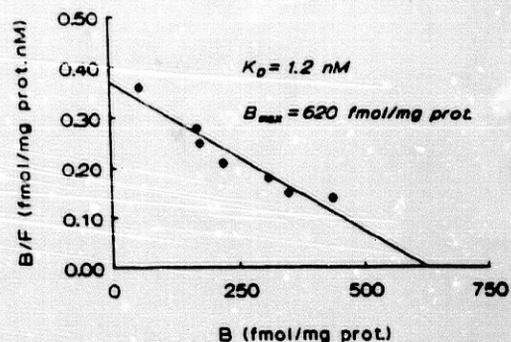
$A_e$  = actividad específica recalculada.

$f$  = factor de corrección.

La *Figura 25* representa un Scatchard obtenido a partir de los datos representados en la *Tabla IX* (y *Figura 24*), después del recálculo de las actividades específicas.

### C.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados presentados se expresan en todos los casos como la media  $\pm$  el error estándar de la media (ESM). El número de animales utilizado en cada grupo es variable, dependiendo del tipo de estudio realizado (ritmo circadiano, cinética tiempo-dependiente, estudios agudos o crónicos, etc.). Por ello, para facilitar su lectura, en cada tabla se indica el número de animales utilizado para cada grupo.



*Figura 25: Scatchard obtenida de una curva de competición, por recálculo de las actividades específicas.*

Cuando se trata de comparar las medias de dos grupos experimentales, se utilizó el test de la  $t$  de Student.

Para el análisis de la significación de los puntos obtenidos en los estudios de ritmo circadiano, se usó el análisis de la varianza (ANOVA), al igual que cuando se trataba de comparar más de dos grupos experimentales. En su caso, se aplicó el test de Student-Newman-Keuls.

Todo el análisis estadístico se realizó mediante el paquete de estadística BMDP (v. PC90).

---

**RESULTADOS**

---

L-DE LAS MANIPULACIONES DE LOS EJES PINEAL-SUPRARRENAL E HIPOTALAMO-HIPOFISARIO-SUPRARRENAL SOBRE LA CINÉTICA DEL RECEPTOR CENTRAL DE ALTA AFINIDAD DE FNZ

En una primera etapa de este trabajo, hemos estudiado el receptor de alta afinidad de benzodiazepinas en la corteza cerebral de la rata, mediante el uso de [<sup>3</sup>H]-FNZ como ligando, determinando los parámetros  $K_D$  y  $B_{max}$  que caracterizan la cinética del enlace. El paso siguiente consistió en estudiar el efecto que la pinealectomía (Px) y la denervación de la pineal tienen sobre dichas constantes cinéticas. Con el

fin de comprobar la existencia de un mecanismo periférico de acción de la melatonina (aMT), estudiamos el efecto de la suprarrenalectomía sobre la cinética de dicho receptor central de BNZ. En último lugar, se estudió si tanto la aMT como la corticosterona pueden afectar al receptor central de BNZ por un mecanismo directo, es decir, si existe o no competencia directa de esas hormonas por dicho receptor.

A.- EFECTOS DE LA MANIPULACION PINEAL.

1.-Resultado de la Px En la Tabla X se representan los cambios en la  $K_D$  y  $B_{max}$  encontrados en las preparaciones de membranas de corteza parietal de ratas Px o SPx y sacrificadas (entre 9-11 a.m.) a los 7 días de la operación. La  $B_{max}$  de la unión de alta afinidad del FNZ disminuye significativamente tras la pinealectomía, mientras

que la afinidad ( $K_D$ ) no muestra cambios significativos. La Figura 32 representa las gráficas de Scatchard típicas de la unión de [<sup>3</sup>H]-FNZ en dichos grupos.

2.-Resultado de la GCSx De forma similar al análisis anterior, se estudió el efecto de la GCSx y SGCSx sobre la  $K_D$  y  $B_{max}$  en la corteza parietal de ratas a los 7 días de la operación, presentándose los resultados en la Tabla X. Se observa que, análogamente al caso anterior, la

TABLA X  
Efectos de la Px y la GCSx sobre el receptor central de BNZ

Grupo Experimental	$K_D$	$B_{max}$
SPx	1.01 ± 0.3	640 ± 13.5
Px	1.23 ± 0.4	420 ± 21.2 <sup>a</sup>
SGCSx	1.11 ± 0.2	630 ± 17.9
GCSx	0.98 ± 0.2	435 ± 13.1 <sup>a</sup>

n = 6; a: p < 0.05

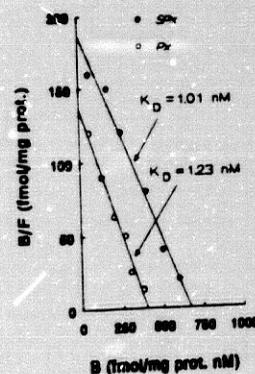


Figura 32: Efecto de la Px sobre la unión del FNZ

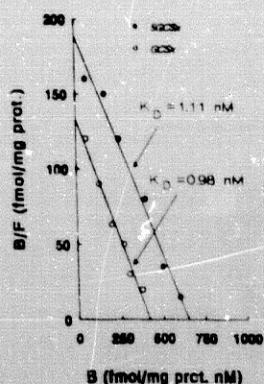


Figura 33: Efecto de la GCSx sobre la unión de FNZ.

gangliectomía induce un descenso significativo del número de sitios receptores ( $B_{max}$ ), sin cambios significativos en la afinidad ( $K_D$ ). En la Figura 33 se presentan los Scatchard típicos de este grupo.

3.-Ritmo circadiano del receptor de alta afinidad de FNZ en el cerebro de la rata intacta: Los cambios en la  $B_{max}$  y  $K_D$  obtenidos en cerebros individuales de las ratas sacrificadas cada 4 horas durante un ciclo de 24 h, se representan en la Figura 34. Los valores de  $B_{max}$  indican una oscilación diaria, con un máximo de sitios de unión a las 24 h. Asimismo, se observa un signifi-

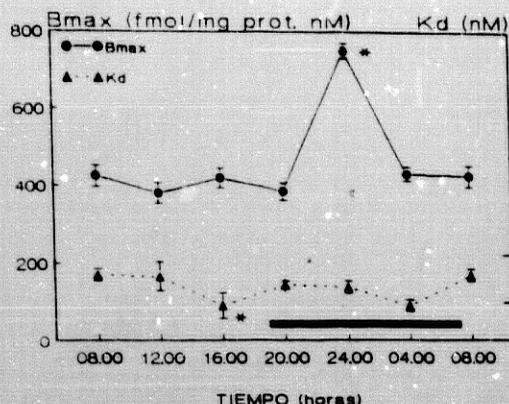


Figura 34: Ritmo circadiano del receptor de FNZ.

cativo descenso de la afinidad (valores más altos de  $K_D$ ) durante la noche, coincidiendo con el máximo en la  $B_{max}$

4.-Efecto de la Px sobre el ritmo circadiano del receptor de alta afinidad de FNZ en el cerebro de la rata: En la Tabla XI se representa la variación diaria de la  $K_D$  y  $B_{max}$  de diferentes grupos de ratas pinealectomizadas y sham-pinealectomizadas 7 días antes y sacrificadas cada 4 horas durante un ritmo de 24 h. Se observa como más característico el hecho de que la Px disminuye de forma significativa la  $B_{max}$  a lo largo del día, anulando el ritmo circadiano que se produce en

TABLA XI

Ritmo circadiano del receptor central de BNZ en ratas normales y Px

Hora del día	Normales		SPx		Px	
	$K_D$	$B_{max}$	$K_D$	$B_{max}$	$K_D$	$B_{max}$
0800	1.41 ± 0.2	430 ± 23.5	2.00 ± 0.5	460 ± 21.3	2.80 ± 0.7	400 ± 28.4
1200	2.00 ± 0.4	390 ± 35.1	1.80 ± 0.6	410 ± 54.2	2.20 ± 0.6	280 ± 13.1 <sup>b</sup>
1600	1.00 ± 0.3	420 ± 38.8	2.40 ± 0.6	430 ± 48.1	1.80 ± 0.4	405 ± 22.8
2000	1.40 ± 0.5	430 ± 23.1	2.00 ± 0.5	410 ± 44.8	2.30 ± 0.6	410 ± 37.5
2400	1.30 ± 0.4	720 ± 42.6 <sup>a</sup>	2.10 ± 0.3	730 ± 56.4 <sup>a</sup>	2.20 ± 0.4	420 ± 32.4 <sup>b</sup>
0400	1.20 ± 0.3	560 ± 37.4	2.10 ± 0.3	580 ± 35.2	2.40 ± 0.7	380 ± 27.6

n = 6 para cada punto horario; a: p < 0.05 vs resto puntos horarios; b: p < 0.05 vs SPx y normales

retas intactas. Además, la Px produce un significativo descenso de la  $B_{max}$  a las 12 h. La afinidad sigue unas variaciones paralelas a las de la  $B_{max}$  disminuyendo por la noche, aunque los cambios no son muy significativos.

**5.-Efecto de la aMT sobre la unión de [ $^3$ H]-FNZ en el cerebro de la rata Px.** Para comprobar si la aMT, una hormona de la glándula pineal que presenta unos efectos endocrinos y conductuales importantes, pudiera ser la responsable de los efectos que la Px produce en la unión del [ $^3$ H]-FNZ a las membranas de corteza parietal de la rata, se hizo un estudio dosis-respuesta de ese indol, cuyos resultados se indican en la Tabla XII. De esta forma, podemos apreciar que una dosis tan pequeña de aMT como 25  $\mu$ g/kg de peso, produce ya una respuesta significativa y revierte el efecto de la Px. La aMT se inyectó vía s.c. a las 9 h de la mañana en ratas pinealectomizadas 7 días antes, y los animales se sacrificaron 3 h más tarde. El efecto de la aMT se manifiesta fundamentalmente sobre la  $B_{max}$ , sin efectos aparentes en la  $K_D$ . Los Scatchards correspondientes a estos experimentos dosis-respuesta de

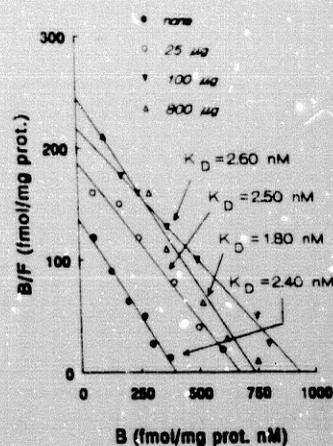


Figura 35: Efecto dosis-respuesta de la aMT.

aMT se representan en la Figura 35.

**6.-La aMT no compite "in vitro" con el receptor de alta afinidad de FNZ en el cerebro de rata:** Los efectos anteriores, que demostraban que la aMT era la hormona de origen pineal responsable de los efectos de la Px sobre el receptor de FNZ en la corteza parietal de la rata, nos llevó a investigar si este indol producía sus efectos por competición con el FNZ en su sitio receptor. Como puede observarse en la Figura 36, el papel que la aMT tiene sobre los sitios de unión de FNZ no depende de un efecto directo de la hormona en esos sitios, ya que concentraciones

TABLA XII

Efecto dosis-respuesta de la administración de aMTx sobre el receptor central de FNZ en ratas Px

Dosis de aMT ( $\mu$ g/kg)	$K_D$	$B_{max}$
0	$2.40 \pm 0.2$	$410 \pm 21.3$
10	$2.00 \pm 0.5$	$440 \pm 23.2$
25	$2.40 \pm 0.2$	$650 \pm 28.6^a$
100	$2.60 \pm 0.4$	$880 \pm 44.3^a$
400	$2.90 \pm 0.1$	$790 \pm 52.6^a$
800	$1.80 \pm 0.2$	$710 \pm 43.7^a$

n = 4; a: p < 0.05

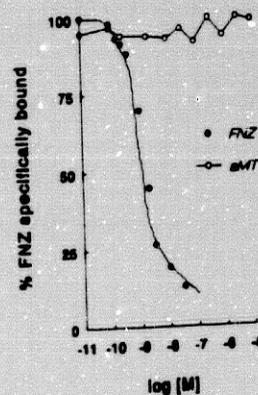


Figura 36: Curva de competición de aMT.

de aMT tan elevadas como  $10^{-5}$  M no interfieren con la unión del FNZ "in vitro".

**B.- EFECTOS DE LA MANIPULACION SUPRARRENAL.**

1.-Efecto de la suprarrenalectomía sobre el ritmo circadiano del receptor de alta afinidad de FNZ en el cerebro de rata: La Figura 37 muestra las representaciones de Scatchard de la unión de [<sup>3</sup>H]-FNZ a las membranas de corteza parietal de grupos de ratas ADx o SADx sacrificadas 7 días después de la cirugía a seis diferentes intervalos

de tiempo a lo largo de un ciclo de 24 h. Puede observarse la presencia de un sólo sitio receptor a FNZ, al igual que en los casos anteriores, con unos valores de  $K_D$  que oscilan entre 1.1 y 2.2 nM, y de  $B_{max}$  entre 350-750 fmol/mg prot en el grupo SADx. La ADx produce un significativo aumento en la  $B_{max}$  en todos los puntos horarios estudiados. En la Tabla XIII se representan los cambios en la  $K_D$  y  $B_{max}$  obtenidos en membranas de corteza parietal de ratas ADx y SADx sacrificadas durante el ciclo de 24 h. Se observa que la  $B_{max}$  que presenta normalmente un máximo hacia las 24 h en el grupo control,

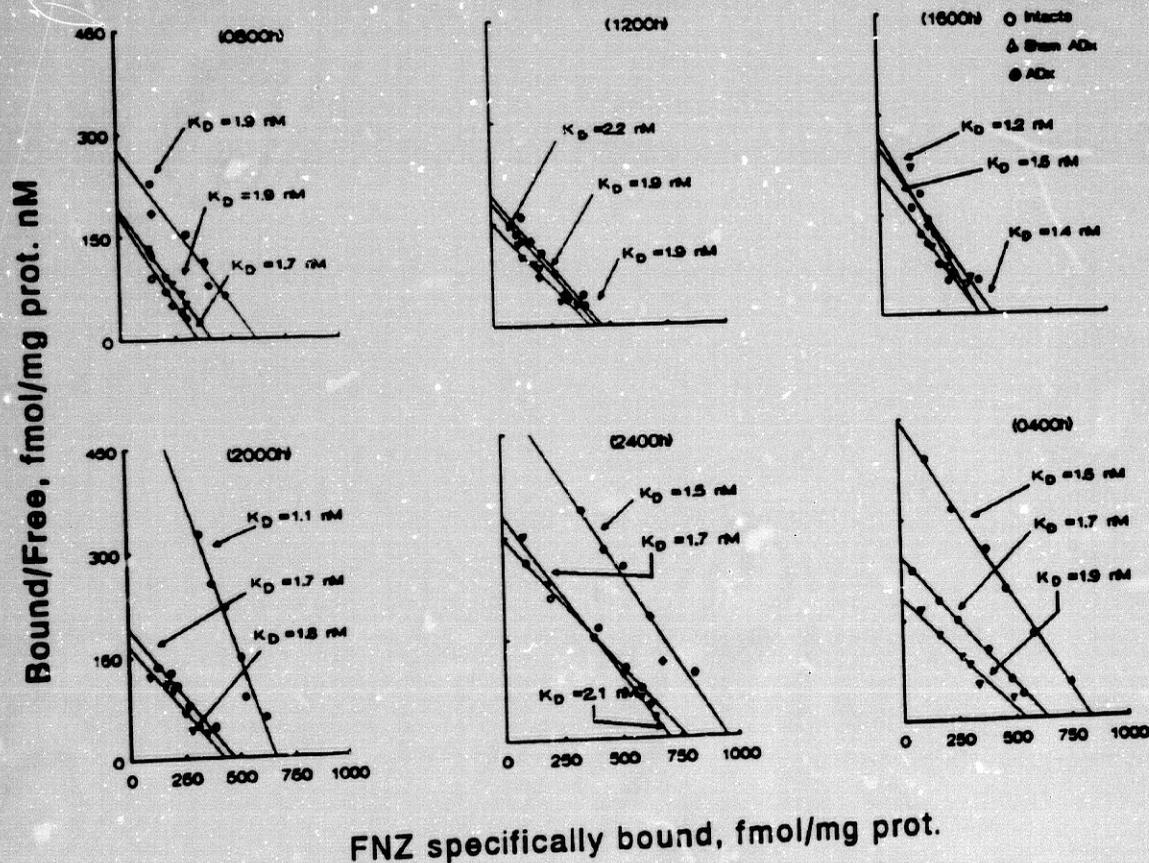


Fig. 37: Scatchards del ritmo circadiano del receptor de FNZ en ratas normales y ADx

TABLA XIII

Ritmo circadiano del receptor central de BNZ en ratas controles y ADx

Hora del día	Normales		SADx		ADx	
	$K_D$	$B_{max}$	$K_D$	$B_{max}$	$K_D$	$B_{max}$
0800	1.40 ± 0.3	430 ± 13.5	1.40 ± 0.5	460 ± 17.5	1.50 ± 0.2	620 ± 45.2 <sup>a,b</sup>
1200	2.00 ± 0.4	390 ± 35.1	1.90 ± 0.7	410 ± 44.2	1.90 ± 0.6	460 ± 40.1
1600	1.00 ± 0.2	420 ± 52.8	1.20 ± 0.4	430 ± 41.1	1.30 ± 0.4	500 ± 42.3
2000	1.40 ± 0.5	430 ± 13.1	1.40 ± 0.4	410 ± 47.6	1.00 ± 0.2	675 ± 38.6 <sup>a,b</sup>
2400	1.30 ± 0.3	720 ± 68.5 <sup>a</sup>	1.20 ± 0.3	730 ± 26.4 <sup>a</sup>	1.10 ± 0.3	950 ± 67.9 <sup>a,b</sup>
0400	1.20 ± 0.4	560 ± 37.2	1.20 ± 0.2	580 ± 45.2	1.20 ± 0.2	810 ± 59.6 <sup>a,b</sup>

n = 6 para cada punto horario; a: p < 0.05 vs resto puntos horarios; b: p < 0.05 vs SADx y normales

aumenta considerablemente en las ratas ADx, sin alterarse el patrón del ritmo circadiano. No se observan cambios significativos en la afinidad en estos grupos, y las variaciones de la  $K_D$  en el grupo ADx fueron esencialmente las mismas que en el grupo control SADx.

2.-Efectos tiempo-dependientes de la ADx y la HPx sobre el receptor de alta afinidad de FNZ en el cerebro de rata: En la Tabla XIV se indican los cambios en la  $K_D$  y  $B_{max}$  de la unión de [<sup>3</sup>H]-FNZ a membranas de corteza parietal de ratas ADx (3, 7 y 15 días antes), HPx (3 y 7 días

antes), y de ratas ADx 15 días antes e HPx 3 días antes del sacrificio, así como sus respectivos controles. La  $B_{max}$  de ratas ADx alcanza su máximo valor a los 3-7 días de la operación, descendiendo ligeramente a los 15 días. Asimismo, los animales SADx exhiben un aumento transitorio en la  $B_{max}$  a los 7 días, que desciende los valores normales a los 15 días. El efecto de la HPx es menos importante, aunque también aumenta significativamente la  $B_{max}$  a los 3 y 7 días, sin variaciones significativas en el grupo SHPx. Asimismo, las ratas con ADx de 15 días,

TABLA XIV

Efectos tiempo-dependientes de la ADx sobre el receptor central de BNZ

Grupo Experimental	Tiempo transcurrido tras la cirugía					
	3 días		7 días		15 días	
	$K_D$	$B_{max}$	$K_D$	$B_{max}$	$K_D$	$B_{max}$
SADx	1.51 ± 0.3	440 ± 28.5	1.80 ± 0.6	510 ± 68.1	1.70 ± 0.5	405 ± 45.3
ADx	2.20 ± 0.3	680 ± 36.1 <sup>a</sup>	3.92 ± 0.4 <sup>a</sup>	787 ± 42.2 <sup>a</sup>	1.51 ± 0.3	650 ± 29.4 <sup>a</sup>
SHPx	1.20 ± 0.2	420 ± 30.8	1.30 ± 0.1	430 ± 68.1	-	-
HPx	1.40 ± 0.4	635 ± 44.1 <sup>b</sup>	1.60 ± 0.5	682 ± 41.1 <sup>b</sup>	-	-
SADx + SHPx	-	-	-	-	1.90 ± 0.7	410 ± 53.1

n = 6-8 para cada grupo; a: p < 0.01 vs SADx; b: p < 0.01 vs SHPx; c: p < 0.01 vs SADx+SHPx

que fueron hipofisectomizadas 3 días antes del sacrificio (en el día 12), muestran unos cambios en la  $B_{max}$  similares a los observados con la ADx sólo. No se han observado cambios significativos en los valores de la  $K_D$  en los grupos anteriores excepto en el grupo de ADx de 7 días, en el cual se observó un aumento significativo en la constante de afinidad.

3.-Efecto de la administración de corticosterona sobre el receptor de alta afinidad de FNZ en el cerebro de ratas ADx y/o HPx: Las Figuras 38a,b

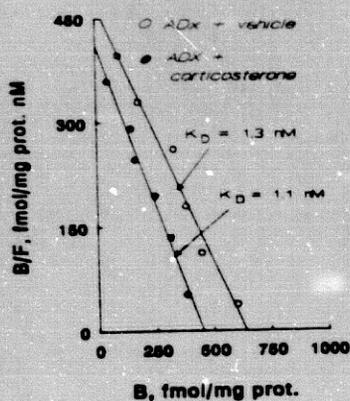


Figura 38a: Efecto de la corticosterona en ratas ADx.

representa el efecto de la corticosterona sobre la unión de [ $^3$ H]-FNZ a preparaciones de membranas de corteza parietal de ratas ADx y/o HPx. La corticosterona se administró en una sólo dosis de 5 mg i.m. 24 h antes del sacrificio. Como puede

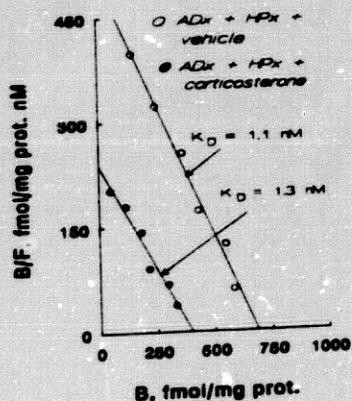


Figura 38b: Efecto de la corticosterona en ratas ADx+HPx.

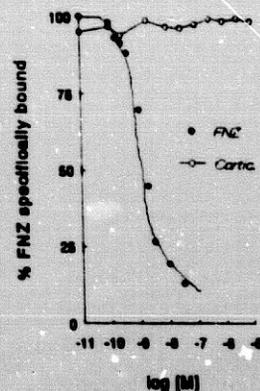


Figura 39: Curva de competición de corticosterona.

apreciarse en la Figura 38a, el tratamiento con corticosterona a ratas ADx de 15 días (n= 7) induce un descenso significativo de las uniones de FNZ, contrarrestando así el aumento inducido en la  $B_{max}$  por la ADx, sin presentar cambios significativos en la  $K_D$ . En el grupo de ratas ADx de 15 días con HPx de 3 días, Figura 38b (n= 7), la administración de corticosterona a la misma dosis también revierte el efecto de la ADx+HPx sobre la  $B_{max}$ .

4.-La corticosterona tampoco compete "in vitro" con el receptor de alta afinidad de FNZ en el cerebro de rata: En un intento de estudiar si estos efectos de la corticosterona pudieran ser producidos por un mecanismo central, actuando ó compitiendo en el mismo sitio receptor del FNZ, se hicieron una serie de curvas de competición para este fin. La Figura 39 demuestra que, al igual que ocurría con la aMT, los efectos de la corticosterona en la corteza cerebral de rata no dependen de un efecto directo del esteroide sobre los sitios receptores, ya que concentraciones de hasta  $10^{-4}$  M de corticosterona no interfieren con la unión del FNZ "in vitro".

## II.-DE LA ADMINISTRACION INTRACEREBROVENTRICULAR DE MELATONINA Y PEPTIDOS HIPOFISARIOS SOBRE LA CINETICA DEL RECEPTOR CENTRAL DE ALTA AFINIDAD DE FNZ

Una vez conocidos los efectos de la administración sistémica de las hormonas estudiadas en los grupos anteriores, y con el fin de comprobar si estos efectos se debían a una acción periférica o central, decidimos hacer un estudio similar pero inyectando directamente en el SNC dichas hormonas. Para ello, colocamos crónicamente una cánula en uno de los ventrículos laterales

### A.- EFECTOS DE LA MANIPULACION PINEAL.

1.-Resultados de la inyección de aMT: En la Tabla XV se representan los valores de la constante de afinidad ( $K_D$ ) y del máximo número de sitios receptores ( $B_{max}$ ) correspondientes a la unión del [ $^3$ H]-FNZ con su receptor de alta afinidad en la corteza cerebral de rata. Las ratas

(generalmente en el ventrículo lateral derecho), que se mantenía permeable mediante la colocación de un fiador. A través de esta cánula se inyectan en su momento la melatonina y los péptidos hipofisarios, estudiando su efecto sobre el receptor central de alta afinidad de FNZ bajo diferentes diseños experimentales.

fueron implantadas con una cánula en el ventrículo lateral derecho, y en la misma operación se practicó la pinealectomía (Px) o la gangliectomía cervical superior (GCSx), o sus correspondientes operaciones simuladas (SPx y SGCSx, respectivamente), como se indicó en Materiales y Métodos. A los siete días de la operación, se inyectan a los animales 5  $\mu$ l de solución salina por la cánula conteniendo la sustancia a estu-

TABLA XV

Efectos dosis-respuesta de la administración de aMT en ratas Px o GCSx

Grupo Experimental	5 ng aMT ó 5 $\mu$ l Salino		10 ng aMT		20 ng aMT	
	$K_D$	$B_{max}$	$K_D$	$B_{max}$	$K_D$	$B_{max}$
SPx + Salino	1.01 $\pm$ 0.3	640 $\pm$ 13.5	-	-	-	-
Px + Salino	0.88 $\pm$ 0.3	425 $\pm$ 23.1 <sup>a</sup>	-	-	-	-
Px + aMT	1.85 $\pm$ 0.3	1125 $\pm$ 56.8 <sup>b</sup>	1.60 $\pm$ 0.2	1343 $\pm$ 65.3 <sup>d</sup>	1.50 $\pm$ 0.4	1653 $\pm$ 77.8 <sup>d</sup>
SGCSx + Salino	1.23 $\pm$ 0.4	630 $\pm$ 14.7	-	-	-	-
GCSx + Salino	2.02 $\pm$ 0.6	440 $\pm$ 16.7 <sup>a</sup>	-	-	-	-
GCSx + aMT	1.98 $\pm$ 0.9	1358 $\pm$ 56.4 <sup>c</sup>	1.75 $\pm$ 0.8	1520 $\pm$ 55.6 <sup>d</sup>	1.83 $\pm$ 0.6	1762 $\pm$ 55.4 <sup>d</sup>

n = 6/grupo; a: p < 0.05 vs control; b: p < 0.01 vs Px ó SPx; c: p < 0.01 vs GCSx ó SGCSx; d: p < 0.05 vs dosis anteriores

diar, en este caso melatonina (aMT), en una dosis de 5 ng en los 5  $\mu$ l de salino. Al cabo de una hora, se sacrifican los animales por dislocación cervical y se preparan sus cerebros para el posterior estudio de los receptores.

Como puede apreciarse, la pinealectomía induce un significativo descenso en el número de sitios receptores ( $B_{max}$ ) sin cambios importantes en la afinidad ( $K_D$ ), como ya habíamos visto en la *Figura 32*. La inyección de aMT produce, ya a la dosis de 5 ng, un aumento de la  $B_{max}$  hasta el doble, sin que se acompañen cambios significativos en la  $K_D$ . Dosis mayores de aMT (10 y 20 ng/5 $\mu$ l) producen un mayor incremento en la  $B_{max}$  de una manera dosis-dependiente. Este efecto se produce también en el animal gangliectomizado, en el cual las dosis de aMT de 5 a 20 ng/5  $\mu$ l inducen un aumento dosis-dependiente de la  $B_{max}$  incluso mayor que en el caso de la rata Px. Al igual que en la Px, la GCSx no se manifiesta en cambios de la afinidad, manteniéndose en valores similares la  $K_D$ .

**2.-Resultados de la administración de péptidos derivados de ACTH:** Los efectos de la inyección

intracerebroventricular de dos péptidos derivados de ACTH, ACTH<sub>1-10</sub> y ACTH<sub>4-10</sub>, en ratas Px se representan en la *Tabla XVI*. La ACTH<sub>1-10</sub>, que presenta un efecto dosis-dependiente en ratas controles (SPx), es capaz de revertir el efecto de la Px sobre la  $B_{max}$  del receptor central de FNZ, de una forma similar, aunque algo menos potente, que la aMT. La inyección de ACTH<sub>4-10</sub> también incrementa de forma notable la  $B_{max}$  de receptor de FNZ, con una potencia mucho mayor que la ACTH<sub>1-10</sub>. Sin embargo, no hay efecto dosis-respuesta, ya que con la dosis mínima inyectada, 5 ng/5  $\mu$ l, se alcanza el efecto máximo. Asimismo, en ratas Px, la inyección de este péptido a dosis de 10 ng/5  $\mu$ l no sólo revierte el efecto de la Px, sino que incrementa bastante más la  $B_{max}$ , alcanzando el doble del efecto producido por la ACTH<sub>1-10</sub>.

**3.-Resultados de la administración de péptidos opiáceos:** Los efectos de la inyección intracerebroventricular de 5 y 10 ng/5 $\mu$ l de  $\beta$ -endorfina y  $\beta$ -lipotropina sobre el receptor central de FNZ se representan en la *Tabla XVII*. La administración de  $\beta$ -endorfina en ratas controles eleva

TABLA XVI

Efectos dosis-respuesta de la administración de los péptidos ACTH<sub>1-10</sub> y ACTH<sub>4-10</sub> en ratas Px

Grupo Experimental	5 ng Péptido ó 5 $\mu$ l Salino		10 ng Péptido		20 ng Péptido	
	$K_D$	$B_{max}$	$K_D$	$B_{max}$	$K_D$	$B_{max}$
SPx + Salino	1.0 $\pm$ 0.3	640 $\pm$ 13.5	-	-	-	-
SPx + ACTH <sub>1-10</sub>	2.7 $\pm$ 0.6	1026 $\pm$ 35.1 <sup>c</sup>	2.9 $\pm$ 0.8	1235 $\pm$ 64.2 <sup>b</sup>	2.1 $\pm$ 0.7	2040 $\pm$ 61.4 <sup>b</sup>
SPx + ACTH <sub>4-10</sub>	1.8 $\pm$ 0.5	2440 $\pm$ 72.8 <sup>a</sup>	2.1 $\pm$ 0.6	2560 $\pm$ 68.1 <sup>a</sup>	2.3 $\pm$ 0.4	2480 $\pm$ 63.4 <sup>a</sup>
Px + Salino	0.8 $\pm$ 0.3	475 $\pm$ 13.1	-	-	-	-
Px + ACTH <sub>1-10</sub>	-	-	1.5 $\pm$ 0.5	880 $\pm$ 26.4 <sup>c</sup>	-	-
Px + ACTH <sub>4-10</sub>	-	-	2.0 $\pm$ 0.5	1755 $\pm$ 75.2 <sup>c</sup>	-	-

n = 6/grupo; a: p < 0.01 vs SPx + Salino; b: p < 0.01 vs otras dosis; c: p < 0.01 vs Px + Salino

M<sup>a</sup> Dolores Gomar Aragón

TABLA XVII

*Efectos dosis-respuesta de la administración de péptidos opiáceos en ratas Px*

Grupo Experimental	5 ng Péptido ó 5 µl Salino		10 ng Péptido	
	$K_D$	$B_{max}$	$K_D$	$B_{max}$
SPx + Salino	1.01 ± 0.3	640 ± 13.5	-	-
SPx + β-END	4.90 ± 1.2 <sup>a</sup>	1156 ± 41.2 <sup>b</sup>	4.86 ± 1.3 <sup>a</sup>	975 ± 44.1 <sup>b</sup>
SPx + β-LIP	4.82 ± 1.1 <sup>a</sup>	780 ± 27.9 <sup>b</sup>	6.13 ± 1.4 <sup>a</sup>	996 ± 26.4 <sup>b</sup>
Px + Salino	0.88 ± 0.3	475 ± 13.1	-	-
Px + β-END	-	-	2.20 ± 0.4	1388 ± 46.9 <sup>c</sup>
Px + β-LIP	-	-	2.1 ± 0.7	540 ± 21.8 <sup>c</sup>

n = 7/grupo; a, b: p < 0.01 vs SPx+Salino; c: p < 0.01 vs Px+Salino

significativamente la  $B_{max}$  con un descenso paralelo en la afinidad (aumento de la  $K_D$ ). Algo semejante ocurre en otro grupo de ratas tras la administración de β-lipotropina a las mismas dosis de 5 y 10 ng/5 µl: en este caso el aumento observado en la  $B_{max}$  es ligeramente menor que con la β-endorfina, pero el descenso de la afinidad, representado por un significativo aumento de la  $K_D$ , es mayor a la dosis de 10 ng/5 µl. En el caso de las ratas pinealectomizadas (operación realizada 7 días antes), la inyección de β-endorfina a dosis de 10 ng/5 µl induce también un significativo aumento de la  $B_{max}$  mayor que en el caso de las ratas controles, pero en este caso no hay cambios importantes en la afinidad. Por su parte, la inyección de β-lipotropina a esta misma dosis de 10 ng/5 µl en ratas pinealectomizadas muestra un efecto opuesto al que producía tras su inyección en ratas controles, ya que no sólo no aumenta el número de sitios receptores ( $B_{max}$ ), sino que los disminuye significativamente. Tampoco en este caso se encontraron cambios estadísticamente importantes en la afinidad con respecto al grupo control.

#### B.- EFECTOS DE LA MANIPULACION DEL EJE H-H-ADRENAL.

1.-Resultados de la administración de aMT: La Tabla XVIII muestra los valores de la  $B_{max}$  y la  $K_D$  correspondientes a la unión del [<sup>3</sup>H]-FNZ a preparaciones de membranas de corteza cerebral de rata en animales suprarrenalectomizados (ADx) y/o hipofisectomizados (HPx). La ADx induce un aumento significativo de la  $B_{max}$  y un descenso ligero en la afinidad (aumento de la  $K_D$ ). La inyección de aMT en ratas ADx no tiene efecto significativo a dosis de 5 ng/5µl, pero a dosis de 10 ng/5 µl aumenta significativamente la  $B_{max}$  con un descenso también significativo en la afinidad (incremento de  $K_D$ ).

Por su parte, la HPx induce también un aumento del número de sitios receptores,  $B_{max}$  aunque en menor grado que la ADx, y no modifica la afinidad. La inyección de aMT en este grupo de ratas no tiene efecto significativo en comparación con la HPx sólo, con sólo un ligero incremento de la  $B_{max}$ .

TABLA XVIII

Efectos dosis-respuesta de la administración de aMT en ratas ADx y/o HPx y Px

Grupo Experimental	5 ng aMT ó 5 µl Salino		10 ng aMT	
	K <sub>D</sub>	B <sub>max</sub>	K <sub>D</sub>	B <sub>max</sub>
SADx + Salino	1.60 ± 0.3	610 ± 27.9	-	-
ADx + Salino	3.90 ± 0.4 <sup>d</sup>	887 ± 32.2 <sup>b</sup>	-	-
ADx + aMT	3.08 ± 1.1	753 ± 31.2 <sup>b</sup>	6.90 ± 1.2	1538 ± 58.6 <sup>c</sup>
SHPx + Salino	1.30 ± 0.1	605 ± 28.4	-	-
HPx + Salino	1.61 ± 0.2	710 ± 29.5 <sup>d</sup>	-	-
HPx + aMT	-	-	2.38 ± 0.4	851 ± 33.6 <sup>d</sup>
SPx + SADx + Salino	1.61 ± 0.2	620 ± 30.1	-	-
Px + ADx + Salino	2.38 ± 0.1	1196 ± 32.5 <sup>c</sup>	-	-
Px + ADX + aMT	-	-	1.07 ± 0.7	1186 ± 47.8 <sup>c</sup>

n= 8/grupo; a, b: p<0.05 vs SADx+Salino; c: p<0.01 vs ADx+aMT; d: p<0.05 vs SHPx; e: p<0.01 vs SPx+SADx+Salino

La extirpación de ambas glándulas suprarrenales y pineal 7 días antes (ADx+Px), produce un aumento significativo en la B<sub>max</sub> con sólo ligeras modificaciones en la K<sub>D</sub>. Asimismo, la inyección de aMT en este grupo, a dosis de 10 ng/5 µl, no modifica sustancialmente los ya elevados valores de la B<sub>max</sub> en el grupo ADx+Px, así como tampoco los valores de la K<sub>D</sub>.

2-Resultados de la administración de péptidos derivados de ACTH: En la Tabla XIX se presentan los resultados de la B<sub>max</sub> y K<sub>D</sub> correspondientes a la unión de FNZ en preparaciones de membranas de corteza cerebral de rata, en los grupos de ratas suprarrenalectomizadas y pinealectomizadas (ADx+Px) e hipofisectomizadas (HPx) 7 días antes. La inyección de ACTH<sub>1-10</sub>, a

TABLA XIX

Efectos de la administración de ACTH<sub>1-10</sub> y ACTH<sub>4-10</sub> en ratas ADx y/o HPx

Grupo Experimental	ACTH <sub>1-10</sub> (10 ng)		ACTH <sub>4-10</sub> (10 ng)	
	K <sub>D</sub>	B <sub>max</sub>	K <sub>D</sub>	B <sub>max</sub>
SADx + SPx + Salino	1.61 ± 0.2	620 ± 30.1	-	-
ADx + Px + Salino	2.38 ± 0.1	1196 ± 32.5 <sup>a</sup>	-	-
ADx + Px + Péptido	2.85 ± 0.6	1318 ± 66.7 <sup>b</sup>	2.03 ± 0.9	1462 ± 57.6 <sup>b</sup>
SHPx + Salino	1.30 ± 0.1	605 ± 28.4	-	-
HPx + Salino	1.61 ± 0.2	710 ± 29.5 <sup>c</sup>	-	-
HPx + Péptido	3.15 ± 1.4	1270 ± 56.8 <sup>d</sup>	5.16 ± 1.7	663 ± 44.2

n=8/grupo; a, b: p<0.01 vs SADx+SPx+Salino; b: p<0.01 vs ADx+Px+Salino; c, d: p<0.05 vs SHPx+Salino; d: p<0.01 vs HPx+Salino

M<sup>o</sup> Dolores Gomar Aragón

TABLA XX

Efecto de ACTH<sub>1-10</sub> y ACTH<sub>4-10</sub> sobre la acción de la aMT en ratas Px

Grupo Experimental	ACTH <sub>1-10</sub> (10 ng) + aMT (10 ng)		ACTH <sub>4-10</sub> (10 ng) + aMT (10 ng)	
	K <sub>D</sub>	B <sub>max</sub>	K <sub>D</sub>	B <sub>max</sub>
SPx + Salino	1.01 ± 0.3	640 ± 13.5	-	-
Px + Salino	0.88 ± 0.3	475 ± 23.1 <sup>a</sup>	-	-
Px + ACTH + aMT	1.1 ± 0.2	2390 ± 89.5 <sup>b</sup>	1.1 ± 0.3	2126 ± 87.4 <sup>b</sup>

n=8/grupo; a, b: p<0.05 vs SPx+Salino; b: p<0.01 vs Px+Salino

dosis de 10 ng/5 µl, a ratas ADx+Px significativamente aumenta la B<sub>max</sub>, sin cambios importantes en la K<sub>D</sub>. Sin embargo, en ratas HPx, la administración de este péptido incrementa de forma importante la B<sub>max</sub>, reduciendo paralelamente la afinidad (aumento de la K<sub>D</sub>). Por su parte, la inyección de ACTH<sub>4-10</sub> a la misma dosis de 10 ng/5 µl produce un efecto similar sobre la B<sub>max</sub> al que producía la ACTH<sub>1-10</sub> en el grupo de ratas ADx+Px, aunque cuantitativamente mayor, permaneciendo sin modificarse la afinidad. En ratas HPx, la administración de ACTH<sub>4-10</sub> sólo desciende ligeramente la B<sub>max</sub> con respecto a las ratas HPx, aunque sí disminuye significativamente la afinidad.

**C.- MODULACION DE LA ACCION DE LA aMT POR LOS PEPTIDOS HIPOFI-SARIOS.**

1.-Efectos de la ACTH<sub>1-10</sub> y ACTH<sub>4-10</sub> sobre la acción de la aMT en ratas Px: La Tabla XX muestra el efecto de la administración conjunta intracerebroventricular de una dosis única de 10 ng/5 µl de ACTH<sub>1-10</sub> o ACTH<sub>4-10</sub> y 10 ng/5 µl de aMT en ratas controles y pinealectomizadas.

Tanto la ACTH<sub>1-10</sub> como la ACTH<sub>4-10</sub> potencian significativamente el efecto de la aMT sólo (Tabla XV), incrementando de forma manifiesta los valores de la B<sub>max</sub> análogamente para ambos péptidos, y sin cambios significativos en la K<sub>D</sub>.

2.-Efectos de la β-endorfina sobre la acción de la aMT en ratas con o sin denervación pineal: La Tabla XXI muestra el efecto de la inyección conjunta de 5 ng/5 µl de β-endorfina y 10 ng/5 µl de aMT en ratas pinealectomizadas o gangliectomizadas. En ratas controles (SPx), la β-endorfina induce un significativo aumento de la B<sub>max</sub>, sin cambios notables en la K<sub>D</sub>. Este efecto es bloqueado totalmente por la inyección simultánea de 10 ng/5 µl de naloxone. En la rata con la pineal denervada (GCSx), la administración de naloxone junto a la de β-endorfina y aMT, a la misma dosis que antes, no es capaz de bloquear el efecto de la β-endorfina+aMT, y sólo disminuye en parte la B<sub>max</sub>. Tampoco se observan cambios significativos en la afinidad en este grupo.

3.-Efecto de la β-lipotropina sobre la acción de la aMT en ratas controles: La Tabla XXII representa los resultados obtenidos sobre la B<sub>max</sub> y la K<sub>D</sub> en ratas controles (SPx). La inyección conjunta de 10 ng/5 µl de β-lipotropina y 10 ng/5 µl

TABLA XXI

*Efecto de  $\beta$ -endorfina sobre la acción de la aMT en ratas controlas*

Grupo Experimental	$\beta$ -END (5 ng) + aMT (10 ng) 6.5 $\mu$ l SALINO		$\beta$ -END (5 ng) + aMT (10 ng) + NALOXONE (10 ng)	
	$K_D$	$B_{max}$	$K_D$	$B_{max}$
SPx + Salino	1.01 $\pm$ 0.3	640 $\pm$ 13.5	-	-
SPx + Péptido	2.26 $\pm$ 1.1	1247 $\pm$ 87.2 <sup>a</sup>	1.5 $\pm$ 0.7	683 $\pm$ 32.3
SGCSx + Salino	1.23 $\pm$ 0.4	630 $\pm$ 14.7	-	-
GCSx + Péptido	5.2 $\pm$ 0.7	1491 $\pm$ 64.2 <sup>b</sup>	2.09 $\pm$ 0.9	1185 $\pm$ 45.2 <sup>b</sup>

n=8/grupo; a: p<0.01 vs SPX+Salino; b: p<0.01 vs SGCSx+Salino

de aMT aumenta de forma significativa la  $B_{max}$ , así como también disminuye muy significativamente la afinidad (aumento de la  $K_D$ ). Sin embargo, estos efectos de la  $\beta$ -lipotropina no son totalmente bloqueados por la inyección simultánea de 10 ng/5  $\mu$ l de naloxone, ya que encontramos que, si bien la afinidad vuelve a presentar un valor equivalente al control, la  $B_{max}$  no sólo no disminuye, sino que se eleva todavía más por la acción del naloxone.

4.-Efectos de la  $\beta$ -endorfina sobre la acción de la aMT en ratas HPx: La Tabla XXIII presenta los resultados obtenidos tras la administración intracerebroventricular simultánea de 5 ng/5  $\mu$ l de  $\beta$ -endorfina y 10 ng/5  $\mu$ l de aMT en ratas hipofisectomizadas 7 días antes. Los valores de

$B_{max}$ , ya de por sí elevados por la HPx, aumentan todavía más al inyectar  $\beta$ -endorfina+aMT, sin observarse cambios significativos en la  $K_D$ . La administración simultánea de naloxone junto a la  $\beta$ -endorfina y aMT a este grupo de ratas bloquea parcialmente el efecto estimulante sobre la  $B_{max}$ , de forma que el naloxone a esta dosis disminuye los valores de la  $B_{max}$ , sin modificar significativamente la  $K_D$ . Este efecto bloqueante o antagónico del naloxone se manifiesta muy significativamente cuando se administra dicha droga junto con aMT solamente; en este caso, el naloxone es capaz de bloquear completamente el efecto estimulante de la aMT sobre la  $B_{max}$  de ratas HPx, como se había visto en la Tabla XVIII, aunque no modifica la  $K_D$ .

TABLA XXII

*Efecto de  $\beta$ -lipotropina sobre la acción de la aMT en ratas controlas*

Grupo Experimental	$\beta$ -LIP (10 ng) + aMT (10 ng) 6.5 $\mu$ l SALINO		$\beta$ -LIP (10 ng) + aMT (10 ng) + NALOXONE (10 ng)	
	$K_D$	$B_{max}$	$K_D$	$B_{max}$
SPx + Salino	1.01 $\pm$ 0.3	640 $\pm$ 13.5	-	-
SPx + Péptido	5.75 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	840 $\pm$ 47.2	2.1 $\pm$ 0.7	1147 $\pm$ 32.3 <sup>b</sup>

n=6/grupo; a, b: p<0.01 vs SPx+Salino

M<sup>a</sup> Dolores Gomar Aragón

TABLA XXIII

Efecto de la administración de  $\beta$ -endorfina sobre la acción de la aMT en ratas HPx

Grupo Experimental	$\beta$ -END (5 ng) + aMT (10 ng) + 5 $\mu$ l SALINO		$\beta$ -END (5 ng) + aMT (10 ng) + NALOX (10 ng)		aMT (10 ng) + NALOX (10 ng)	
	$K_D$	$B_{max}$	$K_D$	$B_{max}$	$K_D$	$B_{max}$
SHPx + Salino	1.30 $\pm$ 0.1	605 $\pm$ 28.4	-	-	-	-
HPx + Salino	1.61 $\pm$ 0.2	710 $\pm$ 29.5 <sup>a</sup>	-	-	-	-
HPx + aMT	-	-	-	-	1.68 $\pm$ 0.4	384 $\pm$ 23.4 <sup>b</sup>
HPx + $\beta$ -END	2.23 $\pm$ 0.5	1031 $\pm$ 42.8 <sup>c</sup>	2.57 $\pm$ 0.6	873 $\pm$ 68.1 <sup>d</sup>	-	-

n = 6/grupo; a: p < 0.05 vs SHPx+Salino; b: p < 0.01 vs HPx+Salino; c: p < 0.01 vs HPx+Salino; d: p < 0.05 vs HPx+Salino

5.-Efectos de los péptidos hipofisarios sobre la acción de la aMT en ratas HPx: La Tabla XXIV muestra los resultados obtenidos tras la inyección intracerebroventricular conjunta de 5 ng/5  $\mu$ l de  $\beta$ -endorfina, 10 ng/5  $\mu$ l de aMT y 10 ng/5  $\mu$ l del péptido ACTH<sub>1-10</sub>. No se estudió el péptido ACTH<sub>4-10</sub> puesto que tiene un alcance menos significativo sobre el receptor de FNZ, por cuanto no presenta un claro efecto dosis-respuesta sobre su cinética. Puede observarse que el esquema de inyección propuesto no modifica

significativamente los valores del número de sitios receptores de FNZ ( $B_{max}$ ), así como tampoco los valores de su afinidad ( $K_D$ ), con respecto al grupo control. Sin embargo, la administración simultánea de 10 ng/5  $\mu$ l de naloxone es capaz de incrementar significativamente la  $B_{max}$  aunque no haya variaciones en la afinidad. Este es otro de los efectos paradójicos del naloxone, en principio, que se han encontrado en el presente estudio, y que se discutirá más adelante.

TABLA XXIV

Efecto de los péptidos hipofisarios sobre la acción de la aMT en ratas HPx

Grupo Experimental	$\beta$ -END (5 ng) + aMT (10 ng) + ACTH <sub>1-10</sub> (10 ng) + 5 $\mu$ l SALINO		$\beta$ -END (5 ng) + aMT (10 ng) + ACTH <sub>1-10</sub> (10 ng) + NALOXONE (10 ng)	
	$K_D$	$B_{max}$	$K_D$	$B_{max}$
SHPx + Salino	1.30 $\pm$ 0.1	605 $\pm$ 28.4	-	-
HPx + Salino	1.61 $\pm$ 0.2	710 $\pm$ 29.5 <sup>a</sup>	-	-
HPx + Péptidos	2.19 $\pm$ 0.7	614 $\pm$ 27.2	2.57 $\pm$ 0.6	820 $\pm$ 32.3 <sup>b</sup>

n = 6/grupo; a: p < 0.05 vs SHPx+Salino; b: p < 0.01 vs HPx+Salino

***DISCUSSION***

## I.-DE LAS POSIBLES VIAS DE ACCION DE LA aMT.

De entre las funciones de la glándula pineal más características están el control de la reproducción estacional en diversos animales, su papel en la sincronización de diversos ritmos biológicos, y la modulación de ciertas funciones del sistema nervioso central (SNC). Estos efectos los realiza la pineal por medio de su hormona melatonina (aMT), que puede actuar a distintos niveles tanto en el SNC como en territorios periféricos. En el SNC, la aMT interactúa con su receptor específico poniendo en marcha diversos segundos mensajeros, como los nucleótidos cíclicos, prostaglandinas y calcio en células neuronales y de la glia. A su vez la aMT, que se segrega de forma rítmica o circadiana, con un pico nocturno que codifica la información diaria, está regulada en primer lugar por señales neuronales proporcionadas por fibras pinealopetas centrales y periféricas y en segundo lugar por influencias moduladoras proporcionadas por determinadas hormonas.

Los efectos centrales de la pineal implican la acción de la aMT sobre ciertos procesos cerebrales, y presentan como característica común una inhibición de la actividad cerebral, lo que podría venir determinado por un efecto de la pineal sobre los mecanismos centrales de inhibición, representados principalmente por el complejo receptor GABA-benzodiazepinas (GABA-BNZ). Esta suposición parte del hecho que la administración de aMT induce un aumento de los niveles de GABA en el

hipotálamo, así como aumento de los niveles de serotonina y de piridoxal fosfoquinasa cerebral. Estos tres efectos ocurren paralelamente, y es muy posible que el aumento tanto de los niveles de GABA como de serotonina sea un reflejo del aumento de la actividad piridoxal fosfoquinasa, ya que este enzima va a dar lugar a la formación de fosfato de piridoxal, que es un grupo prostético de la L-aminoácido descarboxilasa y de la ácido glutámico descarboxilasa; enzimas que intervienen en la síntesis de serotonina y GABA, respectivamente.

En trabajos recientes se ha visto además que la administración de aMT da lugar a un descenso en los niveles de  $\beta$ -endorfinas, mientras que estas últimas son capaces de aumentar la síntesis del indol pineal, por lo que se puede pensar que muchos de los efectos de los opiáceos pueden estar mediados por la aMT, y viceversa.

De los datos de esta breve introducción cabe pensar que los efectos centrales de la aMT pueden producirse a varios niveles, ya que esta hormona puede modificar los niveles y/o la actividad del complejo GABA-BNZ cerebral, bien directamente, bien a través del sistema opiáceo, o bien a través de otros compuestos hipotalámicos o hipofisarios, ya que la ACTH, y concretamente los péptidos derivados ACTH<sub>1-10</sub> y ACTH<sub>4-10</sub>, interaccionan con el receptor opiáceo cerebral.

Además, ya que la glándula pineal es un órgano circunventricular, la secreción de aMT (y

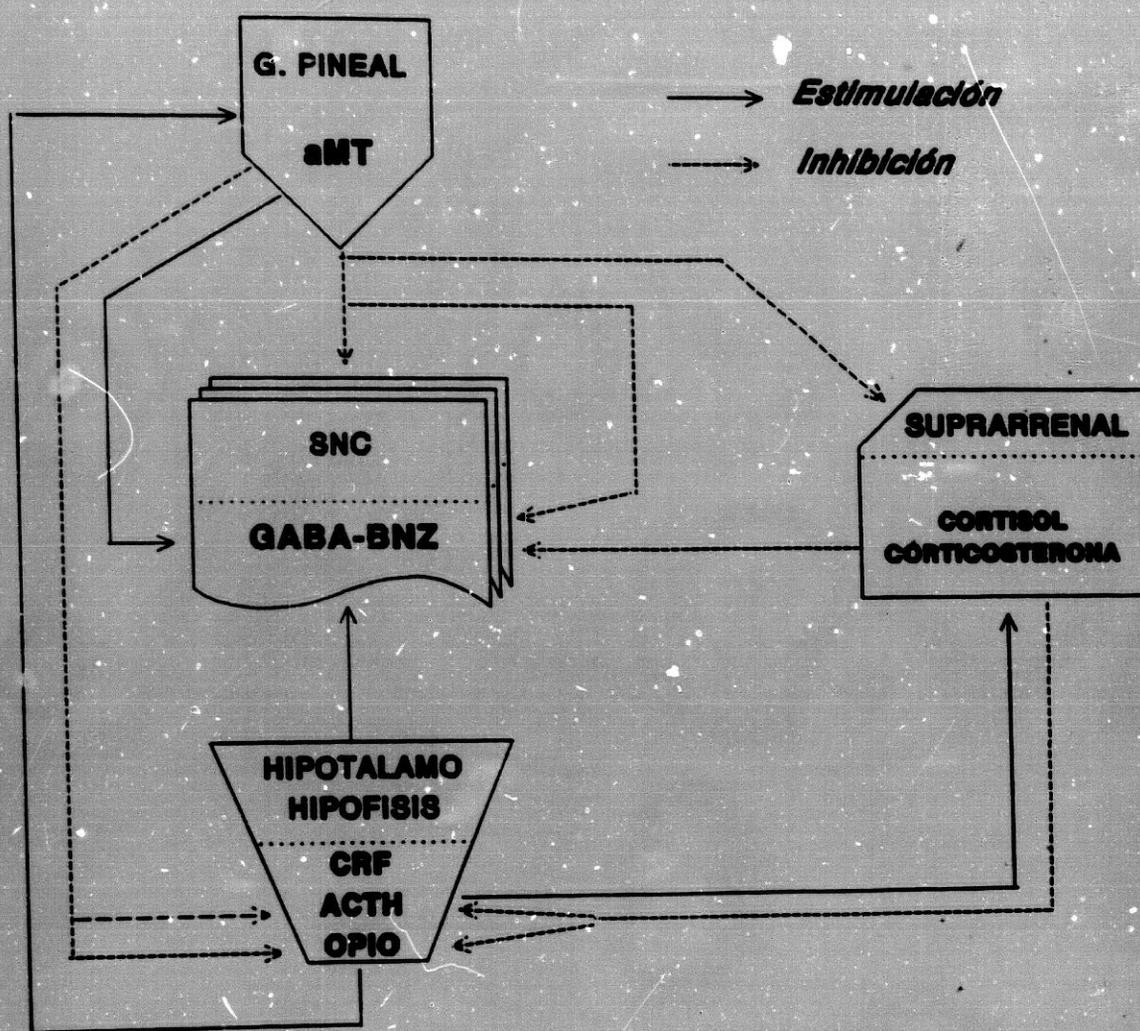


Figura 40: Posibles vías de acción de la aMT sobre el complejo receptor GABA-BNZ.

de otros compuestos pineales) se realiza tanto al LCR como a la circulación sistémica, por lo que es perfectamente lógico pensar que incluso los efectos centrales de la aMT puedan ser mediados por acciones periféricas de dicha hormona. En este sentido, hay que pensar que la existencia de un eje pineal-suprarrenal puede participar en la regulación del complejo GABA-BNZ cerebral, ya que la corticosterona y la ACTH modifican el receptor de GABA.

Por tanto, para un mejor planteamiento de la discusión que se hace de los resultados

obtenidos en este trabajo, el esquema representado en la Figura 40 propone los dos mecanismos fundamentales de acción de la pineal (a través de la aMT) sobre el complejo receptor GABA-BNZ: una vía periférica, en la que están relacionadas las glándulas suprarrenales y su mecanismo de retroalimentación sobre el eje hipotálamo-hipofisario, y una vía central, a través de la cual la aMT modificaría la actividad de dicho complejo receptor sin necesidad de la circunvalación periférica. En síntesis, la aMT segregada por la pineal actúa sobre las glándulas

suprarrenales para disminuir los niveles circulantes de cortisol y corticosterona, ya que la aMT estimula la 5- $\alpha$ -reductasa suprarrenal, y por tanto estimula el catabolismo de dichos esteroides a di- y tetrahidroderivados, hormonalmente inactivos. El descenso de estos corticoides produce, a su vez, una disminución de la retroalimentación negativa ejercida sobre el eje hipotálamo-hipofisario, con el consiguiente aumento de la liberación de ACTH y péptidos derivados. El aumento de la ACTH estimula la neurotransmisión GABAérgica al aumentar el número de los sitios receptores para el GABA

( $B_{max}$ ), sin modificar significativamente la afinidad ( $K_D$ ).

Además de estos efectos, la aMT puede actuar directamente sobre el hipotálamo y/o la hipófisis, para inhibir la síntesis o la liberación de péptidos opiáceos, que a su vez pueden modificar la neurotransmisión inhibitoria central actuando sobre el complejo GABA-BNZ.

A partir de este esquema, vamos entonces a discutir nuestros resultados comenzando por aquellos obtenidos tras el estudio de los mecanismos periféricos de acción de la glándula pineal y la aMT.

## II.- DE LOS EFECTOS PERIFERICOS DE LA aMT.

### A.- LA G. PINEAL COMO MODULADORA DEL RECEPTOR CENTRAL DE BNZ

El estudio de la influencia de la glándula pineal sobre el complejo receptor GABA-BNZ se ha planteado como un proyecto de investigación amplio que, para una mejor planificación, lo hemos separado en dos vías de trabajo paralelas pero separadas. Esta parte del proyecto se refiere a la regulación del receptor central de BNZ, que constituye el receptor de BNZ ligado al del GABA<sub>A</sub>.

Cuando se trabaja manipulando la glándula

pineal para observar sus efectos, hay que analizar con cuidado dos aspectos importantes: 1) que los efectos de la pinealectomía (Px) son en muchas ocasiones tiempo-dependientes, y por tanto hay que ser precavidos a la hora de estudiar a qué tiempo tras la Px se estudian sus efectos; o lo que es mejor, hacer estudios tiempo-dependientes; 2) La aMT se segrega de forma rítmica, circadiana, y por tanto hay que tener en cuenta tanto la hora de su administración como la sincronización de su ritmo con otros ritmos circadianos.

Nuestros resultados indican la existencia de un ritmo circadiano en el número de sitios

receptores de BNZ en la corte a cerebral de la rata. Estos resultados confirman y amplian unos datos previamente publicados (Kafka y colbs., 1982), utilizando para su determinación [<sup>3</sup>H]-diazepán. Con este ligando, dichos autores describen la existencia en preparaciones de membranas de cerebro completo un máximo de unión a la noche. Sin embargo, Kafka y colbs., (1982) utilizan

para su determinación experimentos con sólo puntos máximos, es decir, una sólo concentración saturante de ligando radioactivo, lo que sólo les permite exponer la existencia de un máximo de sitios de unión durante la noche, pero no pueden determinar el número de sitios receptores reales ni su afinidad por el ligando. En nuestro caso, hemos utilizado como ligando radioactivo [<sup>3</sup>H]-flunitrazepan ([<sup>3</sup>H]-FNZ), con dos claras diferencias con respecto a los experimentos publicados anteriormente: 1) el [<sup>3</sup>H]-FNZ tiene una afinidad mucho mayor que el [<sup>3</sup>H]-diazepán sobre el receptor central de BNZ (alrededor de 1 nM de K<sub>D</sub> del FNZ, frente a los 10 nM del diazepán); 2) en nuestros experimentos hemos realizado un análisis completo de Scatchard en preparaciones de cortezas cerebrales individuales de rata que, en grupos de 4-6 animales, fueron sacrificados a seis intervalos diferentes durante un período de 24 h. De los resultados se demuestra que el número máximo de sitios

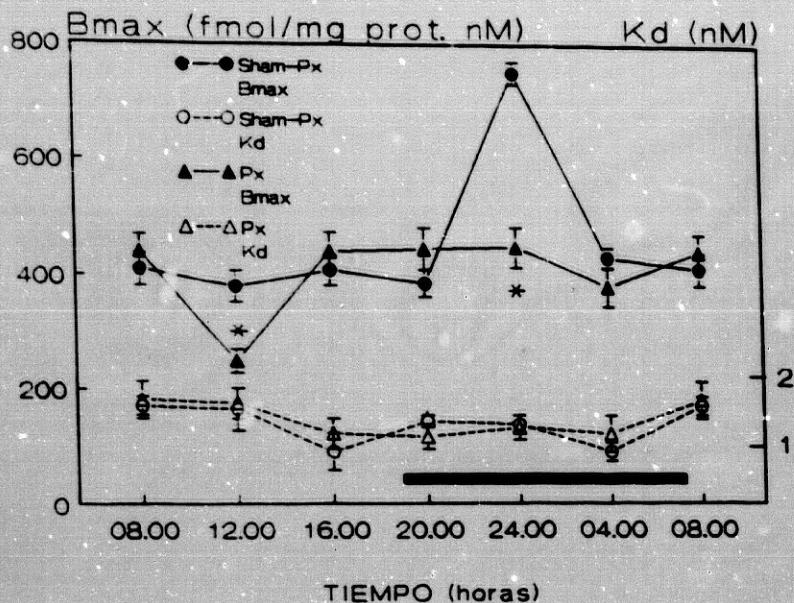


Figura 41: Efecto de la Px sobre el ritmo circadiano del receptor central de BNZ.

receptores (B<sub>max</sub>) alcanza un máximo hacia medianoche (24 h), mientras que en el resto de los puntos horarios estudiados se mantiene en unos niveles más o menos constantes y similares. La afinidad del receptor por su ligando no se modificó significativamente a lo largo del ciclo horario. Si la glándula pineal pudiera tener alguna influencia sobre dicho ritmo circadiano fué el aspecto que a continuación estudiamos. Efectivamente, como puede observarse en la Figura 41, la Px induce una alteración importante en dicho ritmo circadiano, ya que tras la extirpación pineal desaparece el pico nocturno o máximo en la B<sub>max</sub> al mismo tiempo que aparece una depresión en la B<sub>max</sub> al mediodía (12 h). Estos resultados indican que la Px produce un desfase e inversión del ritmo circadiano normal, apareciendo ahora con un mínimo a las 12 del mediodía, mientras que en el resto del ciclo los niveles se mantienen más o menos constantes y por encima de los de ese mínimo.

Cuando se intenta explicar la presencia de este ritmo circadiano de los receptores de BNZ, debemos de pensar que en nuestro caso, hemos utilizado preparaciones de membranas crudas, no muy purificadas ni tratadas con detergente para eliminar del medio todos aquellos agentes que pudieran afectar a la unión del [ $^3\text{H}$ ]-FNZ a su receptor. Por este motivo, los cambios en la  $B_{\text{max}}$  observados pueden deberse tanto a verdaderas modificaciones de los sitios de unión o a variaciones en la concentración de algunas pequeñas moléculas, como posibles ligandos endógenos (Hamon y Soubrié, 1983) o el mismo GABA (Olsen, 1981), que pueden modular la unión. Sin embargo, ya que las preparaciones de membranas fueron realizadas por el mismo procedimiento en cada punto horario, cabría pensar en una verdadera modificación de los sitios receptores de BNZ a lo largo de las 24 h, más que en artefactos de origen metodológico.

Al igual que otros autores (Lowenstein y colbs., 1985), encontramos que la Px causa un significativo descenso en el número de sitios receptores de [ $^3\text{H}$ ]-FNZ, más significativo a los 7 días de la operación, y que se mantiene hasta al menos 15 días. Estos resultados indican una más estrecha relación entre glándula pineal y receptor central de BNZ, y sugieren un papel más específico de la pineal en la homeostasis del SNC. En este sentido, es conocido el hecho de la aparición de hiperexcitabilidad, status convulsivo que llega a convulsiones clónico-tónicas y muerte de las ratas Px (Reiter y colbs., 1973; Yamaoka, 1981). Estos efectos son comparables a aquellos que se manifiestan en situaciones asociadas a alteraciones del receptor de BNZ, y

caracterizados por ansiedad, insomnio y estados de crisis convulsivas. En consecuencia, puede decirse que los efectos homeostáticos de la pineal sobre el SNC (Romijn, 1978) pueden deberse, al menos en parte, a su modulación del receptor central de BNZ, asociado al receptor de GABA<sub>A</sub>.

Si la glándula pineal modifica de forma significativa al receptor central de BNZ, y ya que la aMT presenta efectos que antagonizan la hiperexcitabilidad del SNC dependiente de la Px, dicho indol es un buen candidato para mediar los efectos de la pineal que hemos descrito anteriormente. En trabajos previos (Lowenstein y colbs., 1985) se ha observado que la administración de aMT a dosis farmacológicas es capaz de normalizar la  $B_{\text{max}}$  del receptor de BNZ deprimida por la Px. Sin embargo, es interesante estudiar si la aMT media los efectos de la pineal a dosis fisiológicas y no farmacológicas, para lo cual debe presentar esos efectos a concentraciones de alrededor de 1 nM, por dos motivos: 1) La concentración media de aMT en el SNC ronda los 1-5 nM; 2) La constante de disociación ( $K_D$ ) del receptor de alta afinidad de BNZ que hemos estudiado aquí, es del orden de 1-3 nM, lo que indica que para ser un modulador efectivo, la aMT debería actuar a esas concentraciones.

Nosotros hemos realizado una serie de experimentos conducentes al estudio de los efectos dosis-respuesta de distintas concentraciones de aMT inyectadas s.c. a varios grupos de ratas a las 9 h de la mañana y sacrificadas 3 horas después. Los resultados indican que dosis de aMT tan bajas como 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso ya provocan un aumento

significativo de la  $B_{max}$  en ratas Px. Ya que de la aMT inyectada, aproximadamente el 0.02% alcanza la pineal, se obtendrán unas concentraciones en el SNC en el rango de 1-5 nM, y por tanto se trata de un efecto fisiológico y no farmacológico de la hormona. Estos resultados indican asimismo que los cambios circadianos del receptor de alta afinidad de BNZ aquí descritos están relacionados en algún grado con la secreción rítmica de aMT.

Otro aspecto que hemos considerado en este estudio es el grado de participación de la glándula pineal en todos estos cambios del receptor de BNZ. La secreción rítmica de aMT depende fundamentalmente de la inervación que por medio de una vía postganglionar simpática, enlaza la retina y el núcleo supraquiasmático, a través del ganglio cervical superior, con la glándula pineal. La gangliectomía cervical superior va a dejar sin inervación simpática a dicha glándula, y por tanto, pierde su capacidad regulatoria de la síntesis y liberación rítmica de aMT. En nuestros resultados, observamos que la gangliectomía produce esencialmente los mismos resultados que la pinealectomía, es decir, disminuye significativamente el número de sitios receptores de BNZ ( $B_{max}$ ), sin cambios significativos en la afinidad ( $K_D$ ). Estos datos concuerdan de nuevo con que es la secreción rítmica de aMT por la glándula pineal (condicionada por su inervación simpática), la responsable de los cambios circadianos del receptor central de BNZ.

## B.- MEDIACION DEL EJE PINEAL-SUPRARRENAL

Una vez conocida la modulación por la glándula pineal del receptor de alta afinidad de BNZ en la corteza cerebral de la rata, se plantea la siguiente pregunta: ¿es este efecto derivado de una acción directa de la aMT sobre el receptor de BNZ? o ¿es un efecto mediado por otras vías o compuestos intermedios?. La primera pregunta se responde inmediatamente, puesto que la presencia de aMT en preparaciones de membranas no afecta en absoluto a la unión del [ $^3$ H]-FNZ a su receptor, incluso a concentraciones tan altas como  $10^{-3}$  M. Los resultados por tanto nos indican que la aMT no compete in vitro con el sitio de unión del [ $^3$ H]-FNZ, por lo que su efecto modulador sobre dicho receptor tiene que realizarse a otro nivel.

En este sentido, Kendall, McEwen y Enna (1982) describen que tras la suprarrenalectomía bilateral (ADx) hay un significativo aumento en el número de sitios receptores al GABA en el SNC, a los 3 días de la operación; estos efectos son contrarrestados por la administración de corticosterona. Asimismo, Kendall, McEwen y Enna (1982) encuentran que la hipofisectomía (HPx), al contrario que la ADx, disminuye significativamente la unión del [ $^3$ H]-GABA en el SNC, y este efecto no es revertido por la corticosterona. También estos autores muestran que la administración sistémica de ACTH<sub>1-39</sub> o ACTH<sub>4-10</sub> induce un aumento de la  $B_{max}$  del [ $^3$ H]-GABA en el SNC en ratas normales similar

al que ocurre tras la ADx. Este efecto de la ACTH parece que se debe a la aparición de sitios de unión de alta capacidad y baja afinidad, que no se observan en animales controles. Por tanto, estos datos sugieren también que el receptor GABAérgico central puede modificarse por los niveles circulantes de ACTH.

Estos datos pueden estar relacionados con la existencia de un eje pineal-suprarrenal que se ha descrito anteriormente (Acuña y cols., 1982; Acuña y cols., 1984), por lo que es posible suponer que los efectos de la aMT sobre el receptor central de BNZ que hemos encontrado en el presente trabajo, puedan mediarse por esta vía periférica.

Como paso previo a este análisis, estudiamos el efecto de la ADx sobre el ritmo circadiano del receptor central de BNZ, encontrando que la ADx bilateral (Figura 42) produce un aumento en el número de sitios receptores en todos los puntos horarios estudiados, con un mayor incremento en el pico nocturno de  $B_{max}$  y sin modificaciones significativas de la afinidad ( $K_D$ ). Como característica cabe destacar que los cambios inducidos por la ADx no modifican esencialmente el patrón oscilatorio circadiano de la  $B_{max}$  con respecto a los animales controles. De esta forma, las glándulas suprarrenales parecen actuar sobre el sistema de neurotransmisión inhibitoria central en conjunto, ya que la ADx también modifica la captación de taurina y de

GABA en el SNC de la rata (Acuña y cols., 1987; Kendall, McEwen y Enna, 1982).

Los efectos de la ADx sobre el receptor central de BNZ en corteza cerebral de rata que hemos encontrado en este trabajo son similares a los descritos para otras estructuras cerebrales, en las que se describía también un aumento de la  $B_{max}$  de FNZ tras la ADx (Miller y cols., 1988). Esos efectos de la ADx podrían producirse por la propia manipulación quirúrgica, ya que se ha descrito un aumento de los receptores de BNZ en el cerebro de rata minutos después de una actividad de estrés como la inmersión en agua (Havoundjian, Paul y Skolnick, 1986). Asimismo, la laparotomía induce un aumento de los receptores de BNZ en el cortex cerebral de rata hasta 3 días de la operación, aunque este efecto desaparece y los niveles de  $B_{max}$  vuelven a sus valores normales (Okun y cols., 1988).

Precisamente para tener en cuenta los efectos no específicos debidos al estrés de la cirugía, hemos estudiado la unión del [ $^3$ H]-FNZ a preparaciones corticales de membranas a los 3, 7 y 15 días de la ADx. Encontramos un aumento

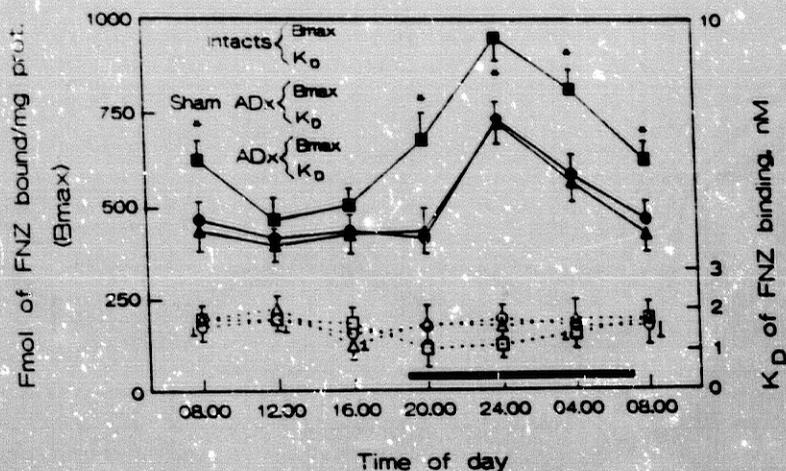


Figura 42: Efecto de la ADx sobre el ritmo circadiano del receptor central de BNZ.

transitorio en la  $B_{\max}$  a los 7 días en los animales con operación simulada (SADx), aunque no fue significativo. El hecho que la ADx aumente la  $B_{\max}$  del FNZ en todos los puntos horarios del ritmo circadiano sugiere un papel para las hormonas suprarrenales en la modulación del receptor central de BNZ en la rata. Asimismo, el hecho observado del mayor incremento del pico nocturno de la  $B_{\max}$  tras la ADx prueba todavía más la existencia de una participación más específica de las hormonas suprarrenales en la modulación del receptor de BNZ.

La administración de corticosterona a una dosis única de 5 mg i.p., 24 h antes de sacrificar a la rata, previene totalmente el efecto de la ADx sobre la unión del [ $^3$ H]-FNZ a su receptor, lo que indica que el esteroide suprarrenal que regula ese receptor es la corticosterona, sin que esto implique que otras hormonas de origen suprarrenal puedan también tener efecto. Este efecto de la corticosterona es interesante, ya que puede explicar el mayor incremento en la  $B_{\max}$  del receptor de BNZ que se observa por la noche: ya que en ratas normales, la secreción de corticosterona disminuye por la noche (Ottenweller y Meier, 1982), coincidiendo con el pico nocturno de la  $B_{\max}$  del receptor de BNZ, mientras que por la mañana los niveles altos de corticosterona se acompañan de un descenso del número de sitios receptores de BNZ, esto sugiere que la ausencia de corticosterona debido a la ADx induce un mayor aumento de la elevación nocturna de la  $B_{\max}$  (hay una menor inhibición). Recientemente se ha descrito también un efecto similar de la corticosterona y desoxicorticosterona (aunque no de la

dexametasona) en el cerebro de ratón (Miller y colbs., 1988). Todo ello sugiere un efecto modulador de los esteroides suprarrenales en la unión del [ $^3$ H]-FNZ al receptor central de BNZ, posiblemente vía del subtipo mineralcorticoide del receptor corticoide.

Sin embargo, y al igual que ocurría en el caso de la Px, los resultados experimentales no indican si los cambios que se observan en el receptor central de BNZ tras la ADx están relacionados directa o indirectamente con la acción (o la falta de acción) de la corticosterona. Una explicación es que estos efectos sean debidos a la elevación en la ACTH que tiene lugar en las ratas ADx y que, según el esquema de la *Figura 40*, incrementa el número de sitios receptores de BNZ, además de influenciar otras funciones cerebrales (De Wied y Jolles, 1982).

En consecuencia, se plantea la tercera posibilidad de acción de la aMT, y es que sus efectos sean mediados por la ACTH hipofisaria. Para probar esta posibilidad, se hicieron otra serie de experimentos en los que se determinó la unión de [ $^3$ H]-FNZ a preparaciones de membranas corticales de ratas hipofisectomizadas de 3 y 7 días (HPx) que además habían sido previamente suprarrenalectomizadas 15 días antes. Como controles se usaron ratas HPx con suprarrenalectomía simulada. Los resultados que se observan están de acuerdo con otros previos (Miller y colbs., 1988), e indican un aumento ligeramente menor de la unión del [ $^3$ H]-FNZ a sus sitios receptores en ratas HPx que en ADx. Además, el efecto de la HPx en ratas ADx no es significativamente diferente del visto en ratas ADx solamente. También, la administración de

corticosterona a ratas HPx o HPx+ADx induce el mismo efecto que en ratas ADx sólo, es decir, revierte la modificación de la  $B_{max}$  devolviéndola a su valor normal correspondiente a las ratas intactas.

Los efectos de la corticosterona sobre los receptores cerebrales de BNZ no tienen lugar sobre los sitios receptores mismos, ya que la presencia de corticosterona en preparaciones de membranas no desplaza al [ $^3$ H]-FNZ in vitro. Los corticoides pueden afectar a los receptores centrales de BNZ a través de un mecanismo GABAérgico, ya que una elevación en los niveles de GABA puede aumentar la unión del [ $^3$ H]-FNZ en el cerebro de rata (Gavish y Snyder, 1980; Cardinali y cols., 1986).

Se ha demostrado que la HPx reduce significativamente la unión del GABA a su receptor mediante la regulación del número de sus receptores (Kendall, McEwen y Enn, 1982), aunque no se ha precisado la existencia de un efecto sobre las BNZ. A su vez, los efectos de la suprarrenal sobre la unión del GABA parecen ser mediados por la ACTH, un factor potencialmente capaz de modificar el turnover de GABA, ya que ni el GABA endógeno ni la actividad de glutamato descarboxilasa (GAD), ni la recaptación de GABA cambian significativamente en ratas ADx de 15 días (Leonard, 1974; Sadasivudu, Rao y Murthy, 1977; Kendall, McEwen y Enna, 1982).

Ya que la ADx aumenta la unión de GABA y de BNZ, y la HPx disminuye la unión de GABA que se acompaña de un aumento de la unión de BNZ, aunque en menor grado que la ADx, y la administración de corticosterona

previene esos efectos, estos resultados implican que la ACTH hipofisaria no parece jugar un papel esencial en la modulación del receptor de BNZ, mientras que la corticosterona parece estar significativamente implicada en este fenómeno.

Debe notarse que la afinidad presenta algunos cambios principalmente en el grupo de ratas ADx de 7 días, en el que se observa un aumento de la  $K_D$  de 3 a 4 veces su valor basal. Esos cambios pueden deberse a una alteración en la actividad de algunos moduladores cerebrales. Es posible, sin embargo, que esos cambios en la afinidad de la unión del [ $^3$ H]-FNZ puedan también deberse a un mecanismo indirecto relacionado con el ganglio cervical superior, ya que se ha demostrado su participación en la afinidad de la unión del [ $^3$ H]-GABA en el cerebro de rata (Acuña y cols., 1986a). Ya que se han descrito receptores glucocorticoideos en preparaciones de membranas de origen citosólico del ganglio cervical superior (Warembourg, Otten y Scwab, 1980), y el ganglio cervical superior proporciona inervación simpática a estructuras extra e intracraneales importantes incluida la hipófisis (Friegood, 1970; Cardinali, Vacas y Gejman, 1981), esta posibilidad es bastante aceptable. Sin embargo, en nuestros resultados no hemos encontrado cambios significativos en el  $K_D$  de la unión del [ $^3$ H]-FNZ tras la gangliectomía en preparaciones de membranas corticales de rata, descartando, en principio, esta posibilidad.

El ligeramente menor incremento en la unión de [ $^3$ H]-FNZ observado en ratas HPx comparado con las ADx puede deberse a un descenso en la síntesis y/o liberación

decorticosterona que ocurre en esa situación de deficiencia de ACTH. Sin embargo, la existencia de péptidos análogos a la ACTH, como la ACTH<sub>4-10</sub>, que tienen efectos conductuales y no

corticotropos (De Wied y Jolles, 1982) hacen necesario el estudio de sus posibles efectos sobre el receptor central de BNZ.

### III-SOBRE LOS EFECTOS CENTRALES DE LA aMT.

#### A.- DE LA MANIPULACION DE LA GLANDULA PINEAL.

La administración intracerebroventricular de aMT nos permite discernir si los efectos de esta hormona sobre la unión del [<sup>3</sup>H]-FNZ a su receptor se realizan directamente actuando a nivel del SNC o, como vimos anteriormente, son efectos periféricos. Indudablemente, hay que

tener en cuenta que la aMT atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica, y por tanto, la aMT inyectada en el ventrículo cerebral de la rata puede alcanzar la circulación sistémica. Sin embargo, las dosis de aMT empleadas en nuestros experimentos (se han inyectado 5-10 ng de aMT/rata) hacen que la cantidad que pueda alcanzar la circulación general sea muy pequeña y, en su caso, se diluya tanto en el volumen

sanguíneo total que ya no llegue a alcanzar concentraciones significativas. Con estas premisas, podemos suponer que los efectos que veamos tras la inyección cerebral de aMT, se deberán casi exclusivamente a efectos mediados por estructuras cerebrales.

Los resultados obtenidos en la primera serie de estos experimentos nos indican que la inyección de aMT en el

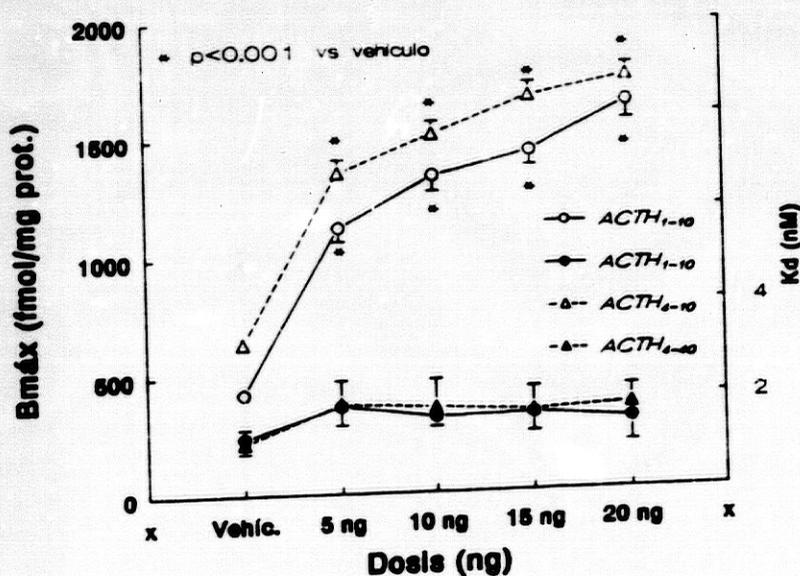


Figura 43: Efecto dosis-dependiente de la aMT

ventrículo lateral derecho de la rata pinealectomizada y canulada 7 días antes produce un efecto dosis-dependiente significativo sobre la unión del [ $^3\text{H}$ ]-FNZ en la corteza cerebral de rata (Figura 43). Además, el efecto de la dosis más pequeña usada, 5 ng/rata, fue significativamente mayor sobre la  $B_{\text{max}}$  del receptor central de BNZ que en los experimentos anteriormente discutidos en los que la aMT se administraba por vía sistémica (s.c.). Este efecto es similar al que se observa tras la inyección cerebral de aMT en ratas gangliectomizadas, en las que la extirpación del ganglio cervical superior elimina la inervación simpática (y por tanto la regulación circadiana) de la glándula pineal, disminuyendo significativamente la síntesis de aMT. Por tanto, el efecto parece depender fundamentalmente de la aMT actuando sobre estructuras que modifican a su vez el receptor de BNZ.

Uno de los mecanismos por los que la aMT inyectada pudiera provocar esos efectos, sería actuando sobre la síntesis y/o liberación de determinadas hormonas hipotálamo-hipofisarias, y concretamente, ACTH y péptidos opiáceos, derivados todos ellos de un precursor común, la POMC (pro-opiomelanocortina). Los efectos de la aMT sobre el eje hipotálamo-hipofisario no están claros. Por un lado, la ACTH estimula la síntesis proteica en la pineal, lo que podría llevar al aumento de la NAT (N-acetiltransferasa) y de la síntesis de aMT (Schotman, Allaart y Gispen, 1981). Por otro lado, la Px induce un aumento significativo de corticosterona en la rata, así como un descenso paralelo de la ACTH en plasma (Acuña y cols., 1982, 1984), aunque

estos dos cambios endocrinos dependientes de la Px no parece que se deban a un mismo mecanismo. La administración s.c. de aMT revierte esos efectos de la Px sobre el eje H-H-suprarrenal, quizá debido fundamentalmente a que disminuye los niveles elevados de corticosterona y este descenso, a su vez, deje de inhibir a la ACTH. Si la aMT tiene efecto directo sobre la ACTH es todavía dudoso, pero parece que al menos no inhibe la liberación de ACTH inducida por el CRF hipotalámico (Rosenthal y Strassman, 1988).

La participación de la ACTH en los cambios del receptor de BNZ inducidos por la aMT pueden deberse a varios mecanismos: por un lado, la ACTH y algunos péptidos derivados, presentan importantes efectos conductuales a nivel del SNC. Concretamente, el ACTH $_{4-10}$  facilita varias formas de plasticidad del SNC (Stewart, 1986). Aunque no se conoce su mecanismo de acción, se sabe que este fragmento carece de actividad corticotropa, y por tanto actúa sólo sobre el SNC. Así, la administración de este péptido acelera la recuperación conductual en animales con laberintectomía unilateral. Este péptido, junto con el 4-7, es el más corto con una potencia comparable a la de la molécula entera. Los péptidos ACTH $_{1-10}$  y ACTH $_{4-10}$  tienen una afinidad apreciable para los sitios de unión esteroespecíficos del receptor opiáceo en sinaptosomas cerebrales (De Wied, 1982).

Si tenemos en cuenta que el estrés es un estímulo que dispara la secreción hormonal de aquellas hormonas que, precisamente, se llaman hormonas de estrés, como los corticoides

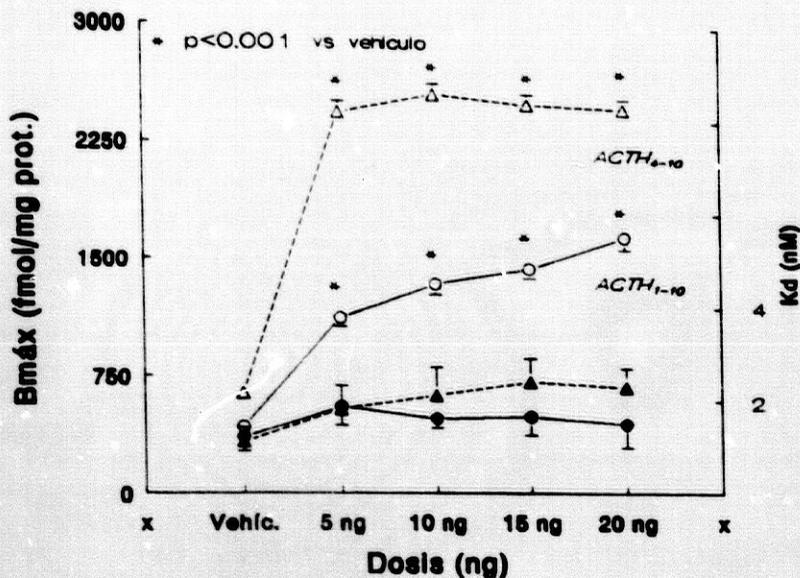


Figura 44: Efecto dosis-respuesta de los péptidos hipofisarios en ratas controladas.

suprarrenales, ACTH,  $\beta$ -endorfina y aMT, entre otras, y el estrés agudo es además un estímulo que disminuye el número de sitios receptores de BNZ en el SNC de la rata (Medina, Novas y De Robertis, 1983), nos encontramos con que los efectos de la pineal, a través de la aMT, sobre el receptor central de BNZ pueden ser mediados por péptidos derivados de la POMC.

Esto nos llevó a estudiar, en ratas normales y Px, el efecto de la ACTH sobre la unión del [ $^3$ H]-FNZ a la corteza cerebral de la rata. Con el fin de eliminar la posibilidad de que la ACTH produjera sus efectos alterando el metabolismo suprarrenal, decidimos utilizar dos péptidos derivados de la ACTH, el péptido ACTH<sub>1-10</sub> y el ACTH<sub>4-10</sub>. El primero de ellos, el ACTH<sub>1-10</sub>, sí presenta cierta actividad corticotropa además de la conductual, pero el ACTH<sub>4-10</sub> carece totalmente de actividad corticotropa, y sólo presenta efectos centrales, con lo que el uso de estos dos péptidos nos puede discernir bien si los

efectos de la ACTH son centrales ó periféricos.

Como podemos ver, (Figura 44) la inyección del péptido ACTH<sub>1-10</sub> en ratas controladas produce un efecto dosis-dependiente sobre la B<sub>max</sub> del receptor de BNZ, aunque la dosis mínima usada, 5 ng/rata, ya presenta un significativo aumento de la B<sub>max</sub>. No se observan variaciones significativas en la afinidad (K<sub>D</sub>), indicando que se trata sólo de un cambio en

el número y/o expresión de los sitios de unión. La inyección de ACTH<sub>4-10</sub> también induce un significativo aumento de la B<sub>max</sub>, sin cambios significativos en la afinidad, pero en este caso no se ha visto un efecto dosis-respuesta; el efecto es máximo con la mínima dosis usada. Esta falta de dependencia de la dosis puede deberse a que el ACTH<sub>4-10</sub> tiene una menor relevancia en la regulación fina del receptor de BNZ, o a que ya la dosis mínima usada (5 ng/rata) es ya suficientemente elevada para provocar el efecto, por lo que sería necesario utilizar dosis más bajas para comprobar este punto.

En ratas Px, la administración de ambos péptidos también significativamente aumenta el número de sitios receptores (B<sub>max</sub>) sin cambios sustanciales en la K<sub>D</sub> (Figura 45). Teniendo en cuenta que en la rata Px la B<sub>max</sub> está significativamente más baja, el incremento en el número de sitios producido por la inyección de dichos péptidos es, porcentualmente, igual que

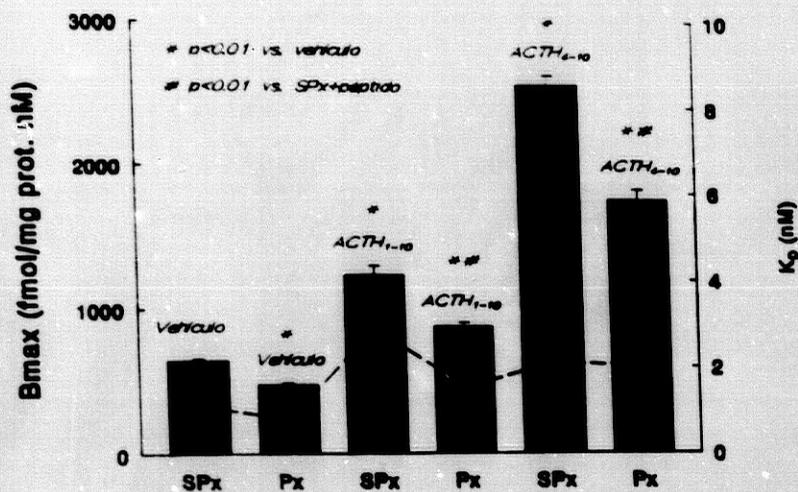


Figura 45: Efecto de los péptidos hipofisarios en ratas Px

en el caso de la inyección en ratas controles, lo que indica que el efecto de estos péptidos ACTH derivados no depende de la existencia de una pineal intacta. Además, el hecho de que tanto la inyección de ACTH<sub>1-10</sub> como de ACTH<sub>4-10</sub> tengan similar efecto (aunque más potente el del ACTH<sub>4-10</sub>), indica que no es un efecto mediado por un mecanismo periférico, dependiente de suprarrenales, ya que, como hemos dicho, el ACTH<sub>4-10</sub> no tiene actividad corticotropa.

En consecuencia, los péptidos derivados de la ACTH tienen un efecto significativo sobre el receptor central de BNZ y, aunque no esté claro su mecanismo de acción, al menos se trata de un efecto central, no periférico. Una posibilidad es, por tanto, que actúen a través de un receptor propio o "prestado". Miller y cols. (1988) proponen que la ACTH no es responsable de los cambios que se producen en el receptor central de BNZ tras un estímulo de estrés, ya que los mismos cambios se observan en ratas hipofisectomizadas. Esta observación es muy discutible, ya que los llamados neuropéptidos,

que incluyen, entre otros, a la ACTH, existen en otras partes del SNC, y la hipófisis no es la única fuente, y quizás ni la más importante fuente de origen de esos péptidos (De Wied y Jolles, 1982). Además, la POMC, originada principalmente en el núcleo arcuato, es transportada vía neuronas peptidérgicas a estructuras del sistema límbico, y después es rota en sus péptidos correspondientes, por lo que dichos péptidos se pueden localizar en muchas otras estructuras que la hipófisis (Watson y cols., 1978).

Por tanto, si consideramos a estos péptidos posibles candidatos a la regulación central del receptor de BNZ, podemos considerar su mecanismo de acción. En este sentido, está demostrado que ambos péptidos ACTH<sub>1-10</sub> y ACTH<sub>4-10</sub> actúan de forma específica sobre el receptor central opiáceo de las  $\beta$ -endorfinas. Es por tanto interesante estudiar si los péptidos opiáceos tienen también algún efecto sobre el receptor de BNZ.

En consecuencia, la inyección intracerebroventricular de  $\beta$ -endorfina en ratas controles induce un significativo aumento de la B<sub>max</sub> a dosis de 5 ng/rata. Este efecto se acompaña también de un significativo descenso en la K<sub>D</sub> (afinidad), lo que parece indicar que la inyección de  $\beta$ -endorfina provoca la aparición de sitios de unión de baja afinidad y alta capacidad, no vistos en animales controles (Kendall,

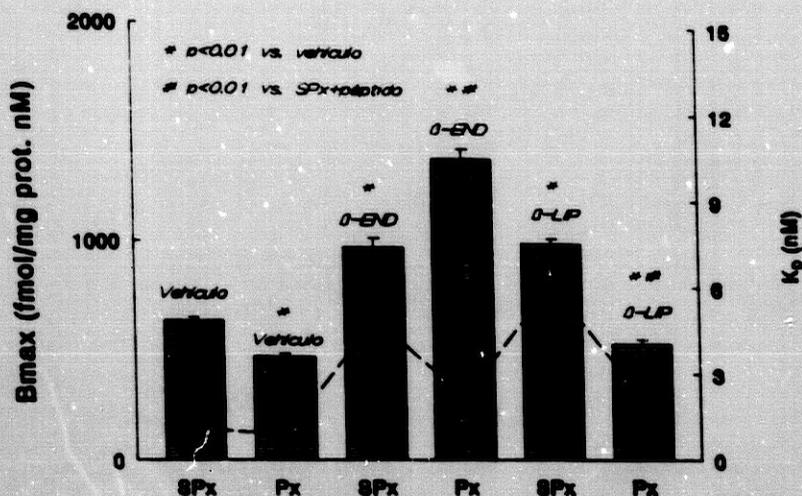


Figura 46: Efecto de los péptidos opioides.

McEwen y Enna, 1982) (Figura 46). No se observa un efecto dosis-dependiente de la acción de la β-endorfina, ya que la inyección de una dosis doble (10 ng/rata), produce esencialmente el mismo efecto. Sin embargo, la inyección de 10 ng/rata de β-endorfina en ratas Px, provoca un mayor aumento de la B<sub>max</sub> que el presente en ratas controles, lo que quizá indique que la presencia de aMT compite con la β-endorfina en algún sitio para regular el receptor de BNZ.

La administración de otro opioide, la β-lipotropina, a las mismas dosis que la β-endorfina en ratas controles aumenta ligera, aunque significativamente, la B<sub>max</sub> del receptor de BNZ, disminuyendo también de forma significativa su afinidad. De otro lado, la inyección de β-lipotropina en ratas Px sólo aumenta ligeramente la B<sub>max</sub> sin cambios en la K<sub>D</sub>.

### B.- DE LA MANIPULACION DEL EJE H-H-SUPRARRENAL.

Vistos los efectos de la inyección de aMT, así como de la posibilidad de que actúe a través de determinados neuropéptidos, debemos estudiar ahora si la aMT inyectada que, como hemos visto, pasa a la circulación

sistémica, tiene algún efecto periférico que implique su actividad central. Para ello, en otra serie de experimentos, inyectamos aMT en ratas normales, ADx e HPx. Los resultados encontrados (Figura 47) indican cómo la administración de aMT a dosis de 5 ng/rata no modifica la B<sub>max</sub> de la unión del [<sup>3</sup>H]-FNZ en ratas ADx, en las que ya la B<sub>max</sub> está significativamente elevada, como habíamos visto. A dosis mayor, de 10 ng/rata, la aMT sí aumenta

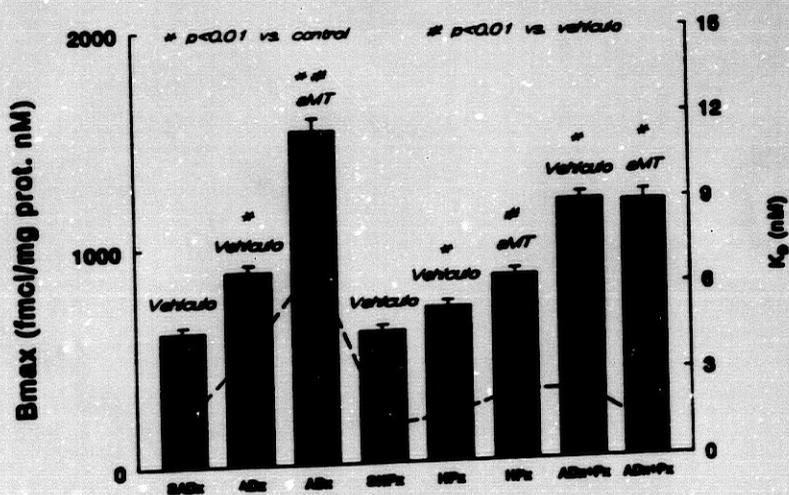


Figura 47: Efecto de la aMT en ratas ADx y HPx.

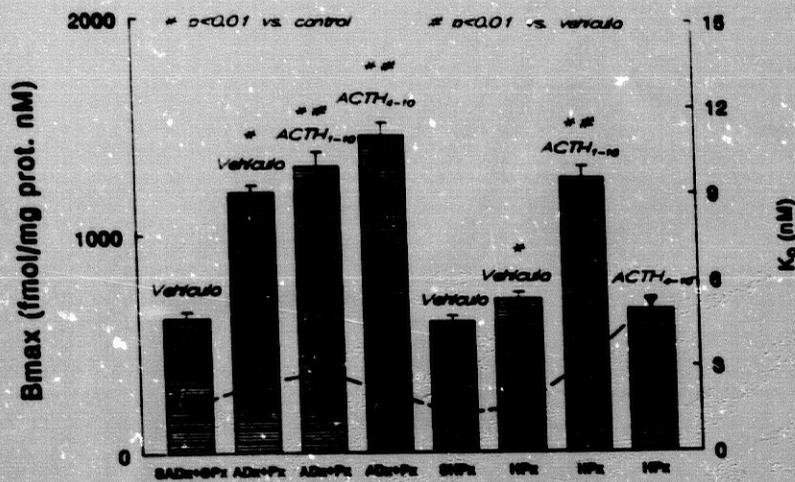


Figura 48: Efecto de los péptidos hipofisarios en ratas ADx y HPx.

significativamente la  $B_{max}$  al mismo tiempo que disminuye significativamente la afinidad. Por tanto, en ausencia de corticoides y de una ACTH elevada, como ocurre en las ratas ADx, la aMT sólo modifica el receptor de BNZ si se administra a una dosis alta, ya que de por sí la  $B_{max}$  está elevada. Por consiguiente, los efectos de la aMT sobre el receptor de BNZ son directamente efectuados en el SNC, y no necesitan estar mediados por los corticoides suprarrenales, aunque la presencia de estos esteroides (o su ausencia) contribuyan a la regulación del dicho receptor.

En ratas HPx, en las que hay ya un ligero aumento de la  $B_{max}$ , la inyección de aMT sólo aumenta ligeramente el número de sitios receptores, lo que parece indicar que la presencia de ACTH y péptidos derivados puede ser necesaria para actuar sinérgicamente con la aMT sobre el receptor de BNZ.

El hecho de que el efecto de la aMT dependa del nivel previo de la  $B_{max}$  para modificar este parámetro o no, parece quedar algo más claro en el experimento en el cual se

inyectó aMT a un grupo de ratas Px+ADx. En este caso, se trata de dos manipulaciones quirúrgicas que tienen efectos opuestos sobre el receptor de BNZ: la Px disminuye la  $B_{max}$  mientras que la ADx la eleva. Aunque el efecto de la ADx parece predominar sobre el de la Px, ya que el resultado final de ambas operaciones es un aumento de la  $B_{max}$  con

respecto a la rata control, la administración de aMT a dosis de 10 ng/rata es incapaz de modificar en ningún sentido la  $B_{max}$ ; ya que el efecto de la aMT es el de aumentar la  $B_{max}$ , parece como si los niveles ya elevados del receptor impidan una posterior elevación por efecto de la aMT. Es decir, la extirpación de suprarrenales y pineal disminuye la actividad estimulante de la aMT. No hay que descartar, sin embargo, que los niveles elevados de ACTH y péptidos derivados que se producen tras la ADx (Stewart, 1986), ocupen ya todos sus sitios receptores, así como los de la  $\beta$ -endorfina, impidiendo un efecto de la aMT.

Para comprobar este punto (Figura 48), se inyectaron en ratas ADx y Px ó HPx, los dos péptidos derivados de la ACTH, el ACTH<sub>1-10</sub> y el ACTH<sub>4-10</sub>, a dosis de 10 ng/rata, que ya sabemos que son efectivas. Los resultados indican que en ratas Px+ADx, tanto el ACTH<sub>1-10</sub> como el ACTH<sub>4-10</sub> son efectivos para aumentar la  $B_{max}$  del receptor de BNZ, demostrando que no hay esa ocupación máxima del receptor al que antes aludíamos. Sin embargo, en ratas HPx, la

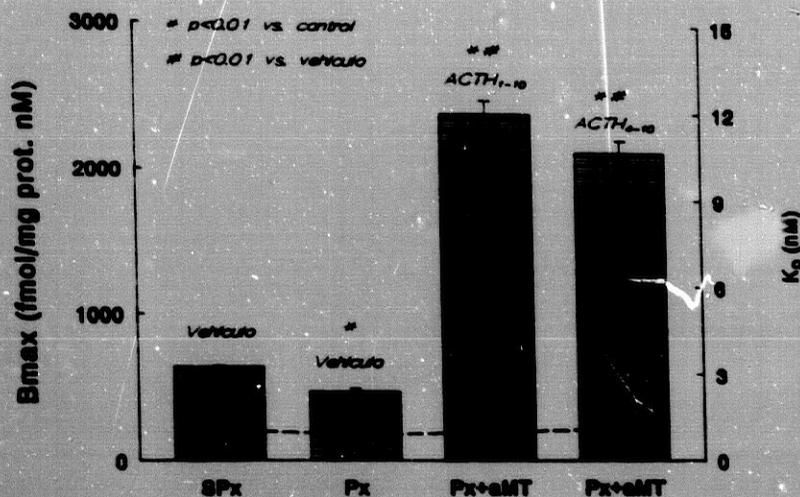


Figura 49: Efecto de los péptidos hipofisarios sobre la acción de la aMT.

efectividad del ACTH<sub>4-10</sub> es menor que la del ACTH<sub>1-10</sub>, indicando algún mecanismo diferente de acción de ambos péptidos.

Además, en ratas Px sólo, la administración conjunta de ACTH<sub>1-10</sub> ó ACTH<sub>4-10</sub> y aMT produce una potenciación de los efectos de la administración individual del péptido o del incó ya que hay un incremento mucho mayor de la B<sub>max</sub> (Figura 49).

### C.- DE LA MODULACION DE LA ACCION DE LA aMT POR LOS NEUROPEPTIDOS.

Llega el momento de discutir si los efectos centrales de la aMT sobre el receptor de BNZ son modulados por los neuropeptidos hasta ahora estudiados, es decir, los péptidos derivados de ACTH

y los péptidos opiáceos.

El primer dato interesante es que en ratas controles, la administración simultánea de aMT (10 ng/rata) y β-endorfina (10 ng/rata) produce un significativo aumento de la B<sub>max</sub> sin cambios sustanciales en al K<sub>D</sub> (Figura 50). Estos efectos son bloqueados totalmente por la inyección simultánea de naloxone a

dosis de 10 ng/rata, restaurando a sus niveles basales la B<sub>max</sub>. Por su parte, en la rata gangliectomizada, en la cual falta la inervación simpática pineal, y por tanto el control rítmico de la secreción de aMT (equivale en cierta medida a una pinealectomía), y que presenta unos valores de B<sub>max</sub> similares a los de las ratas Px, la administración conjunta de β-endorfina y aMT a las mismas dosis que antes, produce similares efectos a los de las ratas controles, aunque con un mayor incremento de la B<sub>max</sub>. Sin

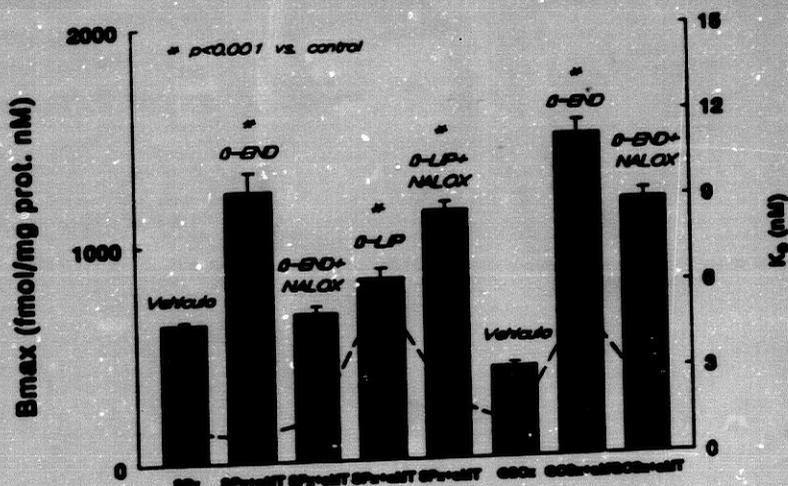


Figura 50: Efecto de la β-END sobre la acción de la aMT.

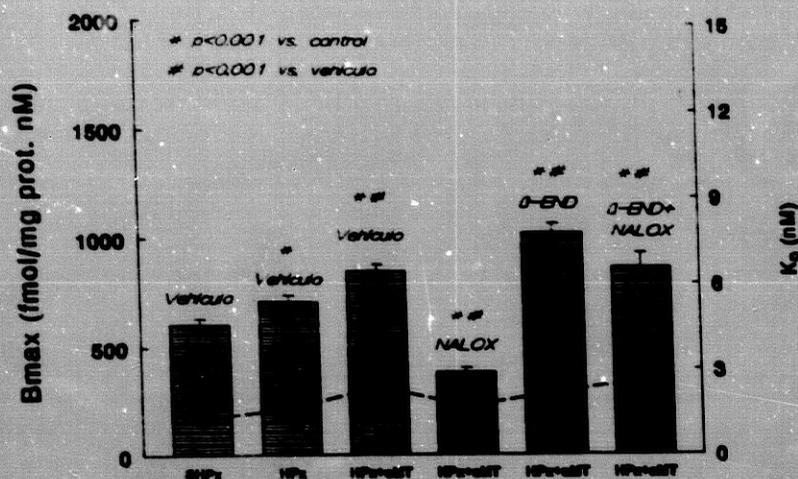


Figura 51: Efecto de la  $\beta$ -END sobre la acción de la aMT en ratas HPx.

embargo, la inyección simultánea de naloxone (10 ng/rata) en este caso no es capaz de bloquear la respuesta. Hay que tener en cuenta que la inervación simpática que se elimina al extirpar el ganglio cervical superior no sólo inerva la glándula pineal, sino muchas otras estructuras cerebrales, incluida la hipófisis (Cardinali, Vacas y Gejman, 1981), y posiblemente la integridad del sistema nervioso simpático sea necesaria para una adecuada acción de determinadas hormonas, como es el caso de la ACTH (Guarini, Ferrari y Bertolini, 1988).

En el caso de la  $\beta$ -lipotropina, su inyección juntamente con la aMT no modifica sustancialmente el efecto del péptido sólo, que induce un aumento significativo de la  $K_D$  (descenso de la afinidad), y un aumento también de la  $B_{max}$  sugiriendo igualmente la aparición de sitios de baja afinidad en el medio. La

administración concomitante de naloxone no bloquea el efecto de la  $\beta$ -lipotropina (Figura 50)

Si extirpamos la hipófisis, para eliminar los efectos de la ACTH y péptidos derivados, la administración simultánea de  $\beta$ -endorfina y aMT a las mismas dosis que antes, produce un incremento de la  $B_{max}$  similar al observado

anteriormente en la rata control, siendo este efecto sólo parcialmente bloqueado por el naloxone (Figura 51). Sin embargo, el naloxone sí es capaz de bloquear totalmente el aumento de la  $B_{max}$  que se produce en ratas HPx tras la inyección de aMT. Esto nos lleva a decir que el efecto de la aMT, al menos parcialmente, sobre el receptor central de BNZ, es mediado por el receptor de  $\beta$ -endorfinas.

La administración simultánea de aMT,  $\beta$ -endorfina y ACTH<sub>1-10</sub> en ratas HPx no modifica

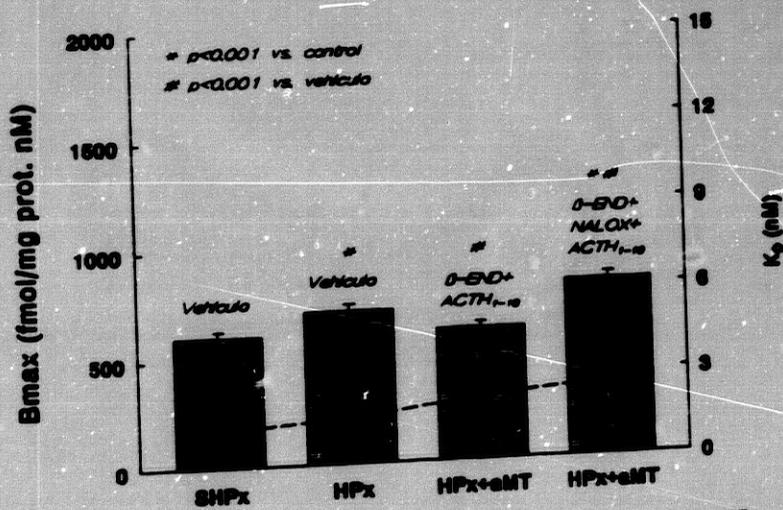


Figura 52: Efecto de los péptidos hipofisarios sobre la acción de la aMT en ratas HPx.

sustancialmente la  $B_{max}$  en relación a las ratas HPx, cosa por otro lado lógica si se tiene en cuenta que si la ACTH<sub>1-10</sub> y la  $\beta$ -endorfina actúan sobre el mismo receptor (y quizás la

aMT), puede existir competitividad entre las drogas para el mismo sitio de unión, y por tanto, se anulan sus efectos (*Figura 52*). Por esta razón, la inyección simultánea de naloxone no produce ningún efecto a la dosis usada.

---

*CONCLUSIONES*

---

## CONCLUSIONES

- 1.- El sitio de unión del [<sup>3</sup>H]-FNZ aquí estudiado presenta unas constantes cinéticas de disociación ( $K_D = 3$  nM) y número de sitios receptores ( $B_{max} = 250$  fmol/mg prot.) compatibles con el receptor central de alta afinidad de BNZ. Dicho receptor exhibe un ritmo circadiano con un máximo de la  $B_{max}$  a las 24 h, y unos valores más bajos el resto del día, sin cambios significativos en la ( $K_D$ ).
- 2.- La pinealectomía anula el pico nocturno y deprime la  $B_{max}$  a las 12 del mediodía, invirtiendo el ritmo circadiano, sin afectar significativamente a la afinidad ( $K_D$ ). Este efecto depresor de la Px sobre la  $B_{max}$  es similar al obtenido tras la denervación simpática de la pineal por extirpación del ganglio cervical superior.
- 3.- El descenso en la  $B_{max}$  tras la Px es contrarrestado por la administración de aMT a dosis de 50  $\mu$ g/kg de peso, indicando un efecto fisiológico de la hormona. Sin embargo, este efecto de la aMT no depende de una acción directa del indol sobre el receptor de BNZ, ya que hasta concentraciones de  $10^{-4}$ , la aMT no compete con la unión del [<sup>3</sup>H]-FNZ a su receptor in vitro.
- 4.- La suprarrenalectomía eleva significativamente la  $B_{max}$  en todos los puntos del ritmo circadiano del receptor de BNZ, con un mayor aumento de su pico nocturno, sin cambios significativos en la  $K_D$ . La presencia de una hipófisis intacta no es necesaria para el desarrollo de los efectos de la ADx, ya que las ratas ADx e HPx muestran unos valores de  $B_{max}$  similares a los de las ratas ADx solamente. Este efecto de la ADx se revierte por una sola dosis de corticosterona (5 mg/rata i.p., 24 h antes), la cual tampoco compete in vitro con la unión del [<sup>3</sup>H]-FNZ a su receptor.
- 5.- La administración intracerebral de aMT en ratas Px produce un efecto dosis-respuesta sobre la unión del [<sup>3</sup>H]-FNZ, en la misma dirección, aunque de mayor magnitud, que la administración sistémica de dicha hormona. Este efecto es similar al obtenido en ratas gangliectomizadas. En ratas ADx, la administración intracerebral de aMT incrementa todavía más la  $B_{max}$  de la unión del [<sup>3</sup>H]-FNZ, con un descenso significativo en la  $K_D$ , mientras que en ratas HPx, el efecto de la aMT es mucho menos significativo.
- 6.- La administración intracerebral de los péptidos ACTH<sub>1-10</sub> y ACTH<sub>4-10</sub> en ratas controles eleva significativamente la  $B_{max}$  siendo el efecto dosis-dependiente para la ACTH<sub>1-10</sub>. En ratas ADx+Px, el efecto de la administración de dichos péptidos es menor, al igual que lo que ocurre en ratas HPx. El efecto de la ACTH<sub>1-10</sub> es sinérgico con el de la aMT, produciéndose la suma de los efectos de ambos tras su inyección conjunta.

- 7.- La inyección intracerebral de los péptidos opioides  $\beta$ -endorfina y  $\beta$ -lipotropina en ratas normales y Px producen un aumento significativo de la  $D_{max}$  siendo este efecto cuantitativamente mayor en el caso de la  $\beta$ -endorfina. En controles, la inyección intracerebral de aMT no modifica los efectos de la  $\beta$ -endorfina sobre la  $B_{max}$ . Sin embargo, la administración concomitante de naloxone bloquea dicho efecto estimulante.
- 8.- En ratas HPx, la inyección intracerebral de aMT aumenta la  $B_{max}$  efecto que es bloqueado por la inyección simultánea de naloxone. Asimismo, el efecto estimulante de la administración de  $\beta$ -endorfina y aMT en ratas HPx, es bloqueado también por el naloxone.
- 9.- El efecto de la administración simultánea de los tres compuestos con efecto estimulante sobre la  $B_{max}$   $\beta$ -endorfina, ACTH<sub>1-10</sub> y aMT, en ratas HPX, no produce un efecto sumatorio total, ya que no altera significativamente la  $B_{max}$  de las ratas HPx. Además, la administración de naloxone no modifica el valor de la  $B_{max}$ .
- 10.- Podemos decir, en consecuencia, que la aMT ejerce un efecto periférico regulador del receptor central de alta afinidad de BNZ en la corteza cerebral de la rata. Dicho efecto, mediado por los corticoides suprarrenales, no parece necesitar de la actividad hipofisaria.
- 11.- En segundo lugar, la aMT parece ejercer un efecto regulador central sobre dicho receptor de BNZ en la corteza cerebral de la rata, efecto que parece mediarse a través del receptor opioide central de la  $\beta$ -endorfina.
- 12.- En tercer lugar, los péptidos conductuales ACTH<sub>1-10</sub> y ACTH<sub>4-10</sub> presentan un efecto modulador sobre dicho receptor central de BNZ que comparten con la aMT. Dicha modulación puede realizarse a través del receptor opioide central, o del propio receptor de ACTH.

---

**BIBLIOGRAFIA**

---

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abols, I.A. and Basbaum, A.L.: Afferent input to the medullary reticular formation and raphe magnus of the cat: an HRP study. *Anat. Record.*, 93: 467, 1979.
- 2.- Acuña, D.; Castillo, J.L.; Fernández, B.; Gomar, M.D.; Del Aguila, C.M.: Modulation by pineal gland of ouabain high affinity binding sites in the rat cerebral cortex. *Am. J. Physiol: Reg. Integr. Comp. Physiol.*, 1992a (en prensa).
- 3.- Acuña, D.; Del Aguila, C.M.; Fernández, B.; Gomar, M.D.; Castillo, J.L.: Pinealectomy increases ouabain-high-affinity binding sites and dissociation constant in rat cerebral cortex. *Neurosci. Lett.*, 127: 227-230, 1991.
- 4.- Acuña, D.; Del Aguila, C.M.; Fernández, B.; Gomar, M.D.; Castillo, J.L.: Characterization of ouabain high affinity binding to rat cerebral cortex. Modulation by melatonin. *Eur. J. Pharmacol.*, 1992b (en prensa).
- 5.- Acuña, D.; Fernandez, B.; Aguila, C.M. del; Castillo; J.L.: Lesions in suprachiasmatic nuclei stimulate effects of pinealectomy on prolactin release in ovariectomized and sulpiride-treated female rats. *Experientia*, 45: 739-742, 1989.
- 6.- Acuña, D.; Fernández, B.; Ferrón, F.; Del Rosal, J.A.: Effects of pineal-adrenal axis on central inhibitory transmission in male rats. *4th Colloquium of the European Pineal Study Group. Modena (Italia)*, 1987.
- 7.- Acuña, D.; Fernandez, B.; Gomar, M.D.; Del Aguila, C.M.; Castillo, J.L.: Influence of the pituitary- adrenal axis on benzodiazepine receptor binding to rat cerebral cortex. *Neuroendocrinology*, 51: 97-103, 1990.
- 8.- Acuña, D.; Garcia del Rio, C.; Garcia Torres, L.; Luna, J.; Osorio, C.: Role of pineal gland in kidney-adrenal homeostasis. *Horm. Metab. Res.*, 16: 589-592, 1984.
- 9.- Acuña, D.; Garcia Torres, L.; Vargas, F.; Soler, A.; Sanchez-Cantalejo, E.; Garcia del Rio, C.: Papel de la glándula pineal en la función suprarrenal de ratas ovariectomizadas. *Laboratorio*, 72: 207-216, 1982.
- 10.- Acuña, D.; Lowenstein, P.R.; Rosenstein, R.; Cardinali, D.P.: Diurnal variations on benzodiazepine binding in rat cerebral cortex: disruption by pinealectomy. *J. Pineal Research*, 3: 101-106, 1986b.
- 11.- Acuña, D.; Rosenstein, R.E.; Romeo, H.E.; Cardinali, D.P.: Changes in gamma-aminobutyric acid high affinity binding to cerebral cortex membranes after pinealectomy or melatonin administration to rats. *Neuroendocrinology*, 43: 24-31, 1986a.
- 12.- Acuña, D.; Soler, A.; García Torres, L.; Vargas, F.; García del Rio, C.; Quesada, T.; Osorio, C.: Inhibition of the renin-angiotensin system by pinealectomy in female rats. *Rev. Esp. Fisiol.*, 38: 251-256, 1982.
- 13.- Adams, J.E.: Naloxone reversal of analgesia produced by brain stimulation in the human. *Pain.*, 2: 161-166, 1976.

- 14.- Airaksinen, E.M.: Tryptophan treatment in infants with Down's Syndrome. *Ann. Clin. Res.*, 6: 33-39, 1974.
- 15.- Akil, H. and Liebeskind, J.C.: Monoaminergic mechanism of stimulation produced analgesia. *Brain Res.*, 94: 279-296, 1975.
- 16.- Albertson, T.E.; Petterson, S.L.; Stark, L.G.; Lakin, M.L.: The anticonvulsant properties of melatonin in kindled seizures in rats. *Neuropharmacology*, 20: 61-66, 1981.
- 17.- Almay, B.G.L.; Knorrning, L. Von; Wetteberg, L.: Melatonin in serum and urine in patients with idiopathic pain syndromes. *Psychiatry Res.*, 22: 179-191, 1987.
- 18.- Axerod, J.; Weissbach, H.: Enzymatic O-methylation of N-acetyl-serotonin to melatonin. *Science*, 131: 1312, 1960.
- 19.- Allen, R. G.; Herbert, E.; Hinman, M.; Shibuya, H. and Pert, C.B.: Coordinate control of corticotropin,  $\beta$ -lipotropin, and  $\beta$ -endorphin release in mouse pituitary cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75: 4972-4976, 1978.
- 20.- Anton-Tay, F.: Melatonin effects on brain function. *Adv. Biochem. Psychopharm.*, 11: 315-324, 1974.
- 21.- Anton-Tay, F.: Pineal-brain relationships. En: *The Pineal Gland*. Wolstenhokme, G.E. N.; Knight, J. (eds.). Churchill, Londres; pp: 213-227, 1971.
- 22.- Anton-Tay, F.; Chou, D.; Anton, S.; Wurtman, R.J.: Brain serotonin concentration: elevation following melatonin administration, I. *Science*, 162: 277-278, 1968.
- 23.- Anton-Tay, F.; Dfiaz, J.L.; Fernández-Guar-  
diola, A.: On the effect of melatonin upon human brain. Its possible therapeutic implication, II. *Life Sciences*, 10: 841-850, 1971.
- 24.- Anton-tay, F.; Sepulveda, J.; Gonzalez, S.: Increase on brain pyridoxal phosphokinase activity following melatonin administration, I. *Life Sciences*, 9: 1283-1288, 1970.
- 25.- Ardeleanu, A.; Sterescu, N.: RNA and DNA synthesis in developing rat brain: hormonal influences. *Psychoneuroendocrinology.*, 3: 93-101, 1978.
- 26.- Arnaud, J.; Nobili, O.; Boyer, J.: Does the neurotropic action of adrenocorticotrophic hormone involve a lipolytic step ?. *Biochem. Biophys. Acta.*, 665: 244-249, 1981.
- 27.- Baesrup, C.; Nielsen, M.; Olsen, C.E.: Urinary and brain  $\beta$ -carboline-3-carboxylates as potent inhibitors of brain benzodiazepine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 2288-2292, 1980.
- 28.- Bailey, C.J.; Atkins, T.N.; Matty, A.J.: Melatonin inhibition of insulin secretion in the rat and mouse. *Horm. Reg.*, 5: 21, 1974.
- 29.- Behbehani, M.M. and Pomeroy, S.L.: Effect of morphine injected in periaqueductal gray on the activity of single units in nucleus raphe magnus of the rat. *Brain Res.*, 149: 266-269, 1978.
- 30.- Bertolini, A.; Poggioli, R.; Vergoni, A.V.; Castelli, M.; Genedani, S. En: *Central action of ACTH and related peptides*. De Wied, D.; Ferrari, V., (eds). Liviana Press/Springer Verlag, Berlin. pp. 207-222, 1986.
- 31.- Bindoni, M.; Rizzo, R.: Hippocampal evoked potentials and convulsive activity after elec-

- trolytic lesions of the pineal body, in chronic experiments on rabbits. *Arch. Sci. Biol.*, 49: 223-233, 1965.
- 32.- Birks, R.I.: The role of Na<sup>+</sup> ions in the metabolism of acetylcholine. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 41: 2573-2597, 1963.
- 33.- Blalock, J.E.; Smith, E.M. and Meyer, W.J. IIIrd.: The pituitary- adrenocortical axis and the immune system. En: *Clinics in Endocrinology and Metabolism: the Pituitary-Adrenocortical Axis*. Besser, G.M. and Rees, L.H. ( eds.). Saunders, London. pp. 1021-1038, 1985.
- 34.- Bohus, B.: Effect of ACTH-like neuropeptides on animal behaviour and man. *Pharmacology*, 18: 113-122, 1979.
- 35.- Brueske, V.; Allen, J.; Kepic, T.; Meissner, W.; Lee, R.; Vaughan, G.; Weinberg, V.: Melatonin inhibition of seizure activity in man. *American EEG Society*, Boston, 1980.
- 36.- Buckingham, J.C.: Secretion of corticotrophin and its hypothalamic releasing factor in response to morphine and opioid peptides. *Neuroendocrinology*, 35: 111-116, 1982.
- 37.- Bylund, D.B.: Analysis of receptor binding data. En: *Receptor binding techniques*. Society for Neuroscience (Eds.). Ohio. pp. 70-79, 1980.
- 38.- Cardinali, D.P.: Melatonin: a mammalian pineal hormone. *Endocrine Rev.*, 2: 327-346, 1981.
- 39.- Cardinali, D.P.; Lowenstein, P.R.; Rosenstein, R.; González-Solveyra, C.; Keller Sarmiento, M.I.; Romeo, H.E.; Acuña, D.: Functional links between benzodiazepine and GABA receptors and pineal activity. En: *GABA and Endocrine Function. Advances in Biochemical Psychopharmacology*. Racagni, G.; Donoso, A.O. (eds.). Raven Press, New York. pp. 155-164, 1986.
- 40.- Cardinali, D.P.; Nagle, C.A.; Rosner, J.M.: Gonadotrophin and prolactin induce increase in rat pineal hydroxindole-O-methyltransferase. Involvement of the sympathetic nervous system. *J. Endocrinol.*, 68: 341-346, 1976.
- 41.- Cardinali, D.P.; Nagle, C.A.; Rosner, J.R.: Aromatization of androgens to estrogens by the rat pineal gland. *Experientia*, 30: 1022, 1974.
- 42.- Cardinali, D.P.; Vacas, M.I.; Gejman, P.V.: The sympathetic superior cervical ganglia as peripheral neuroendocrine centers. *J. Neural Transm.*, 52: 1-21, 1981.
- 43.- Cardinali, D.P.; Vacas, M.I.; Keller Sarmiento, M.I.; Etchegoyen, G.S.; Perayra, E.; Chuluyan, H.E.: Neuroendocrine integrative mechanism in mammalian pineal gland. Effects of steroid and adenohipophyseal hormones on melatonin synthesis in vitro. *J. Steroid. Biochem.*, 27: 565-571, 1987.
- 44.- Cardinali, D.P.; Vacas, M.I.; Lowenstein, P.R.: Mechanism for controlling pineal activity. En: *Advances in the Biosciences*. Brown, G.M.; Bainwright, S.D. (eds.); Pergamon Press, New York; pp. 1-12, 1985.
- 45.- Carter, D.; Lightman, S.L.: Opiates. *Neuroendocrinology*, 5: 103-153, 1986.
- 46.- Carter, D.A.; Lightman, S.L. and Williams, T.D.M.: Naloxone potentiates the posterior

- pituitary response to immobilization in female, but not male rats. *J. Physiol.*, **360**: 76, 1985.
- 47.- Castillo, J.L.; Vives, F.; Acuña, D.: Paradoxical effects on spontaneous neuronal activity in the striatum of sham-operated and pinealectomized rats. *J. Pineal Res.*, 1992 (enviado).
- 48.- Coleman, M.: Infantile spasms associated with 5-hydroxytryptophan administration in patients with Down's Syndrome. *Neurology*, **21**: 911-919, 1971.
- 49.- Coleman, M.: Myoclonus in the young after 5-hydroxytryptophan. *New Engl. J. Med.*, **7**: 820, 1977.
- 50.- Costa, E. Guidotti, A.: Endogenous ligands for benzodiazepine recognition sites. *Biochem. Pharmacol.*, **34**: 3399-3402, 1988.
- 51.- Costa, E.; Guidotti, A.; Hanbauer, I.; Hexum, T.; Saiani, L.; Stine, S.; Yang, H.Y.T.: Regulation of acetylcholine receptors by endogenous cotransmitters: studies of adrenal medulla. *Fed. Proc.* **40**: 160-165, 1981.
- 52.- Costa, E.; Guidotti, A.; Mao, C.C.: Evidence for involvement of GABA in the action of benzodiazepines: studies on rat cerebellum. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **14**: 113-130, 1975.
- 53.- Cotzias, G.C.; Papavasiliou, P.S.; Ginos, J.; Steck, A.; Duby, S.: Metabolic modification of Parkinson's disease and of chronic manganese poisoning. En: *Annual Review of Medicine*. Degraff, A.C.; Creger, W.P. (eds.). Palo Alto, California; **22**: 305-326, 1971.
- 54.- Cramer, H.; Rudolph, J.; Consbruch, V.; Kendel, K.: On the effects of melatonin on sleep and behavior in man. *Adv. Biochem. Psychopharm.*, **11**: 187-191, 1974.
- 55.- Chadwick, D.; Gorrod, J.W.; Jenner, P.; Marsden, C.D.; Reynolds, E.H.: Functional changes in central 5-hydroxytryptamine metabolism in the mouse induced by anti-convulsant drugs. *Br. J. Pharmacol.*, **62**: 115-124, 1978.
- 56.- Chadwick, D.; Hallet, M.; Jenner, P.; Marsden, C.D.: Hydroxytryptophan-induced myoclonus in guinea pigs. *J. Neurol. Sci.*, **35**: 157-165, 1978.
- 57.- Cheng, Y.; Prusoff, W.H.: Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharm.*, **22**: 3099-3108, 1973.
- 58.- Chiang, C.Y.; Chang, C.T.; Chu, H.L. and Yang, L.F.: Peripheral afferent pathway for acupuncture analgesia. *Sci. Sin.*, **16**: 210-217, 1973.
- 59.- De Robertis, E.: GABAergic neurotransmission. An overview. En: *GABA and Endocrine Function*. Racagni, G.; Donoso, A.O., (eds). Raven Press, New York. pp. 1, 1986.
- 60.- De Souza, E.B. and Van Loon, G.R.: D-Ala<sup>2</sup>-Met-Enkephalinamide, a potent opioid peptide, alters pituitary-adrenocortical secretion in rats. *Endocrinology*, **111**: 1483-1490, 1982.
- 61.- De Wied, D. and Bohus, B.: Long-term and short-term effect on retention of a conditioned avoidance response in rats by treat-

- ment respectively with long acting pitressin or  $\alpha$ -MSH. *Nature*, 212: 1484-1486, 1966.
- 62.- De Wied, D.: Inhibitory effect of ACTH and related peptides on extinction of conditioned avoidance response in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 122: 28-32, 1966.
- 63.- De Wied, D.; Jolles, J.: Neuropeptides derived from pro-opiocortin: behavioral, physiological and neurochemical effects. *Physiol. Revs.* 62: 976-1059, 1982.
- 64.- Del Aguila, C.M.: Tesina de Licenciatura. Universidad de Granada. Facultad de Medicina, 1990.
- 65.- Del Aguila, C.M.; Castillo, J.L.; Gomar, M.D.; Acuña, D.: Pineal modulation of circadian rhythm of high affinity ouabain binding in the rat cerebral cortex. *Vth Colloquium of the European Pineal Study Group*. Guildford, Surrey (U.K.), 2-7 de septiembre, 1990.
- 66.- Dennis, T.; Dubois, A.; Benavides, J.; Scatton, B.: Distribution of central  $W_1$  (Benzodiazepine 1) and  $W_2$  (Benzodiazepine 2) receptor subtypes in the monkey and human brain. An autoradiographic study with [3H]-flunitrazepam and the  $w_1$  selective ligand [3H]zolpidem. *J. Pharmacol. Exptl. Ther.*, 247: 309-322, 1988.
- 67.- Dubois, A.; Benavides, J.; Peny, B.; Duverger, D.; Fage, D.; Gotti, B.; Mackenzie, E.T.; Scatton, B.: Imaging of primary and remote ischaemic and excitotoxic brain lesions. An autoradiographic study of peripheral type benzodiazepine binding sites in the rat and cat. *Brain Res.*, 445: 77-90, 1988.
- 68.- Duggan, A.W.: Enkephalins as transmitters in the central nervous system. *Circ. Res.*, 46: 149-153, 1980.
- 69.- Duka, T.; Cumin, R.; Haefely, W.; Herz, A.: Naloxone blocks the effect of diazepam and meprobamate on conflict behavior in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 15: 115-117, 1982.
- 70.- Dunn, A.; Schotman, P.: Effects of ACTH and related peptides on cerebral RNA and protein synthesis. *Pharmacol. Ther.*, 12: 353-372, 1981.
- 71.- Eadie, G.S.: The inhibition of cholinesterase by physostigmine and prostigmine. *J. Biol. Chem.*, 146: 85-93, 1942.
- 72.- Ebadi, M.: Regulation of the synthesis of melatonin and its significance in Neuroendocrinology. En: *Comprehensive Endocrinology: The Pineal Gland*. Reiter, R.J. (ed.). Pergamon Press, New York. pp. 1-37, 1984.
- 73.- Ebadi, M.; Chan, A.; Hammand, H.; Govitrapong, P.; Swanson, S.: Serotonin N-acetyltransferase and its regulation by pineal substances. En: *The Pineal and Its Hormones*. Reiter, R.J. (ed). Alan R. Liss, New York. pp. 21-33, 1982.
- 74.- Ebadi, M.; Chan, A.: Characteristics of GABA binding sites in bovine pineal gland. *Brain Res. Bull.*, 5: 179, 1980.
- 75.- Ellis, L.C.: Peripheral and CNS effects of the pineal gland: Target enzymes common to tissues and species. *Am. Zool.*, 16: 67-78, 1976.
- 76.- Enna, S.J.; Mohler, H.:  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) receptors and their association with benzodiazepine recognition sites. En: *Psicho-*

- pharmacology: The Third Generation of Progress*. Meltzer, H.Y. (ed). Raven Press, New York. pp. 265-272, 1987.
- 77.- Everitt, B.J. and Hokfelt, T.: Neuroendocrine anatomy of the hypothalamus. *Neuroendocrinology*, 2: 5-31, 1986.
- 78.- Facchinetti, F.; Nalin, A.; Petraglia, F.; Galli, V.; Genazzi, A.R.: Reduced ACTH, while normal  $\beta$ -endorphin CSF levels in early epileptic encephalopathies. *Peptides*, 6: 31-33, 1985.
- 79.- Fehm, H.L.; Rockstroh, B.; Fehm-Wolfsdorf, G.; Voigt, K.H.; Birbaumer, N. Effects of an ACTH<sub>4,9</sub> analog on event-related brain potentials in man. *Acta Endocrinol*, 96: 45, 1981.
- 80.- Fernández, B.; Malde, J.L.; Montero, A.; Acuña, D.: Pineal gland and gonadotropins: renal clearance rate of FSH, LH and melatonin in the fertile period and in peri- and postmenopausal women. *Med. Sci. Res.*, 16: 849-850, 1988.
- 81.- Fernández, B.; Malde, J.L.; Montero, A.; Acuña, D.: Relationships between adenohipophyseal and steroid hormones and variations in serum and urinary melatonin levels during the ovarian cycle, perimenopause and menopause in healthy women. *J. Steroid. Biochem*, 35: 257-262, 1990.
- 82.- Fernstrom, J.D.; Wurtman, R.J.: Brain serotonin content: Physiological regulation by plasma neutral aminoacids. *Science*, 178: 414-416, 1972.
- 83.- Fields, H.L. and Anderson, S.D.: Evidence that raphe-spinal neurons mediate opiate and midbrain stimulation-produced analgesia. *Pain*, 5: 333-349, 1978.
- 84.- Fiskie, V.M.; Huppert, L.C.: Melatonin action on pineal varies with photoperiod. *Science*, 162: 279, 1968.
- 85.- Flórez, J.; Mediavilla, A. and Pazos, A.: Respiratory effects of  $\beta$ -endorphin, D-al<sup>2</sup>-met-enkephalina-mide, and met-enkephalin injected into the lateral ventricle and the pontomedullary subarachnoid space. *Brain Res.*, 199: 197-206, 1980.
- 86.- Fonnum, F.: Biochemistry, anatomy, and pharmacology of GABA neurons. En: *Psychopharmacology: The Third Generation of Progress*. Meltzer, H.Y., (ed). Raven Press, New York. pp. 173-182, 1987.
- 87.- Frederickson, R.C.A. and Geary, L.E.: Endogenous opioid peptides: review of physiological, pharmacological and clinical aspects. *Progress in Neurobiology*, 19: 19-69, 1982.
- 88.- Frederickson, R.C.A. and Norris, F.H.: Enkephalins as an inhibitory transmitters modulating nociception. En: *Iontophoresis and Transmitter Mechanisms in the Mammalian Central Nervous System*. Ryall, R.W.; Kelly, J.S. (eds.). Elsevier, Amsterdam. pp. 320-322, 1978.
- 89.- Frederickson, R.C.A.: Enkephalin pentapeptides, a review of current evidence for a physiological role in vertebrate neurotransmission. *Life Science*, 21: 23-42, 1977.
- 90.- Frenk, H.; Urca, G. and Liebeskind, J.C.: Epileptic properties of leucine and methionine-enkephalin: comparison with morphine

- and reversibility by naloxone. *Brain Res.*, 147: 327-337, 1978.
- 91.- Friegood, H.B.: The nervous control of the anterior hypophysis. *J. Reprod. Fertil.*, 10: 3-14, 1970.
- 92.- Fukumori, R.; Minegishi, A.; Satoh, T.; Kitagawa, H.; Yanaura, S.: Tryptophol-induced change in brain 5-hydroxytryptamine metabolism. *Psychopharmacol*, 69: 243-246, 1980.
- 93.- Fuxi, K.; Corrodi, H.; Hokfelt, T.; Jonsson, G.: Central monoamine neurons and pituitary-adrenal activity. En: *Pituitary adrenal and the brain. Progress in Brain Res.*, De Wied; Weijnen, (eds.). Elsevier, Amsterdam. pp. 42-56, 1970.
- 94.- Gaffori, O.; Geffard, M.; Ree, J.M. Van: Des-Tyr-gamma-endorphin and haloperidol increase pineal gland melatonin levels in rats. *Peptides*, 4: 393-395, 1983.
- 95.- Gahwiler, B.H.: Excitatory action of opioid peptides and opiates on cultured hippocampal pyramidal cells. *Brain Res.*, 194: 193-203, 1980.
- 96.- Gallager, D.W. and Pert, A.: Afferents to brainstem nuclei in the rat as demonstrated by microiontophoretically applied horseradish peroxidase. *Brain Res.*, 144: 257-275, 1978.
- 97.- Gavish, M.; Snyder, S.: Soluble benzodiazepine receptor: gabaergic regulation. *Life Sci.*, 26: 579-582, 1980.
- 98.- Genadani, S.; Castelli, M.; Viappiani, A.; Bertolini, A.: Influence, in rats, of intraventricularly-injected ACTH-fragments on the pain threshold and on morphine analgesia. *Riv. Farmacol. Terap.* 9: 51-54, 1978.
- 99.- Gerner, R.H.; Sharp, B. and Catlin, D.H.: Peripherally administered  $\beta$ -endorphin increases cerebrospinal fluid endorphin immunoreactivity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 45: 358-360, 1982.
- 100.- Gillis, R.A.; Quest, J.A.: The role of the nervous system in the cardiovascular effects of digitalis. *Pharmacol. Rev.*, 31: 19-57, 1980.
- 101.- González-García, C.; Ceña, V.; Klein, D.C.: Characterization of the  $\alpha$ -like Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase which mediates ouabain inhibition of adrenergic stimulation of N-acetyltransferase activity: Studies with isolated pinealocytes. *Mol. Pharmacol.*, 32: 793-797, 1987.
- 102.- Greenlee, D.V.; Van Ness, R.C.; Olsen, R.W.: Endogenous inhibitor of GABA binding in mammalian brain. *Life Sci.*, 22: 1653-1662, 1978.
- 103.- Grossman, A. and Besser, G.M.: Opiates control ACTH through a noradrenergic mechanism. *Clin. Endocr.*, 17: 287-290, 1982.
- 104.- Grossman, A. and Rees, L.H.: The neuroendocrinology of opioid peptides. *Br. Med. Bull.*, 39: 83-88, 1983.
- 105.- Guarini, S.; Ferrari, W.; Bertolini, A.: Involvement of the sympathetic nervous system in the cardiovascular effects of ACTH-(1-24) during hemorrhagic shock in rats. *Arch. Pharmacol.*, 337: 556-560, 1988.
- 106.- Guerillot, G.; Cleffran, P.; Pfister, A.;

- Palace, C.: Contribution to the study of the pineal stalk nerve fibers in the rat. En: *The Pineal Gland including man*. Kappers, J.A.; Pevet, P. (eds.); Biomedical Press, Elsevier North Holland, Amsterdam. pp: 97-102, 1979.
- 107.- Guidotti, A.; Gale, K.; Suria, A.; Toffano, G.: Biomedical evidence for two classes of GABA A receptors in rat brain. *Brain Res.*, 172: 566-577, 1979.
- 108.- Haefely, W.: Benzodiazepine receptor and ligands: structural and functional differences. En: *Benzodiazepines: Current Concepts*. Hindmarch, I.; Beaumont, G.; Brandon, S.; Leonard, B.E., (eds.). John Wiley Ltd., New York. pp.1, 1990.
- 109.- Haefely, W.: Endogenous ligands of the benzodiazepine receptor. *Pharmacopsychiatry*, 21: 43-46, 1988.
- 110.- Haefely, W.: The GABA-Benzodiazepine interaction fifteen years later. *Neurochem. Res.*, 15: 169-174, 1988.
- 111.- Haefely, W.; Hunkeler, W.: The story of flumazenil. *Eur. J. Anaesthesiol.*, 2: 3-14, 1988.
- 112.- Haefely, W.; Polc, P.: Physiology of GABA enhancement by benzodiazepines and barbiturates. En: *Benzodiazepine/GABA receptors and chloride channels: structural and functional properties*. Olsen, R.W.; Venter, J.C., (eds.). Alan R. Liss, New York. pp. 97-133, 1986.
- 113.- Haefely, W.E.: Benzodiazepines. *Int. Anesthesiol. Clin.*, 26: 262-272, 1988.
- 114.- Haefely, W.E.; Kyburz, E.; Gerecke, M.; Mohler, H.: Recent advances in the molecular pharmacology of benzodiazepine receptors and in the structure-activity relationships of their agonist and antagonist. *Adv. Drug Res.*, 14: 165-322, 1985.
- 115.- Hamberger, A.; Jacobson, I.; Lindroth, P.; Mopper, K.; Nystrom, B.; Sandberg, M.; Molin, S.; Sranberg, V.: Neuron-glia interactions in the biosynthesis and release of transmitter amino acids. En: *Amino Acids Neurotransmitters*. DeFeudis, F.V.; Mandel, P., (eds.). Raven Press, New York. pp. 509-518, 1981.
- 116.- Hamon, M.; Soubrié, P.: Searching for endogenous ligand(s) of central benzodiazepine receptors. *Neurochem. Int.* 5: 663-672, 1983.
- 117.- Hantraye, P.; Brouillet, E.; Fukada, H.; Chavoix, C.; Guibert, B.; Dudd, R.M.; Prenant, C.; Cronzel, M.; Maquet, R.; Mazzière, M.: Benzodiazepine receptors studied in living primates by positron emission tomography: antagonist interactions. *Eur. J. Pharmacol.*, 153: 25, 1988.
- 118.- Harik, S.I.; Doull, G.H.; Dick, A.P.K.: Specific ouabain binding to brain microvessels and choroid plexus. *J. Cerebral Blood Flow. Metab.*, 5: 156-160, 1985.
- 119.- Harrison, N. L.; Vicini, S.; Barker, J.L.: A steroid anesthetic prolongs inhibitory postsynaptic currents in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurosci.*, 7: 604-609, 1987.
- 120.- Harrison, N.L.; Simmonds, M.A.: Two distinct interactions of barbiturates and chlormethiazole with GABA complex in

- rat cuneatus nucleus in vitro. *Br. J. Pharmacol*, 80: 387-394, 1983.
- 121.- Havoundjian, F.; Paul, S.M.; Skolnick, P.: Acute, stress-induced changes in the benzodiazepine/gamma-aminobutyric acid receptor complex are confined to the chloride ionophore. *J. Pharmac. Ther.*, 237: 787-793, 1986.
- 122.- Hayes, R.L.; Newlon, P.G.; Rosecrans, J.A. and Mayer, D.J.: Reduction on stimulation-produced analgesia by lysergic acid diethylamide, a depressor of serotonergic neural activity. *Brain Res.*, 122: 367-372, 1977.
- 123.- Haynes, R.; Larner, J.: Adrenocorticotrophic hormone: adrenocortical steroids and their synthetic analogs; inhibitors of adrenocortical steroid biosynthesis. En: Dukes, M., (ed.). The side effects of drugs annual. I. The worldwide yearly survey of new data and trends. *Excerpta Medica*, 1501: 1485-1488, 1977.
- 124.- Herrera, H.W.; Morgan, W.W.; Reiter, R. J.: Brain norepinephrine levels in parathyroidectomized rats induced to convulsive by pinealectomy. *Exp. Neurol*, 48: 595-600, 1975.
- 125.- Hill, A.W.: The mode of action of nicotine and curare determined from the contraction curve and the method of temperature coefficients. *J. Physiol*, 39: 361, 1909.
- 126.- Hoffman, R.A.; Reiter, R.J.: Rapid pinealectomy in hamster and other small rodents. *Science*, 148: 1609, 1965.
- 127.- Hofstee, B.H.J.: On the evaluation of the constants  $V_m$  and  $K_m$  in enzyme reactions. *Science*, 116: 329-331, 1952.
- 128.- Hokfelt, T.; Lundberg, J.M.; Schultzberg, M.; Johansson, O.; Ljungdahl, A. and Rehfled, J.: Coexistence of peptides and putative transmitters in neurons. En: *Adv. in Biochem. Psychopharmacol.* Costa E.; Trabucchi, M. (eds.). Raven Press, New York. pp. 1-23, 1980.
- 129.- Holaday, J.W. and Faden, A.I.: Naloxone reversal of endotoxin hypotension suggest role of endorphins in shock. *Nature*, 275: 450-451, 1978.
- 130.- Holtt, V.; Przewlocki, R. and Herz, A.:  $\beta$ -endorphin-like immunoreactivity in plasma, pituitaries and hypothalamus of rats following treatment with opiates. *Life Sci.*, 23: 1057-1066, 1978.
- 131.- Hoscobuchi, Y.; Rossier, J. Bloom, F.E. and Guillemin, R.: Stimulation of human periaqueductal gray for pain relief increases immunoreactive  $\beta$ -endorphin in ventricular fluid. *Science*, 203: 279-281, 1979.
- 132.- Houghten, R.A.; Swann, R.W.; and Li, C.H.:  $\beta$ -endorphin: stability, clearance behaviour, and entry into the central nervous system after intravenous injection of the tritiated peptide in rats and rabbits. *Proceed. of the Natl. Acad. of Sci. USA*, 77: 4588-4591, 1980.
- 133.- Huges, J.; Smith, T.W.; Kosterlitz, A.W.; Fothergill, L.A., Morga, H.R.: Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*, 258: 577-579, 1975.
- 134.- Huidobro-Toro, J.P.; Bleck, V.; Allan, A.M.; Harris, R.A.: Neurochemical actions

- of anesthetic drugs on the  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor-chloride channel complex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 242: 963-969, 1987.
- 135.- Huttenlocher, P.; Willbourne, A.; Signore, J.: Medium-chain triglycerides as a therapy for intractable childhood epilepsy. *Neurology*, 21: 1097, 1971.
- 136.- Iguchi, H.; Kato, K.; Ibayashi, H. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 55: 27-29, 1982.
- 137.- Illterova, H.: Effect of estradiol on the activity of serotonin N-acetyl-transferase in the rat epiphysis. *Endocrinol. Exp.*, 9: 141-144, 1975.
- 138.- Imura, H.: ACTH and related peptides: molecular biology, biochemistry and regulation of secretion. En: *Clinics in Endocrinol. and Metabolism., The Pituitary-Adrenal Axis.* Besser, G.M.; Rees, L.H. (eds.). W.B. Saunders, London. pp. 845-866, 1985.
- 139.- Ito, M.; Mikawa, F.; Yanaguchi, T.: Cerebrospinal fluid GABA levels in children with infantile spasms. *Neurology*, 34: 235-238, 1984.
- 140.- Ito, M.; Okuno, T.; Mikawa, H.; Osumi, Y.: Elevated homovanillic acid in cerebrospinal fluid of children with infantile spasms. *Epilepsia*, 21: 387-392, 1980.
- 141.- Jacob, J.J.; Tremblay, E.C. and Colombel, M.C.: Facilitation de reactions nociceptives par la naloxone chez la souris et chez le rat. *Psychopharmacologica*, 37: 217-223, 1974.
- 142.- Jacquet, Y.F.: Opiate effects after adrenocorticotropin or  $\beta$ -endorphin injection in the periaqueductal gray matter of rats. *Science*, 201: 1032-1034, 1978.
- 143.- Jacquet, Y.F.; Abrams, G.M.: Postural asymmetry and movement disorder after unilateral microinjection of adrenocorticotropin 1-24 in rat brain stem. *Science* 218: 175-177, 1982.
- 144.- Judd, A.M. and Hedge, G.A.: The role of opioid peptides in controlling thyroid stimulin hormone release. *Life Sci.* 31: 2529-2536, 1982.
- 145.- Kafka, M.S.; Wirz-Justice, A.; Naber, D.; Marangos, P.J.; O'Donohue, T.L.; Werh, T.A.: Effect of lithium on circadian neurotransmitter receptor rhythms. *Neuropsychobiology*, 8: 41-50, 1982.
- 146.- Kahri, A.L.; Salmempera, M.; Voutilainen, R.: Steroid background during neuronal differentiation of medullary cell of human and rat adrenals in primary cultures. En: *Histochemistry and cell biology of autonomic neurons.* II International Symposium on Nervous Transmission. University of Helsinki, Helsinki, 1979.
- 147.- Kalin, N.; Carnes, M.; Barksdale, C.M.: Effects of acute behavioural stress on plasma and cerebrospinal fluid ACTH and  $\beta$ -endorphin in rhesus monkey. *Neuroendocrinology*, 40: 97-101, 1985.
- 148.- Kappers, J.A.: The development of topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rats. *Z. Zellforsch.*, 52: 163-215, 1960.
- 149.- Kavaliers, M.; Hirst, M.; Teskey, G.C.: Ageing, opioid analgesia and the pineal gland. *Life Sci.* 32: 2279-2287, 1983.

- 150.- Kellogg, C.K.: Benzodiazepines: influence on the developing brain. *Prog. Brain Res.*, **73**: 207-228, 1988.
- 151.- Kendall, D.A.; McEwen, B.S.; Enna, S.J.: The influence of ACTH and corticosterone on (<sup>3</sup>H) GABA receptor binding in rat brain. *Brain Res.*, **236**: 365-374, 1982.
- 152.- King, M.G.; Geffard, M.R.; Chavreau, J.; Gaffori, O.; Le Moal, M.; Muiyard, J.P.: Des-Tyr-γ-Endorphin (DTγE) and pineal levels of melatonin and arginine vasopressin (AVP). *Eur. J. Pharmacol.*, **76**: 271-274, 1981.
- 153.- Kiser, R.S.; Jackson, S.; Smith, R.: Endorphin related peptides in rat cerebrospinal fluid. *Brain Res.*, **288**: 187-192, 1983.
- 154.- Kiss, J.Z.; Kanyicstka, B.; Mezey, E. and Nagy, G.: The Hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) appears to have a pivotal role in suckling induced and episodic prolactin secretion in lactating rats. *Neurosci. Lett.*, **22**: 5223, 1985.
- 155.- Kitay, J.; Altschule, M.D.: The Pineal Gland. Harvard University Press, Cambridge, Mass. 1954.
- 156.- Klein, D.C.; Auerbach, D.A.; Weller, J.L.: Seesaw signal processing in pineal cells: homologous sensitization of adrenergic stimulation of cyclic GMP accompanies homologous desensitization of β-adrenergic stimulation of cyclic AMP. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**: 4625, 1981.
- 157.- Klein, D.C.; Weller, J.L.: Adrenergic adenosine-3'-5'-monophosphatase regulation of serotonin N-acetyl-transferase activity and the temporal regulation of serotonin N-acetyl-serotonin and <sup>3</sup>H-melatonin in the cultured rat pineal gland. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **186**: 516-527, 1973.
- 158.- Klepner, C.A.; Lippa, A.S.; Benson, D.I.; Sano, M.C.; Beer, B.: Resolution of two biochemically and pharmacologically distinct benzodiazepine receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **11**: 457-462, 1979.
- 159.- Konturek, S.J.: Endogenous opiate and the digestive system. *Scand. J. Gastroent.*, **13**: 257-261, 1978.
- 160.- Krieger, D.: ACTH, β-lipotropin, and related peptides in brain, pituitary and blood. *Recent. Prog. Horm. Res.*, **16**: 277-336, 1980.
- 161.- Krieger, D.T.: Placenta as a source of pituitary and brain hormones. *Biol. Reproduc.*, **26**: 55-71, 1982.
- 162.- Krieger, D.T.; Liotta, A.S.; Brownstein, M.J. and Zimmerman, E.A.: β-lipotropin and related peptides in brain, pituitary and blood. *Recent. Progr. Horm. Res.*, **36**: 277-344, 1980.
- 163.- Krnjevic, K.; Schwartz, S.: The action of GABA on cortical neurones. *Exp. Brain Res.*, **3**: 320-336, 1967.
- 164.- Kumar, M.S.A.; Besch, G.L.; Millard, W.J.; Shard, D.C.; Leadem, C.A.: Effect of short photoperiod on hypothalamic methionine enkephalin and LHRH content and serum β-endorphin-like immunoreactivity (β-endorphin-Li) levels in golden hamster. *J. Pineal Research*, **1**: 197-205, 1984.
- 165.- Lagenstein, I.; Willig, R.P.; Kuehne, D.: Cranial computed tomography (CCT)

- findings in children treated with ACTH and desamethasone: first results. *Neuropediatrica*, **10**: 370-384, 1979.
- 166.- Lamberts, S.W.J.; Janssan, E.N.W.; Bous, E.G.; Utterlinden, P.; Zuierwijk, J.M.; Del Pozo, E.: The met-enkephalin analogue FK 33824 directly inhibits ACTH release in the rat pituitary gland in vitro. *Life Sci.*, **32**: 1167-73, 1983.
- 167.- Lancranjan, L.: Hypothalamic and epithalamic control of pituitary secretion. *Sandorama*, **3**: 27, 1980.
- 168.- Langer, S.Z.; Arbilla, S.: Limitations of the benzodiazepine receptor nomenclature: a proposal for a pharmacological classification as omega receptor subtypes. *J. Fund. Clin. Pharmacol.*, **2**: 159-170, 1988.
- 169.- Lasagna, L.: Drug interaction in the field of analgesic drugs. *Proc. R. Soc. Med.*, **58**: 978-983, 1965.
- 170.- Lee, H.K.; Dunwiddie, T. and Hoffer, B.: Electrophysiological interactions of enkephalins with neuronal circuitry in the rat hippocampus. II. Effects on interneuron excitability. *Brain Res.*, **184**: 331-342, 1980.
- 171.- Leino, E.; MacDonald, E.; Airaksinen, M.; Riekkinen, P.: Homovanillic acid and 5-hydroxyindoleacetic acid levels in cerebrospinal fluid of patients progressive myoclonus epilepsy. *Acta Neurol. Scand.*, **62**: 41-54, 1980.
- 172.- Leonard, B.E.: The effect of two synthetic ACTH analogues on the metabolism of biogenic amines in rat brain. *Archs. int. Pharmacodin. Ther.*, **207**: 242-253, 1974.
- 173.- Lerner, A.B.; Case, J.D.; Takahashi, Y.: Isolation of melatonin and 5-met-indole-3-acetic acid from bovine pineal gland. *J. Biol. Chem.*, **235**: 1992-1997, 1960.
- 174.- Lerner, A.B.; Case, J.D.; Takahashi, Y.; Lee, T.H.: Structure of melatonin. *J. Am. Chem. Soc.*, **80**: 2587, 1958.
- 175.- Levine, J.D.; Gordon, N.C.; Jones, R.T. and Fields, H.L.: The narcotic antagonist naloxone enhances clinical pain. *Nature*, **272**: 826-827, 1978b.
- 176.- Lichtstein, D.; Samuelov, S.: Endogenous ouabain-like activity in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **96**: 1518-1523, 1980.
- 177.- Lissoni, P.; Mauri, R.; Resentini, M.; Morabito, F.; Frascini, F.; Fumagalli, P.; Santagostino, A.: Beta-endorphin levels after melatonin administration in man. En: *The Pineal Gland: Endocrine aspects*. Brown, G.M.; Wainwright, S.P. (eds.). Pergamon Press, Oxford. pp 271-275, 1985.
- 178.- Loliat, S.L.; Lim, A.T.W.; Toh, B.H.; Funder, J.: Immunoreactive  $\beta$ -endorphin in a subpopulation of mouse spleen macrophagen. *J. Clin. Invest.*, **73**: 277-280, 1984.
- 179.- Loscher, W.; Siemens, H.: Cerebrospinal fluid gamma-aminobutyric acid levels in children with different types of epilepsy: effect of anticonvulsant treatment. *Epilepsia*, **26**: 314-319, 1985.
- 180.- Lowenstein, P. R.; Gonzalez-Solveyra, C.; Cardinali, D.P.: In vitro uptake of benzodiazepines by rat pineal gland. *J. Pineal Res.*, **1**: 207-213, 1983.
- 181.- Lowenstein, P.R.; Cardinali, G.P.: Charac-

- terization of flunitrazepam and betacarboline high affinity binding in bovine pineal gland. *Neuroendocrinology*, 37: 150-154, 1983.
- 182.- Lowenstein, P.R.; Gonzalez-Solveyra, C.; Rosenstein, R.; Cardinali, D.P.: Benzodiazepine receptors in mammalian pineal gland. En: *The Pineal Gland: Endocrine Aspects*. Brown, G.M.; Wainwright, S.D., (eds.). Pergamon Press, New York. pp. 19-24, 1985.
- 183.- Lowry, O.J.; Rosenbroug, N.J.; Far, A.L.; Randal, R.J.: Protein measurement with the Folin Phenol reagen. *J. Biol. Chem.*, 192: 256, 1965.
- 184.- Maestroni, G.J.M.; Conti, A.: Beta-endorphin and dinorphin mimic the circadian immunoenhancing and anti-stress effects of melatonin. *Int. J. Immunopharmac.*, 11: 333-340, 1989a.
- 185.- Maestroni, G.J.M.; Conti, A.; Pierpaoli, W.: Melatonin, stress and the immune system. En: *Pineal Research Reviews*, vol. 7. Reiter, R.J. (ed.). Alan R. Liss, Inc., New York. pp. 203-226, 1989b.
- 186.- Mains, R.E. and Eipper, B.A.: Coordinate equimolar secretion of smaller peptide products derived from pro-ACTH/endorphin by mouse pituitary tumor cells. *J. Cell Biology*, 89: 21-28, 1981.
- 187.- Mains, R.E.; Eipper, B.A., Ling, N.: Common precursor to corticotropin and endorphins. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 74: 3014-3018, 1977.
- 188.- Majewska, M.D.; Schwartz, R.D.: Pregnenolone-sulfate: an endogenous antagonist of the  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor complex in brain ? *Brain Res.*, 404: 355-360, 1987.
- 189.- Mandel, P.; Ciesielski, L.; Maitre, M.; Silmler, S.; Kempf, E.; Mack, G.: Inhibitory aminoacids, aggressiveness, and convulsions. En: *Amino Acids Neurotransmitters*. DeFeudis, F.V.; Mandel, P., (eds.). Raven Press, New York. pp. 1-9, 1981.
- 190.- Mantegazzini, P.: Pharmacological actions of indolealkylamines and precursor on the central nervous system. En: *Handbook of Experimental Pharmacology*. pp. 424, 1966.
- 191.- Marks, N.; Grynbaum, A. and Weidle, A.: On the degradation of enkephalins and endorphins by rat and mouse brain extracts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 74: 1552-1559, 1977.
- 192.- Martin, J.E.; Engel, J.N.; Klein, D.C.: Inhibition of the in vitro pituitary response to luteinizing hormone-releasing hormone by melatonin, serotonin and 5-hydroxytryptamine. *Endocrinology*, 100: 675, 1977.
- 193.- Martin, W.R.; Eadea, C.G.; Thompson, J.; Huppler, R.E.; Gilbert, P.E.: The effects of morphine and nalorphine-like drugs in non-dependent and morphine dependent chronic spinal dog. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 197: 517-532, 1976.
- 194.- Matthew, E.; Parritt, A.G.; Sudgen, D.; Engelhardt, D.L.; Zimmerman, E.A.; Klein, D.C.: Benzodiazepines: rat pinealocyte binding sites and augmentation of

- norepinephrine-stimulated N-acetyltransferase activity. *J. Pharmacol. Exptl. Ther.*, **228**: 434-438, 1984.
- 195.- Mayer, D.J. and Price, D.D.: Central nervous system mechanisms of analgesia. *Pain*, **2**: 379-404, 1976.
- 196.- Mc Ewen, B.S.; Davis, P.G.; Parsons, B.; Plaff, D.W.: The brain as a target for steroid hormone action. *Annu. Rev. Neurosci.*, **2**: 65-112, 1979.
- 197.- Medina, J.H.; Novas, M.L.; De Robertis, E.: Changes in benzodiazepine receptors by acute stress: Different effect of chronic diazepam or RO 15-1788 treatment. *Eur. J. Pharmacol.*, **96**: 181-185, 1983.
- 198.- Meites, J.; Bruni, J.F.; Van Vugt, D.A. and Smith, A. F.: Relation of endogenous opioid peptides and morphine to neuroendocrine functions. *Life Sci.*, **24**: 1325-1336, 1979.
- 199.- Mendelson, W.B.; Gillin, J.C.; Dawson, S.D.; Lewy, A.J.; Wyatt, R.J.: Effects of melatonin and propranolol on sleep of the rat. *Brain Research*, **201**: 240-244, 1980.
- 200.- Menscewicz, J.; Linkowski, O; Branchey, L.; Weinberg, V.; Weitzman, E.D.; Branchey, M.: Abnormal 24 h. pattern of melatonin secretion in depression. *Lancet*, Diciembre 22/29: 1362, 1979.
- 201.- Meyerson, B.J. and Terenius, L.:  $\beta$ -endorphin and male sexual behavior. *Eur. J. Pharmacol.*, **42**: 191, 1977.
- 202.- Millan, M.J.; Gramsch, C.; Przewlocki, R.; Holtt, V. and Herz, A.: Lesions of the hypothalamic arcuate nucleus produce a temporary hyperalgesia and attenuate stress-evoked analgesia. *Life Sci.*, **27**: 1513-1523, 1980.
- 203.- Miller, L.G.; Greenblatt, D.J.; Barnhill, J.G.; Thompson, M.L.; Shaderh, R.I.: Modulation of benzodiazepine receptor binding in mouse brain by adrenalectomy and steroid replacement. *Brain Res.*, **446**: 314-320, 1988.
- 204.- Monguilevsky, J.; Scacci, P.; Deis, R.P.; Siseles, N.O.M.: Effect of melatonin on the luteinizing hormone release induced by clomiphene and luteinizing hormone-releasing hormone. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **151**: 663, 1976.
- 205.- Moore, R.Y.; Siboni, P.: Enkephalin-like immunoreactivity in neurons in the human pineal gland. *Brain Res.* **457**: 395-398, 1988.
- 206.- Morhland, J.S. and Gebhart, G.F.: Effect of selective destruction of serotonergic neurons in nucleus raphe magnus on morphine-induced antinociception. *Life Sci.*, **27**: 2627-2632, 1980.
- 207.- Morley, J.E.; Baranetsky, N.G.; Wingert, T.D.; Carlson, H.E.; Hersman, J.M.; Melmed, S.; Levin, S.R.; Jamison, K.R.; Weitzman, R.; Chang, R.J. and Varner, A.A.: Endocrine effects of naloxone induced opiate receptor blockade. *J. Clin. Endocr. Metab.*, **50**: 251-257, 1980.
- 208.- Morrow, A.L.; Suzdak, P.D.; Paul, S.M.: Steroid hormone metabolites potentiate GABA receptor mediated chloride ion flux with nanomolar potency. *Eur. J. Pharmacol.*

- col., 142: 483-485, 1987.
- 209.- Motta, M.; Schiaffini, O.; Piva, F.; Martini, L.: Pineal principles and the control of adrenocorticotrophin secretion. En: *The Pineal Gland*. Wolstenholmen, G.E.W.; Knight, J. (eds); Churchill, Londres. pp. 279, 1971.
- 210.- Moyer, J.A.; Geenberg, L.H.; Frazer, A.; Bronswick, D.J.; Mendels, J.; Weiss, B.: Opposite effects of acute and repeated administration of desmethylimipramine on adrenergic responsiveness in rat pineal gland. *Life Sciences*, 24: 2237-2244, 1979.
- 211.- Munson, P.J.: LIGAND: A computerized analysis binding data. *Meth. Enzymol.*, 92: 220-239, 1983.
- 212.- Nagle, C.A.; Neuspiller, N.; Cardinali, D.P.; Rosner, J.M.: Uptake and effects the 17- $\beta$ -estradiol on pineal hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) activity. *Life Sciences*, 11: 1105-1109, 1972.
- 213.- Nakanishi, S.; Inoue, A.; Kita, T. et al: Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin- $\beta$ -lipotropin precursor. *Nature*, 278: 423-427, 1979.
- 214.- Nausieda, P.A.; Carvey, P.M.; Braun, A.: Long-term suppression of central serotonergic activity by corticosteroids: a possible model of steroid-responsive myoclonic disorders. *Neurology*, 32: 772-775, 1982.
- 215.- Nicoll, R.A.; Alger, B.F. and Jahr, C.: Enkephalin blocks inhibitory pathways in the vertebrate CNS. *Nature*, 287: 22-25, 1980.
- 216.- Niddan, R.; Dubois, A.; Scatton, B.; Arbi-lla, S.; Langer, S.Z.: Autoradiographic localization of [ $^3$ H]Zolpidem binding sites in the rat CNS: Comparison with the distribution of [ $^3$ H]flunitrazepam binding sites. *J. Neurochem*, 49: 890-899, 1987.
- 217.- Niles, L.P.; Pickering, D.S.; Arciszewski, M.A.: Effects of chronic melatonin administration on GABA and diazepam binding in rat brain. *J. Neural. Transm.*, 70: 117-124, 1987.
- 218.- Nir, I.; Behroozi, K.; Assael, M.; Iuriani, I.; Salmon, F.G.: Changes in the electrical activity of the brain following pinealectomy. *Neuroendocrinology*, 4: 122-127, 1969.
- 219.- Nir, I.; Hirschmann, N.; Puder, M.; Pe-trank, J.S.: Changes in rodent thyroid hormones and cyclic AMP following treatment with pineal indolic compuds. *Arch. Int. Physiol. Biochim.*, 86: 353, 1978.
- 220.- Ogle, T.F.; Kitay, J.I.: In vitro effects of melatonin and serotonin on adrenal steroidogenesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 157: 103, 1978.
- 221.- Okun, F.; Weitzman, R.; Katz, Y.; Bom-zon, A.; Youdim, M.B.H.; Gavish, M.: Increase in central and peripheral benzodiazepine receptors following surgery. *Brain Res.*, 458: 31-36, 1988.
- 222.- Oleson, T.D. and Liebeskind, J.C.: Relationship of neural activity in the raphe nuclei of the rat to brain stimulation-produced analgesia. *The Physiologist*. 18: 338, 1975.
- 223.- Oliveras, J.L.; Redjemi, F.; Guilbaud, G. Besson, J.M.: Analgesia induced by electri-

- cal stimulation of the inferior centralis of the raphe in the cat. *Pain*, 1: 139-145, 1980.
- 224.- Olsen, R.W.: Drug interactions at the GABA receptors ionophore complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 22: 245-277, 1982.
- 225.- Olsen, R.W.: GABA-benzodiazepine-barbiturate receptor interaction. *J. Neurochem.* 37: 1-13, 1981.
- 226.- Ottenweller, J.E.; Meier, A.H.: Adrenal innervation may be an extrapituitary mechanism able to regulate adrenocortical rhythmicity in rats. *Endocrinology*, 111: 1334-1338, 1982.
- 227.- Owens, P.C.; Smith, R.; Green, D. Falconer, J.: Effect of hypoglycaemic stress on plasma and cerebrospinal fluid  $\beta$ -endorphin in conscious sheep. *Neuroscience Letters*, 49: 1-6, 1984.
- 228.- Palo, J.; Savolainen, H.: The effect of high doses of synthetic ACTH on rat brain. *Brain Res.*, 70: 313-320, 1974.
- 229.- Papavasiliou, P.S.; Cotzias, G.C.; Duby, S.E.; Steck, A.J.; Bell, M.; Lawrence, N.: Melatonin and parkinsonism. *JAMA*, 221: 88, 1973.
- 230.- Pavel, S.: Arginine-vasotocin as a pineal hormone. *J. Neural. Transm.*, 13 (supl.): 135-155, 1978.
- 231.- Pechnick, R.; George, R. and Polard, R.E.: Identification of multiple opiate receptors through neuroendocrine responses. II. Antagonism of mu, kappa and sigma agonist by naloxone and WIN. *J. Pharmac. Expt. Ther.*, 232: 170-177, 1985b.
- 232.- Pechnick, R.; George, R. and Polard, R.E.: Identification of multiple opiate receptors through neuroendocrine responses. I. Effects of agonists. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 232: 163-169, 1985a.
- 233.- Pert, A.: Behavioral pharmacology of  $\delta$ -alanine<sup>2</sup>-methionine-enkephalinamide and other long-acting opiate peptides. En: *Opiates and Endogenous Opioid Peptides*. Kosterlitz, H.W. (ed.). Elsevier, Amsterdam. pp. 87-94, 1976.
- 234.- Pevet, P.: On the presence of different populations of pinealocytes in the mammalian pineal gland. *J. Neural. Transm.*, 40: 289-304, 1977.
- 235.- Philo, R.; Reiter, R.J.: The involvement of brain amines in pinealectomy-induced convulsions in the gerbil: I. Serotonin. *Behav. Brain Res.*, 3: 71-82, 1981.
- 236.- Pokorski, M.; Griels, P. and Wideman, J.: Opiate system influences central respiratory chemosensor. *Brain Res.*, 211: 221-226, 1981.
- 237.- Polc, P.; Bonetti, E.P.; Schaffner, R.; Haeffely, W.: A three-state model of the benzodiazepine receptor explains the interactions between the benzodiazepine antagonist Ro 15-1788, benzodiazepine tranquilizers,  $\beta$ -carboline and phenobarbitone. *Arch. Pharmacol.*, 321: 260-264, 1982.
- 238.- Pradhan, S.N. *Life Sci* 26: 1643-1656, 1980.
- 239.- Przewlocki, R.; Holet, V. and Herz, A.: Release of  $\beta$ -endorphin from rat pituitary

- in vitro. *Eur. J. Pharmac.* 51: 179-183, 1978.
- 240.- Quay, W.B.: Circadian rhythm in rat pineal serotonin and its modifications by estrous cycle and photoperiod. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 3: 473-479, 1964.
- 241.- Quay, W.B.: Experimental evidence for pineal participation in homeostasis of brain composition. *Prog. Brain Res.*, 19: 646-653, 1965.
- 242.- Raiteri, M.; Cerrito, F.; Cervoni, A.M.; Levi, G.: Dopamine can be released by two mechanism differentially affected by the dopamine release inhibitor nomifensine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 208: 195-202, 1979.
- 243.- Reid, R.L. and Yen, S.S.C.:  $\beta$ -endorphin stimulates the secretion of insulin and glucose in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 52: 592-593, 1981.
- 244.- Reir, C.E.; Georgr, J.M. and Kilman, J.W.: Cortisol and growth hormone response to surgical stress during morphine anesthesia. *Anesth. Anal.*, 52: 1003-1009, 1973.
- 245.- Reiter, R.J.: The mammalian pineal gland: Structure and function. *Am. J. Anat.*, 162: 287-313, 1981.
- 246.- Reiter, R.J.; Blask, D.E.; Talbot, J.A.; Barnett, M.P.: Nature and time-course of seizures associated with surgical removal of the pineal gland from parathyroidectomized rats. *Exptl. Neurol.*, 38: 386-397, 1973.
- 247.- Reiter, R.J.; Morgan, W.N.: Attempts to characteriza the convulsive response of parathyroidectomized rats to pineal gland removal. *Physiol. Behav.*, 9: 203-208, 1972.
- 248.- Reiter, R.J.; Richardson, B.A.; Hurlbut, E.C.: Pineal, retinal and harderian glands metabolism in a diurnal specie, the Richardson's Ground Squirrel. *Neurosci. Lett.*, 22: 285-288, 1971.
- 249.- Reiter, R.J.; Sorrentino, S.; Hoffman, R.A.: Muscular spasms and death in thyro-parathyroidectomized rats subjected to pinealectomy. *Life Science.*, 11: 123-133, 1972.
- 250.- Reiter, R.J.; Vaughan, M.K.; Vaughan, G.M.; Sorrentino, S.; Donoirio, R.J.: The pineal gland as an organ of internal secretion. En: *Frontiers of Pineal Physiology*. Altschule, M.D. (ed.); The MIT Press, Cambridge. pp. 54, 1975.
- 251.- Reith, M.W.; Schotman, P.; Gispen, W.H.: Hypophysectomy, ACTH<sub>1-10</sub> and in vitro protein synthesis in rat brain stem slices. *Brain Res.*, 81: 571-575, 1974.
- 252.- Riikonen, R.: Current knowledge of actions of ACTH and corticosteroids. *Brain and Develop.*, 9: 409-414, 1987.
- 253.- Rogers, O.L.; Jackson, W.J.: The effect of hypophysectomy, ACTH fragments and thalamic lesions upon kindled epilepsy. *Brain Res.*, 403: 96-104, 1987.
- 254.- Roldán, E.; Anton-Tay, F.: EEG and convulsive threshold changes produced by pineal extract administration. *Brain Res.*, 11: 238-245, 1968.
- 255.- Romijn, H.: The pineal, a tranquilizing organ? *Life Science*, 23: 2257, 1978.
- 256.- Ronnelkiewv, O.K.; Kelly, M.J.; Wutte,

- W.: Single unit recordings in the rat pineal gland: Evidence for habenulo-pineal neural connection. *Exp. Brain Res.*, 39: 187-192, 1980.
- 257.- Rosenthal, H.E.: Graphic method for the determination of binding parameters in a complex system. *Anal. Biochem.*, 20: 525-532, 1967.
- 258.- Rosenthal, M.J.; Strassman, R.J.: Melatonin does not inhibit CRF-induced ACTH release from isolated rat pituitary cells. *Neuroendocrinol. Lett.* 10: 27-32, 1988.
- 259.- Rossier, J.; French, E.; Gros, C.; Minick, S.; Guillemin, R. and Bloom, F.E.: Adrenalectomy, dexamethasone or stress alters opioid peptide levels in rat anterior pituitary but not intermediate lobe or brain. *Life Sci.*, 25: 2105-2112, 1979.
- 260.- Sadasivudu, B.; Rao, T.I.; Murthy, C.R.: Metabolic effects of hydrocorticosterone in mouse brain. *Neurochem. Res.*, 2: 521-522, 1977.
- 261.- Satake, N.: Melatonin mediation in sedative effect of serotonin in goldfish. *Physiol. Behav.*, 22: 817-819, 1979.
- 262.- Satoh, M.; Akaike, A.; Nakazawa, T. and Takagi, H.: Evidence for involvement of separate mechanisms in the production of analgesia by electrical stimulation of the nucleus reticularis paragigantocellularis and nucleus raphe magnus in the rat. *Brain Res.*, 194: 525-529, 1980.
- 263.- Sato, M., Yoneda, S.: An efficient method for transauricular hypophysectomy in rats. *Acta Endocrinol.*, 51: 43-48, 1966.
- 264.- Satoh, M.; Akaike, A. and Takagi, H.: Excitation by morphine and enkephalin of single neurons of nucleus reticularis paragigantocellularis in the rat: a probable mechanism of analgesic action of opioids. *Brain Res.*, 169: 406-410, 1979.
- 265.- Sawyer, C.H.; Baldwin, D.M.; Haun, C.K.: Effects of intraventricular injections of corticotropins on hypothalamo-pituitary ovarian function and behavior in the female rabbit. En *Sexual behavior: Pharmacology and Biochemistry.* (Sandler M.; Gessa G.L. (eds.). Raven Press, New York. pp. 259-268, 1975.
- 266.- Scatchard, G.: The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 51: 660-672, 1949.
- 267.- Schlachter, L.B.; Wardlaw, S.L.; Tindall, G.T. and Frantz, A.G.: Persistence of  $\beta$ -endorphin in human cerebrospinal fluid after hypophysectomy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 57: 221-224, 1983.
- 268.- Schoch, P.; Richards, J.G.; Haring, P.: Colocalization of GABA receptors and benzodiazepine receptors in the brain shown by monoclonal antibodies. *Nature*, 314: 168-171, 1985.
- 269.- Schofield, P.R.; Darlison, M.G.; Fujita, N.: Sequence and functional expression of the GABA<sub>A</sub> receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature*, 328: 221-227, 1987.
- 270.- Schon, F.; Beart, P.M.; Chapman, D.; Kelley, J.S.: On GABA metabolism in gliocyte cells of the rat pineal gland. *Brain*

- Res.*, 85: 479, 1975.
- 271.- Schotman, P.; Allaart, J.; Gispen, W.H.: Pineal protein synthesis highly sensitive to ACTH-like neuropeptides. *Brain Res.*, 219: 121-135, 1981.
- 272.- Schwartz, R.D.: The GABA<sub>A</sub> receptor-gated ion channel: biochemical and pharmacological studies of structure and function. *Biochem. Pharmacol.*, 37: 3369-3375, 1988.
- 273.- Schwartz, R.D.; Mindlin, M.C.: Inhibition of the GABA receptor-gated chloride ion channel in brain by non-competitive inhibitors of the nicotinic receptor-gated calcium channel. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 244: 963-970, 1988.
- 274.- Semm, P.; Demaina, C.; Vollrath, L.: Electrical response of pineal cells to melatonin and putative transmitter. *Expt. Brain Res.*, 43: 367-370, 1981.
- 275.- Shah, Y.; Dostrovsky, J.O.: Electrophysiological evidence for a projections of the periaqueductal gray matter to nucleus raphe magnus in cat and rat. *Brain Res.*, 193: 534-538, 1980.
- 276.- Siegel, R.A.; Chowers, I.; Conforti, N.; Feldman, S. and Weidenfeld, J.: Effects of naloxone on basal and stress-induced ACTH release in rats is mediated by ventral noradrenergic bundle. *Am. J. Physiol.* 249: 219-226, 1985.
- 277.- Silman, R.E.; Leone, R.M.; Hooper, R.-J.L.: Melatonin, The pineal gland and human puberty. *Nature*, 282: 301-303, 1979.
- 278.- Snyder, S.H.: Brain peptides as neurotransmitters. *Science*, 209: 976-983, 1980.
- 279.- Spratto, G.R.; Dorio, R.E. *Res. Comm. Chem. Path. Pharm.* 19: 23-36, 1978.
- 280.- Squires, R.F.; Bastrup, C.: Benzodiazepine receptors in rat brain. *Nature*, 266: 732-734, 1977.
- 281.- Steward, J.M.: Roles in behavior for ACTH neurons. En: *Central Actions of ACTH and Related Peptides*. De Wied, D., Ferrari, W. (eds.) pp. 93-113, 1986.
- 282.- Stoelting, R.K.: Opiate receptors and endorphins: their role in anesthesiology. *Anesth. Analog.* 59: 874-880, 1980.
- 283.- Stubbs, W.A.; Delitalia, G.; Jones, A.; Jeffcoate, W.J.; Edwards, C.R.W.; Ratter, S.; Besser, G.M.; Bloom, S.R. and Alberti, K.G.M.: Hormonal and metabolic responses to an enkephalin analogue in normal man. *Lancet*, 1225-1225, 1978.
- 284.- Swanson, L.W.; Cowan, W.N.: The efferent connections of the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus. *J. Comp. Neurol.*, 160: 1-12, 1975.
- 285.- Szafarczyk, A.; Alonso, G.; Izart, G.; Malaval, F. and Assenmacher, I.: Diurnal-stimulated and stress-induced ACTH release in rats is mediated by ventral noradrenergic bundle. *Am. J. Physiol.*, 249:219-226, 1985.
- 286.- Tagliatela, M.; Amoroso, S.; Karos, G.; Maurano, F.; Renzo, G.F.Di.; Annunziato, L.: Membrane events and ionic processes involved in dopamine release from tuberoinfundibular neurons. I. Effect of the inhibition of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-adenosine triphosphatase pump by ouabain. *J. Pharma-*

- col. *Exp. Ther.*, 246: 682-688, 1988.
- 287.- Thompson, C.; Franey, C.; Arendt, J.; Checkley, S.: Melatonin secretion before and after desimipramine treatment in depression. *XVI Acta Endocrinologica Congress Satellite Symposium*, 20, 1983.
- 288.- Thorn, C.: On the analysis of pharmacological experiments in terms of an allosteric receptor model. *Mol. Pharmacol.*, 9: 1-9, 1973.
- 289.- Thurston, J.; Hauhart, R.; Dirgo, J.; Jones, E.: Mechanism of increased brain glucose and glycogen after hydrocortisone. Possible clinical significance. *Ann. Neurol.*, 7: 515-523, 1978.
- 290.- Torda, C. and Wolf, H.G.: Effect of pituitary hormones, cortisone and adrenalectomy on some aspects of neuromuscular systems and acetylcholine synthesis. *Am. J. Physiol.*, 169: 140-149, 1952.
- 291.- Touitou, Y. Feure, M.; Lagoguey, M.; Carayon, A.; Bogdan, A.; Reinberg, A.; Beck, H.; Cesselin, F.; Touitou, C. *J. Endocr.* 91: 467-475, 1981.
- 292.- Unseld, E.; Klotz, U.: *Pharmaceutical Res.*, 6: 1-3, 1989.
- 293.- Urca, G.; Frenk, H.; Liebeskind, J.C. and Taylor, A.N.: Morphine and enkephalin: analgesic and epileptic properties. *Sciences*, 197: 83-86, 1977.
- 294.- Vermes, I.; Mulder, G.H.; Smellic, P.G. and Tilders, F.J.H.: Differential control of  $\beta$ -endorphin/ $\beta$ - lipotropin secretion from anterior and intermediate lobes of the rat pituitary gland in vitro. *Life Sci.* 27: 1761-1768, 1980.
- 295.- Volavka, J.; Cho, D.; Mallya, A. and Danman, J.: Naloxone increases ACTH and cortisol levels in man. *New Engl. J. Med.*, 300: 1056-1057, 1979.
- 296.- Vollrath, L.: Comparative morphology of vertebrate pineal complex. *Prog. Brain Res.*, 52: 28-38, 1979.
- 297.- Waniewski, R.A.; Suria, A.: Modulation of cyclic GMP in the rat pineal gland by GABA. *Brain Res. Bull.*, 5: 347, 1980.
- 298.- Warembourg, M.; Otten, U.; Schwabb, M.E.: Labelling of Schwann and satellite cells by  $^3\text{H}$ -dexametasone in a rat sympathetic ganglion and sciatic nerve. *Neuroscience*, 6: 1139-1143, 1980.
- 299.- Wasterlain, C.G.; Duffy, T.E.: Status epilepticus in immature rats. *Arch. Neurol.*, 33: 821, 1976.
- 300.- Watanabe, Y.; Khatami, S.; Shibuya, T.; Salafsky, B.: Ontogenetic properties of benzodiazepine receptor subtypes in rat spinal cord. *Eur. J. Pharmacol.*, 109: 307-309, 1985.
- 301.- Watson, S.J.; Akil, M.: Opioid peptides and related substances: immunocytochemistry. En: Martin, J.B.; Richlin, S.; Bick, K.L. (eds.), *Neurosecretion and Brain Peptides. Advances in Biochemical Pharmacology*, 28: 77-78, Raven Press, New York, 1981.
- 302.- Watson, S.J.; Richerd, C.W.III; Barchas, J.D.: ACTH in rat brain: Immunocitochemical localization in cells and axons. *Science*, 200: 1180-1182, 1978b.

- 303.- Weichsel, M.: Glucocorticoid effect upon thymidine kinase in the developing cerebellum. *Pediatr. Res.*, 8: 361, 1974.
- 304.- Weiss, B.; Crayton, J.: Gonadal hormones as regulator of the pineal adenil-ciclastase activity. *Endocrinology*, 87: 527-532, 1970.
- 305.- Wetterberg, L.; Arendt, M.; Pannier, L.; Sizonenko, P.C.: Human serum melatonin changes during the menstrual cycle. *J. Endocrinol Metab.*, 42: 185-189, 1976.
- 306.- Willer, J.C.; Dehen, H. and Cambier, J.: Stress-induced analgesia in humans: endogenous opioids and naloxone-reversible depression of pain reflexes. *Science*, 212: 689-691, 1981.
- 307.- Winters, W.; Lakin, M.: Melatonin-induced analgesia reversed by naloxone. *Proc. West. Pharmca. Soc.*, 23: 423-427, 1980.
- 308.- Wolfe, D.E.: The epiphyseal cell: an electron microscopic study of its intercellular relationships and intracellular morphology in the pineal body of the albino rats. *Prog. Brain Res.*, 10: 332-386, 1965.
- 309.- Wolstencroft, J.H.; West, D.C. and Gent, G.P.: Actions of morphine and opioid peptides on neurones in the reticular formation, raphe nuclei and the periaqueductal gray. En: *Iontophoresis and Transmitter Mechanisms in the Mammalian Central Nervous System*. Ryall, R.W.; Kelly, J.S. (eds.). Elsevier, Amsterdam. pp. 341-343, 1978.
- 310.- Woodbury, D.M.: Effect of hormones on brain excitability and electrolytes. *Recent Progr. Hormone Res.*, 10: 65-104, 1954.
- 311.- Wurtman, R.J.; Roth, N.; Altschule, M.D.: Wurtman, J.J.: Interactions of the pineal gland and exposure to continuous light on organ weights of female rats. *Acta Endocr.*, 36: 617-624, 1961.
- 312.- Yamaoka, S.: The role of the pineal gland in the steroidal modification of sleep circadian rhythm. *Jikeikai Med.*, 28: 17-21, 1981.
- 313.- Yaksh, T. L. and Rudy, T.A.: Narcotic analgesics: CNS sites and mechanism of action as revealed by intracerebral injection techniques. *Pain*, 4: 299-359, 1978.
- 314.- Zieglansberger, W.; French, E.D.; Siggins, G.R. and Bloom, F.E.: Opioid peptides may excite hippocampal pyramidal neurons by inhibiting adjacent inhibitory interneurons. *Science*, 205: 414-417, 1979.