

Tesis de Posgrado

La unidad glándula pineal-ganglio cervical superior como un modelo de integración neuroendócrina

Vacas, María Irene

1980

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Vacas, María Irene. (1980). La unidad glándula pineal-ganglio cervical superior como un modelo de integración neuroendócrina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1642_Vacas.pdf

Cita tipo Chicago:

Vacas, María Irene. "La unidad glándula pineal-ganglio cervical superior como un modelo de integración neuroendócrina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1980. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1642_Vacas.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

LA UNIDAD GLANDULA PINEAL-GANGLIO CERVICAL SUPERIOR
COMO UN MODELO DE INTEGRACION NEUROENDOCRINA

Autor : Lic. María Irene Vacas

Director de Tesis : Dr. Daniel P. Cardinali

Lugar de trabajo : Centro de Estudios Farmacológicos y de Principios Naturales. CONICET.

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Daniel P. Cardinali que hizo posible mi formación a su lado y que me apoyó y estimuló permanentemente para realizar esta investigación.

Al Dr. Eduardo H. Charreau por su espontáneo asesoramiento.

Al Lic. Rubén Lombardo por su contribución en los estudios estadísticos.

A Carlos Valenti que compartió mis primeros pasos en investigación.

A mis compañeros de laboratorio por la colaboración prestada y por crear el ambiente adecuado para que esta investigación pudiera desarrollarse.

Al Centro de Estudios Farmacológicos y de Principios Naturales (CEFAPRIN) por permitir la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por las becas que me otorgara para investigar sobre este tema.

A todos aquellos que de alguna manera contribuyeron para que esta tesis pudiera concretarse.

A MIS PADRES

ABREVIATURAS

FSH	Hormona folículo estimulante
LH	Hormona luteinizante
LHRH	Hormona liberadora de LH
PMS	Suero de yegua preñada
TSH	Tirotrofina
Estradiol	1,3,5(10)-estratrieno-3,17 β -diol
Testosterona	17 β -hidroxi-4-androsten-3-ona
Dihidrotestosterona	17 β -hidroxi-5 α -androstan-3-ona
Progesterona	4-pregнено-3,20-diona
20 α -dihidroproges- terona	20 α -hidroxi-4-pregnen-3-ona
20 β -dihidroproges- terona	20 β -hidroxi-4-pregnen-3-ona
5 α -pregnanodiona	5 α -pregnano-3,20-diona
Corticosterona	11 β ,21-dihidroxi-4-pregнено-3,20-diona
Cortisol	11 β ,17,21-trihidroxi-4-pregнено,3,20- diona
Norepinefrina (NE)	3,4-dihidroxiifeniletanolamina
DOPA	3,4-dihidroxiifenilalanina
Dopamina	3,4-dihidroxiifeniletilamina
Serotonina (5-HT)	5-Hidroxitriptamina
Melatonina	N-acetil-5-metoxitriptamina
AMP cíclico	3',5'-adenosina-monofosfato cíclico
GMP cíclico	3',5'-guanosina-monofosfato cíclico
GTP	Guanosina trifosfato
ARN	Acido ribonucleico

BSA	Albúmina de suero bovino
Tris	Tris (hidroximetil)-amino metano
EDTA	Acido etilendiamino tetraacético
EGTA	Acido etilenglicol tetraacético
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenin dinucleó- tido reducido
PCPA	p-clorofenilalanina
TCA	Acido tricloroacético
³ H	Tritio
¹⁴ C	Carbono 14
T _{1/2}	Tiempo de vida media
VR	Velocidad de recambio
CI	Concentración inicial
nm	Nanómetro
M	Molar
mmol	Milimol
pmol	Picomol
fmol	Fentomol
N	Normal
ug	Microgramo
ng	Nanogramo
pg	Picogramo
ul	Microlitro
RPM	Revoluciones por minuto
dpm	Desintegraciones por minuto
Ci	Curie
mCi	Milicurie
SNC	Sistema nervioso central

LCR	Líquido cefalorraquídeo
GCS	Ganglio cervical superior
MAD	Monoamino oxidasa
COMT	Catecol-O-metiltransferasa
HIOMT	Hidroxiindol-O-metiltransferasa
NAT	N-acetiltransferasa
TH	Tirosina hidroxilasa
DHE	Dihidroergocriptina
DE ₅₀	Dosis efectiva 50
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenosa
act. esp.	actividad específica

INDICE

pág.

I	<u>INTRODUCCION</u>	
1.-	Neuroendocrinología. Mecanismos básicos de interacción neuroendócrina.	1
1-1.-	Transducción neuroendócrina.	3
1-2.-	Transducción endócrino-neural.	5
1-3.-	Transducción endócrino-endócrina.	7
2.-	La glándula pineal.	13
2-1.-	Anatomía.	15
2-2.-	Inervación.	19
2-3.-	Fisiología pineal. La glándula pineal como órgano endócrino regulador de la función reproductiva.	22
2-4.-	Hormonas pineales.	
2-4-1.-	Metoxindoles.	
	A) Biosíntesis.	27
	B) Metabolismo de la melatonina.	28
	C) Sitios y mecanismo de acción.	33
2-5.-	Regulación de la función pineal.	
2-5-1.-	Control neural.	36
2-5-2.-	Control hormonal.	37
3.-	El ganglio cervical superior.	
3-1.-	Anatomía.	41
3-2.-	Fisiología del GCS. La neurona noradrenérgica.	42
4.-	Objetivos del presente trabajo	48

11	<u>MATERIALES Y METODOS</u>	
1.-	Animales y tejidos.	40
1-1.-	Alteración por cirugía de las señales neurales del GCS y glándula pineal.	
	- Gangliectomía cervical superior bilateral.	50
	- Descentralización ganglionar bilateral.	50
1-2.-	Hipofisectomía.	51
1-3.-	Tratamiento con hormonas reproductivas.	51
2.-	Medición de actividades enzimáticas.	
2-1.-	Tirosina hidroxilasa.	57
2-2.-	Catecol-O-metiltransferasa.	60
2-3.-	Monoamino oxidasa.	61
2-4.-	Serotonina-N-acetiltransferasa.	62
3.-	Estudio de receptores	
3-1.-	Sitios de unión citoplasmáticos para progestágenos en la glándula pineal.	
	- Caracterización del receptor pineal citoplasmático para progestágenos.	63
	- Estudio por centrifugación en gradiente de sacarosa.	66
3-2.-	Caracterización de sitios de unión para melatonina en la glándula pineal.	67
3-3.-	Caracterización de receptores α -adrenérgicos pineales.	69
3-4.-	Determinación de los sitios de unión para estradiol en GCS.	

	<u>pág.</u>
- Captación y retención de ^3H -estradiol <u>in vivo</u> .	71
- Captación de ^3H -estradiol <u>in vitro</u> .	72
- Determinación de la constante de disociación y del número de sitios de unión citoplasmáticos para estradiol en GCS.	72
- Determinación del complejo estradiol-receptor nuclear en GCS.	73
4.- Incorporación de aminoácidos tritiados a proteínas pineales.	74
5.- Captación de ^3H -norepinefrina <u>in vitro</u> .	75
6.- Determinación del "turnover" de norepinefrina.	76
7.- Determinación del contenido de serotonina pineal.	78
8.- Determinación del "turnover" de serotonina pineal.	79
9.- Determinación del contenido de tubulina.	79
10.- Reactivos utilizados.	81
 III <u>RESULTADOS</u>	
1.- Transducción neuroendócrina.	
1-1.- Caracterización de receptores α -adrenérgicos en la glándula pineal.	83
2.- Transducción endócrino-endócrina.	
2-1.- Cambios en la síntesis de proteínas pineales durante el ciclo estral: participación del estradiol y la progesterona.	89

	<u>pág.</u>
2-2.- Caracterización del receptor citoplasmático para progestágenos en la glándula pineal.	95
2-3.- Caracterización de sitios de unión para melatonina en la glándula pineal.	100
3.- Transducción endócrino-neural.	
3-1.- Metabolismo de la serotonina en la glándula pineal. Cambios por el tratamiento con hormonas reproductivas.	107
3-2.- Efectos de FSH y LH sobre el "turnover" de NE en la glándula pineal y GCS.	119
3-3.- Efectos del tratamiento hormonal sobre el contenido de serotonina de la glándula pineal en animales gangliectomizados o descen-	
tralizados.	128
3-4.- Efectos del estradiol sobre el GCS.	130
IV <u>DISCUSION</u>	140
V <u>CONCLUSIONES</u>	164
VI <u>REFERENCIAS</u>	168

1.- Neuroendocrinología. Mecanismos básicos de interacción neuroendócrina.

El descubrimiento de la regulación por el sistema nervioso central (SNC) de la función de la glándula hipófisis constituyó un hito fundamental en la historia de la Fisiología y significó el nacimiento de una nueva rama de la Endocrinología, la Neuroendocrinología, de gran desarrollo en los últimos años. La Neuroendocrinología estudia las interrelaciones entre el SNC y las glándulas de secreción interna. Mediante la respuesta integrada de estas estructuras, el organismo reacciona metabólicamente y conductualmente a cambios en el medio interno y externo y se adapta a las exigencias reproductivas derivadas de la sobrevivencia de la especie.

Numerosos componentes y relaciones funcionales del sistema neuroendócrino se conocen actualmente. Existe información sobre las distintas señales ambientales y endógenas que regulan la liberación de trofinas hipofisarias, los presuntos neurotransmisores involucrados en dicha regulación y el compromiso relativo de distintas áreas del SNC en la mediación de la respuesta hormonal hipofisaria. Sin embargo, no resulta aventurado afirmar que el próximo adelanto relevante de la Neuroendocrinología sólo se producirá cuando se comprendan las intrincadas y recíprocas relaciones entre hormonas y neurotransmisores a nivel subcelular en el SNC. Para ello, es necesario caracterizar el funcionamiento de las células que lo forman mediante la descripción de las señales recibidas y emitidas, es decir, qué es lo que secretan y en respuesta a qué y la forma cuantitativa general de tal relación.

En el hipotálamo, la interrelación neurohumoral da lugar a varios fenómenos relevantes (Fig. 1): la transducción neuroendócrina, la endócrino-neural y la endócrino-endócrina. Su integración conduce al control de la hipófisis, tema central de la Neuroendocrinología.

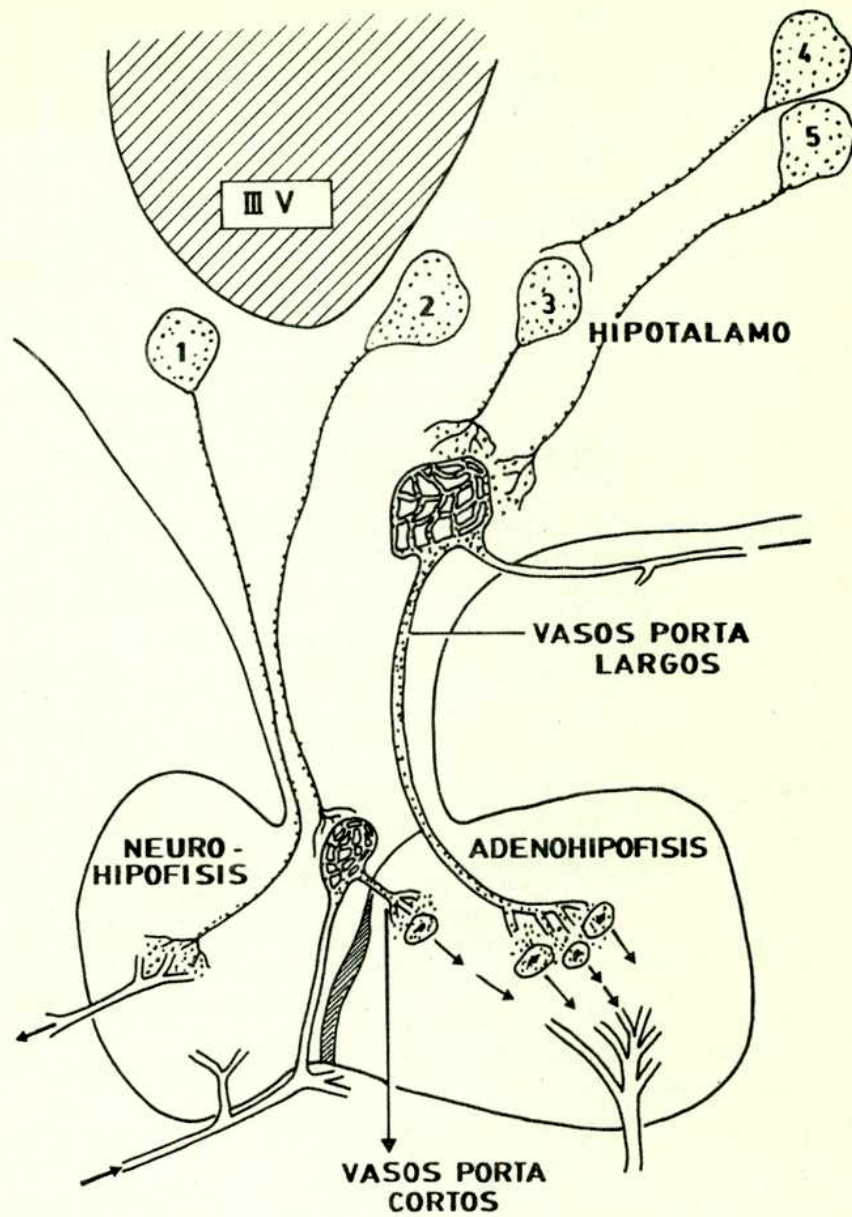


Fig. 1: Representación esquemática de la base del hipotálamo con sus circuitos neuronales básicos. Las neuronas (1), (2), (3) y (5) son neurosecretorias. La primera está relacionada con la producción de péptidos neurohipofisarios y las tres últimas con la de péptidos hipofisiotropos. La neurona (4) controla la secreción de la (3) (transducción neuroendócrina) y a su vez puede recibir señales hormonales desde la circulación (transducción endócrino-neural). Cualquiera de las neuronas neurosecretorias (1, 2, 3, 5) pueden ser efectores hormonales (transducción endócrino-endócrina). III V: tercer ventrículo.

1-1.- Transducción neuroendócrina.

La función y estructura de la hipófisis y del hipotálamo se hallan íntimamente ligadas entre sí. Neuronas neurosecretoras hipotalámicas ejercen el control neural de los lóbulos anterior y posterior de la glándula hipófisis. La neurohipófisis es, en realidad, una prolongación de la base del hipotálamo formada por los axones de las neuronas peptidérgicas hipotalámicas localizadas en los núcleos supraóptico y paraventricular, las cuales secretan las hormonas neurohipofisarias: ocitocina y vasopresina en los vasos hipofisarios inferiores (Fig. 1). La adenohipófisis, si bien carece de fibras nerviosas, se halla bajo control neural a través de las hormonas hipofisiotropas (p.ej.: LHRH). Estas son secretadas por las terminales nerviosas de las neuronas peptidérgicas neurosecretoras de la base del hipotálamo en relación con el plexo primario del sistema porta hipotálamo-hipofisario (zona denominada eminencia media) y son llevadas directamente por las venas porta del tallo hipofisario a los sinusoides de la adenohipófisis (Fig. 1). Es decir, los dos sistemas hipotalámicos aquí mencionados, productores de hormonas neurohipofisarias e hipofisiotropas, están formados por células neurosecretoras. Estas retienen las características estructurales y funcionales de las neuronas además de poseer capacidad secretora, de modo que sus productos de secreción no se vuelcan en la sinapsis sino en el torrente sanguíneo o en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de la misma forma que las hormonas y actúan sobre órganos distantes. Este concepto de neurosecreción fue introducido inicialmente por Scharrer en 1928 sobre bases morfológicas y posteriormente se aplicó al desarrollo de la Neuroendocrinología.

A las células neurosecretoras especializadas capaces de transformar una señal neural proveniente de las sinapsis aferentes, en una señal hormonal liberada al LCR o al plasma, se las conoce como "trans-

TRANSDUCCION NEUROENDOCRINA

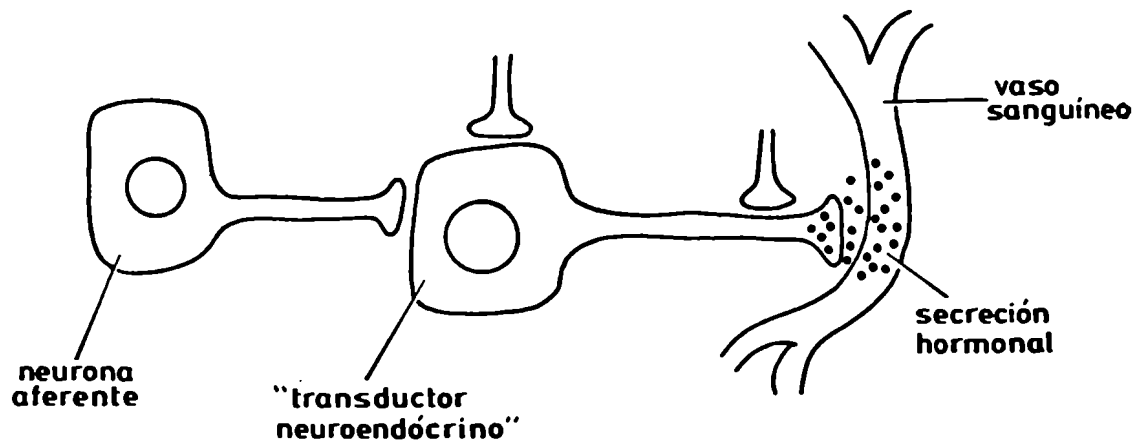


Fig. 2: Esquema de transducción neuroendócrina.
El transductor neuroendócrino es una célula neurosecretoria especializada capaz de traducir la información neural proveniente de sinapsis aferentes en respuesta hormonal liberada al LCR o al sistema circulatorio sanguíneo.

ductores neuroendócrinos"¹ (Fig. 2).

Tal como se observa en la Fig. 1, las neuronas neurosecretorias responsables de la síntesis y liberación de las hormonas peptídicas hipofisiotropas se hallan bajo el control del SNC a través de la sinapsis de neuronas fundamentalmente monoaminérgicas, dado que los neurotransmisores liberados en el espacio sináptico son principalmente monoaminas: dopamina, norepinefrina (NE) y serotonina².

Debe destacarse que la función de los neurotransmisores monoaminérgicos de alterar la actividad de la neurona peptidérgica es análoga a la de otros sistemas de control neuroendócrino localizados fuera del cerebro propiamente dicho. Estos incluyen entre otros, la inervación noradrenérgica de la glándula pineal la cual deriva del ganglio cervical superior (GCS) y controla la síntesis de la hormona pineal melatonina.

Por lo tanto, los sistemas aquí mencionados, el complejo hipotálamo-hipofisario y la glándula pineal actúan como transductores neuroendócrinos al liberar hormonas en respuesta a señales neurales aferentes.

1-2.- Transducción endócrino-neural.

Existen, a su vez, otras neuronas hipotalámicas más típicas que las anteriores que hacen la conversión inversa: transforman señales hormonales que les llegan por vía sanguínea o desde el LCR en cambios en su actividad eléctrica neuronal. Para adoptar la misma nomenclatura, dichas estructuras deberían llamarse "transductores endócrino-neurales" (Fig. 3). Cabe recalcar que prácticamente no existe hormona que, aplicada por microiontoforesis, no haya producido cambios en la actividad eléctrica de grupos hipotalámicos aislados³.

Las hormonas pueden producir muchos de los efectos de retroali-

TRANSDUCCION ENDOCRINO - NEURAL

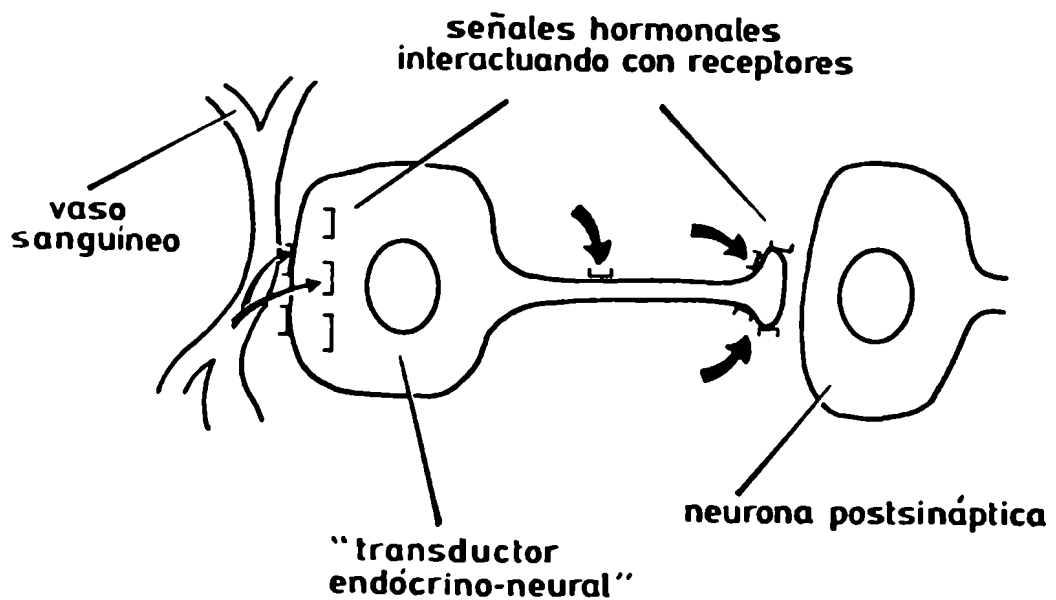


Fig. 3: Transducción endócrino-neural.

Los transductores endócrino-neurales son neuronas capaces de transformar señales hormonales que les llegan por vía sanguínea o desde el LCR en cambios en su actividad eléctrica normal.

mentación central no sólo alterando la velocidad de liberación o despolarización y repolarización eléctrica por parte de las neuronas efectoras, sino que pueden interactuar con la maquinaria bioquímica de las neuronas modificando la actividad del neurotransmisor. Pueden estimular o interferir en la biosíntesis y transporte axonal de enzimas que participan en la biosíntesis del neurotransmisor; alterar la disponibilidad de precursores o cofactores; interferir con el almacenamiento o liberación del neurotransmisor; antagonizar o potenciar los efectos del neurotransmisor sobre el receptor; bloquear el proceso de recaptación o inhibir las enzimas responsables de la degradación del neurotransmisor (Fig. 4). Así por ejemplo, en la eminencia media hipotalámica se ha comprobado que la actividad de la tirosina hidroxilasa, enzima limitante en la biosíntesis de la NE, puede alterarse por distintos tratamientos endócrinos, incluyendo la castración y hormonas sexuales⁴.

1-3.-Transducción endócrino-endócrina.

Datos recientes de la literatura⁵, sugieren la existencia de un tercer tipo de interacción en neuronas hipotalámicas consideradas inicialmente como transductores neuroendócrinos. La coexistencia de receptores para estradiol y 5α -dihidrotestosterona, revelados autorradiográficamente, en neuronas hipotalámicas que contienen hormonas hipofisiotropas como LHRH, visualizadas inmunohistoquímicamente^{5,6}, indican que dichas neuronas poseen propiedades quimiorreceptivas que les permiten detectar cambios en las concentraciones de hormonas en plasma y convierten una señal hormonal (p. ej.: esteroidea) en otra, también hormonal pero de distinta especie, liberada al sistema porta hipofisario (LHRH). Siguiendo con la nomenclatura, este tipo de interacción se debería denominar: "transducción endócrino-endócrina" (Fig. 5).

SITIOS POSIBLES DE MODULACION DE LA ACTIVIDAD NEURAL POR HORMONAS

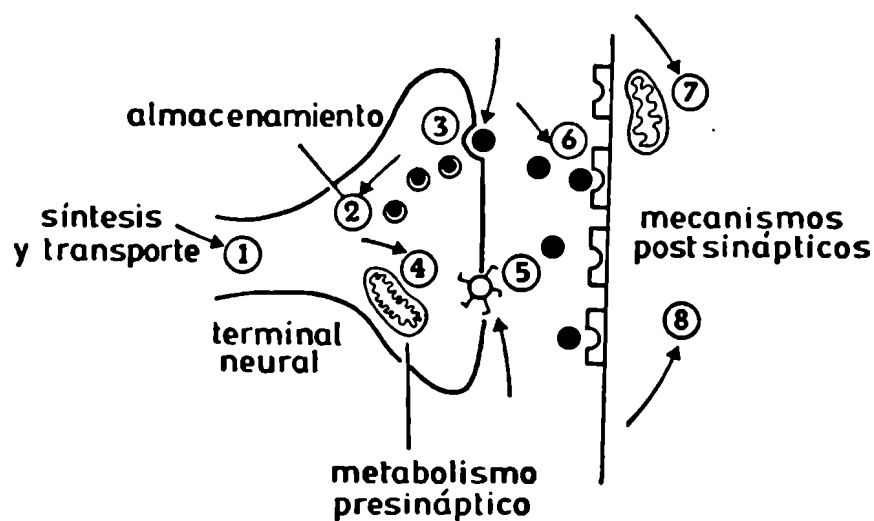


Fig. 4: Las hormonas pueden afectar: 1) la síntesis y transporte de sustancias a lo largo del axón, 2) el almacenamiento del neurotransmisor, 3) su liberación, 4) su metabolismo presináptico, 5) su recaptación neuronal, 6) la interacción con el receptor, 7) el metabolismo postsináptico del transmisor y 8) los fenómenos metabólicos desencadenados por el neurotransmisor en la postsinapsis.

TRANSDUCCION ENDOCRINO - ENDOCRINA

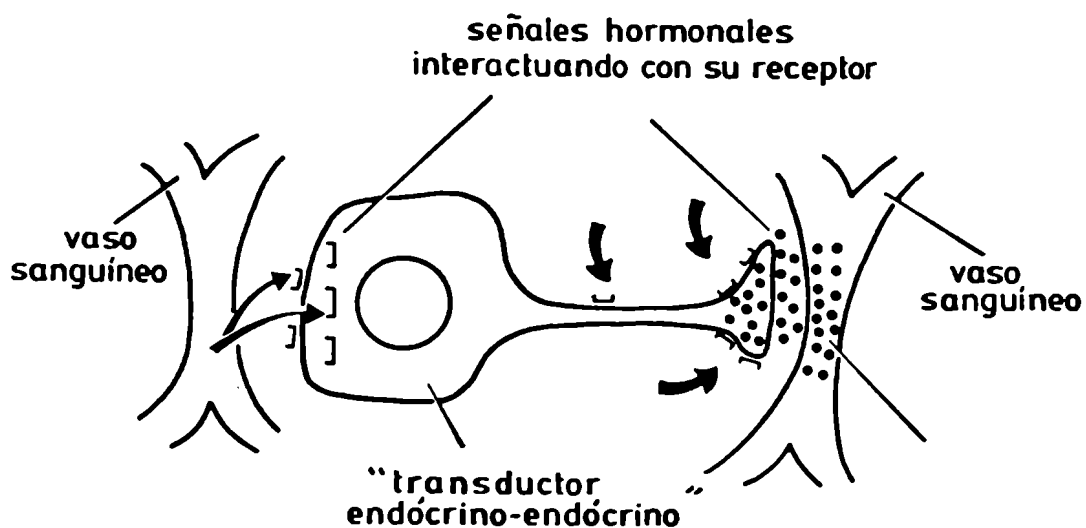


Fig. 5: Esquema de transducción endócrino-endócrina. Los transductores endócrino-endócrinos son neuronas neurosecretoras capaces de detectar, a través de receptores, señales hormonales que les llegan por vía sanguínea o desde el LCR y transformarlas en otra señal hormonal que liberan al plasma o al LCR.

Es decir, más de un mecanismo de transducción puede coexistir en la misma neurona hipotalámica y, por lo tanto, surge claramente la necesidad de considerar el balance neto entre fenómenos neuroendócrinos, endócrino-neurales y endócrino-endócrinos al analizar los mecanismos subcelulares que median la acción de una determinada hormona sobre un proceso central monoaminérgico.

Se conoce muy poco acerca de cómo operan dichos mecanismos en el hipotálamo para resultar en una respuesta final integrativa. Aún en el caso del sistema hormonal más estudiado, el de las hormonas reproductivas, el conocimiento es sólo fragmentario. Si bien es cierto que se ha avanzado mucho en el estudio de las fluctuaciones dinámicas de las diversas hormonas reproductivas, se desconocen prácticamente en su totalidad los mecanismos y sitios intracelulares involucrados en la acción de los esteroides sexuales y hormonas hipofisarias sobre las neuronas hipotalámicas o, inversamente, la forma en que los impulsos neurales aferentes modulan la respuesta de neuronas u otros grupos celulares a variaciones en los niveles plasmáticos de las hormonas. Por ejemplo, es posible que los receptores intracelulares para hormonas gonadales presentes en el hipotálamo u otras áreas del SNC estén modulados por la actividad neuronal, o que, los efectos de las hormonas gonadales sean postsinápticamente regulados por neurotransmisores y de esta forma se controle la respuesta de la neurona a la hormona. También es factible que alguno de los acontecimientos metabólicos que siguen a la interacción neurotransmisor-receptor e incluso ella misma, sean afectados por la concentración de hormona en la biofase.

La elucidación de estos interrogantes es fundamental para el estudio de la fisiología del SNC en especial la del hipotálamo, para el diseño de nuevos agentes terapéuticos que permitan su regulación far-

macológica y, en general, para el esclarecimiento de los procesos integrativos neuroendócrinos centrales y periféricos a nivel celular y subcelular.

Sin embargo, debido a la complejidad anatómica de los sistemas neuronales participantes (por ej.: la coexistencia de varias vías neuronales inhibitorias y excitatorias y de más de treinta neurotransmisores presuntos en el hipotálamo⁷) y a la baja concentración de neuronas efectoras de hormonas reproductivas, el hipotálamo en sí mismo es un órgano inadecuado y una estructura muy compleja para ser examinado con tal objetivo.

Es preciso, entonces, recurrir a un modelo biológico a) de estructura y función semejante a la del hipotálamo, b) con una inervación homogénea y fácilmente accesible y c) con las propiedades de tejido efector para las hormonas.

En este sentido, bordeando las paredes de los ventrículos cerebrales existe una serie de estructuras neuroendócrinas que se denominan, en conjunto, órganos circunventriculares y de los cuales la eminencia media es el representante más conspicuo (Fig. 6). Son ellos: la neurohipófisis, la glándula pineal, el órgano vasculoso de la lámina terminal, el órgano subfornical, el órgano subcomisural y el área postrema. Todas estas estructuras poseen la característica peculiar de hallarse fuera de la barrera hematoencefálica, a pesar de estar ubicadas en el cerebro. Es decir, en estas regiones el endotelio capilar no restringe la distribución de las sustancias; la mayor parte de ellas, ionizadas o no, difunden por lo menos al líquido intersticial siendo la distribución limitada principalmente por la conjugación a proteínas plasmáticas. Esta característica, que les permite actuar como verdaderas "ventanas" por las que el cerebro toma libre contacto con el medio interno, es evidentemente fundamental en cuanto a la

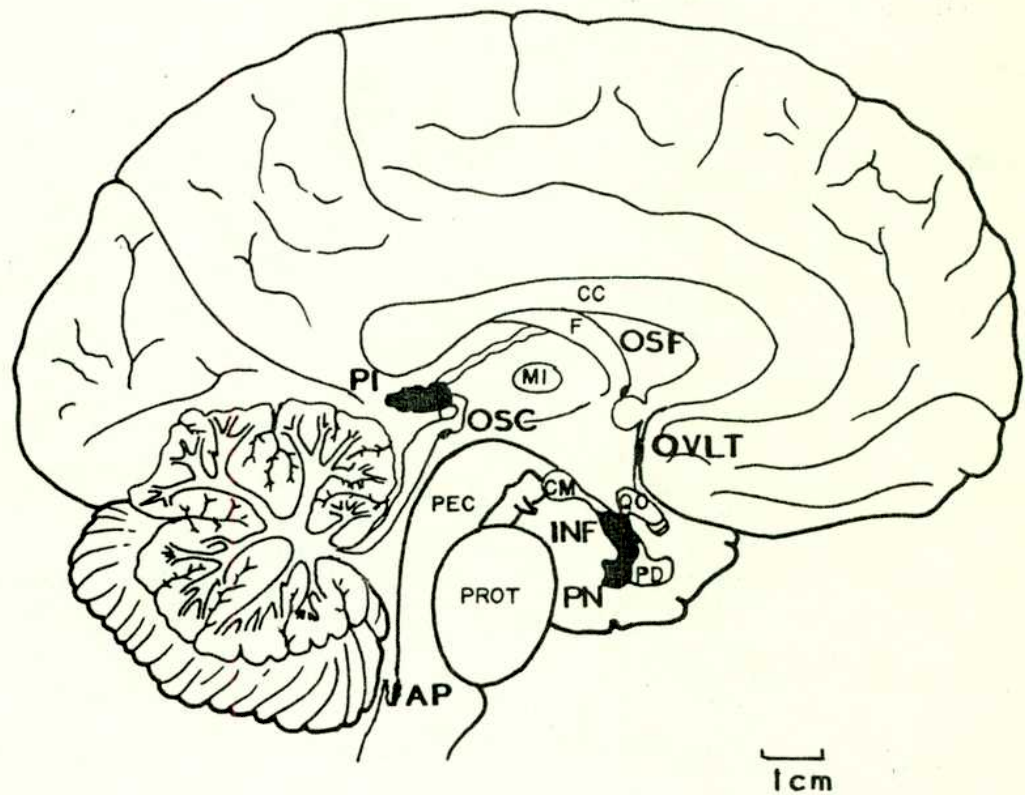


Fig. 6: Organos circunventriculares (en negro) del cerebro humano (sección mediosagital).
 AP: área postrema; INF: infundíbulo y eminencia media del hipotálamo; PN: pars nervosa de la hipófisis; OVL: organum vasculosum lamina terminalis; PI: pineal; OSC: órgano subcomisural; OSF: órgano subfornical. Otras estructuras representadas en la Fig. son: CC: cuerpo calloso; F: fórnix; CM: cuerpos mamilares; MI: masa intermedia; QO: quiasma óptico; PD: pars distalis de la adenohipófisis; PEC: pedúnculo cerebral; PROT: protuberancia.

posibilidad de mecanismos de interacción neuroendócrina.

El objetivo de este trabajo de tesis es aportar evidencias experimentales que revelen que la unidad funcional glándula pineal-GCS, dadas sus características anatómicas y fisiológicas, es un buen modelo para el estudio de las interrelaciones entre señales neurales y endócrinas, en particular las referidas al sistema reproductivo.

En esta parte de la Introducción se hará una breve revisión de la anatomía y fisiología de la glándula pineal y del GCS.

2.- La glándula pineal.

Luego de una etapa inicial de escepticismo, el estudio de la glándula pineal ha pasado a adquirir máximo interés fisiológico. Su descripción anatómica precedió a la de muchos órganos endócrinos y, ya en el siglo III A.C., Herófilo la vinculó a funciones valvulares regulatorias del "flujo" de la memoria, siendo considerada luego como una válvula que regulaba el flujo del LCR. Galeno, en el siglo II, describió su anatomía en detalle y la llamó cornarium (del griego, piña), denominación que ha perdurado (los nervios simpáticos que penetran a la glándula por su polo caudal se llaman conarios). Galeno supuso que la pineal servía de sostén para la masa de venas cerebrales que recorren la cara posterior y dorsal del diencéfalo. Su nombre actual, sin embargo, proviene del anatomista inglés Thomas Gibson quien, en 1682, recurriendo a analogías genitales, la describió como un penis suspendido sobre y entre los tubérculos cuadrigéminos inferiores (testes).

Una de las concepciones más antiguas sobre la función pineal se originó probablemente en los Vedas y fue popularizada en Occidente por Descartes (1596-1650), quien, en su descripción del reflejo neuromuscular, supuso que la glándula participaba en la convección del "espí-

ritu" desde la sangre a los ventrículos cerebrales. De aquí la noción que el alma se ubicaba en la glándula pineal, idea que indudablemente influyó para su vinculación posterior con la enfermedad mental.

La era actual del conocimiento pineal se inicia en 1954 con el libro de Kitay y Altschule "The Pineal Gland", quienes recopilaron los trabajos publicados hasta la fecha y concluyeron que pueden atribuirse a la pineal tres propiedades probables: 1) participación en el control de la función reproductiva; 2) participación en la respuesta cromática de la piel de los vertebrados inferiores a los cambios de la luz ambiental y 3) vinculación con la conducta.

Unos años más tarde, en 1959, Lerner y col.⁸ aislaron e identificaron el factor pineal aclarador de la piel de los anfibios, la melatonina. Esta sustancia era capaz de reproducir los efectos de los extractos pineales y de revertir los cambios inducidos por la pinealectomía. Estudios fisiológicos y anatómicos de varios laboratorios revelaron que la síntesis de melatonina en los mamíferos es controlada por la luz ambiental a través de una vía neural cuya estación final son las neuronas simpáticas del GCS^{9,10}. En 1965, dos hechos contribuyeron a consolidar el concepto que la pineal es un órgano neuroendócrino activo en los mamíferos. Hoffman y Reiter demostraron que la oscuridad o fotoperíodos cortos inducen marcados cambios gonadales en el hamster, que pueden ser totalmente suprimidos por la pinealectomía¹¹. En este mismo año, Axelrod y Wurtman propusieron el término "transdúctor neuroendócrino", al que ya se ha hecho referencia, para describir a la pineal como una estructura que convierte un estímulo neural proveniente de la retina y originado por la luz ambiental en una respuesta endócrina: la producción de melatonina. Esta definición de la glándula permitió sintetizar el conocimiento acumulado previa-

mente por anatomistas, bioquímicos y fisiólogos. Es de destacar que, en la actualidad, estos conceptos se han extendido y verificado en diversos tipos de vertebrados, incluido el hombre.

2-1.- Anatomía

El complejo pineal se desarrolla a partir de una evaginación tubular del techo del diencéfalo, por lo tanto, las células pineales características, los pinealocitos, si bien no son células nerviosas en el sentido estricto, derivan del neuroepitelio embrionario. En el hombre, donde ya es evidente en el segundo mes de vida intrauterina y llega a pesar 100-200 mg en el adulto, está ubicada en el borde posterior e inferior del cuerpo calloso, entre ambos tubérculos cuadrigéminos superiores (Fig. 6). Se halla encapsulada por la piamadre desde la cual le llegan los vasos sanguíneos, fibras nerviosas amielínicas y estroma de tejido conjuntivo.

La glándula pineal se caracteriza por una gran variabilidad anatómica a través de la escala zoológica¹². En 1918, el anatomista suizo Holmgren observó, mediante el empleo del microscopio, que la pineal de los anfibios contenía células semejantes a los fotorreceptores retinianos; esto le llevó a sugerir que la pineal en estas especies funcionaba como un "tercer ojo". Ciertamente en los vertebrados inferiores la pineal actúa como un fotorreceptor que envía información directamente al cerebro mediante axones que forman el tractus pinealis o nervio eferente pineal. Con el desarrollo filogenético estas estructuras morfológicas para la percepción directa de la luz se van perdiendo gradualmente, así como la conexión directa con el SNC y se transforman en órganos de secreción interna. En los mamíferos, la pineal es una glándula endócrina carente de función sensorial cuyo metabolismo es controlado por la luz a través de un mecanismo multisináptico que, originado en la reti-

EVOLUCION FILOGENETICA DE LA RESPUESTA PINEAL A LA LUZ AMBIENTAL

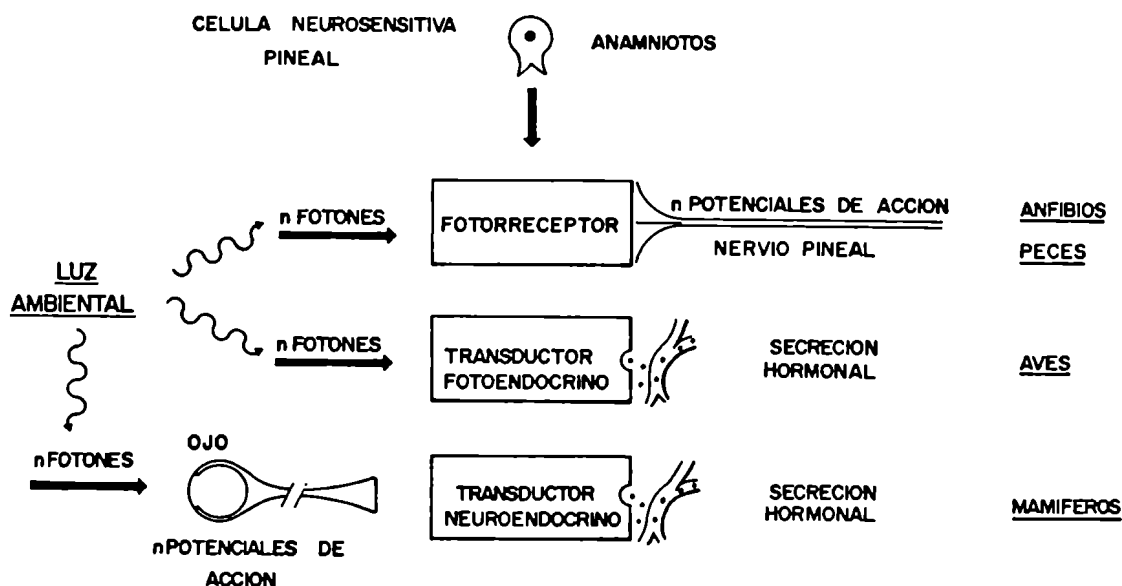


Fig. 7: Evolución filogenética del órgano pineal.

En los vertebrados inferiores actúa como un fotorreceptor que transforma la señal luminosa ambiental en señal neural eferente hacia el SNC a través del nervio pineal. En las aves presenta un estadio intermedio de transductor fotoendócrino. Posee fotorreceptores rudimentarios que, si bien carecen de nervio eferente, tienen una cierta capacidad de transformar la energía lumínica en respuesta secretoria (13). En los mamíferos pierde la propiedad fotorreceptora (transductor neuroendócrino) siendo la conexión con la retina, neural. Las neuronas simpáticas del GCS son la vía final común para el control fotico de la glándula pineal.

na involucra los nervios simpáticos periféricos (Fig. 7).

El pinealocito, o célula parenquimatosa pineal, es el componente más importante en la glándula pineal de los mamíferos. Existen motivos sustanciales para suponer que los aspectos bioquímicos y funcionales específicos de la glándula pineal están vinculados a la presencia de dichas células. La glándula pineal puede considerarse una estructura relativamente homogénea. Los pinealocitos representan el 85% de la masa pineal, estando el resto constituido por células gliales que se distribuyen como elementos de sostén y por terminales nerviosas.

Como todo órgano circunventricular, la pineal se halla fuera de la barrera hematoencefálica. Los pinealocitos emiten, en su mayoría, prolongaciones o "procesos" citoplasmáticos que terminan en los espacios perivasculares o contactan con la cavidad ventricular, lo que constituye la base anatómica para la secreción de hormonas hacia ambos compartimientos (Fig. 8). Es de hacer notar que la pineal posee un sistema vascular profuso y el flujo sanguíneo por gramo de tejido se halla entre los más altos del organismo, evidencia contraria al carácter vestigial otorgado otrora a la glándula.

Uno de los principales problemas no resueltos aún por los anatomistas es el sitio intracelular de producción y almacenamiento de las hormonas pineales¹⁵. Se acepta, en general, que las vesículas secretorias presentes en los pinealocitos contienen una sustancia probablemente glucoproteica, sintetizada en el retículo endoplásmico granular y transportada y concentrada en los sáculos del retículo de Golgi. La formación y liberación de estas vesículas muestra un ritmo circadiano y depende de la integridad de la inervación¹⁵. Si bien se ha propuesto que tales vesículas son el sitio de almacenamiento del o de los principios endócrinos pineales, no existe aún pruebas experimentales al respecto. La posibilidad que la vesícula secretoria contenga tanto la sus-

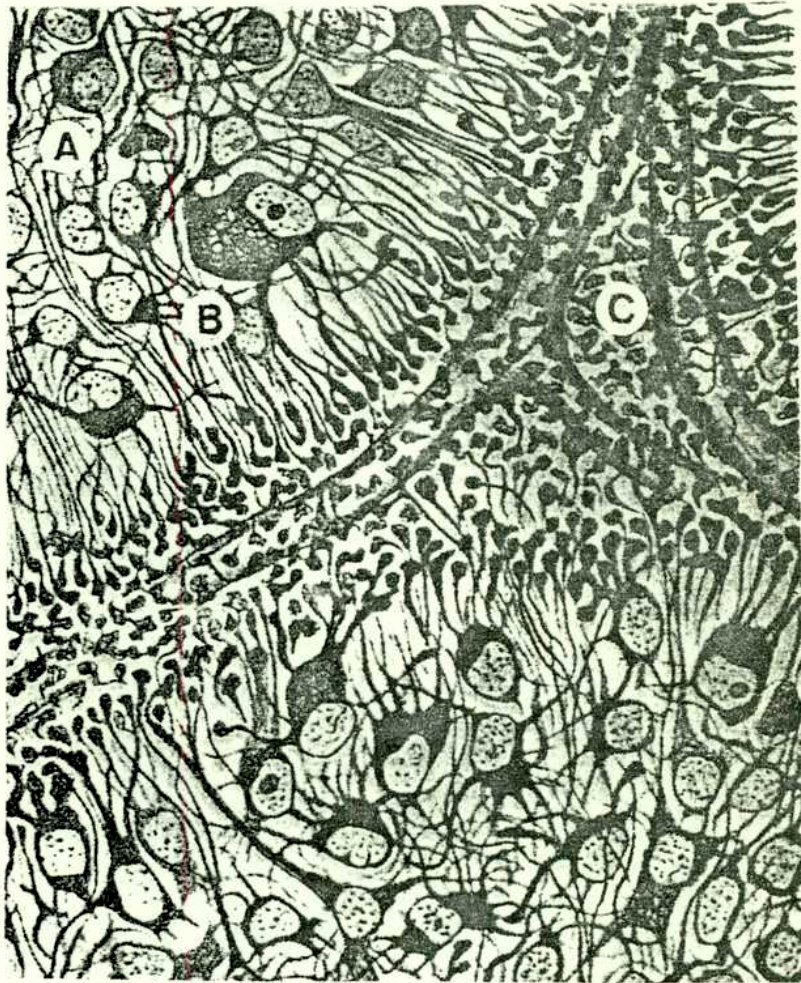


Fig. 8: Diagrama de una sección de la glándula pineal humana¹⁴. (A) y (B): pinealocitos; (C): procesos citoplasmáticos de los pinealocitos en las proximidades del espacio pe rivascular.

tancia proteica como un derivado indólico (melatonina o serotonina) constituye la extensión al pinealocito del concepto de célula APUD (amine precursor uptake and decarboxylation)¹⁶. En efecto, existen evidencias autorradiográficas que apoyan la localización preferencial de la serotonina en la matriz de las vesículas secretorias de las células parenquimatosas pineales¹⁵. La glándula pineal posee la concentración de serotonina más elevada de todo el organismo, así como los niveles más altos de otras aminas biógenas (ver biosíntesis de melatonina).

En la rata, aparte de las características aquí expuestas, la glándula pineal presenta varias peculiaridades. Posee una ubicación superficial debajo de la calota entre ambos hemisferios cerebrales, justo por delante del cerebelo. Esto hace posible que su extirpación pueda realizarse en menos de 20 segundos después de la decapitación del animal, ya que queda visible al levantar la tapa ósea craneana. Ello representa, indudablemente, una ventaja respecto de la pineal de otras especies (como, por ej., los primates), en las que se halla cubierta por los hemisferios cerebrales. Además, otra característica es su forma y tamaño: es un órgano aproximadamente esférico de 1-1.5 mm. de diámetro, lo que permite usarla in vitro como cultivo de órgano inmediatamente después de su extirpación sin necesidad de proceder a la obtención de cortes que no siempre son representativos del tejido en cuestión. Sus dimensiones hacen factible la difusión homogénea in vitro, desde y hacia el centro del órgano, de las sustancias en estudio.

2-2.- Inervación

La síntesis de melatonina y, en general la actividad pineal, exhiben un ritmo diario, con máximos durante el período de oscuridad. La información sobre el estado de la luz ambiental converge a la

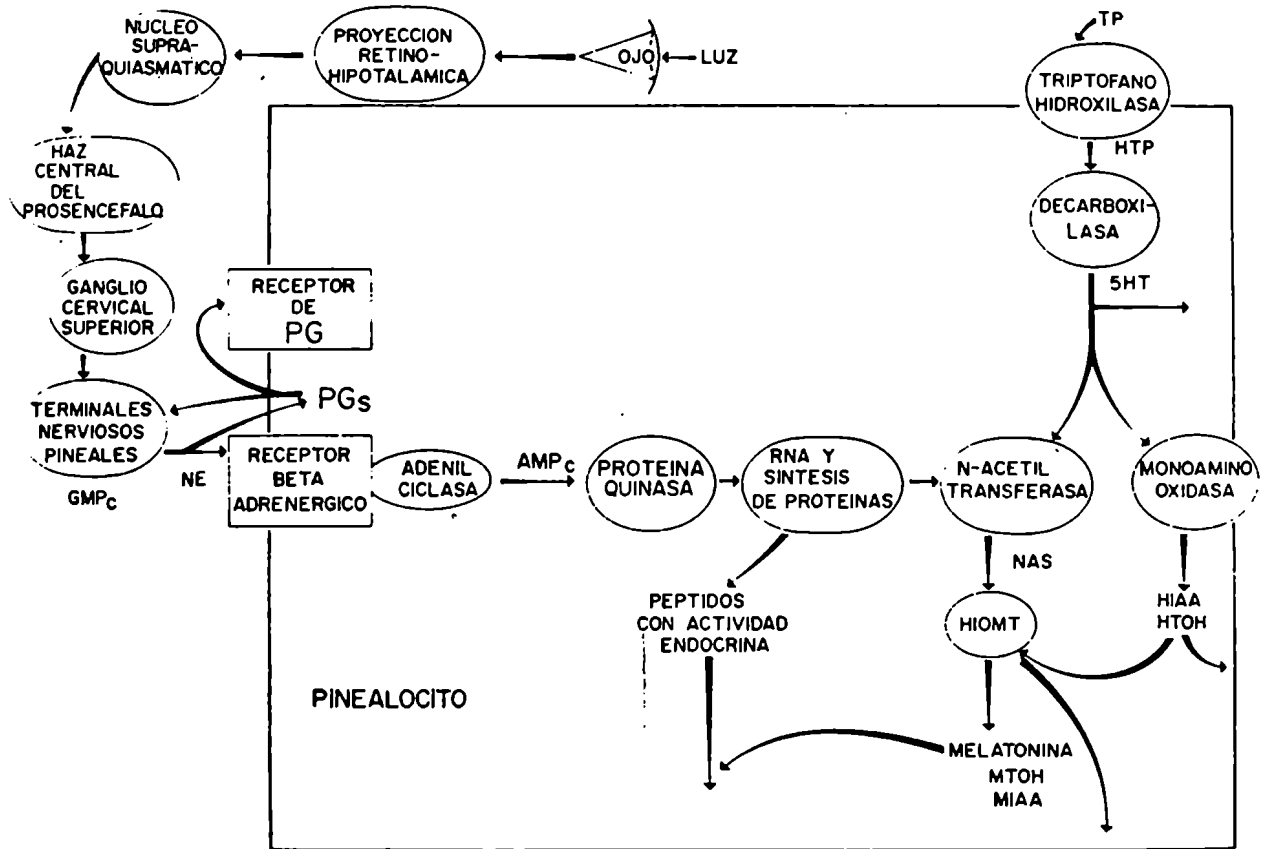


Fig. 9: Vía neuronal y secuencia metabólica de control de la actividad pineal por la luz ambiental.
 TP: triptófano; HTP: 5-hidroxitriptófano; 5-HT: serotonina; HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético; HTOH: 5-hidroxitriptófól; NAS: N-acetilserotonina; MTOH: 5-metoxitriptófól; MIAA: ácido 5-metoxiindolacético; PG: prosteglandinas.

glándula pineal por una vía multisináptica originada en la retina y que en sus últimos pasos utiliza los nervios simpáticos periféricos o autónomos. Es decir, la pineal de rata, a pesar de ser una parte del SNC, no posee conexión directa con el cerebro.

Las distintas etapas de la vía neural están esquematizadas en la Fig. 9. Se considera hoy como establecido (en particular luego de los estudios de Moore¹⁷) que las neuronas de la capa ganglionar de la retina proyectan bilateralmente sobre neuronas del núcleo supraquiasmático. El núcleo supraquiasmático, zona central de control de varios ritmos circadianos¹⁸, proyecta hacia el hipotálamo periventricular, hipotálamo lateral y columna intermedio-lateral de la médula cervical donde se originan las fibras preganglionares del GCS (Fig. 9). Las fibras simpáticas postganglionares utilizan como neurotransmisor a la NE y alcanzan a la glándula pineal por dos vías. Un grupo sigue la distribución de los vasos sanguíneos y termina en el espacio perivascular¹⁹ y en las cercanías de los procesos de los pinealocitos²⁰; otro grupo penetra a la glándula por el polo caudal formando los nervios conarios. Estas terminales tienen distribución parenquimatosa y perivascular, confirmada por estudios con microscopio electrónico²¹. Las brechas aparentes entre las terminales nerviosas y el parénquima celular parecen tener muchas de las características morfológicas de una sinápsis.

Por lo tanto, dada su inervación profusa y exclusivamente noradrenérgica proveniente del GCS, la glándula pineal de la rata es un modelo único para el estudio de los factores que regulan la síntesis de monoaminas y de sus mecanismos de acción²². Además por su inusualmente alta densidad de terminales nerviosas simpáticas, provee una herramienta experimental para el estudio de la morfología de la neuro-

na noradrenérgica.

En la rata, el GCS se halla ubicado ventralmente en el cuello, lo que lo hace fácilmente manipulable y con posibilidades de desafferentación (descentralización) o de extirpación (gangliectomía cervical superior). Ambos procedimientos han sido utilizados en este trabajo y se describen en Materiales y Métodos. Este hecho permite analizar, a su vez, si las diversas señales hormonales que regulan la actividad pineal actúan en forma directa sobre la glándula: transducción endócrino-endócrina y/o su inervación (terminales neurales, GCS, vía neural multisináptica aferente al ganglio): transducción endócrino-neural.

2-3.-Fisiología pineal. La glándula pineal como órgano endócrino regulador de la función reproductiva

Desde el punto de vista endócrino, la glándula pineal ha concitado en años recientes gran interés como órgano integrador de señales originadas por variables ambientales, en particular, cambios en la luz ambiental^{23,24}. En los últimos 15 años, la investigación fisiológica y farmacológica sobre la glándula pineal ha obtenido claras evidencias acerca de su intervención en mecanismos de regulación central, de la adenohipófisis, gonadas, tiroides y corteza suprarrenal (Tabla 1).

El mayor ímpetu para su estudio ha provenido, sin embargo, de observaciones que correlacionan a la glándula pineal con el control de la función reproductiva¹¹. La pinealectomía altera el estado reproductivo de la mayoría de las especies estudiadas en su habitat natural. La ablación pineal en ratas hembra o macho anula los efectos antigonadales que normalmente ocurren cuando se les extirpan los ojos para dejarlas ciegas¹¹. Si se somete a hamsters a privación de luz

TABLA 1Cambios endócrinos producidos por la pinealectomía y por la administración de melatonina.PINEALECTOMIAADMINISTRACION DE MELATONINAFunción gonadalHOMBRE

Tumores pineales con destrucción parenquimatosa productores de pubertad precoz. (11, 24).

Inhibición de la liberación de LH y hormona de crecimiento (11,24).

HAMSTER

Abolición de la atrofia gonadal estacional con depresión de FSH y LH plasmáticas o inducida por la oscuridad o la ceguera (11).

Inyectada en la última parte del período de luz produce la regresión gonadal. Implantada s.c. produce un efecto semejante a la pinealectomía (11).

RATON

Abolición de la atrofia gonadal estacional o inducida por la oscuridad o la ceguera (25).

Regresión gonadal (25).

HURON

Retardo en la entrada en la estación de apareamiento. Retardo en la involución gonadal (26).

Regresión gonadal (26).

"GERBIL"

Abolición de la atrofia gonadal estacional o inducida por la oscuridad o la ceguera (11).

Regresión gonadal (11).

RATA

Apertura vaginal precoz (11). Incremento en peso testicular y ovárico y aumento en los niveles plasmáticos de testosterona, FSH, y LH en ratas anósmicas o desnutridas, en oscuridad (11).

Apertura vaginal retardada (13). Disminución del peso testicular y de órganos accesorios (13). Disminución en los niveles plasmáticos de testosterona, FSH, LH (13, 11).

Reversión de los efectos inhibitorios de la oscuridad sobre la función gonadal de ratas androgenizadas (11).

Inyectada simultáneamente con testosterona inhibe la androgenización de hembras recién nacidas (11).

Ovulación temprana luego de administrar PMS a ratas impúberes (11).

Inhibición de la liberación de LH y la ovulación. Inhibición de la descarga de LH y de la ovulación que siguen a la inyección de PMS a ratas inmaduras (13, 11, 27).

Eliminación del máximo nocturno en prolactina plasmática. (11).

Liberación de prolactina (13,28).

OVEJA

Reducción de los efectos del fotoperíodo en la concentración plasmática de prolactina y testosterona (29).

Bloqueo del incremento postcastración de LH plasmática (30).

CIERVO

Alteraciones en el desarrollo puberal y el apareamiento estacional (31)

FOCA

Inducción de pelaje invernal y reposo gonadal (32).

PERRO

Inhibición de la respuesta hipofisaria al LHRH (33).

AVES

Crecimiento gonadal retardado en fotoperíodos estimulatorios (codorniz (34), pato (35), gorrion (34), gallina (36)).

Inhibición de la función gonadal (13, 36,34,35).

REPTILES

Reversión de los efectos inhibitorios y estimulatorios del fotoperíodo sobre la función gonadal (12).

Inhibición gonadal (12).

ANFIBIOS

Reversión de los efectos inhibitorios y estimulatorios del fotoperíodo sobre la función gonadal (12).

Inhibición gonadal (12).

PECES

Reversión de los efectos inhibitorios y estimulatorios del fotoperíodo sobre la función gonadal (12,37).

Inhibición gonadal (12,37).

Otras funciones hipotálamo-hipofisarias

RATA

Aumento del peso de la hipófisis y del número de mitosis. Aumento del contenido de tubulina hipotalámica. Disminución de la captación sinaptosomal hipotalámica de serotonina. Disminución en la actividad neurosecretoria del núcleo supraóptico. Induc-

Inhibición de la síntesis de proteínas hipotalámicas. Inhibición de la captación sinaptosomal hipotalámica de serotonina. Disminución en el contenido de tubulina hipotalámica. Cambios ultraestructurales en la eminencia media compatibles con alteración de la neurosecreción y transporte axo-

ción de la liberación diurna de hormona de crecimiento (13,38,39).

nal. Aumento de la liberación excitóica de neurotransmisores y LHRH. Aumento de LHRH hipotalámico. Inhibición de la liberación de prostaglandinas en el hipotálamo (13,41,38,39,40).

Función tiroidea

RATA

Hipertrofia tiroidea. Aumento de TSH en plasma. Incremento de la captación de ^{131}I y secreción de hormonas tiroideas (42,43).

Disminución del peso de la tiroides. Aumento de TSH en plasma. Disminución en la captación de ^{131}I (42,43).

HAMSTER

Abolición de la disminución en tiroxina plasmática producida por la oscuridad (43).

Disminución de tiroxina plasmática (43).

Función suprarrenal

RATA

Aumento en el peso de la corteza suprarrenal. Incremento en los niveles hipofisarios de ACTH y en la secreción de aldosterona y corticosterona. Aumento en renina plasmática e hipertensión. Abolición del ritmo diurno en dopamina- β -hidroxilasa adrenal. Hipertrofia y aumento de la incorporación de tirosina en células medulares (13,44,42).

Disminución del peso suprarrenal y de la hipertrofia adrenal compensatoria. Disminución en los niveles plasmáticos de corticoides y aldosterona (13,42).

Páncreas

RATA

Hipertrofia de células paratiroides. Aumento de la calcemia (42).

Disminución de la calcemia por 5-metoxitriptamina(42).

por lesión ocular o por exposición a fotoperíodos de menos de 12.5 h de luz por día, las gonadas regresionan en 8 a 10 semanas; sin embargo, en animales pinealectomizados, esta regresión no se produce, lo cual indica que el efecto del fotoperíodo sobre el eje neuroendócrino-gonadal es mediado por la glándula pineal¹¹. Observaciones semejantes se han efectuado en otras especies y están resumidas en la Tabla 1.

Analizados en conjunto, dichos resultados indican que la glándula pineal produce una sustancia antigonadal en respuesta a condiciones ambientales que afectan la actividad gonadal (longitud del fotoperíodo) y han permitido la elaboración de una hipótesis coherente sobre la participación de la glándula en la regulación neuroendócrina. De acuerdo a esta hipótesis, la glándula pineal constituye ante todo un transductor que convierte la información fótica que le llega por vía neuronal desde la retina, en una señal endócrina. Tal información, que consiste primariamente en la lectura del fotoperíodo, regula el ingreso o la salida de la estación de apareamiento y, por lo tanto, desempeña un papel fundamental en la sincronización de la reproducción y de la función endócrina en general, con las condiciones más favorables para la sobrevivencia de la cría¹¹. Una característica fisiológica de importancia de la glándula pineal es la tendencia a la compensación de la mayoría de las secuelas endócrinas de la pinealectomía (excepto las relacionadas a la desincronización circanual), lo que ubica a esta estructura en su correcta perspectiva de órgano modulador más que trófico neuroendócrino y vínculo necesario para la sincronización de la función endócrina con los cambios ambientales circadianos y circanuales. La pinealectomía no elimina la actividad anual de las gonadas sino que la retrasa o acelera. Esta es la razón por la cual los animales sometidos a condiciones ambientales constantes de luz y tempe-

ratura, como la rata de laboratorio, los efectos de la pinealectomía están muy atenuados por hallarse la función pineal deprimida y se requiere la exposición a fotoperíodos normales para la especie (2-3 h de luz escasa intensidad por día) para que se exterioricen en forma plena. En la especie humana, sólo en condiciones extremas de iluminación, como en las poblaciones ubicadas al norte del Círculo Artico¹¹, se observa la estacionalidad del fenómeno reproductivo.

La existencia de una sustancia antigonadal pineal ha sido comprobada fehacientemente mediante numerosas observaciones en las que la administración de extractos pineales, tanto crudos como parcialmente purificados, produjo alteraciones de la función reproductiva. Así, por ejemplo, la inyección de distintos extractos pineales indujo: a) disminución del peso de las gonadas y de los órganos sexuales accesorios^{45,46} b) inhibición de la hipertrofia gonadal compensatoria^{47,48,49} c) reducción de los niveles plasmáticos de LH^{49,50} y d) esterilidad⁵¹.

2-4.-Hormonas pineales

Hasta el momento tres familias de compuestos con actividad sobre la función reproductiva han sido aislados de estos extractos: los metoxindoles, de los cuales la melatonina es el prototipo¹³, péptidos antigonadales de bajo peso molecular, como por ejemplo, la arginina vasotocina y proteínas del tipo de la GIS ("gonadotrophin inhibiting substance")⁵². La masa de información sobre los metoxindoles excede en mucho la de los restantes grupos, ya que constituyen la primera familia de hormonas pineales aisladas en forma pura⁸.

2-4-1.-Metoxindoles

A) Biosíntesis

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), prototipo de una

familia de compuestos biológicamente activos, los metoxindoles, es sintetizada por la glándula pineal de todos los vertebrados, inclusive el hombre. El descubrimiento de esta hormona, capaz de reproducir los efectos de la administración de extractos pineales y revertir las secuelas endócrinas que siguen a la pinealectomía, brindó las primeras bases bioquímicas para el análisis experimental de la función pineal.

En 1959, Lerner y col.⁸, quienes se hallaban en la búsqueda de un factor pineal aclarador de la piel de los anfibios, aislaron e identificaron la melatonina en extractos de glándulas pineales bovinas. Este compuesto demostró ser 10^5 veces más potente que la NE en producir aclaramiento dérmico: 10^{-13} g/ml de melatonina inducen efectos de tectables microscópicamente en larvas de anfibios, lo que ha permitido el desarrollo de un bioensayo muy sensible para su determinación. Los efectos de la melatonina sobre la pigmentación dérmica en los mamíferos son mucho menos marcados y probablemente indirectos, a través de la modificación en la secreción de hormonas hipofisarias⁵³. En cambio, en estos animales, la melatonina ejerce efectos significativos sobre otra estructura neuroectodérmica, el SNC, y particularmente a nivel de los centros integrativos neuroendócrinos (Tabla 1).

A la caracterización de la melatonina siguió la demostración, por Axelrod y col.⁹, de la presencia en la glándula pineal de las enzimas necesarias para su síntesis a partir del aminoácido esencial triptofano (Fig. 10). Dicha biosíntesis se inicia con la captación de triptofano por los pinealocitos, parte del cual se utiliza para la síntesis proteica, mientras que una porción cuantitativamente mayor es convertida a indolaminas. El paso inicial lo constituye la oxidación del triptofano a 5-hidroxitriptofano por acción de la enzima triptofano-hidroxilasa, reacción que requiere la presencia de Fe^{++} , O_2

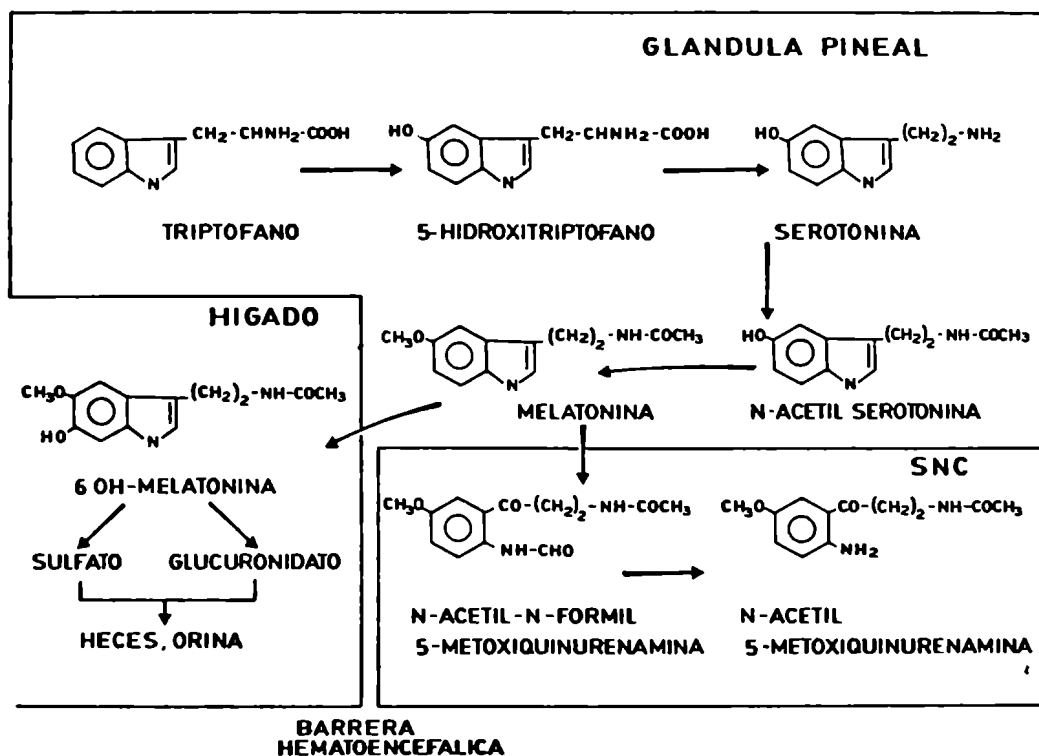


Fig. 10: Biosíntesis y metabolismo de la melatonina. La glándula pineal carece de sistemas enzimáticos de degradación para la melatonina y almacena sólo una fracción mínima de la hormona que sintetiza. El metabolismo central y periférico (hígado) difieren entre sí, como se discute en el texto.

y pteridina reducida. La enzima se halla probablemente insaturada en condiciones fisiológicas, ya que el K_m para el triptofano es mucho mayor que las concentraciones de aminoácido libre presentes en la glándula, por lo que es factible que los niveles de triptofano circulantes controlen la síntesis de serotonina pineal¹⁹. El 5-hidroxitriptofano es descarboxilado por acción de una descarboxilasa de relativa especificidad, que participa también en la biosíntesis de catecolaminas. Las concentraciones de serotonina pineal resultantes son las más altas del organismo y muestran un marcado ritmo diario, con máximos niveles durante el período de luz, los que decaen abruptamente durante la oscuridad, fase de síntesis máxima de melatonina (Fig. 11). Una vez sintetizada la serotonina, una fracción (30%) pasa a las terminales nerviosas simpáticas pineales, donde es almacenada en vesículas junto con la NE^{54,55}.

Más del 90% de la serotonina producida fuera de la glándula pineal, por ejemplo en los núcleos del rafe mesencefálico, es metabolizado por deaminación oxidativa, por acción de la enzima MAO, la cual convierte a la serotonina en un aldehído inestable que se reduce u oxida respectivamente a 5-hidroxitriptofol y 5-hidroxiindolacético. La MAO se encuentra también en la glándula pineal en forma de 2 enzimas: tipos A y B, con localización en las terminales neurales y pinealocitos respectivamente y participa en la metabolización de la serotonina pineal, así como de la NE¹⁹. Sin embargo, la vía específica endocrina del metabolismo pineal de la serotonina es su conversión a melatonina, la que comprende dos reacciones enzimáticas¹⁹. En primer término, la serotonina es acetilada a N-acetilserotonina por acción de la enzima serotonina-N-acetiltransferasa; luego otra enzima, la hidroxindol-O-metiltransferasa, transfiere un grupo metilo de la S-adenosil metionina a la posición 5-hidroxi de la N-acetilserotonina, resultando

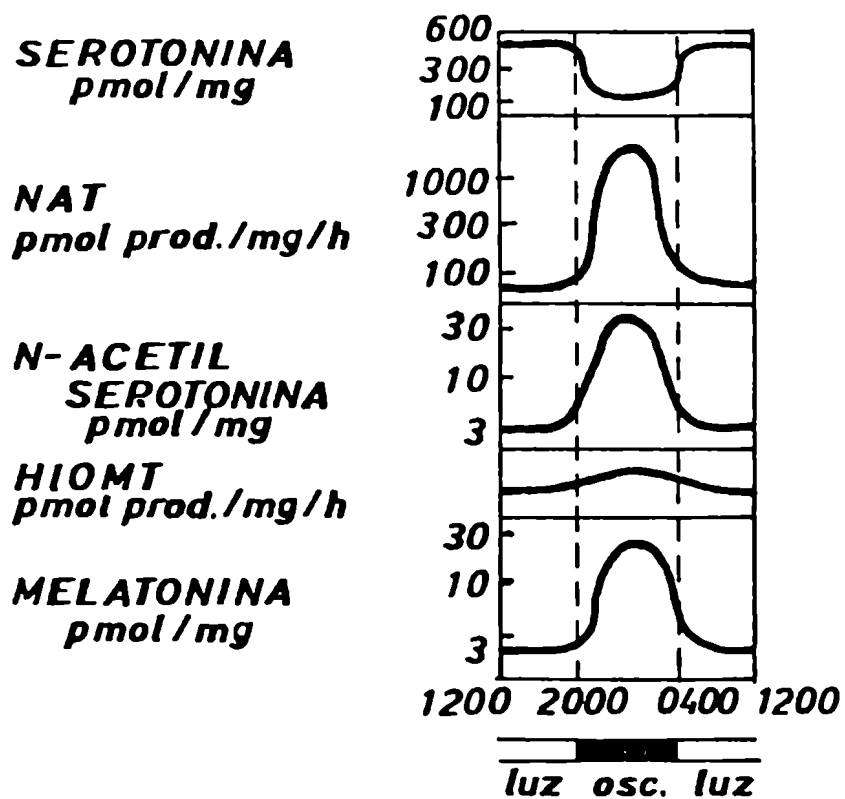


Fig. 11: Ritmo diario en los niveles de serotonina, N-acetil serotonina y melatonina pineales y de las actividades de las enzimas involucradas en la biosíntesis de melatonina: N-acetiltransferasa (NAT) e hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT).

en la formación de melatonina (Fig. 10). La hidroxindol-O-metiltransferasa también convierte al 5-hidroxitriptofol y 5-hidroxiindolacético en sus respectivos derivados metilados: 5-metoxitriptofol y 5-metoxindolacético, de actividad hormonal. (Fig. 9).

La serotonina-N-acetiltransferasa se encuentra en varios tejidos del organismo, mientras que la hidroxindol-O-metiltransferasa sólo se detecta en la glándula pineal, en la retina y en una estructura orbitaria particular, la glándula harderiana¹³. La posibilidad de síntesis extrapineal de melatonina, sugerida por estos estudios, fue confirmada años después por la descripción de niveles residuales de melatonina luego de la pinealectomía y por la identificación inmunohistoquímica de melatonina en la retina y glándula harderiana¹². Es posible que en la retina la melatonina participe como se ha postulado previamente¹³ en la regulación del epitelio pigmentario.

La capacidad de estas enzimas pineales, la N-acetiltransferasa y la hidroxindol-O-metiltransferasa, de responder rápidamente a cambios en la luz ambiental, con valores altos durante la noche y bajos en el día⁹ (Fig. 11) tiene un corolario obvio. Los ciclos normales de luz y oscuridad a los cuales se hallan expuestos la mayoría de los animales y el hombre inclusive, genera un ritmo paralelo en la producción de melatonina. Esto provee al organismo de una señal circulante tiempo-dependiente potencialmente utilizable para sincronizar ritmos biológicos con el estado de luz ambiental (circadianos, circanuales).

B) Metabolismo de la melatonina

Se ha establecido, por técnicas de radioinmunoanálisis, que la glándula pineal almacena y metaboliza una fracción mínima de la melatonina que sintetiza. Por lo tanto, la variación diaria en la bio

síntesis y contenido tisular del metoxindol es un indicador confiable de la secreción glandular¹². La concentración de melatonina en la glándula pineal humana varía entre 0.05 y 0.4 ug/g⁵⁶ y en el plasma oscila entre 10 y 300 pg/ml⁵⁷. En este compartimiento circula unida a la albúmina en un 60%, lo que no es detectable en el LCR^{13,58}. El complejo melatonina-albúmina es fácilmente dissociable y la presencia de la proteína ligadora no modifica la actividad biológica de la hormona¹³.

El hígado es el principal sitio de inactivación de la melatonina; en él se hidroxila a un compuesto carente de actividad biológica, la 6-hidroximelatonina, que se excreta en orina y heces conjugado con ácido glucurónico o sulfúrico (Fig. 10). La melatonina también se excreta en forma libre por orina, detectándose en humanos un claro ritmo diario con 60-80% de las cantidades totales excretadas entre las 2300 y 0700 h.⁵⁶ La caracterización de los metabolitos cerebrales de la melatonina (los que no incluyen los 6-hidroxiderivados) fue realizada por Hirata y col.⁵⁹, quienes verificaron la ruptura del anillo indólico (Fig. 10).

Los compartimientos hacia los cuales se secreta la melatonina producida por la glándula pineal no están identificados hasta el presente. Se ha sugerido que el LCR puede ser más importante que el plasma; sin embargo, el estudio de la velocidad de secreción hacia ambos compartimientos indica que la transferencia hacia el plasma es cuantitativamente más importante, aunque no puede descartarse que dicho pasaje sea posterior a una secreción inicial en el LCR⁵⁸.

C) Sitios y mecanismo de acción

En la Tabla 1 se enumeran diversos efectos endócrinos de la melatonina; varios de ellos son compartidos por su análogo pineal, el

5-metoxitriptofol (Fig. 9) que se halla presente como hormona circulante en varias especies, inclusive en el hombre⁶⁰.

El tratamiento con melatonina revierte, en distintos animales la mayoría de las secuelas endócrinas de la pinealectomía (Tabla 1). Su sitio primario de acción está ubicado, probablemente, a nivel del SNC, ya que la hormona afecta, actuando sobre el hipotálamo¹³ y la adenohipófisis⁶¹, la liberación de varias hormonas hipofisarias (mecanismos de transducción endócrino-endócrinos y/o endócrino-neurales). Estudios de captación preferencial de la hormona tritiada luego de su administración in vivo sugieren también un sitio de acción central⁶². Recientemente, la descripción de receptores para melatonina en preparaciones de membrana de distintas regiones de tejido cerebral bovino, especialmente el hipotálamo mediobasal⁶³, sustentan desde el punto de vista bioquímico la existencia de dichos procesos de interacción neuroendócrina para la hormona en el SNC.

Asimismo, varios indicadores de la función hipotalámica son modificados por el tratamiento con melatonina; estos comprenden la concentración de serotonina y ácido gamma aminobutírico⁶⁴, la liberación y recaptación sinaptosomal de neurotransmisores³⁸, la liberación y contenido hipotalámico de LHRH⁴¹ y la síntesis de proteínas, en particular de tubulina^{39,65}. Existe una relación significativa entre melatonina y fenómenos relacionados al sistema de microtúbulos neuronales. Los resultados de varios trabajos^{39,66} sugieren que una serie de efectos aparentemente distintos de la melatonina en los seres vivos (migración de pigmento en la piel de los anfibios, inhibición de la mitosis celular, cambios neuroendócrinos en vertebrados superiores) pueden tener un mecanismo común: la modificación

de proteínas contráctiles intracelulares del tipo de la tubulina.

Otro aspecto de interés en el mecanismo de acción de la melatonina es su similitud estructural con la indometacina (ácido-N-p- [clorobenzoil] -2-metil-5-metoxindol-3-acético), agente antiinflammatorio que inhibe la síntesis de prostaglandinas. Esta semejanza plantea la posibilidad que la melatonina también inhiba dicha síntesis en los órganos que afecta. Resultados recientes indican que, efectivamente, la hormona pineal tiene tal propiedad en el hipotálamo mediobasal y útero⁴⁰. La inhibición de la síntesis de prostaglandinas por inyección de indometacina induce un cuadro neuroendócrino muy semejante al observado luego de la administración de melatonina (Tabla 1).

Una característica peculiar de la glándula pineal es su sensibilidad a la administración exógena de melatonina. La inyección de esta hormona afecta la concentración de lípidos pineales⁶⁷, modifica los niveles de serotonina pineal⁶⁸ y produce cambios ultraestructurales compatibles con estimulación glandular en varias especies (rata⁶⁹, hamster⁷⁰, ratón⁷¹). En la rata, la inyección de melatonina aumenta la actividad de las dos enzimas participantes en la conversión de serotonina a melatonina (N-acetiltransferasa e hidroxindol-O-metiltransferasa)⁶⁹. Considerados en conjunto, estos resultados sugieren que el tratamiento con melatonina produce una activación del proceso secretorio pineal, sin compromiso neural evidente, ya que no se observan modificaciones concomitantes en la velocidad de recambio o "turnover" de NE de los terminales simpáticos pineales³⁹. La demostración directa de cambios en la secreción pineal luego de la administración exógena del metoxindol está dada por el incremento en la concentración del neuropéptido pineal, ar-

ginina vasotocina, en el LCR del gato luego de la inyección de melatonina⁵².

Dado que los resultados precedentes sugieren un sitio intrapineal de acción para la melatonina, uno de los objetivos del presente trabajo ha sido la identificación de receptores intraglandulares de esta hormona, los que confirmarían la presencia de fenómenos de transducción endócrino-endócrina para la melatonina en la glándula pineal.

2-5.-Regulación de la función pineal

2-5-1.-Control neural

La síntesis de melatonina y, en general, la función metabólica de la glándula pineal muestran un ritmo diario con máximos durante el período de oscuridad (Fig. 11). A través de este mecanismo, como ya se ha discutido, la glándula provee al organismo de una señal utilizable para la sincronización circanual de la función endócrina así como para la sincronización de ciertos ritmos circadianos.

Las variaciones en la síntesis de melatonina por la luz ambiental han sido útiles para definir las vías neurales por las cuales la luz afecta la función pineal así como la de otros órganos neuroendócrinos (Fig. 9).

Dado lo multisináptico de la vía neural aferente a la glándula existe también la posibilidad que otras señales, si bien menos importantes que la luz, intervengan en el control neural de la glándula pineal. Así por ejemplo, el aumento transitorio del tráfico neuronal en el sistema simpático producido por el stress⁷² o por impulsos sensoriales como el sonido, cambio de temperatura, etc.¹⁹, o el aumento sostenido originado por inyecciones neonatales de testos

terona⁷³ producen también estimulación de la función pineal. Por el contrario, la interrupción de estas conexiones por gangliectomía cervical superior bilateral o por bloqueo adrenérgico, producen cambios profundos compatibles con hipofunción pineal.

La NE descargada por las fibras postganglionares desencadena al actuar sobre los receptores beta de los pinealocitos, una secuencia de fenómenos que conducen a la síntesis de hormonas pineales (Fig. 9). Estos comprenden: cambios en el potencial de membrana, incremento en la actividad adenilato ciclasa y en niveles de AMP cíclico, síntesis y liberación de prostaglandinas y GMP cíclico, fosforilación de histonas, aumento en la síntesis de ARN y activación de las enzimas que sintetizan melatonina (para referencias ver 9, 74 y 75). Estos cambios bioquímicos explican el aumento de melatonina en LCR y plasma que sigue a la exposición de los animales a la oscuridad⁵⁷. Como puede apreciarse, el fenómeno de transducción neuroendócrina ha sido bien caracterizado en los pinealocitos.

En el presente trabajo se discutirá y ofrecerá evidencia sobre la presencia de receptores α -adrenérgicos en la glándula pineal, lo que sugiere que la misma es un buen modelo neuroendócrino no sólo para estructuras en las que tienen lugar procesos β -adrenérgicos, sino también para aquéllas como el hipotálamo donde los fenómenos son predominantemente de tipo α -adrenérgico.

2-5-2.-Control hormonal

Si bien la luz ambiental, como ya se ha mencionado, es el principal regulador de la síntesis de melatonina y, en general, de la función pineal, el sistema no carece de retroalimentación hormonal por parte de los distintos órganos cuya función afecta. Un ejemplo

lo dan los cambios en la síntesis y concentración plasmática de melatonina durante el ciclo estral en diversas especies como la rata⁷⁶, la oveja⁷⁷ y la mujer⁷⁸, superpuestos a los cambios pineales diurnos producidos por el ciclo luz-oscuridad. Estos datos sugieren que en los pinealocitos se producen fenómenos de transducción endócrino-endócrina.

La condición sine qua non para la existencia de procesos de transducción endócrino-endócrina es la presencia de receptores hormonales en la glándula pineal. Tal posibilidad ha sido evaluada cuidadosamente en los últimos años. La primera descripción de un receptor hormonal en la glándula pineal bovina, realizada en 1974 para el receptor androgénico⁷⁹, ha sido confirmada y extendida a otras especies, inclusive los primates^{80,81,82}. La aplicación de técnicas autorradiográficas ha permitido caracterizar una población de células pineales capaces de captar estradiol⁶.

Los pinealocitos metabolizan la testosterona a 5α -dihidrotestosterona, 5α -androstano diol, androstano diona y 5α -androstano diona⁷⁹, y a estrógenos⁸³, a semejanza de lo que ocurre en otras áreas del SNC involucradas en la regulación de la secreción de gonadotrofinas; la 5α -dihidrotestosterona se concentra en la fracción nuclear⁷⁹, hecho igualmente observado en la próstata. La concentración nuclear de 5α -dihidrotestosterona ha sido también revelada por estudios autorradiográficos⁶.

Asimismo, la progesterona es captada por la glándula pineal in vitro y es metabolizada a 5α -pregnanodiona y 3α -hidroxi- 5α -pregnan-20-ona^{84,85,86}, paso metabólico que se considera importante para la expresión de la actividad progestacional en otros órganos (Fig. 12).

GLANDULA PINEAL
VIAS METABOLICAS PARA LOS ESTEROIDES SEXUALES

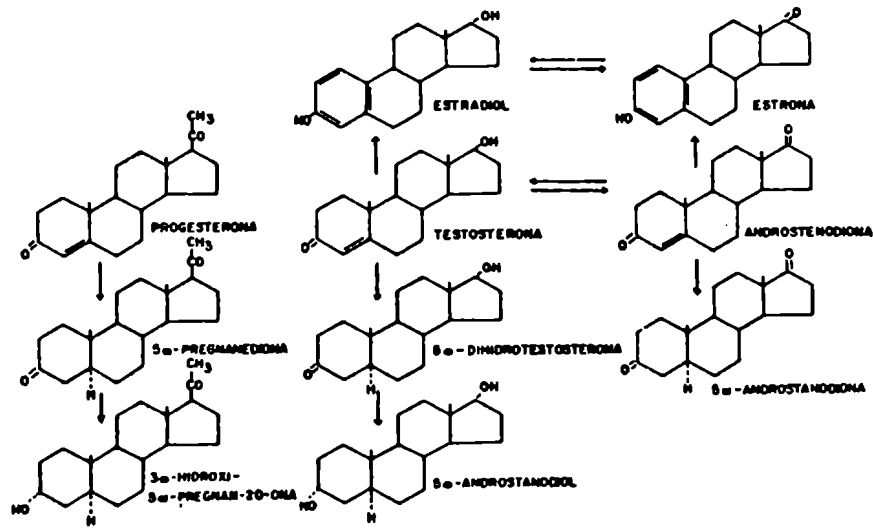


Fig. 12: Vías metabólicas para los esteroides en la glándula pineal.

En el presente trabajo se discute la participación de la progesterona en los cambios en la síntesis de proteínas pineales durante el ciclo estral, observaciones que condujeron a la descripción de un receptor citoplasmático específico para esta hormona en la glándula pineal. Durante el desarrollo de los presentes experimentos se publicó la demostración que la progesterona agregada al medio de incubación de glándulas pineales, inhibe la liberación de melatonina, es decir, se observó un fenómeno de transducción endócrino-endócrina para dicha hormona en la glándula pineal⁸⁷.

La serotonina es una amina clave en la fisiología de la pineal. Este órgano posee la capacidad de sintetizar y almacenar serotonina, característica que lo ha convertido en un modelo extrapolable a neuronas serotoninérgicas. En 1963, Quay⁸⁸ constató que los niveles de serotonina pineal variaban como una función del ciclo estral de la rata. Dicha observación llevó a investigar, en este trabajo de tesis, los efectos de las hormonas reproductivas sobre el contenido y la velocidad de recambio o "turnover" de serotonina pineal.

Los efectos de las hormonas sobre la función pineal pueden resultar, no sólo de su acción secuencial directa sobre dicha estructura (transducción endócrino-endócrina), sino también de un mecanismo indirecto mediado total o parcialmente por modificaciones en la actividad neural de la vía aferente simpática (transducción endócrino-neural).

La singular inervación pineal constituida por fibras simpáticas originadas en el GCS, presenta cambios en el "turnover" de NE⁸⁹ y en enzimas relacionadas con la síntesis del neurotransmisor⁹⁰.

luego del tratamiento con estradiol o testosterona. Estos cambios se interpretan como una activación hormonal de la vía simpática y, teóricamente, pueden deberse a: 1) un efecto a nivel de los terminales pineales, directo, o a través de un mecanismo de retroalimentación originado en los pinealocitos; 2) a un efecto a nivel de los cuerpos ganglionales; 3) a cambios en algún punto de la vía multisináptica que conecta a la retina con el ganglio.

La información disponible, aún fragmentaria, sugiere que el GCS es un sitio de acción para estrógenos y andrógenos⁹⁰ y esa posibilidad se examinó en el presente trabajo, en el que se discuten varios efectos metabólicos del estradiol y la presencia de presuntos receptores estrogénicos en dicha estructura neural. Se investigaron también los cambios en el "turnover" de NE en la glándula pineal y GCS producidos, en ratas castradas, por la inyección de FSH o LH.

En el punto siguiente se hará una breve revisión de la anatomía y fisiología del GCS.

3.- El ganglio cervical superior

3-1.-Anatomía

El GCS es clásicamente considerado como un "cerebro en miniatura" y ha sido utilizado ampliamente para el estudio de los fenómenos electrofisiológicos y bioquímicos de la neurotransmisión⁹¹. Su relación con el hipotálamo es obvia: desde los trabajos de Sherrington en 1906 el hipotálamo es considerado como el primer ganglio del sistema nervioso.

Desde el punto de vista anatómico forma parte del sistema nervioso autónomo. Este último media el control de las funciones vegetativas (por ejemplo, viscerales) y, a diferencia del sistema ner-

vioso somático, sus neuronas se hallan íntegramente fuera del SNC. El sistema nervioso autónomo se compone de dos sectores: simpático y parasimpático, con distribución de los cuerpos neuronales (ganglios) en las cercanías de las vísceras (parasimpático) o paravertebral (simpático). El neurotransmisor en la mayoría de las fibras simpáticas postganglionares es la NE, mientras que para las fibras parasimpáticas postganglionares es la acetilcolina.

El GCS está compuesto por las terminales de las fibras colinérgicas preganglionares, los cuerpos de las neuronas postganglionares simpáticas noradrenérgicas, células pequeñas intensamente fluorescentes que contienen catecolaminas, predominantemente dopamina (células SIF: "small, intense, fluorescent cells") y células de la glia⁹² (Fig.13).

3-2.- Fisiología del GCS. La neurona noradrenérgica

Dada la estructura del GCS, tres sistemas están involucrados en la modulación o integración de la transmisión ganglionar. El primer tipo implica mecanismos intrasinápticos mediados por receptores pre- y post-sinápticos (por ejemplo: nicotínicos y muscarínicos a través de los cuales actúa la acetilcolina). El segundo tipo involucra mecanismos intersinápticos en los que participa una interneurona SIF. Por último, el tercer tipo de efecto modulador es mediado por sustancias endógenas que pueden ser liberadas o estar presentes en el ganglio y en la sangre y que modifican la transmisión ganglionar a través de mecanismos pre- o post-sinápticos⁹¹. Estas sustancias incluyen, entre otras, catecolaminas, serotonina, angiotensina II, etc. En este trabajo de tesis se estudia la participación de las hormonas reproductivas en el tercer tipo de mecanismo, lo que implica fenómenos de transducción endócrino-neurales.

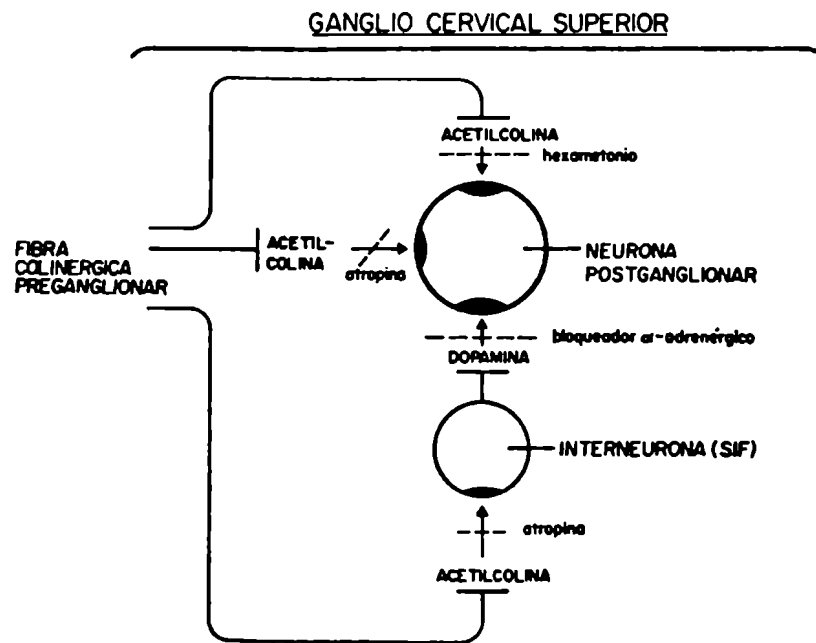


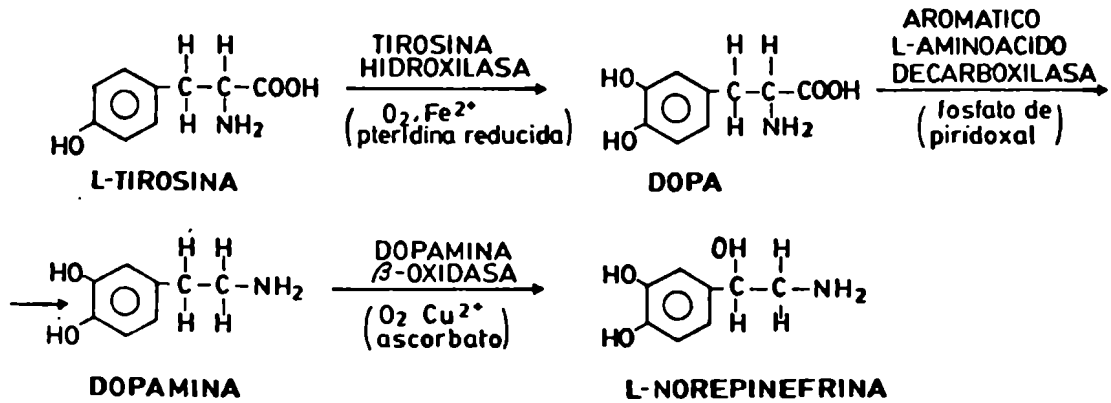
Fig. 13; Esquema del ganglio cervical superior de mamífero.

La localización del GCS en la rata (ventral en el cuello) hace factible la descentralización del mismo, así como su extirpación y brinda la posibilidad de estudiar los posibles fenómenos de transducción endócrino-neural a nivel del GCS, así como su modulación por la aferencia colinérgica.

El entendimiento de los hechos bioquímicos más importantes involucrados en el proceso de neurotransmisión en las fibras postganglionares simpáticas que inervan la pineal, implica el conocimiento de la fisiología de la neurona noradrenérgica.

El camino biosintético de la NE en la neurona está representado en la Fig. 14. Todas las enzimas son sintetizadas en el cuerpo neuronal y se transportan a lo largo del axón hacia las terminales. Este proceso, descubierto en 1958 por Weiss y Hiscoe⁹³, es conocido como transporte axoplasmático. Los microtúbulos pueden actuar como rieles a lo largo de los cuales viajan los componentes celulares hacia las partes más distales de la célula. Drogas tales como la colchicina y vinblastina, las cuales interfieren, probablemente, con la integridad funcional de los microtúbulos (por ejemplo, la colchicina se une irreversiblemente a la tubulina, proteína formadora de los mismos), bloquean el transporte axoplasmático⁹⁴. La tirosina es captada desde el torrente sanguíneo hacia las terminales nerviosas catecolaminérgicas, donde es hidroxilada por la tirosina hidroxilasa para formar dihidroxifenilalanina (DOPA)⁹⁵. Esta enzima es específica para la L-tirosina y requiere, para su activación, O_2 , Fe^{++} y el cofactor tetrahydropteridina; además se halla bajo control regulatorio inhibitorio por producto final, NE. La DOPA es descarboxilada por la L-aminoácido aromático descarboxilasa para formar dopamina (DA) y requiere como cofactor fosfato de piridoxal. El nivel

BIOSINTESIS DE NOREPINEFRINA



METABOLISMO DE NOREPINEFRINA

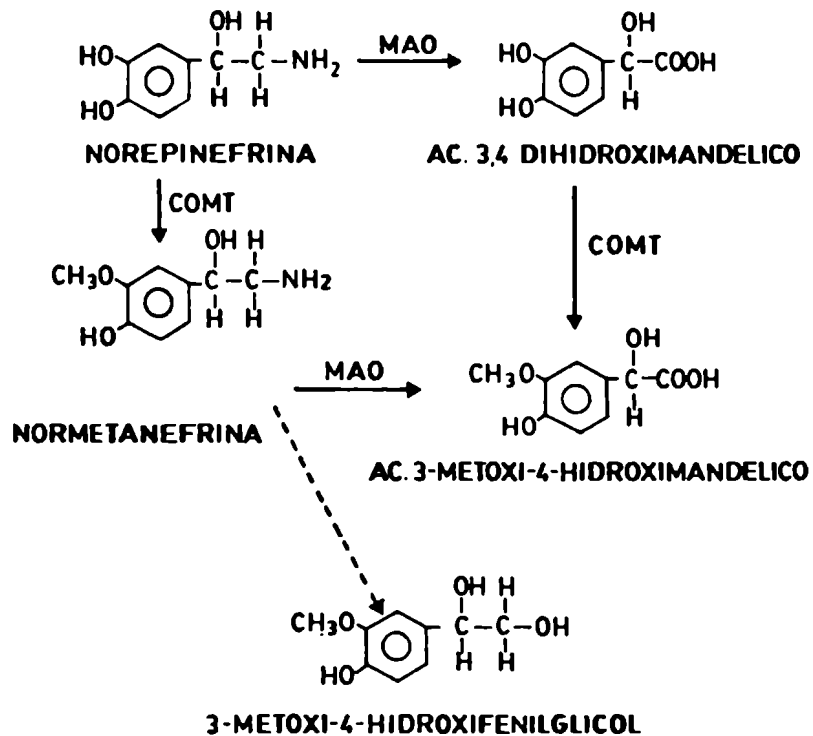


Fig. 14: Biosíntesis y metabolismo de la norepinefrina

de esta última enzima citoplasmática en las terminales nerviosas catecolaminérgicas es muy alto; el paso limitante en la síntesis de catecolaminas es la hidroxilación de tirosina⁹⁶. Por último, la DA es captada por gránulos o vesículas de almacenamiento, donde se convierte a NE por acción de la dopamina- β -hidroxilasa asociada a dichas vesículas. Esta enzima requiere ácido ascórbico y Cu^{++} como cofactores y, al igual que la tirosina hidroxilasa, O_2 . Su especificidad por el sustrato es baja y puede oxidar prácticamente cualquier feniletilamina a su correspondiente feniletanolamina⁹⁷.

Una vez sintetizada, la NE se mantiene unida y almacenada en vesículas sinápticas donde forma un complejo estable con ATP y una proteína específica, la cromogranina. Estas pequeñas vesículas subcelulares se hallan en gran número en las terminales nerviosas; de esta forma previenen la difusión de la NE al exterior y su metabolización por acción de la monoamino oxidasa, una enzima degradativa intraneuronal (Fig. 14)⁹⁸⁻¹⁰⁰.

Se conoce poco acerca del mecanismo por el cual los impulsos conducidos a lo largo del axón y que finalmente invaden las terminales nerviosas producen la liberación de monoaminas. La despolarización de la terminal produce un incremento en la permeabilidad a los iones, entre ellos el Ca^{++} . El incremento en el Ca^{++} intracelular parece ser el responsable primario de la iniciación de los acontecimientos que conducen a la liberación de catecolaminas¹⁰¹.

Las catecolaminas parecen ser liberadas de las terminales nerviosas simpáticas periféricas principalmente por un proceso conocido como exocitosis. Este involucra la fusión de las vesículas con la membrana celular y la apertura de las primeras al espacio extra

celular volcando así su contenido. Sin embargo, aunque el aumento de la actividad del sistema nervioso simpático se acompaña de mayor concentración de dopamina- β -hidroxilasa y cromogranina en la circulación (compatible con la liberación del contenido del gránulo), por motivos de metodología aún no se ha establecido fehacientemente la comprobación que la exocitosis sea el acontecimiento primario en la liberación de NE en las terminales nerviosas noradrenérgicas cerebrales como ocurre en la médula suprarrenal.

Dado que la liberación exocitótica es bloqueada por colchicina, vinblastina y citochalasina-B, es posible que los microtúbulos y microfilamentos estén involucrados en este tipo de liberación¹⁰². Por otra parte, es factible que las enzimas que participan en la síntesis de NE, sean sintetizadas en los cuerpos celulares de las neuronas y experimenten después el transporte siguiendo los cilindroejes hasta las terminaciones nerviosas, como se mencionó anteriormente. Ello puede ocurrir lentamente (1 a 3 mm/día) por flujo de masa a lo largo del axón, como parece suceder con la tirosina hidroxilasa, o mucho más rápidamente (1 a 10 mm/h), caso de la dopamina- β -hidroxilasa. Por tanto, el sistema microtubular podría participar en el transporte axónico y también en la formación de gránulos y en su expulsión ante impulsos nerviosos.

Las monoaminas ejercen su acción interaccionando con receptores postsinápticos α -y/o β -adrenérgicos.¹⁰³ Cambios en la sensibilidad de las células postsinápticas luego de la desnervación o administración crónica de agonistas es atribuible, según se ha comprobado, a cambios en el número de receptores presentes en la superficie de estas células¹⁰⁴. La desnervación resulta en supersensibilidad al agonista y se halla asociada con un incremento en el número de receptores; la

administración de agonistas produce el efecto opuesto¹⁰⁵.

En la terminación del efecto de la NE se halla implicado más de un mecanismo. La recaptación y el proceso de retención en la terminal presináptica son los mecanismos más importantes, sin lugar a dudas¹⁰⁰. La inactivación puede llevarse a cabo por degradación enzimática del compuesto mediante la deaminación oxidativa por MAO, asociada principalmente con las mitocondrias, o por metilación por la catecol-O-metiltransferasa confinada en gran parte en la fracción citoplasmática soluble y sin asociación selectiva con los nervios noradrenérgicos (Fig. 14)^{106,107}.

4.- Objetivos del presente trabajo

Esta serie de trabajos fue realizada con el objeto de responder a interrogantes planteados acerca del modelo neuroendócrino propuesto:

a) ¿Participan receptores α -adrenérgicos en el proceso de transducción neuroendócrina de la NE en la glándula pineal?. De ser así, ¿su localización es pre- y/o post-sináptica?.

b) ¿Existe modulación de la síntesis de proteínas pineales, un probable indicador de la producción de péptidos antigonaedales por hormonas durante el ciclo estral?.

c) ¿Se detectan fenómenos de transducción endócrino-endócrina para los efectos de la progesterona sobre la glándula pineal?.

d) ¿Se detectan "autorreceptores" para melatonina en la glándula pineal, índice de regulación ultracorta de la función pineal?.

e) ¿Ocurren modificaciones por hormonas reproductivas en el contenido, "turnover" y metabolismo de serotonina en los pinealocitos, un modelo de control aplicable a las vías que utilizan serotonina como neurotransmisor?.

- f) ¿Se producen efectos de transducción endócrino-neural para las gonadotrofinas en el territorio simpático-cervical?
- g) ¿Existen efectos del estradiol sobre diversos aspectos del mecanismo de síntesis, degradación y liberación del neurotransmisor adrenérgico en el GCS?
- h) ¿Se observan efectos del estradiol sobre el GCS en animales sometidos a decentralización ganglionar bilateral?
- i) ¿Existen receptores citoplasmáticos y nucleares para el esteroide en el GCS?

II

MATERIALES Y METODOS1.- Animales y tejidos

Se utilizaron ratas Wistar adultas (180-250 g), mantenidas en régimen de luz diaria de 14 h (0700 a 2100 h) en ambiente climatizado (22 ± 2 C) y alimentadas con alimento balanceado "Purina" y agua ad libitum.

Para el experimento con hamsters, se usaron machos adultos dorados (Mesocricetus auratus) sometidos a las mismas condiciones de iluminación y alimentos descritos para las ratas.

Las pineales de vaca y el hígado de oveja se obtuvieron en un matadero de la zona dentro de los 20-30 min. después del sacrificio del animal y se congelaron en hielo seco hasta el momento de usarlos (normalmente dentro de las 24 h).

1-1.-Alteración por cirugía de las señales neurales del GCS y glándula pineal.

Gangliectomía cervical superior bilateral

Se realizó bajo anestesia etérea de la rata una semana antes del sacrificio (a fin de asegurarse la degeneración de las terminales neurales una vez que han sido separadas del cuerpo ganglionar). Se expusieron las glándulas salivares mediante una incisión ventral en el cuello y se las retrajo con el objeto de exteriorizar los músculos suprahioides. Cada GCS fue identificado en la bifurcación carotídea entre sus ramas interna y externa y ambos ganglios, derecho e izquierdo, fueron totalmente resecaos.

Descentralización ganglionar bilateral

Se procedió a exponer los ganglios tal como se indica más arri-

ba y se los descentralizó, es decir, se interrumpieron las señales aferentes al ganglio mediante la sección quirúrgica de las fibras preganglionares que provienen de la médula cervical y de las conexiones del GCS con el resto del sistema simpático, a fin de eliminar las posibles aferencias preganglionares que lleguen de metámeras inferiores o superiores.

Como se ha descrito previamente, ambos procedimientos interrumpen la liberación circadiana de NE de las terminales simpáticas pineales⁹⁰.

1-2.-Hipofisectomía

La hipofisectomía se realizó de acuerdo con la técnica de Naik y Sheriff¹⁰⁸. Los animales se anestesiaron con éter y la aguja hipodérmica Becton-Dickinson se introdujo por vía transauricular con el bisel hacia arriba hasta llegar a la cápsula de la hipófisis. En este momento se giró la aguja 180° (generalmente la presencia de sangre en la jeringa asegura que es la zona adecuada) y se aspiró extrayendo la glándula, de color rosado. En ensayos previos se verificó que la longitud expuesta de la aguja no debía exceder los 15 mm.; para ello se colocó un tope de teflón. El extremo de la aguja fue lo suficientemente filoso y duro como para perforar los huesos, ya duros, de la rata adulta y con un bisel de 1.0-1.5 mm. (aproximadamente la mitad de la longitud de la glándula) para asegurar una extracción adecuada.

Luego de la operación los animales fueron colocados en jaulas individuales con una botella de solución salina y otra de agua. Durante los 3 a 4 días siguientes a la hipofisectomía se los alimentó con pan embebido en leche con 10% de azúcar, así como con el a-

limento de rutina "Purina".

Los animales se sacrificaron 7 días después verificándose por autopsia la eficiencia de la operación. El índice de sobrevivencia fue de un 30%.

1-3.-Tratamiento con hormonas reproductivas

Las ratas Wistar hembra, en las condiciones de nuestro bioterio, exhibieron ciclos estrales de 4 días. En la Fig. 15 se observa el esquema de los niveles plasmáticos de las hormonas reproductivas durante el ciclo.

Los efectos del tratamiento con esteroides ováricos sobre la secreción de gonadotrofinas, así como el momento elegido para la administración de las hormonas reproductivas, son mejor entendidos dentro de una perspectiva fisiológica, es decir, si se tienen en cuenta los principales acontecimientos hormonales durante el ciclo estral. En el estro, un nuevo grupo de folículos comienza a crecer bajo el estímulo de los niveles elevados de FSH. Este incremento en FSH se inicia en la tarde del día precedente (proestro) y se prolonga hasta las primeras horas de la tarde del estro. Aunque después los niveles plasmáticos de FSH declinan a valores bajos, el incremento folicular continúa linealmente (medido por el aumento en el volumen total folicular) a través de los diestros 1 y 2 hasta la tarde del proestro. Los folículos secretan poco estrógeno y recién en la tarde del diestro 2 han alcanzado un grado de desarrollo tal que pueden responder a los niveles aún constantes de LH (medidos por radioinmunoanálisis) con secreción aumentada de estradiol. Esta alcanza su máximo en la mañana del proestro y declina en la tarde presentando valores basales en la mañana del estro. En forma si

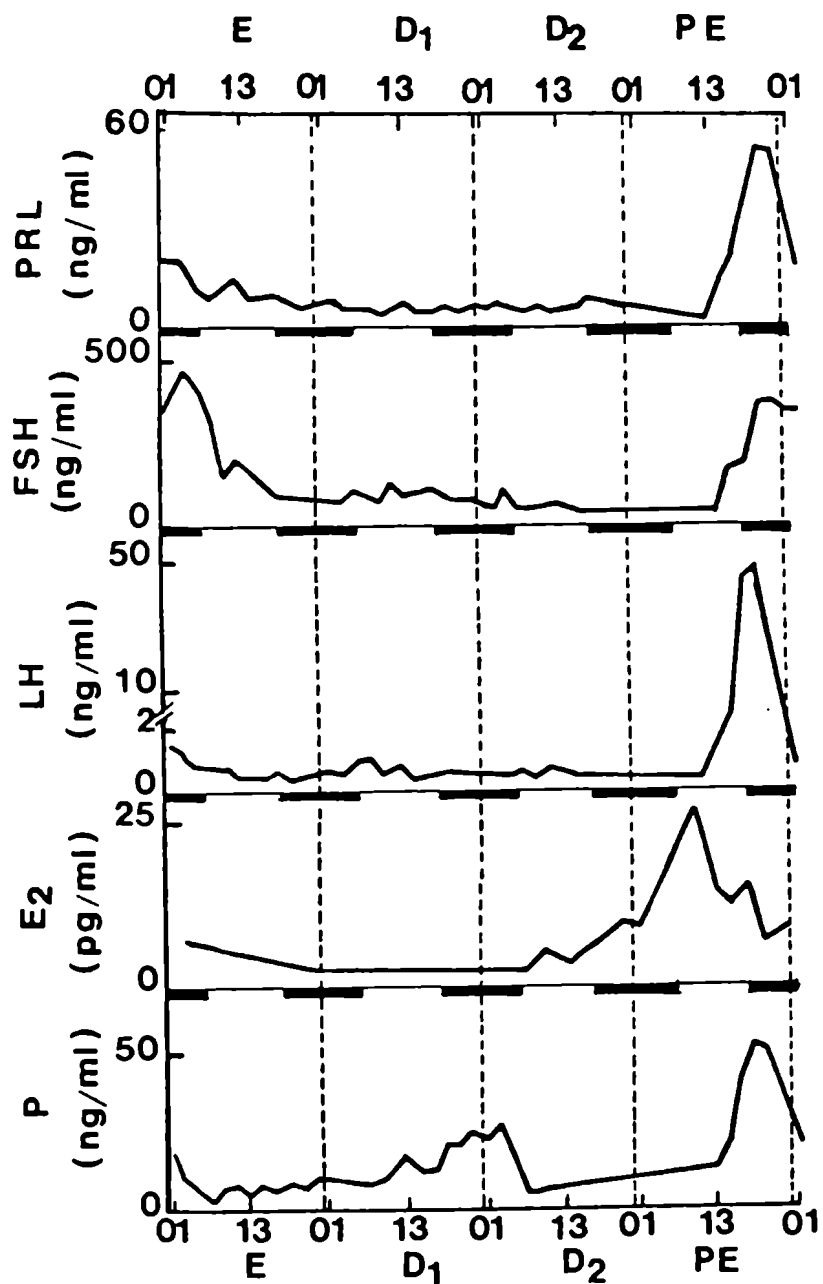


Fig. 15: Esquema de los niveles plasmáticos de progesterona (P), estradiol (E₂), LH, FSH y prolactina (PRL) de la rata en función del ciclo estral. Este último consta de 4 días: estro (E), diestro 1 (D₁), diestro 2 (D₂) y proestro (PE). En abscisas se indica el tiempo en horas y el período diario de oscuridad de 12 horas (barras oscuras)¹⁰⁹.

multánea con la disminución en los niveles séricos de estradiol de la tarde del proestro, los niveles de LH, FSH, prolactina y progesterona en plasma comienzan su abrupto ascenso ("período crítico" de liberación de gonadotrofinas, definido por el bloqueo con barbitúricos entre la 8⁰⁰ y 10⁰⁰ h de luz en un régimen de iluminación de 12 h diarias de luz)¹⁰⁹.

El pico de estradiol del proestro es responsable de los principales acontecimientos hormonales del ciclo: a) extendidos vaginales nucleados y cornificados del proestro y estro respectivamente; b) acumulación de los fluidos uterinos en el proestro; c) secreción de LH en la tarde del proestro, la que a su vez estimula un rápido incremento en el volumen folicular que culmina con la ovulación y formación del cuerpo lúteo en las primeras horas del día del estro; además, esta secreción de LH estimula el incremento rápido en la liberación de progesterona del folículo, la que a su vez inicia la receptividad sexual y causa la relajación del esfínter cervical permitiendo la salida de los líquidos del útero; d) pico secretorio de FSH durante el intervalo proestro-estro que inicia el crecimiento folicular del ciclo siguiente y e) incremento en la secreción de prolactina del proestro que a su vez estimula la regresión morfológica del grupo previo de cuerpos lúteos (Fig. 15).

Tanto en machos como en hembras los esteroides gonadales, testosterona y estradiol respectivamente, inhiben la liberación de gonadotrofinas por la hipófisis y mantienen un nivel tónico bajo de LH y FSH en plasma (retroalimentación negativa). En las hembras existe además una secreción fásica de gonadotrofinas en el día del

proestro inducida por el pico ovulatorio de estradiol (retroalimentación positiva).

Para los estudios durante el ciclo estral, se utilizaron animales con extendidos vaginales regulares durante 3 ciclos estrales consecutivos. Los tratamientos con hormonas reproductivas se efectuaron siempre en ratas castradas. En los machos la castración se realizó 1-3 días antes del sacrificio y en las hembras 3 semanas antes (castración crónica). Se eligieron estos tiempos, ya que son los intervalos adecuados para la reducción a un mínimo de los niveles de los esteroides gonadales.

Para evitar el aumento post-castración de LH y FSH, en los estudios con hormonas hipofisarias los animales se castraron inmediatamente antes de la administración de la hormona (castración aguda).

Los efectos de la testosterona sobre la actividad pineal y ganglionar se estudiaron en ratas macho castradas 96 h antes y tratadas durante 3 días con 2 inyecciones diarias s.c. (0900 y 1700 h) de 400 ug de testosterona disuelta en 0.2 ml de salina:etanol (1:1). Una inyección adicional de 400 ug se les administró 3 h antes del sacrificio (aproximadamente 1200 h). Esta dosis produce total mantenimiento de los órganos sexuales accesorios.

En cuanto al estradiol, se usaron ratas hembra castradas en forma crónica y tratadas por 2 días consecutivos con 0.5 y 2.0 ug de estradiol administrado en forma s.c. en 0.2 ml de salina:etanol (2:1). Los animales se sacrificaron en la mañana siguiente (aproximadamente 1100 h). Con este diseño experimental se produce en la tarde del tercer día una liberación de gonadotrofinas y prolactina semejante a la del período crítico del proestro, tanto en la hora

como en la duración (rata de Taleisnik)¹¹⁰.

Para el estudio de los posibles cambios por gonadotrofinas se utilizaron ratas hembra o macho según se detalla en los experimentos. En el caso de los machos (efecto sobre el metabolismo de serotonina pineal) se los castró en forma aguda y se administraron 2 inyecciones s.c. de 100 ug de FSH (NIH-FSH-S12) o LH (NIH-LH-S19) en 1 ml de salina 3 y 18 h después de la castración, sacrificándose a los animales 3 h más tarde (aproximadamente 1200 h). Cuando se analizaron los efectos de las gonadotrofinas en hembras ("turnover" de ³H-NE), se realizaron extendidos vaginales y se utilizaron aquellos animales que exhibían al menos 2 ciclos estrales consecutivos. Los animales se castraron entre las 0900 y 1100 h del día del estro para minimizar el incremento post-castración de gonadotrofinas y los diferentes tratamientos se comenzaron 5 h después (1600 h). Las ratas recibieron 5 inyecciones s.c. de FSH de 100 ug cada una en 0.2 ml de salina a las 1600 h del día de la castración y a las 0900 y 1600 h de los 2 días subsiguientes. Los animales se sacrificaron en la mañana del tercer día. Para los estudios con gonadotrofinas se eligieron estos diseños experimentales porque en los animales inyectados con vehículo no han ocurrido aún modificaciones en LH plasmática y se observa un leve incremento en FSH en el momento del sacrificio.

Para examinar los efectos de prolactina se usaron ratas macho castradas administradas 3 y 18 h después de la orquidectomía con dosis de 200 ug de prolactina (NIH-S-P12) resuspendida en 1 ml de solución salina, pH 9.0. Los animales se sacrificaron 3 h más tarde de la última inyección (aproximadamente 1200 h) administrada en forma

S.C..

Los estudios con progesterona se realizaron en ratas hembra castradas crónicas. La hormona (4 mg) se administró por vía s.c. suspendida en 1 ml de solución salina a las 0700 h (4 h antes del sacrificio), según se describe en la sección III-2-1.

En todos los casos se prepararon animales controles inyectados con los vehículos respectivos.

2.- Medición de actividades enzimáticas

2-1.- Tirosina hidroxilasa

El primer paso en la biosíntesis de catecolaminas es la hidroxilación de tirosina a 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA). Esta reacción es catalizada por la tirosina hidroxilasa (TH).

La actividad de esta enzima se determinó en GCS de rata por la conversión de L-¹⁴C-tirosina (act. esp. 453 Ci/mol) a ¹⁴C-L-DOPA de acuerdo al procedimiento descrito por Coyle⁹⁵. Los ganglios, obtenidos inmediatamente después del sacrificio, se pesaron y homogeneizaron de a dos, a 0 C en 50 volúmenes de buffer Tris-HCl 50 mM, pH 6.0, conteniendo Tritón X-100 0.2% (v/v). Alícuotas de 50 ul de los sobrenadantes de 6000 x g, preparados por centrifugación durante 10 min a 0-4 C en una Sorvall RC2B, se incubaron con 25 ul de tirosina 1 mM conteniendo 0.2 uCi/muestra de ¹⁴C-tirosina más 50 ul de la siguiente mezcla: 20 ul de buffer fosfato de potasio 0.5 M pH 5.5; 10 ul de dihidropteridina reductasa de hígado de oveja; 1100 unidades de catalasa (Boehringer Chemical Co.) en 10 ul de agua destilada; 5 ul de NADPH⁺ (12 mg/ml de agua destilada; Boehringer Chemical Co.) y 5 ul de 2-amino-4-hidroxi-6,7-dimetiltetrahydropteridina (DMPH₄, Aldrich Chemical Co., preparada en el

momento por disolución de 1.65 mg/ml de HCl 1 mM). En forma paralela se prepararon blancos de reactivos y con tejido hervido. Se incubó durante 30 min a 37 C y se detuvo la reacción por el agregado de 6 ml de HClO₄ 0.4 N conteniendo 50 ug de L-DOPA como "carrier". En ensayos preliminares se observó que la hidroxilación fue lineal hasta los 45 min y que el agregado de Fe⁺⁺ (3 mM) no ejerció un efecto estimulador aditivo con la catalasa sobre la actividad de la enzima, ni redujo aún más la oxidación espontánea de la tirosina (medida en el sobrenadante hervido), por lo tanto se suprimió el Fe⁺⁺ como cofactor (datos en Tabla).

REQUERIMIENTO DE COFACTORES DE LA TH EN GCS DE RATA

Variable	Radiactividad (dpm)*		
	Sobrenadante	Sobrenadante hervido	Diferencia
Sistema completo	17192 ± 453	2153 ± 104	15039
Sin catalasa	13015 ± 281	10926 ± 359	2089
Sistema completo y Fe ⁺⁺ (3mM)	17810 ± 347	1839 ± 97	15971

Alícuotas de 50 ul del sobrenadante de la homogeneización de los ganglios en buffer Tris se incubaron según se indica en el texto. Un volumen equivalente de agua destilada se utilizó para sustituir el de los cofactores suprimidos. La concentración final de Fe⁺⁺ se indica entre paréntesis.

*Los valores se expresan como Media ± ES de 7 a 9 determinaciones.

La ^{14}C -L-DOPA formada se separó del sustrato radiactivo por cromatografía de adsorción en columnas de alúmina (Woelm neutral, grado 1, Alupharm Chemicals) según se detalla a continuación. Las mezclas de incubación inactivadas con HClO_4 se centrifugaron a $1000 \times g$ durante 10 min. Los sobrenadantes se agregaron con agitación constante a vasos con 30 mg de NaSO_3H , 5 ml de EDTA 2% (p/v) y 1.5 ml de KPO_4H_2 0.35 M y se llevaron rápidamente a pH 8.6 con NaOH, cuidando de no sobrepasar este valor. Posteriormente, la mezcla se volcó sobre columnas de 0.6 cm de diámetro preparadas con 400 mg de alúmina activada lavada con 5 ml de buffer NaAcO 0.2 N, pH 8.6. Los vasos se lavaron con un volumen adicional de 5 ml de buffer acetato y éste se vertió en la columna.

Las columnas se lavaron con 20 ml de agua destilada y luego la ^{14}C -L-DOPA se eluyó con 2.5 ml de HAcO 0.2 N. Los eluidos se recogieron en viales y su radiactividad se leyó por espectrometría de centelleo líquido, luego del agregado de 15 ml de solución de centelleo tolueno-fósforo (4 g de 2,5-difeniloxazol y 50 mg de p-bis-2(5-feniloxazol)-benceno por litro de tolueno) con 30% (v/v) de Tritón X-100. La eficiencia de la lectura, efectuada en un contador Beckman LS 100, se corrigió por standard externo.

Los resultados fueron corregidos por la recuperación de las columnas de L-DOPA standard. Esta se midió en un espectrofotofluorómetro Aminco-Bowman determinando las unidades de fluorescencia nativa a 285/335 nm. La recuperación fue, en todos los casos, de $(70 \pm 2)\%$. Los datos se expresaron en pmoles de L-DOPA formados/h/mg de tejido.

Preparación de dihidropteridina reductasa: La enzima se obtuvo a partir de hígado de oveja. El tejido se homogeneizó en 1.5 vol. de HAcO 0.03 M en frío con ayuda de un Polytrón a velocidad 6 durante 1 min. Se agregaron 1.5 vol. adicionales de ácido, se mezcló y centrifugó a 4000 x g durante 35 min a 0 C. A partir del sobrenadante se purificó la enzima siguiendo la técnica descrita por Kaufman a excepción del último fraccionamiento con gel-alúmina, que fue suprimido¹¹¹.

Preparación de alúmina activada: La alúmina se hirvió con 3 vol. de HCl 2 N durante 15 min. con agitación constante. La fase acuosa se aspiró y se repitió el tratamiento. A su término se lavó repetidamente con agua destilada hasta llegar a pH 3.5. Se separó el agua y se calentó 2 h a 100 C y 2 h a 250 C en cápsula de porcelana. Con la alúmina así activada se prepararon las columnas y se las llevó a pH 8.6 con NaAcO 0.2 N.

2-2.-Catecol-O-metiltransferasa

La catecol-O-metiltransferasa (COMT), así como la monoamino-oxidasa (MAO) son las enzimas que participan en el metabolismo de dopamina y NE^{106/7} (Fig. 14). La COMT es una enzima citosólica que, en presencia de cationes divalentes, cataliza la transferencia del grupo lábil metilo de la S-adenosil-L-metionina a uno de los grupos fenólicos de las catecolaminas para formar el derivado metoxifenol y S-adenosilhomocisteína. La actividad de la COMT fue determinada mediante la estimación de la transferencia de los grupos ¹⁴C-metilo de la ¹⁴C-S-adenosil-L-metionina al ácido 3,4-dihidroxibenzoico¹¹².

Los GCS se homogeneizaron de a dos en 230 ul de un medio hipotónico de buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 8.2. Alícuotas de 100 ul

de homogenato se incubaron durante 1 h a 37 C en un volumen final de 125 ul de ácido dihidroxibenzoico 1 mM, ^{14}C -S-adenosil-L-metionina $2.7 \times 10^{-5}\text{M}$ (act. esp. 47 Ci/mol) en presencia de MgCl_2 5 mM y en un medio buffer final de fosfato de potasio 80 mM, pH 8.0. Se observó linealidad hasta una concentración de 3GCS/230 ul y 60 min. de incubación. La reacción se detuvo por el agregado de 50 ul de HCl 2 N. El producto metilado se extrajo con 500 ul de acetato de etilo y se lavó con 100 ul de HCl 0.3 N. Finalmente una alícuota de 250 ul de la fase orgánica se midió por espectrometría de centelleo líquido en 2.5 ml de la mezcla centelleadora de tolueno-fósforo. Los resultados se expresaron en pmoles de producto formado/min/mg de proteína.

2-3.-Monoamino oxidasa

La monoamino oxidasa (MAO) es una enzima mitocondrial clave en el catabolismo de la NE y la serotonina (Fig. 14 y 9). La MAO deamina un amplio espectro de aminas que poseen el carbono α -metileno vecino a la amina no sustituida, dando así el aldehído correspondiente. Este compuesto es rápidamente reducido a alcohol u oxidado a ácido. En experimentos in vitro, prácticamente el 80% del producto se halla como ácido, lo cual sugiere que el compuesto formado por la MAO es subsecuentemente oxidado a ácido por la aldehído dehidrogenasa ¹¹³. Esta última enzima tiene una distribución muy similar a la de la MAO (mitocondrial) y se ha sugerido que estarían acopladas ¹¹³. Por lo tanto, o el bajo K_m de la aldehído dehidrogenasa por los aldehídos, o la fácil oxidación no enzimática del aldehído al ácido, pueden dar cuenta de la alta proporción de este último compuesto.

De acuerdo con la diferente movilidad electroforética ¹¹⁴ y la

sensibilidad a inhibidores¹¹⁵ la MAO ha sido clasificada en tipos A y B. En nuestros experimentos se determinó la actividad de la MAO por un procedimiento conjunto que permite la estimación simultánea de las enzimas tipos A y B. El ensayo utiliza serotonina como sustrato para la tipo A¹¹⁶ y clorhidrato de β -feniletilamina para la tipo B¹¹⁷.

Glándulas pineales individuales o pares de GCS se homogeneizaron en 180 μ l de buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 8.2 y alícuotas de 50 μ l se incubaron durante 30 min a 37 C en presencia de 0.15 mM de bioxalato de 14 C-serotonina (0.1 Ci/alícuota) o 0.1 mM de clorhidrato de 14 C- β -feniletilamina (0.05 Ci/alícuota). Luego de detener la reacción con 50 μ l de HCl 2 N se extrajeron los productos de deaminación con 500 μ l de acetato de etilo y se lavaron con 100 μ l de HCl 0.3 N según el método descrito por Jarrot¹¹¹. La radiactividad presente en alícuotas de 250 μ l de la fase orgánica se midió por espectrometría de centelleo líquido, luego del agregado de 2.5 ml de solución centelleadora de tolueno-fósforo.

Ensayos previos indicaron que la reacción era lineal hasta una concentración de proteínas de 100 μ g/tubo y durante los primeros 45 min de incubación. Los resultados se expresaron como pmoles de producto formado/min/mg de proteína.

2-4.-Serotonina-N-acetiltransferasa

La serotonina-N-acetiltransferasa, una de las dos enzimas involucradas en la síntesis de la melatonina pineal a partir de serotonina (Fig. 10), se estimó por la transferencia del grupo 14 C-acetilo de la acetil-Coenzima A marcada (act. esp. 45 Ci/mol) a triptamina y posterior partición con solventes de la 14 C-N-acetil-

triptamina formada según el método descrito por Deguchi y Axelrod¹¹⁶. Pineales individuales se homogeneizaron e incubaron durante 10 min a 37 C en 70 μ l de una solución que contenía buffer fosfato de potasio 36 mM, pH 6.5, 0.1 μ mol de triptamina y 3.4 nmoles de ¹⁴C-acetil-Coenzima A. La reacción se interrumpió por el agregado de 0.5 ml de buffer borato 0.5 M, pH 10 y el producto formado por transferencia enzimática del grupo ¹⁴C-acetilo a la triptamina se extrajo con 6 ml de tolueno : alcohol isoamílico (97:3; vol:vol). Se lavó una vez con 0.5 ml de buffer borato y una alícuota de 5 ml de la fase orgánica se leyó por espectrometría de centelleo líquido luego del agregado de 10 ml de tolueno-fósforo.

Los resultados se expresaron como pmoles de producto formado/h/mg de pineal.

3.- Estudio de receptores

3-1.-Sitios de unión citoplasmáticos para progestágenos en la glándula pineal.

Caracterización del receptor pineal citoplasmático para progestágenos.

Glándulas pineales bovinas se homogeneizaron a 0 C en 5 volúmenes de buffer Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, EDTA 1.5 mM, β -mercaptoetanol 1.0 mM y 30% (v/v) de glicerol. Para minimizar la interacción de la progesterona con la proteína transportadora de corticosteroides, se agregó siempre cortisol al buffer (concentración final: 10 μ M). Una vez homogeneizados los tejidos se centrifugaron 15 min a 1000 x g a 0-4 C. La fracción nuclear cruda se descartó y del sobrenadante se obtuvo el citosol por centrifugación a 105000

x g durante 1 h a 0-4 C. Con el fin de disminuir los niveles endógenos de progesterona, se removió la hormona libre y unida con baja afinidad tratando al citosol con 0.1 volúmenes de una suspensión de carbón-dextrán en buffer (5% carbón Norit A, 0.5% dextrán) durante 15 min a 0-4 C. Se separó después el carbón por centrifugación a 3000 x g durante 10 min a 0-4 C.

Para los estudios de unión de progesterona a su receptor se incubaron 15 h a 0-4 C alícuotas de 300 ul de citosol (0.4 -0.7 mg de proteína) con 5 ul de ^3H -progesterona (act. esp. 105 Ci/mmol; concentración final 1-12 nM) en presencia de 5 ul de hormona no marcada (concentración final 4-8 μM) o 5 ul de vehículo (etanol). La separación de la ^3H -progesterona de la libre se realizó por adsorción durante 15 min a 0-4 C sobre un volumen igual de una suspensión de carbón-dextrán en buffer (0.5% Norit A, 0.5% dextrán). El carbón se separó por centrifugación a 1000 x g, durante 15 min a 0-4 C y el sobrenadante se transfirió a un vial con 7.5 ml de solución centelleadora de tolueno-fósforo - 30% (v/v) de Tritón X-100, para su dosaje por espectrometría de centelleo líquido.

En cada experimento se preparó una serie paralela de mezclas de tejidos para ser utilizadas como blanco. Se definió como unión específica a la diferencia entre la ^3H -progesterona unida total y la unida en presencia de un exceso de hormona no marcada (unión inespecífica).

En una serie de experimentos preliminares se establecieron las condiciones óptimas para la concentración de carbón y su tiempo de contacto con el medio a adsorber (15 ± 3 min), así como la curva de tiempo para la asociación de ^3H -progesterona a su recep-

tor.

La constante de equilibrio se determinó incubando por triplicado alícuotas de 300 μ l de citosol pineal con concentraciones crecientes de hormona marcada. Para cada concentración de ^3H -progesterona se llevaron a cabo blancos e incubaciones en paralelo con hormona no marcada. Los datos de unión específica se representaron en un gráfico según el método de Scatchard¹¹⁹ y la abscisa al origen (número máximo de sitios receptores) así como la pendiente ($1/K_D$ o constante de disociación) se determinaron por regresión lineal.

La especificidad de la unión se analizó en estudios de competencia incubándose por triplicado alícuotas de citosol con una concentración fija de ^3H -progesterona (1 nM) y cantidades crecientes de esteroides no marcados. Los valores de radiactividad unida específica resultante se graficaron en papel log-probit y se calcularon las concentraciones de los agentes que causan una inhibición del 50% de la unión específica de ^3H -progesterona (DE_{50} = dosis efectiva 50). Las pendientes e intersecciones se calcularon por análisis de regresión. Las constantes de disociación en el equilibrio de los ligandos competidores no marcados se calcularon a partir de la fórmula: $K_i = DE_{50} / 1 + (^3\text{H-progesterona}) / K_D$, donde K_D es la constante de disociación para la ^3H -progesterona calculada a partir del gráfico de Scatchard¹²⁰.

La naturaleza de la radiactividad ligada se verificó luego de ser extraída 2 veces con 6 vol. de éter etílico. Una vez secos bajo N_2 , los extractos se tomaron con etanol y se cromatografiaron en capa delgada de sílica gel G, utilizándose dos sistemas de eluyentes: acetato de etilo:cloroformo (1:13, v:v) y benceno:meta-

nol (19:1, v:v).

Estudio por centrifugación en gradiente de sacarosa

Para los estudios en gradiente de sacarosa, las glándulas pineales bovinas se homogeneizaron en buffer Tris-HCl 10 mM (pH 7.4) conteniendo EDTA 1.5 mM, β -mercaptoetanol 1.0 mM, 10% de glicerol y cortisol 10 μ M. Se preparó el citosol tal como se indica en el punto anterior y alícuotas de 300 μ l (1.7 mg de proteína citosólica) se incubaron durante 7 h a 0 C con 1.8 nM de 3 H-progesterona y con hormona radiactiva más 1000 X de progesterona no marcada.

Los gradientes lineales de ultracentrifugación de sacarosa 5-20% (p/v) fueron preparados con el buffer de homogeneización utilizando una bomba peristáltica Desaga, y se cargaron en tubos de polialómero. Los gradientes se estacionaron durante 3 h antes de ser utilizados, procedimiento que suministra gradientes extremadamente lineales y reproducibles¹²¹.

Luego de finalizada la incubación, las muestras fueron aplicadas sobre el gradiente previo agregado de albúmina de suero bovino (BSA) como proteína marcadora.

Las centrifugaciones se llevaron a cabo a 49000 RPM durante 14 h a 0-4 C en un rotor Spinco SW 50-L. Los gradientes se fraccionaron recogiendo alícuotas de 0.2 ml cada 15 seg. por aspiración a través de un capilar metálico conectado a la bomba de succión.

La posición del pico proteico fue determinada mediante la lectura de su densidad óptica a 280 nm en un espectrofotómetro Beckman DB-G y la de los picos radiactivos de 3 H-progesterona fue localizada dosando la radiactividad presente en cada fracción por espectrometría de centelleo líquido con 3 ml de solución centelleadora como

se describe en el punto anterior.

3-2.-Caracterización de sitios de unión para la melatonina en la glándula pineal

Se utilizó como radioisótopo ^3H -melatonina (N-(2-amino-etil-2- ^3H); act. esp. 31.5 Ci/mmol) cuya pureza radioquímica fue verificada por cromatografía en capa delgada de sílica gel G con los siguientes sistemas de eluyentes : 1) acetato de etilo; 2) cloroformo:metanol (9:1, v:v); 3) metanol. Los estudios se realizaron en la preparación cruda de membranas descrita por Bennet y Snyder¹²². El tejido se homogeneizó en 10 volúmenes de sacarosa 0.32 M a 0-4 C en un homogeneizador Polytrón (intensidad 6 durante 20 seg). Se centrifugó primero 10 min. a 1000 x g para obtener un sobrenadante libre de núcleos y restos de tejido. Se descartó el precipitado y el resto del homogenato se centrifugó a 50000 x g durante 20 min a fin de obtener el precipitado combinado mitocondrial-microsomal. Esta fracción fue sometida a lisis hipotónica por rehomogeneización en 20 vol de agua destilada, utilizando nuevamente el Polytrón (intensidad 6 durante 20 seg) y fue centrifugada 10 min a 50000 x g para recoger las membranas. El precipitado se resuspendió en 5 vol. de buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, 0.1% de ascórbico. Toda la preparación de membranas se realizó a 0-4 C. Alícuotas de 0.25 ml de la suspensión de membranas fueron incubadas por triplicado durante 5 h a 0-4 C (o en las condiciones que se consignan en el experimento respectivo) con 70-300 nM de ^3H -mg melatonina en presencia o ausencia de 100 uM de hormona no marcada. En cada experimento se utilizó como control una serie paralela de mezclas de reacción que no contuvieron tejido. La separación de la

melatonina unida de la libre se realizó por filtración rápida sobre papel de fibra de vidrio Whatman GFB bajo vacío parcial¹¹⁷. Luego de 4 lavados con 3 ml de buffer cada uno, la radiactividad remanente en el filtro se determinó por espectrometría de centelleo líquido y se usó como líquido centelleador una solución de tolueno-fósforo - 30% (v/v) de Tritón X-100. La corrección de "quenching" se realizó automáticamente por standard externo. En todos los experimentos la diferencia entre ³H-melatonina unida en ausencia y en presencia de la hormona no marcada se consideró como la melatonina unida específicamente. Esta unión específica varió entre 31 y 50% del total.

Para la determinación de las constantes de equilibrio se incubaron alícuotas de 0.25 ml de la suspensión de membranas pineales con concentraciones crecientes de ³H-melatonina y se determinó la unión específica para cada concentración. Luego de la transformación de los datos según el método de Scatchard¹¹⁹, la pendiente y la abscisa al origen fueron calculadas por análisis de regresión.

En otro experimento se determinaron las afinidades relativas de diversos indoles por los sitios de unión para melatonina. Alícuotas de membranas pineales se incubaron con una cantidad fija de ³H-melatonina en presencia de concentraciones crecientes del compuesto a probar (4 por lo menos). Las DE₅₀ y las K_i se calcularon según se describió para el receptor de progesterona.

La distribución intracelular de los sitios de unión para melatonina fue estudiada en homogenatos de glándula pineal bovina preparados en sacarosa 0.32 M. Se procesaron en una centrífuga refrigerada a fin de obtener las siguientes fracciones: 1) nuclear

cruda (900 x g, 10 min); 2) mitocondrial cruda (27000 x g, 10 min); 3) microsomal cruda (105000 x g, 60 min), las que fueron sometidas a lisis hipotónica en agua destilada como se describió más arriba. Alícuotas de las suspensiones de estas membranas se incubaron con ^3H -melatonina como ya ha sido descrito y se determinó la concentración proteica por el método de Lowry y col.¹²³, con seroalbúmina bovina como standard.

Para verificar si la melatonina permaneció inalterada durante el proceso de incubación, el indol se extrajo con cloroformo y el residuo se cromatografió según la técnica antes descrita.

3-3.-Caracterización de receptores α -adrenérgicos pineales.

En 1948, Ahlquist propuso la existencia, al menos, de dos tipos de receptores: α y β con los cuales puede reaccionar un agente simpático-mimético para despertar una respuesta en las células efectoras simpáticas. Se basó para ello en el orden de potencia de varias catecolaminas en contraer y relajar el músculo uterino. Para el primer tipo de respuesta (contracción) el orden de potencia fue: epinefrina > NE > isoproterenol: grupo α y para el segundo (relajación): isoproterenol > epinefrina > NE: grupo β ¹²⁴. Trabajos posteriores indicaron que, casi todas las respuestas adrenérgicas, pueden clasificarse en estas dos categorías¹⁰²..

Además de la respuesta diferencial a las catecolaminas, los efectos α y β -adrenérgicos pueden distinguirse por los antagonistas específicos que bloquean dicha acción. Por ejemplo, las respuestas α -adrenérgicas pueden bloquearse por compuestos como fenotolamina, fenoxibenzamina y compuestos alcaloides como dihidroergocriptina, mientras que las β -adrenérgicas son antagonizadas por

propranolol y dihidroalprenolol.

La caracterización del receptor α -adrenérgico pineal, definido por la unión del antagonista ^3H -dihidroergocriptina (^3H -DHE : dihidroergocriptina 9,10 - [9,10 - $^3\text{H}(\text{N})$], act. esp. 25.7 Ci/mmol) se realizó sobre preparaciones crudas de membrana. Las pineales bovinas se homogeneizaron a 0-4 C en 10 vol de sacarosa 0.25 M, buffer Tris-HCl 5 mM pH 7.4 y MgCl_2 1 mM con Polytrón (posición 6 durante 20 segundos). Los homogenatos se centrifugaron a 1000 x g durante 10 min a 0-4 C. La fracción libre de núcleos se centrifugó a 37000 x g durante 20 min para obtener un precipitado combinado mitocondrial-microsomal que luego se lisó por resuspensión en 20 vol de buffer frío utilizando nuevamente el Polytrón. Las fracciones lisadas se centrifugaron a 37000 x g durante 10 min para obtener la fracción cruda de membranas que se resuspendió en 4 vol de buffer Tris-HCl 75 mM, pH 7.65, con MgCl_2 25 mM. Todos estos procedimientos se efectuaron a 0-4 C.

Los estudios en glándula pineal de rata se realizaron en homogenatos libres de núcleos (1000 x g durante 10 min) preparados en buffer Tris-HCl 75 mM, MgCl_2 25 mM, pH 7.65. Se homogeneizaron 50 pineales de rata (\approx 80 mg) en 3.4 ml de este buffer.

Todas las reacciones típicas de asociación de ^3H -DHE a preparaciones de membrana se realizaron por triplicado. En el caso de las membranas bovinas, estas se incubaron en un volumen total de 320 ul: 300 ul de homogenato (340 - 450 ug de proteína), 10 ul de ^3H -DHE (concentración final 1-150 nM) y 10 ul de fentolamina (concentración final 10 uM) o 10 ul de vehículo (buffer).

En cuanto a las mediciones en la glándula pineal de rata, se

utilizaron alícuotas de 100 μ l (200-240 μ g de proteína) que se incubaron en un volumen total de 110 μ l. En cada experimento se realizó una serie paralela de mezclas de reacción sin tejido para ser usadas como blanco. Las incubaciones se realizaron a 25 C durante 30 min que son las condiciones óptimas de tiempo y temperatura descritas en general para los receptores α -adrenérgicos. La separación de ^3H -DHE unida de la libre se realizó por filtración rápida con vacío a través de filtros de fibra de vidrio GFB los cuales se embebieron previamente, para disminuir el inespecífico, en el buffer de incubación al que se agregó: dopamina 5 mM, pirocatecol 1 mM, pirogalol 1 mM, ácido ascórbico 1 mM, EGTA 1 mM y albúmina de sangre bovina 0.1%. Luego de lavar con 12 ml de buffer frío, la radiactividad remanente en el filtro se midió por espectrometría de centelleo líquido igual que se describió para los receptores de melatonina. En todos los experimentos la diferencia entre ^3H -DHE unida en ausencia y presencia de fentolamina se tomó como unión específica. La asociación de ^3H -DHE a los filtros sin tejido (blanco) fue menor del 4%. En cuanto a la unión específica, varió entre un 50 y 65%.

La metodología aplicada en los estudios cinéticos y de especificidad fue igual que para el receptor de melatonina.

3-4.-Determinación de los sitios de unión para estradiol en GCS

Captación y retención de ^3H -estradiol in vivo

La captación y retención de ^3H -estradiol in vivo fue examinada a distintos tiempos luego de la inyección s.c. de 40 μCi de 6,7- ^3H -estradiol (act. esp. 46.3 Ci/mmol). Los tejidos (GCS, glándula pineal, útero, hipófisis anterior y músculo tibial) fueron rápidamente obtenidos y pesados después de sacrificar al animal. Luego de

digerirlos en 0.5 ml de hidróxido de hiamina durante 24 h, se determinó la radiactividad en los mismos por espectrometría de centelleo líquido, utilizándose una solución centelleadora de tolueno-fósforo. Al igual que en los demás experimentos, el "quenching" fue corregido en forma automática mediante standard externo y las cuentas acumuladas fueron las suficientes como para dar un error de conteo inferior al 3%. La naturaleza de la radiactividad presente en el GCS fue identificada como estradiol en un 86-92% luego de su extracción en éter etílico. Los extractos fueron tomados, una vez secos, con etanol y cromatografiados en placa delgada de sílica gel G con diversos sistemas cromatográficos: a) cloroformo:acetato de etilo (75:25); b) cloroformo:etanol (90:10); c) benceno:etanol (80:20) Los resultados se expresaron como dpm/mg de tejido.

Captación de ^3H -estradiol in vitro

Apenas sacrificado el animal se extrajeron los tejidos (GCS y glándula pineal) y se pesaron. Se incubaron durante 1 h a 37 C en buffer Krebs-Ringer-bicarbonato ¹²⁵ en presencia de 0.1 nM de ^3H -estradiol. Posteriormente se hizo una incubación adicional de 15 min en buffer fresco. Todas las incubaciones se efectuaron en un ambiente de O_2 (95%) - CO_2 (5%). Se digirieron luego los tejidos en 0.5 ml de hidróxido de hiamina durante 24 h y se midió la radiactividad por espectrometría de centelleo líquido como se indica en el punto anterior. Los resultados se expresaron como dpm/mg de tejido.

Determinación de la constante de disociación y el número de los sitios de unión citoplasmáticos para el estradiol en GCS

La constante de disociación de los sitios de unión citoplasmá

ticos para el estradiol en homogenatos de GCS fue estudiada mediante la técnica descrita previamente para la glándula pineal⁸⁴, adaptación del procedimiento de adsorción sobre carbón-dextrán utilizado en otros tejidos. Los ganglios fueron homogeneizados en buffer Tris 0.01 M, pH 7.4, EDTA 1.5 mM y se obtuvo la fracción citoplasmática (≈ 1 mg proteína/ml) por centrifugación a 105000 x g durante 1 h a 0-4 C. Alícuotas de 0.5 ml de esta fracción fueron incubadas con distintas concentraciones de ³H-estradiol en presencia o en ausencia de una concentración 100 veces mayor de estradiol, durante 8 h a 0-4 C y, posteriormente, se las trató con 0.1 ml de una suspensión de carbón-dextrán (0.05 g de dextrán y 0.5 g de Norit A en 100 ml de buffer Tris-EDTA) para remover el estradiol libre y unido con baja afinidad. El carbón fue finalmente sedimentado por centrifugación a 2000 x g durante 15 min a 0-4 C y la radiactividad de los sobrenadantes se leyó con 15 ml de la mezcla centelleadora de tolueno-fósforo.

Determinación del complejo estradiol-receptor nuclear en GCS

Se utilizó el procedimiento de intercambio receptor-estradiol nuclear descrito por Anderson y col.¹²⁶ y con la técnica adaptada a la glándula pineal por Cardinali¹²⁷. Los animales fueron sacrificados a distintos tiempos luego de la inyección s.c. de 2 ug de estradiol (estradiol-17 β , E. Merck, Darmstadt) en 0.2 ml de vehículo (etanol:salina, 5:95, v:v) por exposición a una atmósfera saturada de éter etílico. Los ganglios cervicales superiores se extrajeron y fueron rápidamente pesados y homogeneizados en buffer Tris 10 mM - EDTA 1.5 mM, pH 7.4. Los homogenatos fueron centrifugados a 800 x g durante 10 min a 0-4 C. La fracción nuclear precipitada

fue lavada 3 veces con buffer Tris-EDTA y fue finalmente resuspendida en el mismo buffer en una concentración de 5 GCS/0.5 ml. Para la determinación de la constante de disociación se incubaron fracciones de 0.5 ml a 37 C durante 30 min con distintas concentraciones de ^3H -estradiol, en presencia o en ausencia de una concentración 100 veces mayor de dietilestilbestrol. Finalizada la incubación se agregaron 3 ml de buffer Tris-EDTA a cada tubo y se centrifugó a 800 x g durante 10 min a 0-4 C. Los precipitados fueron lavados 2 veces con el mismo buffer y, finalmente, se extrajeron con 3 ml de etanol absoluto. El extracto etanólico fue transferido a un vial, secado y resuspendido en 10 ml de solución centelleadora de tolueno-fósforo.

4.- Incorporación de aminoácidos tritiados a proteínas pineales

La síntesis de proteínas pineales se estimó in vitro por la incorporación de aminoácidos marcados a proteínas pineales.

Se incubaron grupos de 2 glándulas pineales, inmediatamente después de sacrificar al animal, durante 2 h a 37 C en 0.5 ml de buffer Krebs-Ringer-bicarbonato, pH 7.4 bajo atmósfera de O_2 (95%) - CO_2 (5%) con 2 uCi de una mezcla de ^3H -L-aminoácidos conteniendo 160 nCi de L-alanina, 140 nCi de L-arginina, 160 nCi de ácido L-aspártico, 250 nCi de ácido L-glutámico, 80 nCi de glicina, 30 nCi de L-histidina, 100 nCi de L-isoleucina, 280 nCi de L-leucina, 120 nCi de L-lisina, 160 nCi de L-fenilalanina, 100 nCi de L-prolina, 80 nCi de L-serina, 100 nCi de L-treonina, 80 nCi de L-tirosina y 160 nCi de L-valina. Luego de la incubación los tubos se enfriaron rápidamente en hielo y se lavaron los tejidos 3 veces con solución salina; se homogeneizaron en ácido tricloroacético (TCA) 10% y se

centrifugaron a 6000 x g durante 20 min a 0-4 C. Los residuos insolubles en TCA se lavaron 2 veces con TCA 4%, 2 veces con etanol y 1 vez con dietiléter y se disolvieron finalmente en NaOH 1 M en caliente.

La concentración de proteínas del precipitado una vez resuspendido se determinó por el método de Lowry¹²³ y se usó albúmina de suero bovino como standard. La radiactividad del precipitado resuspendido y del sobrenadante de TCA se midió por espectrometría de centelleo líquido utilizando como líquido de centelleo la solución de tolueno-fósforo - 30% (v/v) Tritón X-100. La captación e incorporación de aminoácidos marcados a proteínas pineales fue lineal al menos durante 2 h. Los resultados se expresaron com dpm/mg de proteína/1000 dpm del sobrenadante de TCA.

Los cambios en la incorporación de aminoácidos marcados a proteínas in vitro pueden reflejar, en cierta medida, modificaciones en otros mecanismos además de la síntesis de proteínas; por ejemplo: la velocidad de entrada de aminoácidos a las células pineales, el tamaño del "pool" del precursor y la velocidad de catabolismo de las proteínas sintetizadas. Experimentos realizados utilizando cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas, en dosis que disminuyen la incorporación de aminoácidos marcados a proteínas pineales en un 60-70%, suprimieron el incremento en la incorporación de ³H-leucina producida por estradiol en ratas castradas, lo cual indica que cambios en la síntesis de proteínas están involucrados en la acción del estradiol sobre la glándula pineal.⁸⁹.

5.- Captación de ³H-norepinefrina in vitro

Para la determinación de la captación de ³H-NE in vitro se uti-

lizó el procedimiento descrito por Silberstein y col.¹²⁸. Antes de usarse la $^3\text{H-NE}$, se controló la pureza del compuesto radiactivo por cromatografía de adsorción en columna de alúmina y por intercambio iónico en columna de Dowex 50W - X4; más del 97% de la radiactividad cromatografió con la amina standard pura.

Los tejidos, inmediatamente después de su extracción, se incubaron en atmósfera de O_2 (95%) - CO_2 (5%) durante 30 min a 37 C en buffer Krebs-Ringer bicarbonato con 0.01 mM de $^3\text{H-L-NE}$ (act. esp. 4.6 Ci/mmol) y durante 10 min más en buffer fresco sin el compuesto radiactivo. Los tejidos se digirieron luego con hidróxido de hiamina y la radiactividad se determinó por espectrometría de centelleo líquido utilizando tolueno-fósforo como solución centelleadora. Los resultados se expresaron en femtomoles de $^3\text{H-NE}$ acumulada/h/mg de tejido.

6.- Determinación del "turnover" de norepinefrina

Desde el punto de vista bioquímico, los parámetros que mejor reflejan la fisiología de la neurona son: 1) la velocidad en que se sintetiza el neurotransmisor y 2) la velocidad de recambio del mismo ("turnover")⁹⁵.

En nuestros experimentos el "turnover" de NE se estimó por la velocidad de desaparición de una dosis trazadora de amina marcada (50 uCi de $^3\text{H-L-NE}$) inyectada por vía intravenosa según el método descrito previamente por Cardinali y col.⁸⁸.

Las ratas se anestesiaron levemente con éter y se les inyectó en la vena yugular 50 uCi de $^3\text{H-NE}$ disuelta en 0.5 ml de solución salina. Los animales se sacrificaron 30, 60 y 120 min después de la administración de la amina y se extrajeron los tejidos (glándula pi

neal, GCS, corazón (ventrículo izquierdo) y glándulas adrenales). Estos se pesaron y congelaron en hielo seco hasta el momento de realizarse las determinaciones bioquímicas, usualmente dentro de las 24 h.

Los tejidos se homogeneizaron en 6 ml de HClO_4 0.4 N frío y, en el caso de la glándula pineal y el GCS, a los homogenatos se les agregó 1 μg de NE no marcada como standard interno. Se centrifugó a 20000 x g durante 20 min en centrífuga refrigerada a 0-4 C y la NE de la fracción sobrenadante se adsorbió sobre columnas de alúmina activada (400 mg), a pH 8.6, y se eluyó con 2 ml de HAcO 0.2 N. El contenido en tritio de alícuotas de 1 ml de eluato se midió por espectrometría de centelleo líquido luego de disolver en 15 ml de tolueno-fósforo - 30% (v/v) Tritón X 100. Los resultados se expresaron como femtomoles de $^3\text{H-NE}$ /mg de tejido.

Otra porción del eluato se utilizó para estimar la recuperación de las columnas (pineal y GCS) o el contenido de catecolaminas endógenas (corazón y glándula adrenal) mediante el método espectrofluorométrico de Laverty-Taylor¹²⁹. Este procedimiento se basa en la medición de la fluorescencia del producto de oxidación con I_2 en dos combinaciones de longitud de onda, de excitación y emisión (390/500 y 400/530 nm). Con la primera, la fluorescencia de epinefrina y NE es casi igual; con la segunda, el fluoróforo de epinefrina da una lectura mucho mayor que la NE. La recuperación fue de $(87 \pm 3)\%$.

La caída exponencial en los niveles de $^3\text{H-NE}$ se calculó como en trabajos anteriores asumiendo un único compartimiento donde los niveles de NE son mantenidos por balance entre la síntesis y el metabolismo y eflujo de la amina. En tal sistema los niveles de $^3\text{H-NE}$

se pueden expresar como:

$${}^3\text{H-NE} = {}^3\text{H-NE}_0 \cdot e^{-kt}$$

donde k = constante de decaimiento; t = tiempo ; ${}^3\text{H-NE}_0$ = concentración inicial de la amina; ${}^3\text{H-NE}$ = concentración de la amina al tiempo t .

Se graficó en papel semilogarítmico la concentración de NE ver-
sus el tiempo y se calculó por análisis de regresión la ecuación que mejor representaba los datos. Por lo tanto, se obtuvo el $T_{1/2}$ (tiempo necesario para la reducción a la mitad del contenido de ${}^3\text{H-NE}$) y $k = \ln 2 / T_{1/2}$ y la velocidad de recambio o $VR = {}^3\text{H-NE}_0 \cdot k$

7.- Determinación del contenido de serotonina pineal

La concentración de serotonina pineal se determinó espectrofluorométricamente según la técnica descrita por Hyypä y col.¹³⁰. Cada pineal se homogeneizó en 2 ml de butanol ácido (0.85 ml de HCl concentrado por litro de n-butanol). El homogenato se transfirió a un tubo de centrífuga y se centrifugó durante 5 min a 2000 RPM. Una alícuota de 1.25 ml se transfirió a un tubo de centrífuga con 2.5 ml de n-heptano y 0.2 ml de HCl 0.1 N. Luego de agitar durante 5 min los tubos se centrifugaron 5 min a 2000 RPM. La fase orgánica, incluyendo el disco proteico en la interfase, se removió por aspiración y se descartó. Alícuotas de 0.1 ml de la fase ácida se transfirieron a tubos de Kahn y se les agregó 0.6 ml de una solución de o-ftaldehído recién preparada (10 mg/100 ml de HCl 10 N). Luego de agitar en vortex, los tubos se calentaron en baño de agua a 100 C durante 10 min. La fluorescencia se midió en un espectrofotofluorómetro Aminco Bowman con cubetas de cuarzo de 1 cm. Las longitudes de onda de activación se fijaron a 360 nm y 470 nm respectivamente.

8.- Determinación del "turnover" de serotonina pineal.

El "turnover" de serotonina pineal se examinó en ratas tratadas con DL-p-clorofenilalanina (PCPA), un inhibidor de la triptofano hidroxilasa¹³¹. La droga se suministró i.p. como suspensión en solución salina (30 mg/ml) en una dosis de 300 mg/kg de peso. Las ratas se sacrificaron a distintos tiempos después de la inyección y se determinó en cada caso el contenido de serotonina pineal, como se describe en el punto anterior. Se tomó como índice del "turnover" de serotonina la caída en el contenido de la amina en función del tiempo transcurrido luego de la inhibición de su síntesis.

Si se asume que PCPA no libera serotonina sino que bloquea totalmente su síntesis, se puede hacer una estimación del "turnover" de serotonina aplicando los principios cinéticos a una caída exponencial única de serotonina como se explicó en el caso de la NE, es decir, la velocidad de recambio (VR) se calculó como: $VR = k \cdot [serotonina]_0^{54}$. Los resultados se graficaron como porcentaje del contenido de serotonina respecto del valor al tiempo cero en función de los minutos transcurridos luego de la administración de PCPA (papel semilogarítmico) y las constantes cinéticas se calcularon de la misma forma que para el "turnover" de NE.

Este método ha sido aplicado en áreas del SNC por otros investigadores¹³¹. Se acepta que la velocidad a la cual se sintetiza y recambia (liberación, metabolismo) la serotonina, es independiente de los niveles de la amina que contiene la glándula a pesar de alterarse las condiciones de equilibrio por PCPA.

9.- Determinación del contenido de tubulina.

La tubulina es la subunidad proteica de los microtúbulos y su

concentración en el cerebro representa un 11-40% del total de la proteína soluble cerebral. Su rol fisiológico no se conoce, si bien ha sido implicada como se destaca en la Introducción en la neurosecreción y flujo axoplasmático.

Su cuantificación se hace posible dada la capacidad de alcaloides como la colchicina de unirse en relación mol a mol con la molécula de tubulina en su forma dímera (condición natural). A medida que el alcaloide se une irreversiblemente a la tubulina se produce la depolimerización de los microtúbulos de modo que este método permite el dosaje de la tubulina total¹³².

Los tejidos se homogeneizaron en buffer fosfato de sodio 0.067 M pH 6.9, conteniendo KCl 0.1 mM y GTP 0.01 mM. Alícuotas de los homogenatos se dejaron llegar al equilibrio con 0.02 M de ³H-colchicina durante 90 min a 37 C, después de lo cual la colchicina libre se removió por adsorción sobre carbón activado. Posteriormente se separó el carbón por centrifugación a 600 x g durante 15 min y la radiactividad se determinó en el sobrenadante por espectrometría de centelleo líquido, utilizando como líquido de centelleo la solución de tolueno-fósforo - 30% Tritón X 100 (v/v). Los resultados se expresaron como nmoles de tubulina/mg de proteína soluble, asumiendo que en condiciones de saturación la colchicina se une a la tubulina en la relación mol a mol.

En todos los experimentos las proteínas se determinaron por el método de Lowry y col.. Se usó como standard albúmina sérica bovina¹²³.

10.- Reactivos utilizados

LH (NIH-LH-S19), FSH (NIH-FSH-S12) y prolactina (NIH-S-P12) ovinas: donación del National Institute of Health, Bethesda Md.

N-acetil-5-metoxitriptamina, (2-³H-aminoetil)-, act. esp. 31.5 Ci/mmol; acetil-Coenzima A, (1-¹⁴C-acetil)-, act. esp. 45.0 Ci/mmol; 5-hidroxitriptamina, bioxalato, (2-¹⁴C)-, act. esp. 47.2 mCi/mmol; β-feniletilamina, HCl, (1-¹⁴C-etil)-, act. esp. 50.98 mCi/mmol; 5-adenosil-l-metionina, (¹⁴C-metil)-, act. esp. 47.0 mCi/mmol; 9,10-dihidroergocriptina, (9,10-³H(N))-, act. esp. 25.7 Ci/mmol; estradiol, (6,7-³H(N))-, act. esp. 46.3 Ci/mmol; progesterona, (1,2,6,7-³H(N))- act. esp. 105 Ci/mmol; l-norepinefrina, (7-³H(N))-, act. esp. 4.6 Ci/mmol; colchicina, (anillo C, ³H-metoxi)-, act. esp. 16.05 Ci/mmol; tirosina, (¹⁴C(U)), act. esp. 453 Ci.mol: New England Nuclear, Mass..

Catalase y NADPH: Boehringer Chemical Co..

2-Amino-4-hidroxi-6,7-dimetiltetrahidropteridina: Aldrich Chemical Co..

Testosterona y 17 β-estradiol: Merck, Darmstadt.

Dextran T-70: Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala.

Norit-A neutro: Amend Drug and Chemical Co. N. Y..

Alúmina neutra, grado 1: Alupharm Chemicals.

Dowex W-X4; dietilstilbestrol; β-feniletilamina, HCl; progesterona; serotonina creatinina, sulfato; melatonina; N-acetilserotonina; 2-metilindol; 5-hidroxitriptofol; 5-metoxitriptamina, HCl; 5-metoxitriptofol; 5-metoxi-3-indolecético; 5-hidroxiindolecético; triptamina, HCl; 5-hidroxitriptofano; 6-hidroxi melatonina; l-dopamina, HCl; p-clorofenilalanina; l-epinefrina, bitartrato; octopamina, HCl; propanolol, HCl; isoproterenol, HCl; colchicina: Sigma Chemical. Co.

Fentolamina, HCl: CIBA lab. Bs. As..

Dihidroergocriptina: Sandoz S.A. Beale.

Los solventes de grado analítico (Mallinckrodt, Carlo Erbe y Merck) se usaron sin posterior purificación.

RESULTADOS

1.- Transducción neuroendócrina.

1-1.- Caracterización de receptores α -adrenérgicos en la glándula pineal.

Uno de los procesos fundamentales de la transducción neuroendócrina es la interacción del neurotransmisor con su receptor. En la glándula pineal se acepta en forma general que la NE desencadena, al actuar sobre un receptor β -adrenérgico acoplado a una adenilciclase, una secuencia de acontecimientos metabólicos que conducen al incremento de la síntesis de la hormona melatonina. Sin embargo, es sabido desde hace años, que el uso de bloqueantes α -adrenérgicos incrementa la actividad de las enzimas sintetizantes de melatonina¹³³ y la síntesis de fosfolípidos pineales,¹³⁴ así como estimula la liberación de NE de las terminales nerviosas pineales¹³⁵. Dichos resultados sugieren la presencia de receptores α -adrenérgicos en la glándula pineal, los que se investigaron en este trabajo por la unión de ³H-DHE a preparaciones crudas de membranas de glándula pineal bovina.

Como se observa en la Fig. 16 la unión fue saturable y el análisis de Scatchard de la curva de saturación indicó una única población de sitios de unión con $K_D = (4.5 \pm 1.9) \times 10^{-8} M$ (Media \pm ES, n=3) y una concentración máxima de sitios = (834 \pm 103) fmoles/mg de proteína de membrana. Representaciones de Scatchard no lineales y coeficientes de Hill distintos de 1 han indicado en otras regiones cerebrales la presencia de poblaciones diferentes de sitios de unión para ³H-DHE, probablemente de tipo α_1 y α_2 . En este caso, no obstante, tanto el gráfico de Scatchard (Fig. 16) como el de Hill (Fig. 17) fueron lineales (véase también la Fig. 18). La ecuación de Hill resultó en una única recta con un coeficiente de Hill de 0.99, lo que asimismo revela la ausencia

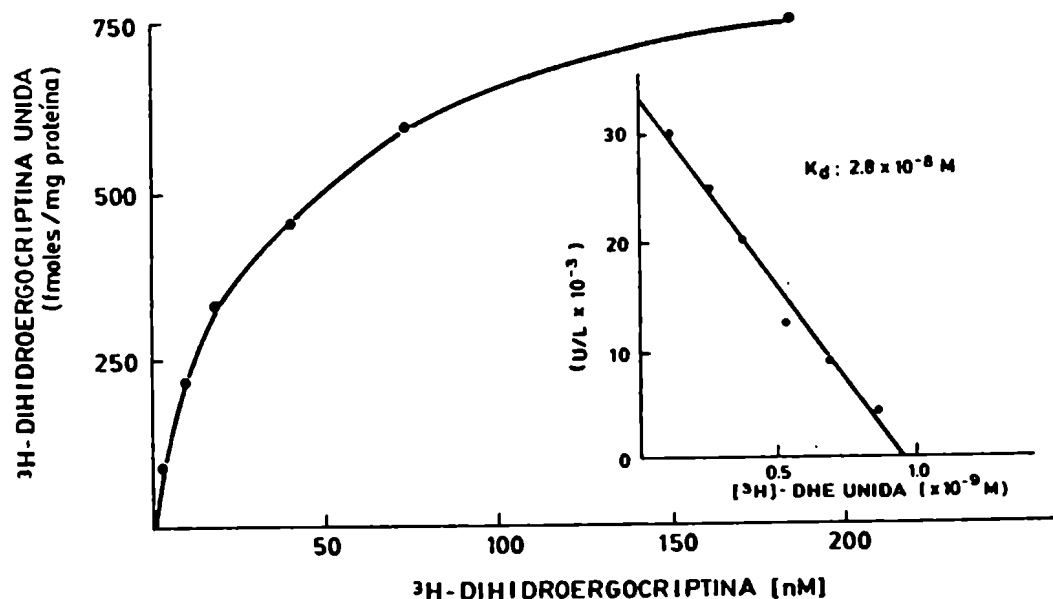


Fig. 16: Unión específica de ^3H -DHE a membranas de glándula pineal bovina como una función de concentraciones crecientes de ^3H -DHE en el medio. Cada punto es la media de triplicados de muestras. A la derecha, el gráfico de Scatchard¹¹⁹. En este experimento: $K_D = 2.8 \times 10^{-8}\text{M}$; concentración máxima de sitios de unión específicos: 732 fmoles/mg de proteína.

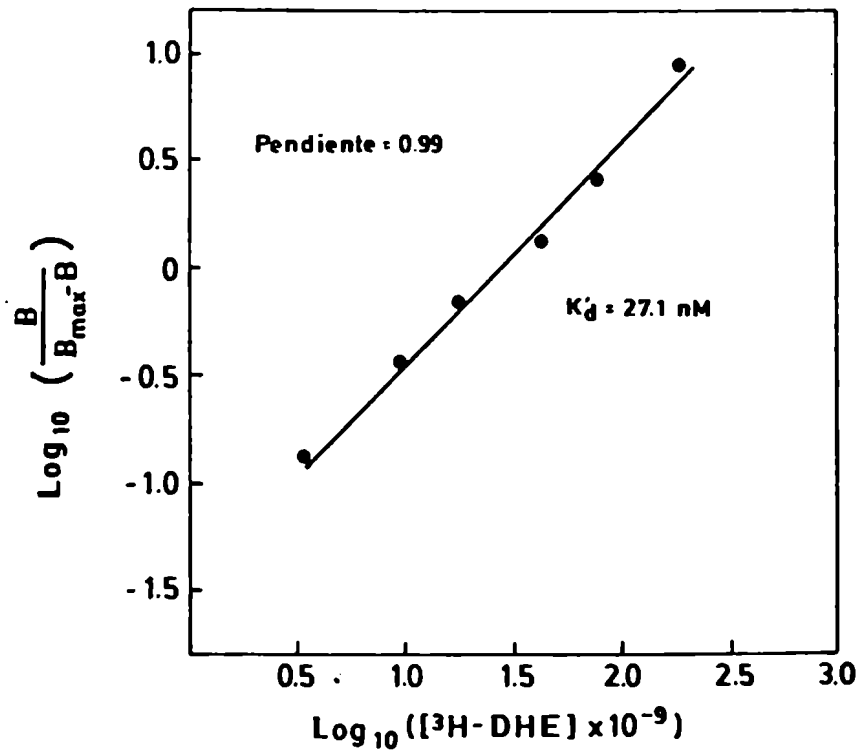
RECEPTOR α -ADRENERGICO PINEAL

Fig. 17: Datos de la Fig. 16 graficados según la ecuación de Hill¹³⁸.

de cooperatividad.

En cuanto a los ensayos de competencia para determinar la especificidad de la unión (Tabla II) se verificó que la DHE no marcada fue potente en desplazar a la $^3\text{H-DHE}$ de su sitio de unión con una K_D calculada de $3.9 \times 10^{-8}\text{M}$ similar a la obtenida con el compuesto radiactivo en los estudios de saturación. Los antagonistas α -adrenérgicos fentolamina y fenoxibenzamina fueron 10^4 veces más efectivos que el agonista o antagonista- β , isoproterenol o propranolol, en desplazar a la $^3\text{H-DHE}$ de su receptor. La serotonina resultó sólo levemente menos potente que la epinefrina en competir con la $^3\text{H-DHE}$ por la unión al receptor. Una observación similar fue realizada por Davis y col. en membranas de corteza cerebral y constituye, probablemente, la base para interpretar respuestas farmacológicas de la serotonina sensibles al bloqueo por fentolamina¹³⁶. En conjunto, el orden de competencia de la Tabla II indica que la $^3\text{H-DHE}$ se une a un sitio α -adrenérgico en la glándula pineal. Sin embargo, estos estudios no ofrecen información sobre la localización de dichos presuntos receptores.

Con el objeto de determinar si los sitios de unión detectados se modificaban luego de la degeneración de los terminales noradrenérgicos, se sometieron grupos de ratas a gangliectomía cervical superior bilateral o a operación simulada y 7 días más tarde se estudió la unión de $^3\text{H-DHE}$ a membranas pineales. La desnervación de la glándula pineal produjo un incremento del 53% en la unión de $^3\text{H-DHE}$ a membranas pineales, sin cambios en las K_D ($5.2 \times 10^{-8}\text{M}$ y $5.5 \times 10^{-8}\text{M}$ para los animales desnervados y controles respectivamente)(Fig. 18). Estos resultados sugieren una localización predominantemente postsináptica de los sitios de unión observados.

Tabla II: DE_{50} y K_i de una variedad de drogas en los estudios de competencia por los sitios de unión para 3H -DHE en membranas de glándula pineal bovina.*

Droga	DE_{50} (μM)	K_i (μM)
dihidroergocriptina	0.118	0.039
fentolemina	0.307	0.102
fenoxihenzamina	0.785	0.262
metisergida	2.01	0.670
l-epinefrina	6.81	2.27
serotonina	9.27	3.09
l-norepinefrina	9.60	3.20
octopamina	90.8	30.3
l-propranolol	5120	1710
l-isoproterenol	6000	2000

*Las preparaciones de membrana se incubaron por triplicado como se describe en Materiales y Métodos con varias concentraciones (mínimo: 4) de la droga en estudio y 96 nM de 3H -DHE. Los valores resultantes de unión específica se representaron en papel log-probit para determinar las DE_{50} . Las pendientes, así como las intersecciones, se determinaron por análisis de regresión. La constante de disociación para los distintos inhibidores (K_i) se calcularon a partir de la fórmula: $K_i = DE_{50} / 1 + (^3H\text{-DHE})/K_D$, donde K_D es la constante de disociación para 3H -DHE 120.

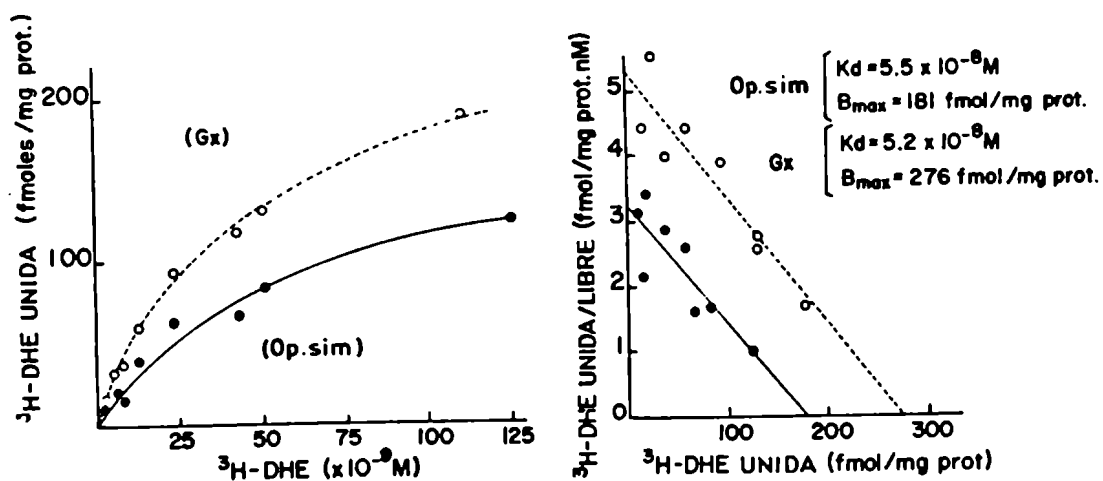
RECEPTORES α -ADRENERGICOS EN GLANDULA PINEAL DE RATA

Fig. 18: Unión específica de $^3\text{H-DHE}$ al sobrenadante de 1000 x g de glándulas pineales de ratas sometidas a gangliectomía cervical superior bilateral o a operación simulada 7 días antes. En el panel de la derecha están representados los datos en un gráfico de Scatchard para la determinación de los K_D y el nº máximo de sitios de unión ($U_{\text{máx}}$). Las diferencias en el $U_{\text{máx}}$ son significativas ($p < 0.05$), análisis de covarianza 137.

2.- Transducción endócrino-endócrina

2-1.- Cambios en la síntesis de proteínas pineales durante el ciclo estral: participación del estradiol y la progesterona.

Por definición, los mecanismos de transducción endócrino-endócrina involucran cambios inducidos por hormonas en el metabolismo celular conducentes a la secreción de otra hormona y desencadenados por la acción directa endócrina sobre el efector.

Es sabido que la castración disminuye la síntesis de melatonina⁸⁴. Por el contrario, la administración de dosis fisiológicas de estradiol o testosterona la aumentan en forma significativa, así como también incrementan la síntesis de proteínas pineales. Se presentan aquí los cambios observados en la síntesis de proteínas pineales, posiblemente vinculados a la producción de péptidos y proteínas pineales de actividad endócrina, durante el ciclo estral de la rata y su relación con la actividad noradrenérgica, evaluada por la activación nocturna de la enzima serotonina-N-acetiltransferasa en cada día del ciclo.

Los animales fueron sacrificados a dos tiempos diferentes durante el período de luz (4^o y 10^o hora de luz) y en la mitad del período de oscuridad. Los cambios en la síntesis de proteínas se restringieron a los días del proestro y estro: alcanzó su máximo en la mañana del proestro y declinó en un 53% ($p < 0.01$) en la tarde durante el "período crítico" de liberación de FSH, LH y prolactina (ver Fig. 15). A las 1100 h del día del estro los valores alcanzaron el promedio obtenido en los restantes días del ciclo (Fig.19).

La enzima serotonina-N-acetiltransferasa exhibió los bien conocidos cambios diurnos¹¹⁸, con incrementos de 10 a 15 veces en la actividad durante la oscuridad, no observándose modificaciones en función del estado del ciclo estral (Fig.20).

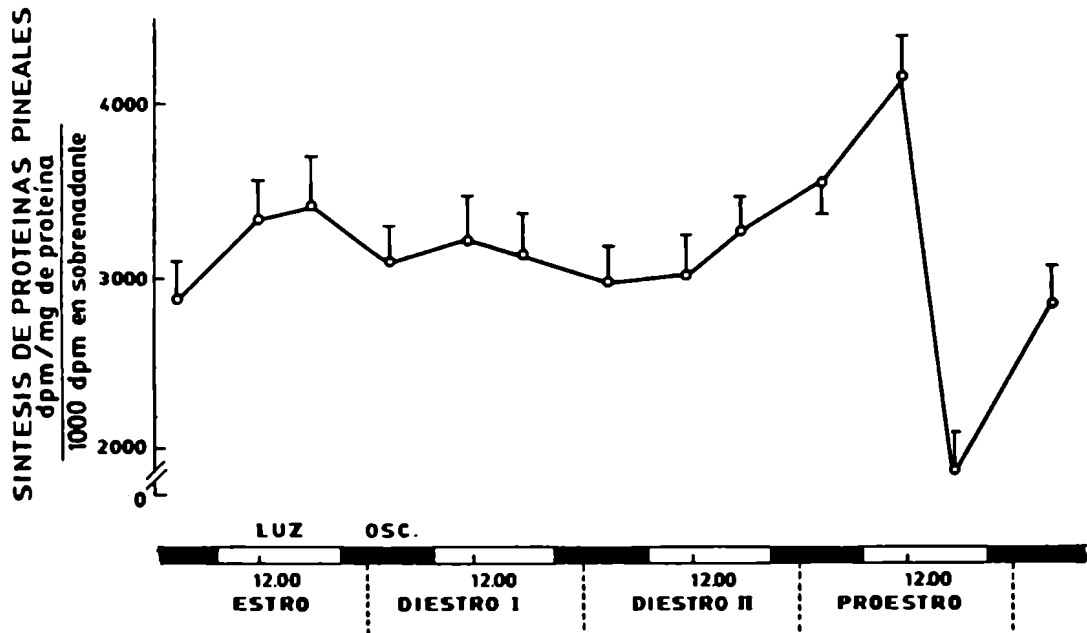


Fig. 19: Cambios en la incorporación de aminoácidos tritiados a proteínas pineales como función del ciclo estral de la rata. Media \pm ES; n = 6 en cada grupo. El valor elevado en la síntesis de proteínas pineales a las 1100 h del día del proestro y su disminución a las 1700 h del mismo día difieren significativamente del valor medio del ciclo estral ($p < 0.05$, análisis de varianza)¹³⁷.

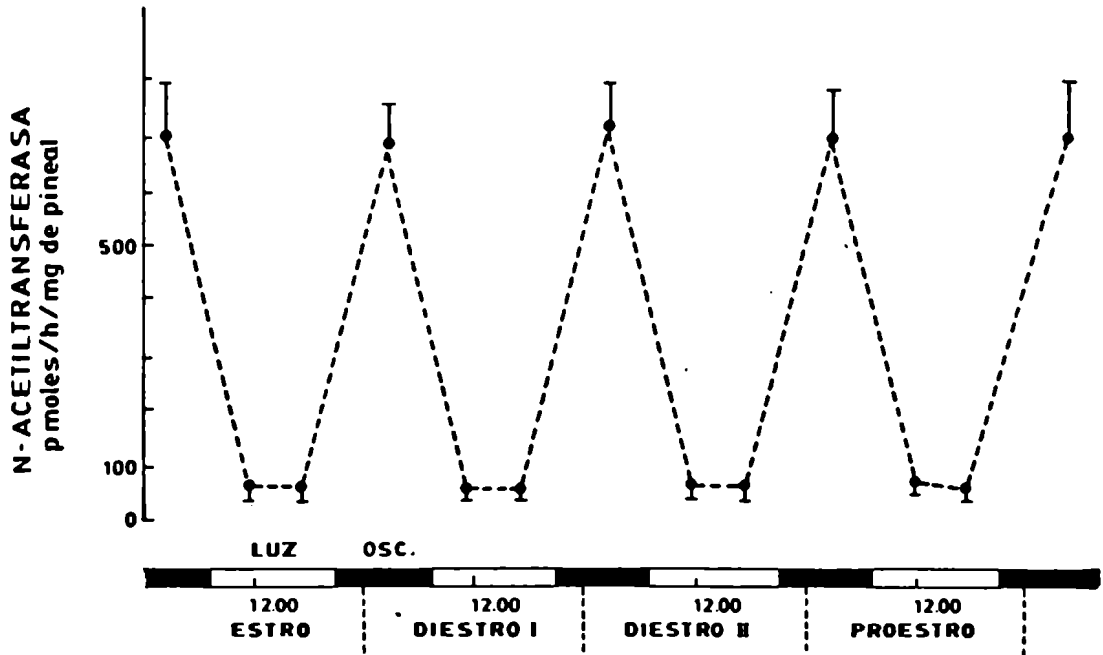


Fig. 20: Actividad de la serotonina-N-acetiltransferasa pineal durante el ciclo estrol de la rata. Cada punto es igual a la Media \pm ES de 6 determinaciones.

Con el objeto de evaluar la participación de las hormonas reproductivas en los cambios en la síntesis de proteínas pineales, se recurrió a un modelo fisiológico experimental que se sabe reproduce en animales castrados la liberación de gonadotropinas y prolactina del período crítico. Se administró a ratas hembra castradas 0.5 y 5 ug de estradiol durante 2 días, sacrificándose los animales a las 1100 y 1700 h del 3º día (Tabla III). De acuerdo a los datos de la literatura se observa, en el 2º grupo de animales, una liberación de FSH, LH y prolactina semejante a la del período crítico^{110,139}. Sin embargo, éste no mostró las diferencias matutinas-vespertinas del proestro a menos que se inyectara progesterona (4 mg) 10 h antes del sacrificio (Tabla III).

El siguiente experimento fue realizado a fin de evaluar si los cambios inducidos por la progesterona eran aún observados en ausencia de estradiol, ya que la administración de progesterona sola no se acompaña de liberación de hormonas hipofisarias. Los resultados de la Tabla IV indican que el tratamiento con progesterona (1-8 mg)/día, 48 y 24 h antes del sacrificio, en ratas ovariectomizadas, disminuyó la incorporación de aminoácidos tritiados a proteínas pineales aún en presencia de la inyección simultánea de 1 ug de estradiol. El estradiol por sí mismo indujo un incremento en la síntesis de proteínas⁹⁰ compatible con los cambios observados en la mañana del proestro, momento en que se produce la liberación del pico ovulatorio de estradiol (Fig. 15).

Puede concluirse que la progesterona per se y no a través de una acción hormonal sinérgica es capaz de disminuir la función pineal así evaluada. Esto llevó a investigar la presencia de posibles receptores pineales para progesterona, requisito indispensable para la existencia de fenómenos de transducción endócrino-endócrina de la hormona.

Tabla III: Cambios en la síntesis de proteínas pineales en ratas ovariectomizadas inyectadas con 0.5 y 50 ug de estradiol 48 y 24 h antes del sacrificio, o con estradiol más 4 mg de progesterona a las 0700 h del 3º día.

<u>Tratamiento</u>	<u>Síntesis de proteínas*</u> (dpm/mg prot./1000 dpm sobrenad.)	
	<u>1100 h</u>	<u>1700 h</u>
	Estradiol	5764 ± 376 (8)**
Estradiol + Progesterona	4997 ± 426 (7)***	3706 ± 296 (8)***
Vehículo	3770 ± 295 (8)	3564 ± 267 (7)

*Media ± ES (n)

**p < 0.02 con respecto a su control tratado con vehículo (test de t).

***p < 0.02 con respecto a las ratas sacrificadas a las 1100 h.

Tabla IV: Efectos del tratamiento con progesterona sola o asociada con estradiol sobre la síntesis de proteínas pineales en ratas ovariectomizadas.*

<u>Tratamiento</u>	<u>Síntesis de proteínas*</u> <u>(dpm/mg prot./1000 dpm sobrenad.)</u>
Control	3732 \pm 216
Progesterona 1 mg	2426 \pm 235**
Progesterona 4 mg	1964 \pm 126**
Progesterona 8 mg	2164 \pm 196**
Estradiol 1 ug	4863 \pm 326**
Estradiol 1 ug - Progesterona 1 mg	3036 \pm 245***
Estradiol 1 ug - Progesterona 4 mg	2526 \pm 197***
Estradiol 1 ug - Progesterona 8 mg	2627 \pm 208***

*Ratas ovariectomizadas fueron tratadas por dos días con progesterona y/o estradiol; los animales se sacrificaron en la mañana del tercer día (1000 h) y la síntesis de proteínas se determinó como se describe en Materiales y Métodos.

Los datos se expresan como Media \pm ES (n = 6 en cada grupo).

**p < 0.05 con respecto al control (test t de Student).

***p < 0.05 con respecto a las ratas inyectadas con estradiol (test t de Student).

2-2.- Caracterización del receptor citoplasmático para progestágenos en la glándula pineal.

La posible existencia de un receptor pineal para progesterona fue investigado en la fracción citosólica de glándulas pineales bovinas. En la Fig. 21 se muestra la evolución de la asociación específica de ^3H -progesterona a citosol pineal, en función del tiempo de incubación, a 0 y 37 C. La unión fue inestable a 37 C, por lo que los experimentos subsiguientes se realizaron a 0 C. Alícuotas del citosol incubadas con tripsina (3 mg/ml) o calentadas a 65 o 100 C durante 15 minutos, mostraron inhibición de la unión específica en un 85, 75 y 98% respectivamente, lo que sugiere una naturaleza proteica para el sitio de unión. El procedimiento de incubación a 0 C no alteró el esteroide radioactivo, ya que más del 95% exhibió una conducta cromatográfica semejante a la del compuesto de referencia puro en los sistemas de solventes descritos en Materiales y Métodos.

Con el objeto de determinar la constante de equilibrio para la asociación de alta afinidad de ^3H -progesterona a citosol pineal, alícuotas de éste fueron incubadas con varias concentraciones del compuesto en presencia o en ausencia de un exceso de progesterona no marcada (Fig. 22) Se detectó una única población de sitios de unión específicos = 34 fmol/mg de proteína, con una $K_D = 1.62 \text{ nM}$.

En la Tabla V se muestran las concentraciones efectivas de diversos esteroides para disminuir en un 50% la unión específica de progesterona en la glándula pineal (DE_{50}). Se observó el siguiente orden de afinidad: progesterona > 20- α -dihidroprogesterona > 20- β -dihidroprogesterona > estradiol > testosterona > corticosterona. Como todos los experimentos de estudio del receptor para progesterona se realizaron en presencia de un exceso de cortisol (10 μM), estos resultados indi-

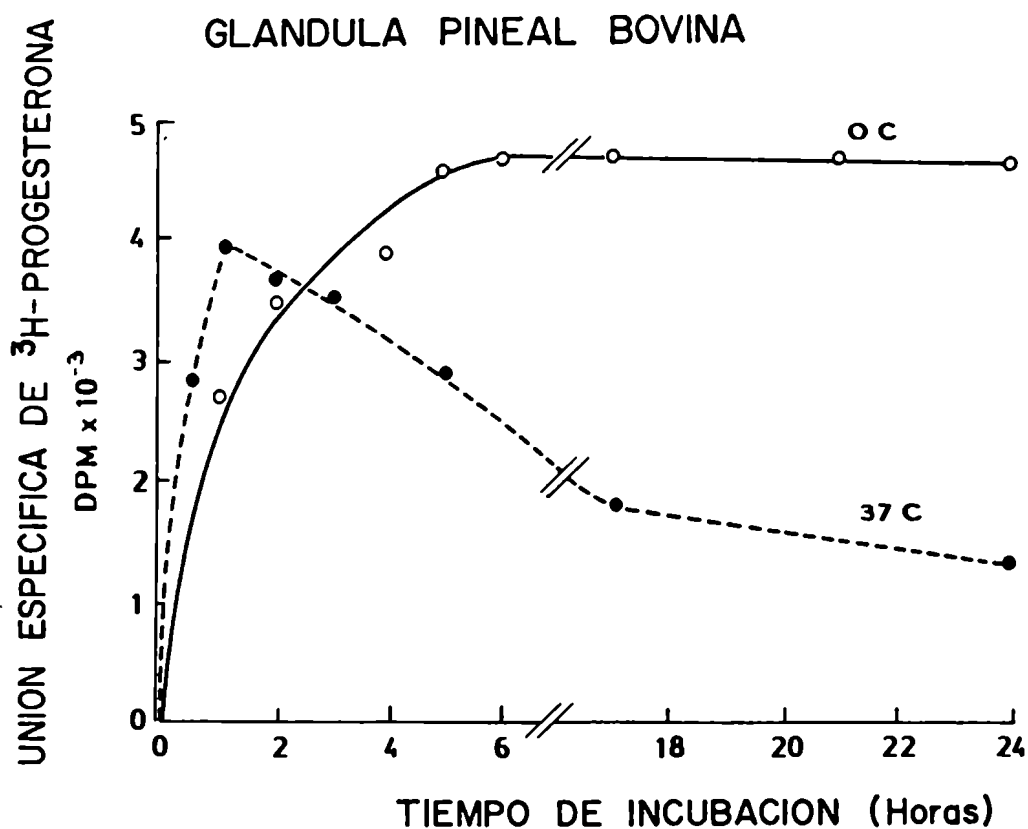


Fig. 21: Asociación específica de ^3H -progesterona a citosol pineal bovino a diferentes temperaturas. La unión específica de progesterona se determinó como se describe en Materiales y Métodos luego de incubar alícuotas de 300 μl de citosol pineal bovino con 12 nM de ^3H -progesterona a 37 C o 0 C durante varios períodos de tiempo. Cada punto es la media de 3 determinaciones.

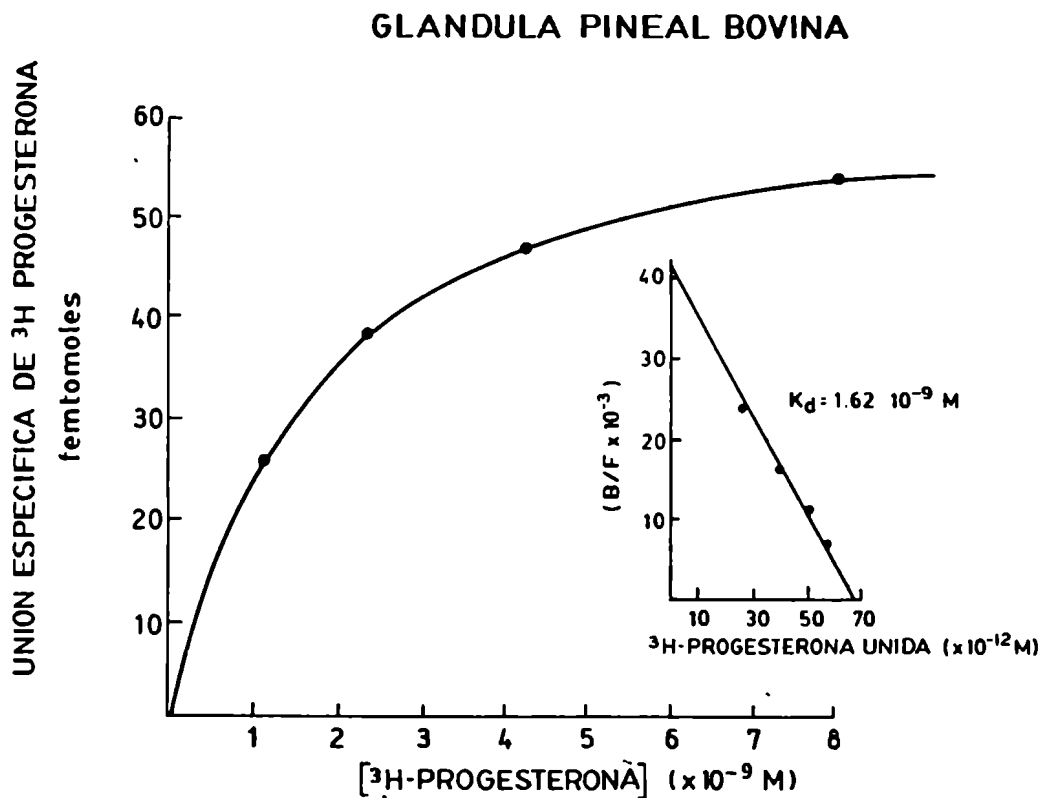


Fig. 22: Unión específica de ^3H -progesterona como función de las concentraciones del compuesto en el medio. Alícuotas de citosol pineal bovino se incubaron como se describe en Materiales y Métodos. Cada punto es la media de 3 determinaciones. A la derecha se muestran los datos en un gráfico de Scatchard 119. $K_d = 1.62 \text{ nM}$ y n^0 máximo de sitios de unión específicos = $= 34 \text{ fmoles/mg}$ de proteína.

Tabla.V: Especificidad de la asociación de ^3H -progesterona al citosol pineal bovino.*

Compuesto	DE_{50}	K_i
Progesterona	2.0	2.4
20- α -dihidroprogesterona	12	15
20- β -dihidroprogesterona	25	30
Estradiol	158	193
Testosterona	675	823
Corticosterona	1000	1220

*Alícuotas de citosol se incubaron por triplicado a 0 C durante 15 h con concentraciones variables (mínimo: 3) de esteroides no marcados y 1 nM de ^3H -progesterona. Los valores resultantes de la unión específica se graficaron en papel log-probit a fin de obtener las DE_{50} . La constante de disociación para los distintos inhibidores (K_i) se calcularon según la ecuación: $K_i = DE_{50} / 1 + (^3\text{H-Progesterona})/K_d$, donde K_d es la constante de disociación para $^3\text{H-Progesterona}$.

GLANDULA PINEAL BOVINA

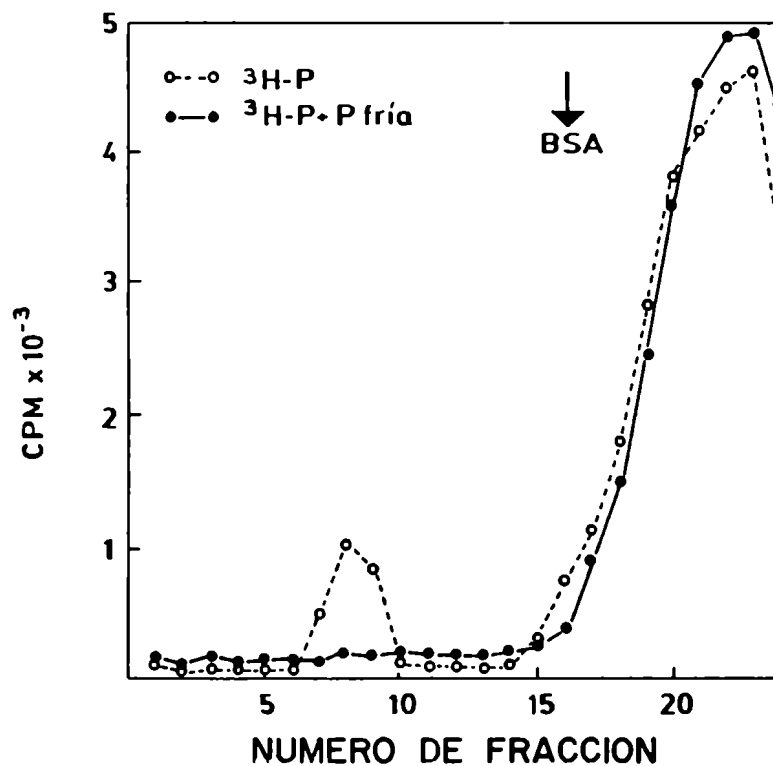


Fig.23 : Centrifugación en gradiente de sacarosa (5-20%) de citosol pineal incubado con 1.8 nM de ^3H -progesterona (o---o) o con 1.8 nM de ^3H -progesterona más 7 μM de progesterona no marcada (●---●) durante 7 h a 0 C. La centrifugación se realizó a 49000 RPM durante 14 h en un rotor Spinco SW 50-1. BSA: albúmina de suero bovino.

can que existe un receptor citosólico para progesterona y descartan la posibilidad que se trate de unión a CBG (globulina plasmática transportadora de corticoides). Por otra parte, esto estaría de acuerdo con la inhibición débil de la unión de ^3H -progesterona a su sitio de unión por corticosterona.

En la Fig. 23 se observan los resultados del experimento de centrifugación en gradiente de sacarosa de la fracción citosólica pineal incubada con ^3H -progesterona en presencia de 10 μM de cortisol. Se observó un pico de radiactividad en la región 7-8 S del gradiente, el que desapareció en presencia de un exceso de progesterona no marcada.

2-3.- Caracterización de sitios de unión para la melatonina en la glándula pineal.

La glándula pineal responde con marcados cambios, tanto morfológicos como bioquímicos, a la administración de melatonina^{67-69,71}. Con esta serie de experimentos se trató de investigar la presencia de posibles receptores para melatonina en la glándula pineal, como un índice de acción directa de la hormona sobre la misma.

En la Fig. 24 se graficó el curso de la unión específica de ^3H -melatonina a una preparación de membranas de glándulas pineales bovinas en función del tiempo y la temperatura de incubación. El máximo se obtuvo en 1 h a 37 C, en 2 h a 25 C y en 5 h a 0 C. Sin embargo, dichos máximos difirieron, siendo a 25 C y 37 C, 36 y 42% del observado a 0 C, debido, probablemente, a daño en el receptor (no se incubó en presencia de enzimas proteolíticas). Por esta razón se eligió como condición de rutina para la incubación en todos los ensayos posteriores: 0 C durante 5 h.

La asociación específica de melatonina a preparaciones de membranas de glándula pineal resultó ser pH-dependiente: en buffer Tris-HCl la

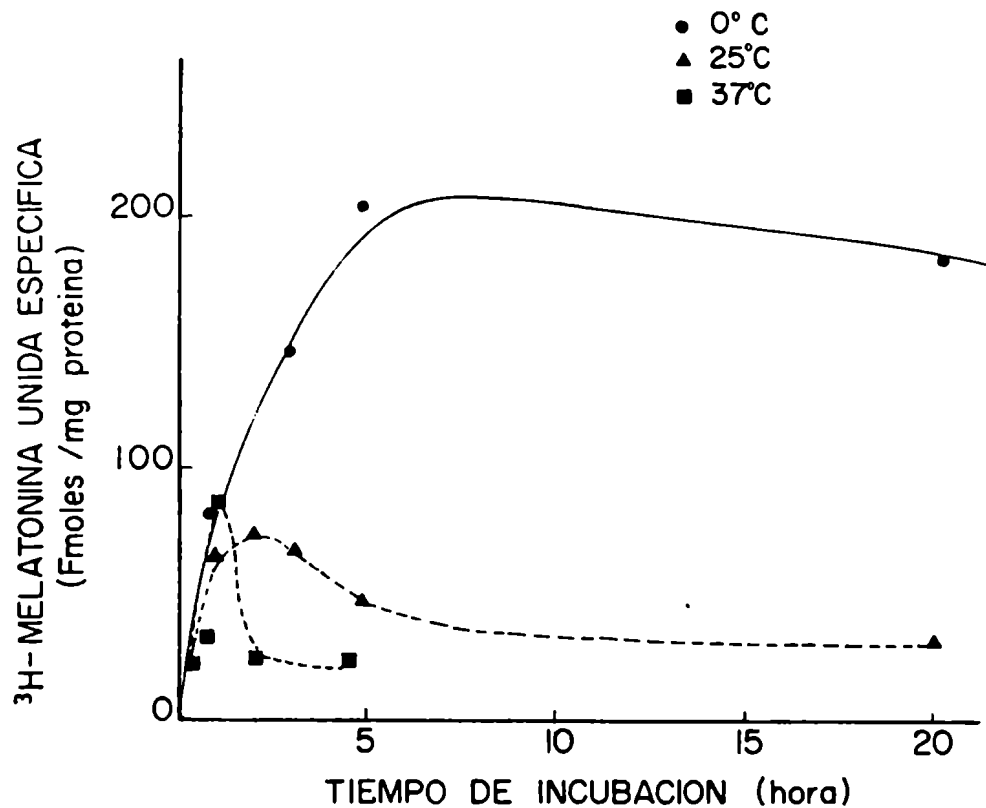


Fig.24 : Asociación de ^3H -melatonina a membranas pineales a distintas temperaturas en función del tiempo de incubación. La unión específica fue determinada según se describe en Materiales y Métodos luego de la incubación de preparaciones de membrana con 600 nM de ^3H -melatonina por los tiempos indicados en la figura. Cada punto es la media de 3 determinaciones.

máxima unión se observó a pH fisiológico (7.4) con disminución gradual a pH menor y mayor. La asociación a pH 6.5 y 8.4 fue un 80 y 87% respectivamente de la obtenida a pH 7.4.

La naturaleza proteica del componente de membrana con actividad de unión para la melatonina es sugerida por la inhibición de dicha unión a un 5% luego de la preincubación durante 15 minutos con tripsina (5mg/ml) y por su abolición luego de someter el homogenato a ebullición por igual tiempo.

Tanto el agregado de iones monovalentes como divalentes al medio de incubación inhibió la asociación de melatonina a sus sitios específicos de unión en la glándula pineal. Esta dependencia del entorno iónico para la unión a sitios receptores se asemeja a lo que ocurre con otras sustancias como las endorfinas, glicina y GABA¹⁴⁰ y con el receptor para melatonina en HMB⁶³ (Tabla VI).

La posible alteración de la melatonina luego de su asociación a los sitios de unión fue examinada por cromatografía en capa delgada de los extractos clorofórmicos usando los sistemas de eluyentes descritos en Materiales y Métodos. Más del 95% de la radiactividad extraída co-cromatografió con el standard puro de melatonina. Este comportamiento cromatográfico sugiere que los sitios de unión para melatonina en la glándula pineal no tienen vinculación con sistemas enzimáticos de degradación de la hormona. Esto también se verificó in vitro en incubaciones de explantes pineales durante 2 h a 37 C. Por su parte, Wurtman y col.¹⁴¹ comprobaron que casi toda la radiactividad recuperada en glándulas pineales de gatos administrados 1 h antes con ³H-melatonina también co-cromatografiaba con el standard de melatonina. Considerados en conjunto estos datos apoyan la conclusión que la glándula pineal carece de sistemas enzimáticos para la metabolización de la melatonina.

Tabla VI: Influencia de la composición iónica del buffer sobre la asociación específica de ^3H -melatonina a preparaciones crudas de membranas pineales.*

Sal	Concentración (mM)	^3H -melatonina unida específica	
		fmoles/mg prot.	% del Máximo
-	-	158.7 \pm 15.7	100
NaCl	120	104.9 \pm 14.8**	66
	40	124.4 \pm 12.6	78
	10	121.4 \pm 7.4	77
KCl	100	90.8 \pm 15.1**	57
	10	87.4 \pm 14.7**	55
	5	141.7 \pm 11.7	89
CaCl ₂	6	104.1 \pm 6.9**	66
	3	109.4 \pm 11.2**	69
MgCl ₂	2.5	127.2 \pm 40.7	80
	1.25	135.1 \pm 31.9	85

*Alícuotas de las preparaciones de membrana se incubaron a 0 C durante 5 h con 600 nM de ^3H -melatonina en buffer Tris-HCl, pH 7.4 conteniendo 0.1% de ácido ascórbico y sales según se indica en la Tabla. La unión específica se determinó como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como Media \pm ES (n = 5 en cada grupo). Los datos fueron analizados por un análisis de la varianza seguido por un test de Dunnet para comparaciones múltiples.

**Significativamente diferente de la unión específica en ausencia de sal (p < 0.05).

Tabla VII: Distribución subcelular de los sitios de unión específicos de ^3H -melatonina a membranas de glándula pineal bovina.*

Fracción	^3H -melatonina unida a sitios específicos		
	fmoles/mg de proteína	fmoles/g tejido	% del total
Ppdo 900 x g	73.2 \pm 6.1	1615.0 \pm 134.2	39
Ppdo 27000 x g	97.4 \pm 7.3***	2060.0 \pm 154.8	50
Ppdo 105000 x g	53.8 \pm 2.3**	459.8 \pm 19.8	11

*Los homogenatos de glándula pineal bovina se fraccionaron por centrifugación diferencial y, en las distintas fracciones, se midió la unión específica de ^3H -melatonina según se describe en Materiales y Métodos. Alícuotas de 250 μl de las distintas fracciones se incubaron durante 5 h a 0 C con 600 nM de ^3H -melatonina en presencia o en ausencia de 100 μM de melatonina no marcada.

Los resultados se expresan como Media \pm ES (n = 4 en cada grupo).

Los datos se analizaron por análisis de varianza seguido por test de Tukey para comparaciones múltiples¹⁴².

**Diferencia significativa con respecto al precipitado de 900 x g (p < 0.05) y el precipitado de 27000 x g (p < 0.01).

***Diferencia significativa con respecto al precipitado de 900 x g (p < 0.05) y el precipitado de 105000 x g (p < 0.01).

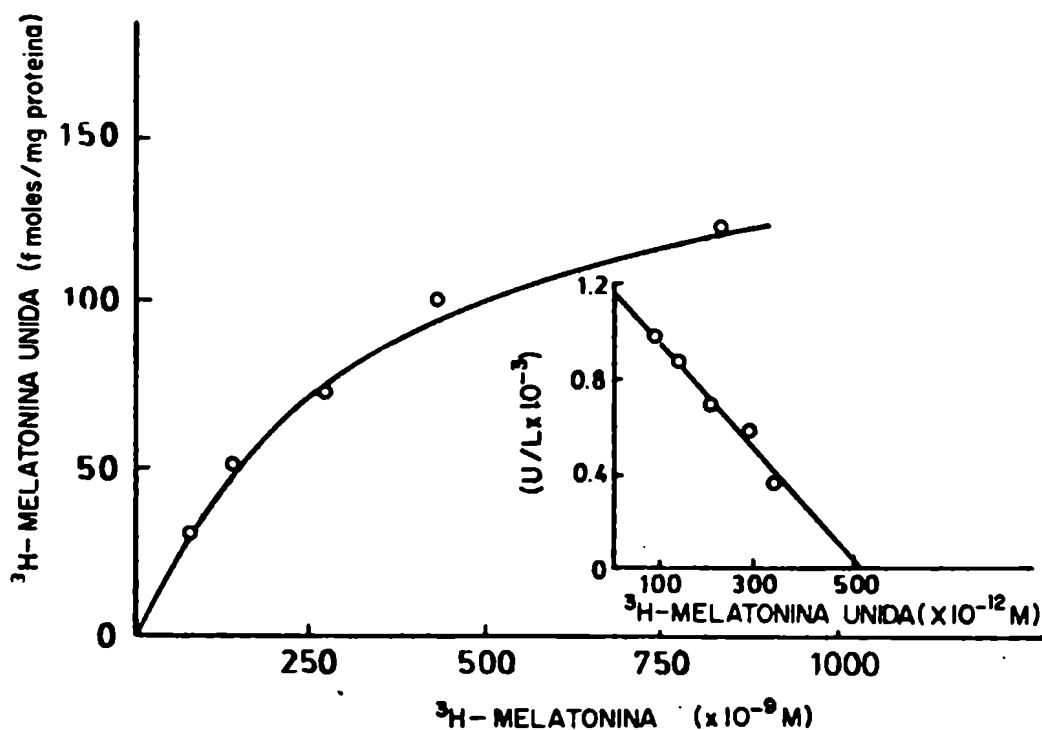


Fig. 25: Unión específica de ^3H -melatonina a membranas de glándula pineal bovina como función de concentraciones crecientes de ^3H -melatonina en el medio. Cada punto es la media de triplicados de muestras. A la derecha se muestra el gráfico de Scatchard. En este experimento $K_d = 5.0 \times 10^{-7}$ M; concentración máxima de sitios de unión específicos: 185 fmoles/mg de proteína.

Tabla VIII: DE_{50} y K_1 de una variedad de indoles para los sitios de unión de 3H -melatonina en membranas pineales bovinas.*

Agente	DE_{50} ($10^{-6}M$)	(r)	K_1 ($10^{-7}M$)
Melatonina	1.8	0.96	9
N-acetilserotonina	24.0	0.98	120
Serotonina	26.1	0.91	130
2-Metilindol	30.8	0.90	154
5-Hidroxitriptofol	43.7	0.99	210
5-Metoxitriptamina	53.1	0.93	266
5-Metoxitriptofol	132	0.99	660
Triptamina	348	0.93	1740
5-Hidroxiindolacético	691	0.93	3455
5-Metoxiindolacético	2538	0.98	12690
5-Hidroxitriptofano	2720	0.93	13600
6-Hidroxi melatonina	11110	0.97	55550

*Las preparaciones de membrana se incubaron por triplicado durante 5 h a 0 C con concentraciones variables (mínimo: 4) del agente inhibidor y 700 nM de 3H -melatonina. Los datos de unión específica obtenidos se graficaron en papel log-probit para determinar la concentración del agente que causa una inhibición del 50% de la unión máxima de 3H -melatonina (DE_{50}). Las pendientes e intersecciones se calcularon por análisis de regresión. Los coeficientes de regresión (r) se han detallado en la Tabla. La K_1 , constante de disociación para el agente inhibitorio de la unión de 3H -melatonina, fue calculada igual que en la Tabla II.

La Tabla VII muestra los resultados del estudio de la distribución subcelular de los sitios de unión específicos de melatonina en los componentes de membranas pineales. La unión fue mayor (50% del total) en la fracción mitocondrial cruda (27000 x g), la cual contiene también vesículas y fracciones de membrana, mientras que en el precipitado de 900 x g y 105000 x g se localizó el 39% y 11% de los sitios de unión específicos respectivamente.

En la Fig. 25 se observa la clásica curva de saturación de la unión específica de ³H-melatonina en función de la concentración creciente de la hormona marcada en el medio de incubación. El análisis de estos datos según el método de Scatchard reveló una única población de sitios de unión específicos de 185-356 fmoles/mg de proteína con una K_d aparente de $(7.0 \pm 1.5) \times 10^{-7} M$ (Media \pm ES; n = 4).

A fin de esclarecer la especificidad de la unión de ³H-melatonina a membranas de glándula pineal bovina, se determinó la capacidad relativa de análogos de este compuesto en competir con el mismo por sus sitios de unión. Se realizaron ensayos de unión con una cantidad constante de ³H-melatonina (700 nM) en presencia de cantidades crecientes de indoles no marcados obteniéndose el siguiente orden de afinidad: melatonina > N-acetilserotonina > serotonina > 2-metilindol > 5-hidroxitriptofol > 5-metoxitriptamina > 5-metoxitriptofol > triptamina > > 5-hidroxiindolacético > 5-metoxiindolacético > 5-hidroxitriptofeno > > 6-hidroxi melatonina (Tabla VIII).

En conjunto, estos resultados indican la presencia de posibles receptores pineales para melatonina y avalan la existencia en la glándula pineal de fenómenos de transducción endócrino-endócrina.

3.-Transducción endócrino-neural

3-1.- Metabolismo de la serotonina en la glándula pineal. Cambios por

el tratamiento con hormonas reproductivas.

Tal como se indicó en la Introducción, la peculiaridad de la glándula pineal de sintetizar y almacenar cantidades elevadas de serotonina la han convertido en modelo ideal para el estudio de síntesis y metabolismo de indolaminas que se ha extrapolado después a las neuronas serotoninérgicas^{99,143}. Por lo tanto, la glándula pineal ofrece una situación propicia para el estudio de los mecanismos de transducción endócrino-neural en sistemas serotoninérgicos.

En la siguiente serie de experimentos se analizaron los cambios en el contenido de serotonina pineal luego de la castración y sustitución hormonal. La castración en ratas macho, pero no en ratas hembra, resultó en un incremento significativo de la concentración de serotonina pineal (Fig. 26). La inyección de testosterona (400 ug, 2 veces por día, durante 3 días) revirtió el efecto de la orquidectomía en forma parcial, mientras que el estradiol (0.5 y 2.0 ug en 2 días consecutivos) también redujo los niveles de serotonina en las ratas ovariectomizadas.

Con el objeto de examinar la posible participación de las gonadotropinas y prolactina en estos cambios, dichas hormonas fueron administradas a ratas macho inmediatamente después de la castración (a fin de minimizar la contribución post-castración de FSH y LH endógenas)¹⁴⁴ (Tabla IX). FSH o LH (2 inyecciones de 100 ug, 3 y 18 h luego de la orquidectomía) incrementaron los niveles de serotonina pineal en un 23 y 19% respectivamente, mientras que la prolactina (2 inyecciones diarias de 200 ug) careció de efectos.

Luego de la hipofisectomía (Tabla X) se observó una disminución significativa de la concentración de serotonina pineal en ratas macho.

Es aceptado, en forma general, que los niveles neuronales de monoaminas como la serotonina no son un indicador sensible de su funcio-

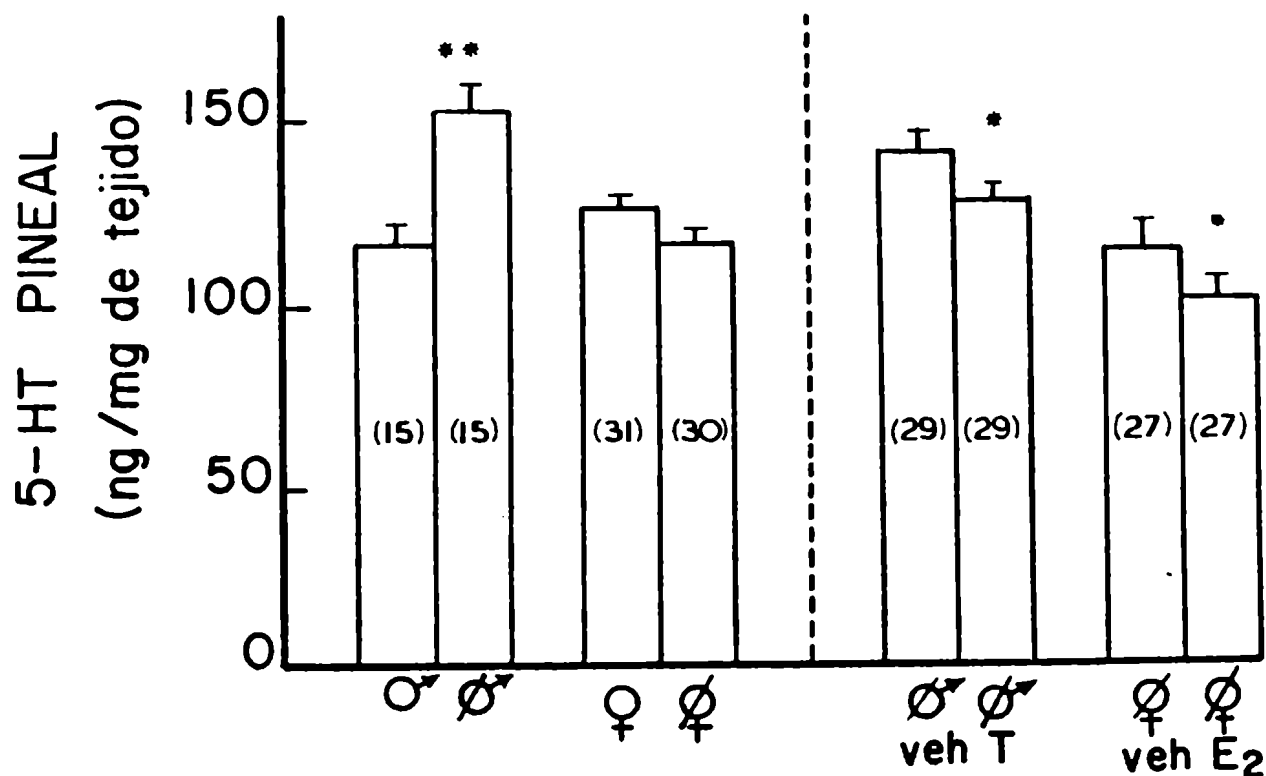


Fig. 26: Efectos de la castración y de la sustitución con estradiol y testosterona sobre el contenido de serotonina pineal en ratas macho y hembra. Los animales se trataron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como Media \pm ES (n).

p < 0.05 con respecto a su control (test de Student).

p < 0.01 con respecto a su control (test de Student).

Tabla IX : Efecto de FSH, LH y Prolactina sobre los niveles de serotonina pineal en ratas orquidectomizadas.*

Tratamiento	Serotonina pineal (ng/mg de tejido)
Vehículo	133.5 ± 5.6 (28)
FSH (2 x 100 ug)	163.6 ± 4.4 (32)**
LH (2 x 100 ug)	158.8 ± 3.6 (30)**
Prolactina (2 x 200 ug)	135.4 ± 5.5 (17)

*Los animales se trataron con las dosis de hormona indicadas en la Tabla y en el esquema indicado en Materiales y Métodos.

Los datos se expresan como Media ± ES (n).

**p < 0.01 con respecto al vehículo (test de Dunnet)¹⁴⁹.

Tabla X: Efecto de la hipofisectomía sobre el contenido de serotonina pineal.

	<u>serotonina (ng/mg de tejido)</u>
Operación simulada	131.4 \pm 8.7 (6)
Hipofisectomía	75.2 \pm 9.8 (6)

Ratas macho adultas fueron hipofisectomizadas 7 días antes del sacrificio. Los resultados se expresan como Media \pm ES (n). Las diferencias entre las Medias son significativas ($p < 0.05$, test t de Student).

nalidad ya que la homeostasis del sistema tiende a mantenerlos constantes a pesar de que se produzcan cambios importantes en la actividad neuronal⁹⁶. Fue por esta razón que utilizamos otros aspectos del metabolismo de la serotonina pineal, aplicando como recurso farmacológico la inyección de PCPA, un inhibidor irreversible de la triptofano hidroxilasa. En estas condiciones se produce una inhibición total de la síntesis de serotonina, siendo el decaimiento progresivo en la concentración de la amina un indicador de su "turnover" o velocidad de recambio (VR).

El tiempo de vida media de la amina ($T_{1/2}$) fue: 74 min. en machos controles y 69 min. en hembras controles (Fig. 27). De dicho valor y, por lo tanto, de la constante de decaimiento (k) considerada en la Tabla XI, se calculó la VR según la fórmula: $VR = k [serotonina]_0$, donde $[serotonina]_0$ corresponde a la concentración de la amina en el estado de equilibrio, es decir, el previo a la administración de PCPA. La ovariectomía no resultó en cambios significativos del $T_{1/2}$ mientras que la orquidectomía lo disminuyó en un 44%; sin embargo, como este último procedimiento incrementó la concentración de serotonina pineal, los cambios en la VR fueron menos evidentes.

Luego de la inyección de testosterona, FSH, LH o prolactina a ratas castradas se observó una aceleración significativa del "turnover" de serotonina pineal (Fig. 28 y Tabla XI). Por el contrario, la administración de estradiol prolongó el $T_{1/2}$ en forma significativa.

En síntesis, el $T_{1/2}$ aumentó luego de la orquidectomía y tratamiento con estradiol y disminuyó después de la inyección de testosterona, FSH, LH y prolactina (Tabla XI).

En la siguiente serie de experimentos se investigó el efecto de los diversos tratamientos hormonales sobre la actividad de una de las enzimas responsables de la metabolización de la serotonina, la MAO. Se

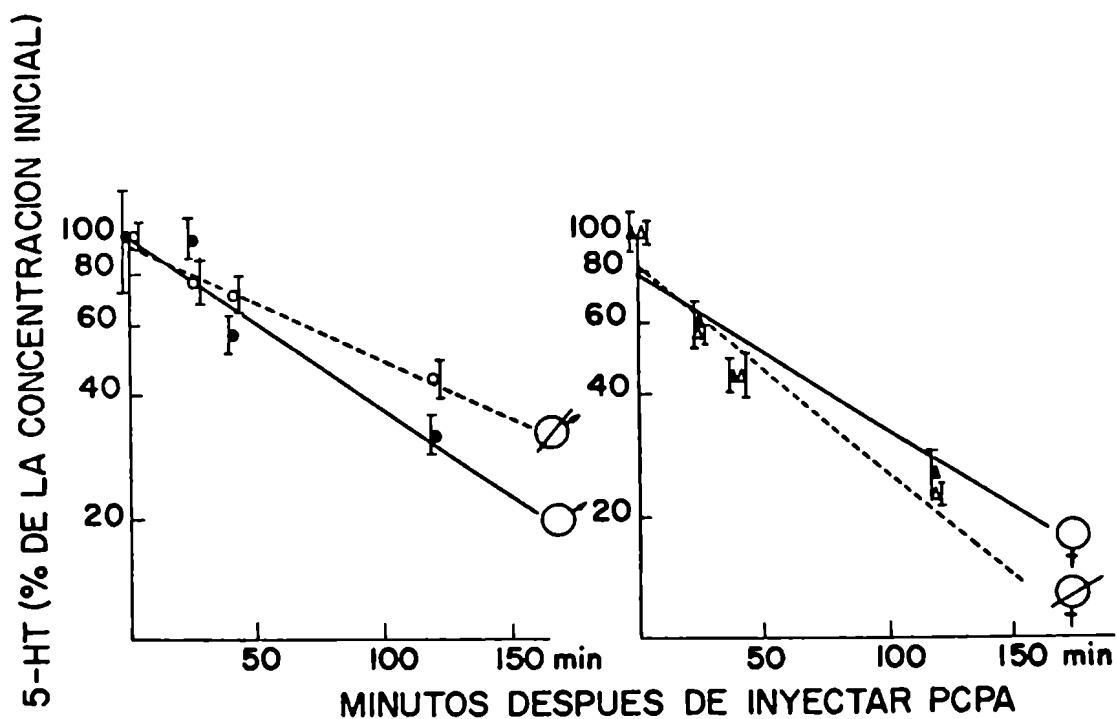


Fig. 27: Efecto de la castración sobre el "turnover" de serotonina pineal luego del tratamiento con PCPA. Cada punto es la Media \pm ES de, por lo menos, 4 determinaciones. Los valores de k , $T_{1/2}$ y VR de serotonina están indicados en la Tabla XI. La disminución por orquidectomía resultó significativa ($p < 0.05$, análisis de covarianza).

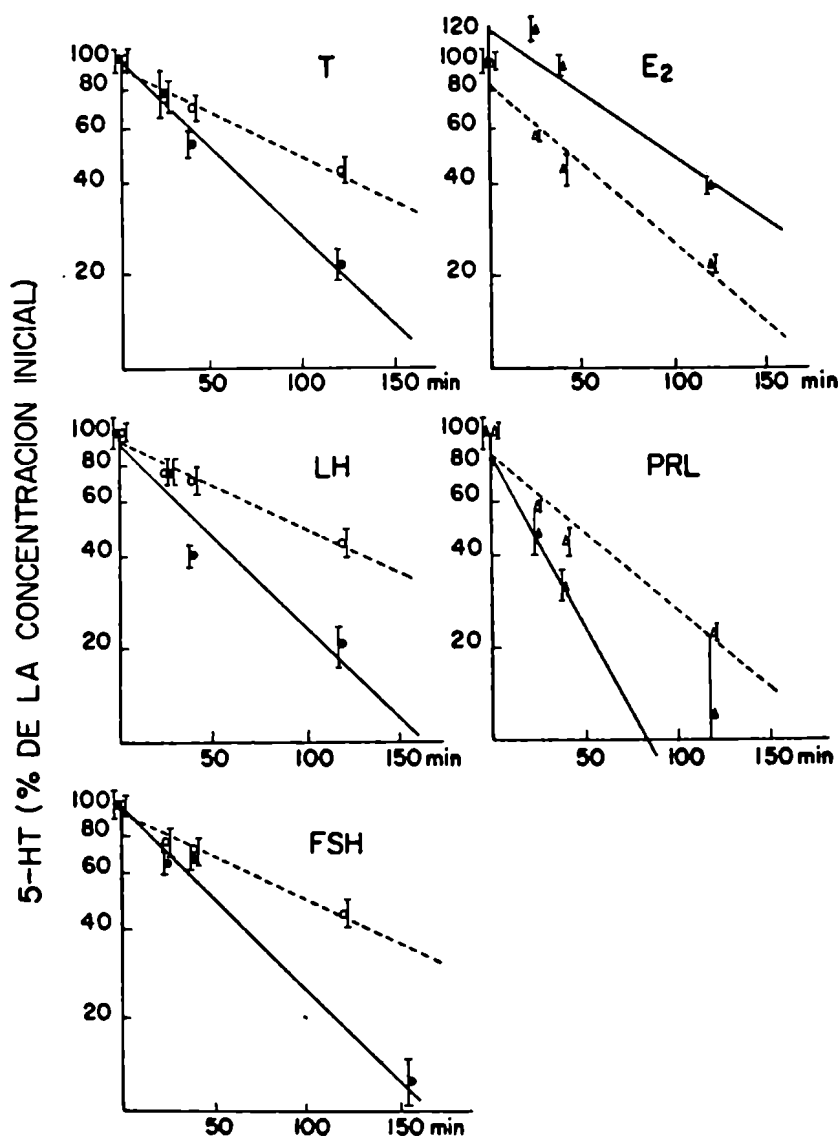


Fig. 28: Efectos de las hormonas reproductivas en el "turnover" de serotonina pineal luego del tratamiento con PCPA. o---o: machos inyectados con vehículo; ■—■: machos inyectados con hormonas; △---△: hembras inyectadas con vehículo; ▲—▲: hembras inyectadas con hormonas. La aceleración del decaimiento por testosterona (T), LH, FSH y prolactina (PRL) y su disminución por estradiol (E₂) es significativa ($p < 0.05$, análisis de covarianza). Los valores de k , $T_{1/2}$ y VR se hallan indicados en la Tabla XI.

Tabla XI: Efectos de la castración y de las distintas hormonas reproductivas sobre el tiempo de vida media ($T_{1/2}$), la constante de decaimiento (k) y la velocidad de recambio (VR) de serotonina pineal medida en ratas tratadas con PCPA.

Tratamiento	$T_{1/2}$ (min)	k (min) ⁻¹	VR ng de serotonina/ mg de tejido/min.
Machos controles	74	0.0093	1.04
Hembras controles	69	0.0100	0.98
Orquidectomía	107*	0.0065*	0.93*
Ovariectomía	60	0.0115	1.12
Testosterona	55**	0.0125**	1.57**
Estradiol	78**	0.0089**	1.13
FSH	50**	0.0138**	2.25**
LH	52**	0.0133**	1.93**
Prolactina	30**	0.0232**	2.52**

Los valores de esta Tabla se calcularon a partir de los datos de las Fig. 27 y 28 según se describe en Materiales y Métodos.

* $p < 0.05$ respecto al animal entero (análisis de covarianza)

** $p < 0.05$ respecto al animal castrado control (análisis de covarianza).

Tabla XII: Efecto de la gangliectomía sobre la actividad MAO en la glándula pineal de ratas macho.

<u>MAO</u>	<u>Op. simulada</u>	<u>Gangliectomía</u>
tipo A	41.9 ± 35.6 (28)	16.4 ± 3.8 (26)*
tipo B	536.6 ± 41.8 (19)	558.0 ± 45.1 (19)

Los animales se gangliectomizaron 7 días antes del sacrificio.
 Los resultados se expresan como pmoles de producto/mg de proteína/
 /min.; Media ± ES (n).

*p < 0.01 con respecto a operación simulada.

Tabla XIII: Efecto de la testosterona y estradiol sobre la actividad MAD de la glándula pineal.

<u>MAD</u>	<u>Vehículo</u>	<u>Testosterona</u>	<u>Vehículo</u>	<u>Estradiol</u>
tipo A	44.9 ± 4.6 (11)	51.8 ± 3.5 (12)	75.2 ± 8.5 (16)	49.8 ± 4.3 (17)*
tipo B	740.4 ± 73.6 (11)	938.8 ± 61.2 (12)*	692.4 ± 76.4 (14)	740.8 ± 56.2 (16)

Los resultados se expresan como pmoles de producto/mg de proteína/min.; Media ± ES (n).

Se inyectaron 400 ug de testosterona 2 veces por día durante 3 días, o 0.5 y 2 ug de estradiol en dos días consecutivos.

*p < 0.05 con respecto al vehículo, test t de Student .

Tabla XIV: Efecto de FSH, LH y prolactina sobre la actividad MAO de la glándula pineal de ratas orquidectomizadas.

	MAO	
	<u>tipo A</u>	<u>tipo B</u>
vehículo	94.5 ± 8.2 (13)	949.0 ± 92.3 (5)
FSH	80.7 ± 10.0 (15)	516.1 ± 57.1 (6)*
LH	68.9 ± 7.4 (12)	498.0 ± 44.2 (7)*
prolactina	45.4 ± 5.6 (15)*	504.8 ± 30.5 (6)*

Las hormonas fueron inyectadas 3 y 18 h luego de la castración (FSH y LH: 100 ug por inyección; prolactina: 200 ug por inyección). Los resultados se expresan como pmoles de producto/mg de proteína/min., Media ± ± ES (n).

*p < 0.05 en relación al vehículo (test de Dunnet)¹⁴⁹.

evaluaron los dos tipos de actividad MAO descritos en la glándula pineal: MAO tipo A (intraneuronal) y B (intrapinealocito) (Tablas XII y XIV).

La glándula pineal contiene un 90% de MAO B y un 10 % de MAO A. La gangliectomía cervical superior sólo altera la MAO A, disminuyéndola en unos dos tercios (Tabla XII). El tratamiento de ratas orquidectomizadas con testosterona resultó en un incremento del 27% en la MAO B sin afectar la tipo A (Tabla XIII) mientras que la inyección de las trofinas hipofisarias redujo la actividad de la MAO B (FSH y LH) o de ambas (prolactina)(Tabla XIV). En ratas ovariectomizadas la administración de estradiol disminuyó la actividad de la MAO A en un 34% sin alterar la MAO B (Tabla XIII).

3-2.- Efecto de FSH y LH sobre el "turnover" de NE en la glándula pineal y GCS.

El estudio del "turnover" de $^3\text{H-NE}$ en las terminales simpáticas es considerado como el mejor indicador bioquímico de la actividad neuronal ^{99,145}. La degeneración de las terminales nerviosas simpáticas en la glándula pineal, producida por desconexión de las mismas con el GCS, produce una marcada disminución en la captación de $^3\text{H-NE}$ inyectada i.v., lo que indica que el compuesto marcado es captado y retenido por las terminales nerviosas pineales (Tabla XV) ^{89,146}. En el GCS la captación de $^3\text{H-NE}$ probablemente ocurra también a nivel de las terminales nerviosas intraganglionares, dado que interneuronas conteniendo NE^{147} y sitios de acción presinápticos para la NE^{148} ya han sido descritos en esta estructura.

Con el objeto de estudiar los posibles cambios por gonadotrofinas en la actividad neural aferente a la glándula pineal, se utilizaron ratas hembra a las que se castró en la mañana del estro y se inyectó

Tabla XV: Efectos de la desnervación sobre la captación de ^3H -norepi
nefrina por glándula pineal de rata*.

<u>Tratamiento</u>	<u>^3H-NE pineal**</u>
Op. simulada	750 \pm 60 (6)
Descentralización	7230 \pm 668 (6)***

*Los animales fueron gangliectomizados 7 días antes del sacrificio.

**Los resultados se expresan como dpm de ^3H -NE/mg pineal, Media \pm ES (n).

***p < 0.01 con respecto a los animales con operación simulada (test t de Student).

con 100 ug de FSH o LH a las 1600 h del mismo día y a las 0900 y 1600 h de los dos días subsiguientes. Este diseño experimental fue elegido porque en los animales inyectados con vehículo no ocurren modificaciones en LH plasmático y hay un leve incremento en FSH en el momento del sacrificio¹⁴⁴. El "turnover" de NE fue estimado a partir de la desaparición del tejido de una dosis trazadora de ³H-NE inyectada intravenosamente. La NE fue aislada por cromatografía de adsorción sobre columna de alúmina como se describe en Materiales y Métodos.

El tratamiento con gonadotrofinas resultó en cambios significativos en la cantidad de ³H-NE captada y metabolizada por la glándula pineal (Fig. 29). La captación inicial del compuesto fue menor en los animales tratados con FSH o LH y decayó más lentamente ($p < 0.01$, análisis de covarianza). El análisis de regresión lineal de los datos indicó los valores de captación inicial, $T_{1/2}$, k y VR de la amina de la Tabla XVI.

La captación inicial de ³H-NE por el GCS fue mayor en los animales tratados con FSH y decayó más rápidamente en función del tiempo que en los controles (Fig. 29, $p < 0.05$, análisis de covarianza). Dichos cambios no se observaron luego de la administración de LH (Fig. 29). El análisis de regresión de los datos de la Fig. 29 indicó los valores de captación inicial, $T_{1/2}$, k y VR de NE de la Tabla XVII.

Con el fin de determinar la selectividad de estos cambios, se realizó la misma serie de experimentos en corazón y glándula suprarrenal (Fig. 30). No hubo cambios en el "turnover" de NE por gonadotrofinas en los tiempos estudiados, aunque debe señalarse que es necesario examinar el "turnover" a intervalos más prolongados (6-24 h) antes de establecerse una conclusión definitiva, dada la lentitud de recambio del neurotransmisor en estas estructuras. Tampoco se observaron efectos de

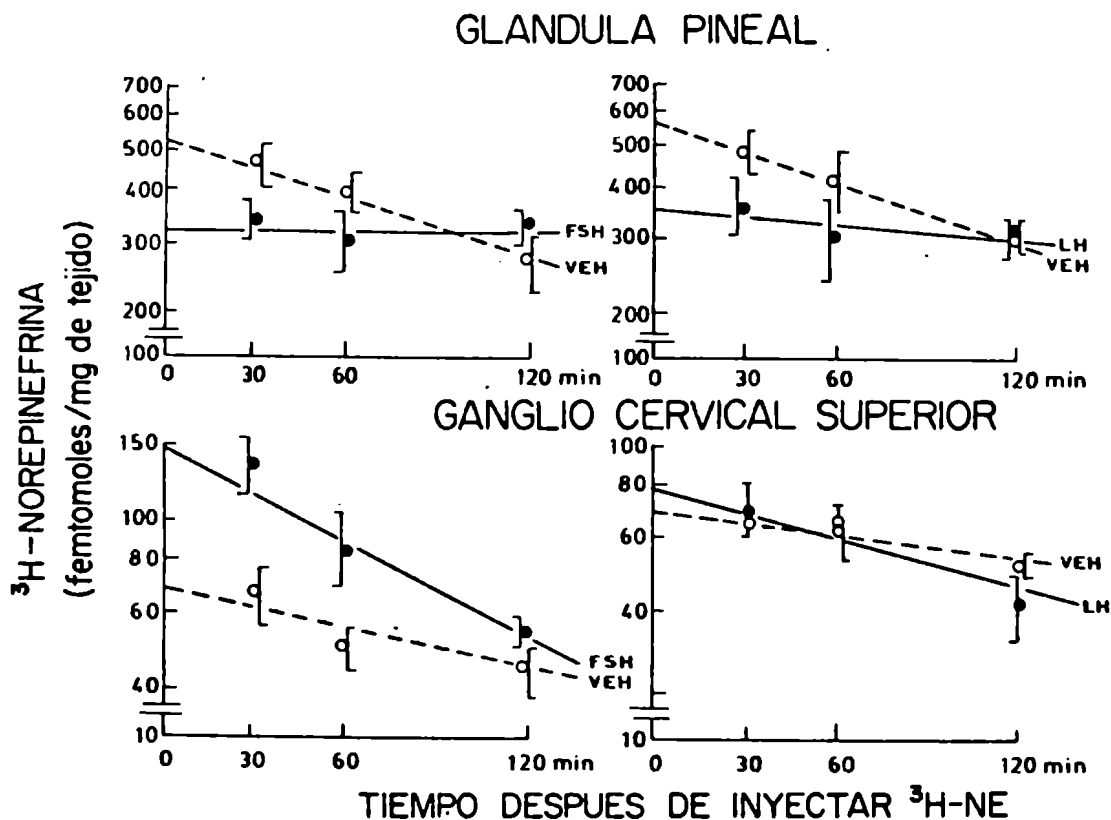


Fig. 29: Efectos de FSH y LH sobre el "turnover" de NE en glándula pineal y GCS de ratas hembra castradas tratadas según se describe en el texto. La pendiente e intersección de animales tratados difieren en la pineal (FSH y LH) ($p < 0.01$) y GCS (FSH) ($p < 0.05$, análisis de covarianza). Media \pm ES, $n = 5$ a 7 animales/grupo.

Tabla XVI: Efecto de FSH o LH sobre la captación inicial (CI), tiempo de vida media ($T_{1/2}$), constante de decaimiento (k) y velocidad de recambio (VR) de $^3\text{H-NE}$ en glándula pineal de ratas ovariectomizadas.

	CI (fmoles/mg)	$T_{1/2}$ (min.)	k (min. ⁻¹)	VR (fmoles/mg/min)
<u>Experimento 1</u>				
Vehículo	530	113	0.0061	3.23
FSH	315*	6980*	0.0001*	0.0315*
<u>Experimento 2</u>				
Vehículo	570	122	0.0059	3.363
LH	353*	995*	0.0007*	0.247*

Los valores de esta Tabla se calcularon a partir de los datos de la Fig. según se describe en Materiales y Métodos.

*p < 0.05 respecto al animal tratado con vehículo (análisis de covarianza)

Tabla XVII: Efecto de FSH o LH sobre la captación inicial (CI), tiempo de vida media ($T_{1/2}$), constante de decaimiento (k) y velocidad de recambio (VR) de $^3\text{H-NE}$ en GCS de ratas ovariectomizadas.

	<u>CI</u> (fmoles/mg)	<u>$T_{1/2}$</u> (min.)	<u>k</u> (min. ⁻¹)	<u>VR</u> (fmoles/mg/min)
<u>Experimento 1</u>				
Vehículo	68	161	0.0043	0.292
FSH	150*	77*	0.0090*	1.35*
<u>Experimento 2</u>				
Vehículo	78	231	0.0030	0.234
LH	70	124	0.0056	0.392

Los valores de esta Tabla se calcularon a partir de los datos de la Fig. según se describe en Materiales y Métodos.

*p < 0.05 respecto al animal tratado con vehículo (análisis de covarianza)

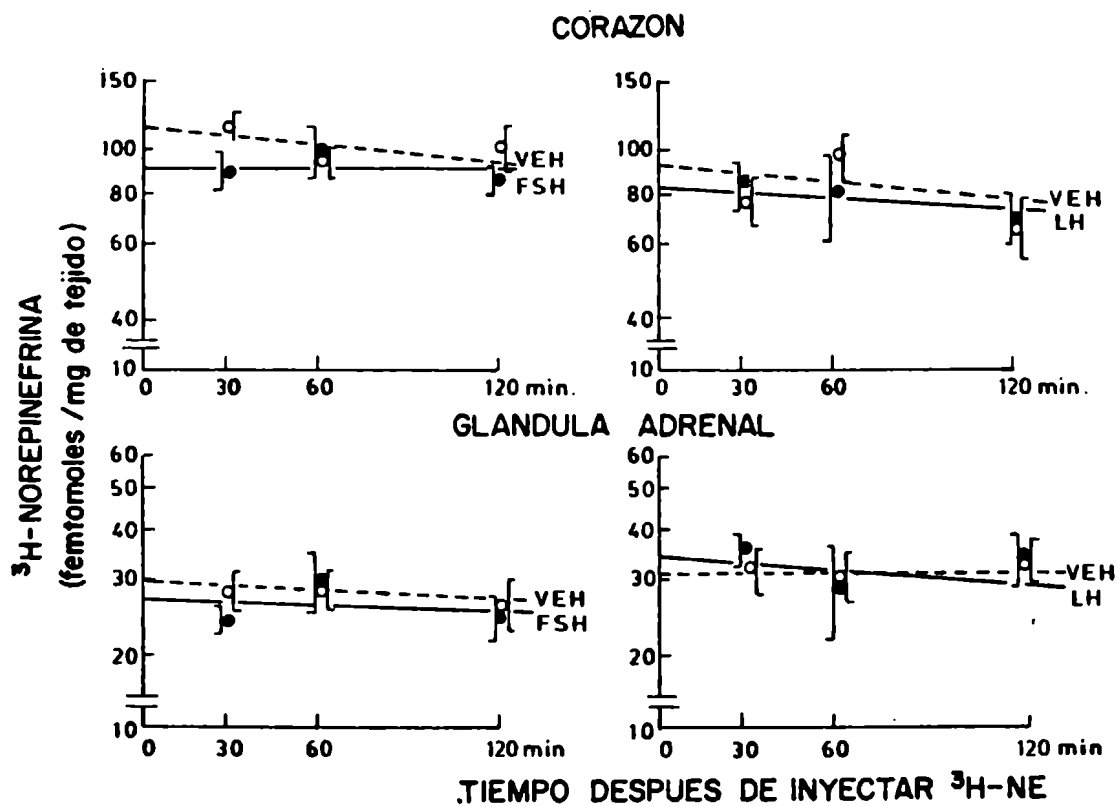


Fig.30 : Efectos de FSH y LH sobre el "turnover" de NE en corazón y glándula suprarrenal de ratas hembra castradas. Media \pm ES, n = 5 a 7 animales/grupo.

Tabla XVIII: Efecto de FSH y LH sobre el contenido de norepinefrina de corazón y de norepinefrina y epinefrina de la glándula suprarrenal.

	<u>Experimento 1</u>		<u>Experimento 2</u>	
	<u>veh.</u>	<u>FSH</u>	<u>veh.</u>	<u>LH</u>
Norepinefrina (corazón)	0.98 ± 0.01 (20)	0.99 ± 0.02 (16)	1.01 ± 0.02 (22)	1.04 ± 0.02 (19)
Norepinefrina (adrenal)	360 ± 30 (22)	362 ± 23 (20)	352 ± 27 (20)	347 ± 18 (21)
Epinefrina (adrenal)	79 ± 3 (22)	81 ± 5 (20)	83 ± 7 (20)	84 ± 4 (21)

Ratas hembra castradas fueron tratadas con FSH y LH según se describe en el texto. Los resultados se expresan como ug/g de tejido, Media ± ES (n).

Tabla XIX: Efecto de FSH y LH sobre la actividad de MAO en glándula pineal y GCS.

<u>MAO</u>	<u>glándula pineal</u>				<u>GCS</u>			
	<u>veh.</u>	<u>LH</u>	<u>FSH</u>	<u>veh.</u>	<u>LH</u>	<u>FSH</u>	<u>LH</u>	<u>FSH</u>
tipo A	93.4 ± 8.1 (8)	83.6 ± 12.9 (7)	101.5 ± 9.6 (7)	182.8 ± 41.1 (14)	200.0 ± 36.3 (14)	327.6 ± 38.2* (15)		
tipo B	960.9 ± 93.3 (5)	496.4 ± 44.5* (7)	522.8 ± 58.0* (6)	93.3 ± 17.0 (12)	60.4 ± 5.9 (13)	88.9 ± 7.2 (15)		

Los resultados se expresan como pmoles de producto/mg de proteínas/min, media ± ES (n).
*p < 0.05 en relación a su control (test de Dunnett)¹⁴⁹.

los tratamientos sobre la concentración de NE en corazón y glándula adrenal, o de epinefrina en adrenal, determinadas espectrofluorimetricamente (Tabla XVIII). Aunque las bajas concentraciones de NE de la glándula pineal y GCS no permitieron su determinación por métodos espectrofluorométricos, resultados previos indican que dichos niveles medidos por procedimientos radioenzimáticos, no se modifican en situaciones en que cambia marcadamente la secreción de FSH o LH, por ejemplo, luego de 3 inyecciones diarias de estradiol (2. ug) o testosterona (500 ug) a ratas castradas⁸⁹.

Entre los múltiples factores que podrían dar cuenta de los cambios en el "turnover" de ³H-NE se estudió la deaminación oxidativa de la amina. Ambas gonadotropinas disminuyeron la actividad de la MAO tipo B pineal en las ratas hembra castradas de la misma forma que en los machos orquidectomizados y sólo FSH incrementó en un 79% la actividad de MAO tipo A ganglionar (Tabla XIX).

3-3.- Efectos del tratamiento hormonal sobre el contenido de serotonina de la glándula pineal en animales gangliectomizados o descentralizados.

De la serie de experimentos anteriores surgió la necesidad de evaluar si el cambio primario en el efecto de la FSH, LH y testosterona sobre el metabolismo de la serotonina pineal ocurría en el pinealocito. Para ello se recurrió al uso de animales con terminales nerviosas pineales en degeneración (gangliectomía) o con interrupción del tráfico neural aferente en la neurona ganglionar (descentralización) determinándose en ellos el efecto de los diversos tratamientos hormonales sobre los niveles de serotonina pineal (Tabla XX).

La inyección de LH o FSH incrementó la concentración de serotonina en la glándula pineal tanto en animales controles como gangliectomi

Tabla XX: Efecto de hormonas reproductivas sobre los niveles de serotonina pineal en ratas gangliectomizadas o descentralizadas.

	<u>veh.</u>	<u>testosterona</u>	<u>veh.</u>	<u>FSH</u>	<u>LH</u>
Operación simulada	150.5 ± 10.7 (8)	103.3 ± 9.9* (8)	138.0 ± 7.5 (19)	175.9 ± 5.6** (22)	171.2 ± 4.5** (20)
Gangliectomía	95.9 ± 3.4 (14)	136.6 ± 7.8* (14)	96.7 ± 3.8 (7)	117.2 ± 7.9** (7)	137.0 ± 4.8** (8)
Descentralización	91.9 ± 10.0 (7)	112.1 ± 8.3 (7)	122.8 ± 11.0 (8)	110.0 ± 7.7 (8)	107.4 ± 8.7 (6)

Los animales fueron operados 7 días antes y sometidos a los tratamientos hormonales como en Tablas XIII y XIV. Los resultados se expresan en ng/mg de pineal; media ± ES (n).

*p < 0.01 con respecto al vehículo (test t de Student).

**p < 0.05 con respecto al vehículo (test de Dunnett)¹⁴⁹.

zados ($p < 0.01$). El análisis factorial (cirugía x hormona)¹³⁷ reveló una interacción significativa ($p < 0.01$) entre FSH y gangliectomía observándose un menor aumento en los niveles de indolamina en el animal desnervado. También se detectaron interacciones ($p < 0.01$) entre FSH o LH y descentralización, aboliendo este procedimiento el efecto de las gonadotrofinas (Tabla XX).

En los animales tratados con testosterona el análisis factorial indicó una interacción significativa ($p < 0.01$) entre la hormona y la remoción o desnervación ganglionar; la disminución en los niveles de la amina pineal por testosterona en animales controles se abolió por descentralización y trocose en estimulación luego de la gangliectomía (Tabla XX).

La gangliectomía cervical superior, y en menor grado, la descentralización, produjeron una disminución significativa de la concentración de la indolamina pineal (análisis factorial, $p < 0.05$).

Estos resultados indican en conjunto la existencia de efectos directos de las gonadotrofinas y la testosterona sobre la glándula pineal así como en las neuronas que la inervan y por tanto de fenómenos de transducción endócrino-endócrinos y endócrino-neurales en el presente modelo.

3-4.- Efectos del estradiol sobre el GCS.

Observaciones previas indicaban que el tratamiento estrogénico mo dificaba la captación de NE y la actividad de la tirosina hidroxilasa del GCS y planteaban la posibilidad que el GCS fuera un sitio de acción para el estradiol. Se decidió entonces realizar la siguiente serie de experimentos tendientes a determinar efectos de la hormona sobre varios componentes metabólicos y actividades enzimáticas relevantes del ganglio y que son la base para la existencia de mecanismos de

transducción endócrino-neurales.

Se utilizaron ratas castradas administradas con 0.5 y 50 ug de estradiol durante dos días consecutivos y sometidas a descentralización u operación simulada 7 días antes del tratamiento.

En la Tabla XXI se resumen los efectos del tratamiento con estradiol sobre la actividad enzimática de la tirosina hidroxilasa (TH), catecol-O-metiltransferasa (COMT) y MAO tipo A y B. El análisis factorial de los resultados (descentralización por estradiol) indicó que la inyección de la hormona disminuye significativamente la actividad de TH ganglionar, aún en ausencia de terminales colinérgicas intactas. Como no se detectó interacción significativa entre el tratamiento quirúrgico y el hormonal, estos resultados revelan que el efecto del estradiol sobre TH es independiente del estado funcional de la inervación aferente colinérgica. Por el contrario, el aumento producido por el estradiol en la MAO tipo A y la tendencia a aumentar en la tipo B y a disminuir en la COMT ganglionares, es decir, en las enzimas responsables del metabolismo de NE, sólo se observaron en animales intactos (Tabla XXI). La descentralización considerada como efecto factorial principal, produjo disminución en ambos tipos de MAO e incremento en la COMT (Tabla XXI).

En la Fig. 31 se observan los efectos del estradiol sobre otros 2 componentes de la actividad del GCS en ratas descentralizadas y controles. El tratamiento hormonal incrementó la captación ganglionar de ³H-NE in vitro, y la cirugía la disminuyó sin detectarse, por análisis factorial, interacción significativa. En cambio dicha interacción sí se observó ($p < 0.01$) al analizar los efectos del estradiol sobre el contenido de tubulina ganglionar: la desnervación disminuyó la tubulina sólo en los animales inyectados con vehículo (Fig.31).

Tabla XXI: Efecto del estradiol sobre el GCS de ratas sometidas a descentralización del ganglio u operación simulada una semana antes.*

	<u>Operación simulada</u>		<u>Descentralización</u>	
	<u>vehículo</u>	<u>estradiol</u>	<u>vehículo</u>	<u>estradiol</u>
Tirosina hidroxilasa	209 ± 15 (6)	114 ± 25 (6)**	156 ± 14 (6)	100 ± 10 (6)**
Catecol-O-metiltransferasa	27.5 ± 2.3 (17)	21.1 ± 2.0 (17)	45.0 ± 2.6 (21)	42.7 ± 2.9 (19)
Monoamino oxidasa tipo A	236 ± 17 (18)	294 ± 18 (18)**	226 ± 20 (20)	211 ± 22 (19)
Monoamino oxidasa tipo B	372 ± 28 (18)	446 ± 30 (18)	293 ± 14 (20)	289 ± 23 (18)

*Ratas hembra adultas castradas 3 semanas antes recibieron estradiol o vehículo como se describe en el texto. Los resultados se expresan como Media ± ES (n). La actividad de TH se expresó como pmol de producto/h/mg de tejido y las actividades de COMT y MAO como pmol de producto/min/mg de proteína. Los resultados se estudiaron primero por análisis factorial de varianza seguido de test t de Student. Analizados como efectos factoriales principales, el tratamiento con E₂ disminuyó la actividad de TH (p < 0.05), mientras que la descentralización disminuyó la actividad de MAO tipo A (p < 0.05) y MAO tipo B (p < 0.01) e incrementó la de COMT (p < 0.01).

**Significativamente diferente de las ratas inyectadas con vehículo dentro del mismo grupo experimental (p < 0.05).

EFECTOS DEL ESTRADIOL SOBRE EL GANGLIO CERVICAL SUPERIOR

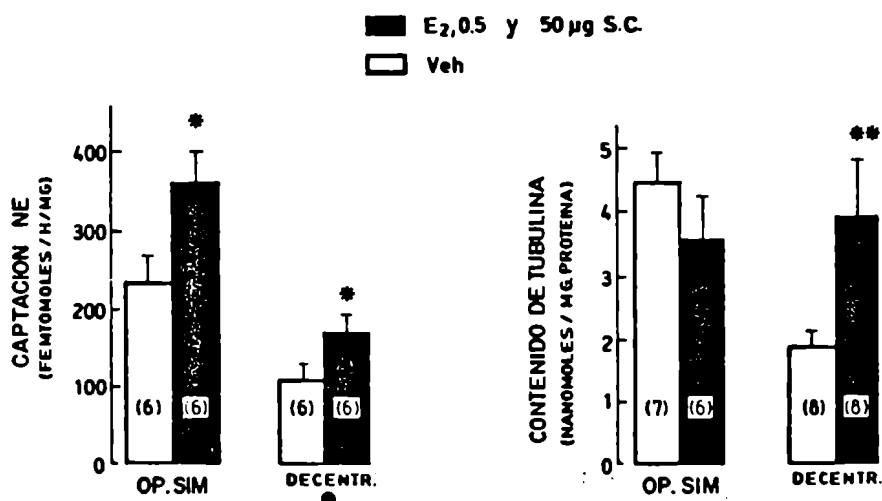


Fig. 31: Efectos del estradiol sobre la captación de ³H-NE y contenido de tubulina del GCS de ratas ovariectomizadas, descentralizadas o con operación simulada. Los resultados se estudiaron primero por análisis factorial de varianza seguido de test t de Student. Los puntos indican las diferencias significativas analizadas como efectos factoriales principales ($p < 0.01$).

- *Diferencia significativa con respecto a las ratas inyectadas con vehículo dentro del mismo grupo experimental ($p < 0.05$).
- **Diferencia significativa con respecto a las ratas inyectadas con vehículo dentro del mismo grupo experimental ($p < 0.01$).

En conjunto, estos resultados indican que el tratamiento con estradiol afecta varios aspectos de la síntesis, metabolismo y liberación de NE en el GCS. Algunos de estos efectos persisten luego de la interrupción de las aferencias preganglionares, lo que sugiere que el estradiol actúa en parte sobre el ganglio y no a través de cambios en la vía simpática medular. Alternativamente, el estradiol podría afectar la concentración plasmática de otra hormona, por ej., FSH o LH, siendo ésta la responsable del cambio metabólico. La posibilidad de un sitio ganglionar de acción del estradiol fue por lo tanto examinada en la siguiente serie de experimentos.

En la Fig. 32 se observa la captación y retención de ^3H -estradiol in vivo por diversos tejidos luego de la inyección s.c. de 40 uCi de la hormona marcada a ratas ovariectomizadas. La captación de ^3H estradiol por el GCS, expresada por mg de tejido, fue semejante a la del útero y superó a la de la adenohipófisis, tejidos estrogénicos clásicos, y por el contrario difirió marcadamente de la del músculo tibial (no efector). El pre-tratamiento con 2 ug de estradiol 30 min antes del sacrificio de primió marcadamente la posterior captación de ^3H -estradiol por el ganglio y glándula pineal (tejido efector de la hormona) in vitro (Tabla XXII). Este hecho sugirió que los sitios de unión para el estradiol eran limitados.

El análisis de saturación de la asociación de estradiol a componentes citosólicos de GCS de rata indicó la presencia de sitios de unión de alta afinidad con una $K_d = 5.5 \text{ nM}$ y una concentración de sitios = 20-30 fmoles/mg de proteína (Fig. 33). La aplicación del método de intercambio para la medición del complejo estradiol-receptor nuclear a distintos tiempos luego de la inyección de 2 ug de estradiol indicó la existencia de translocación de receptores del citoplasma al

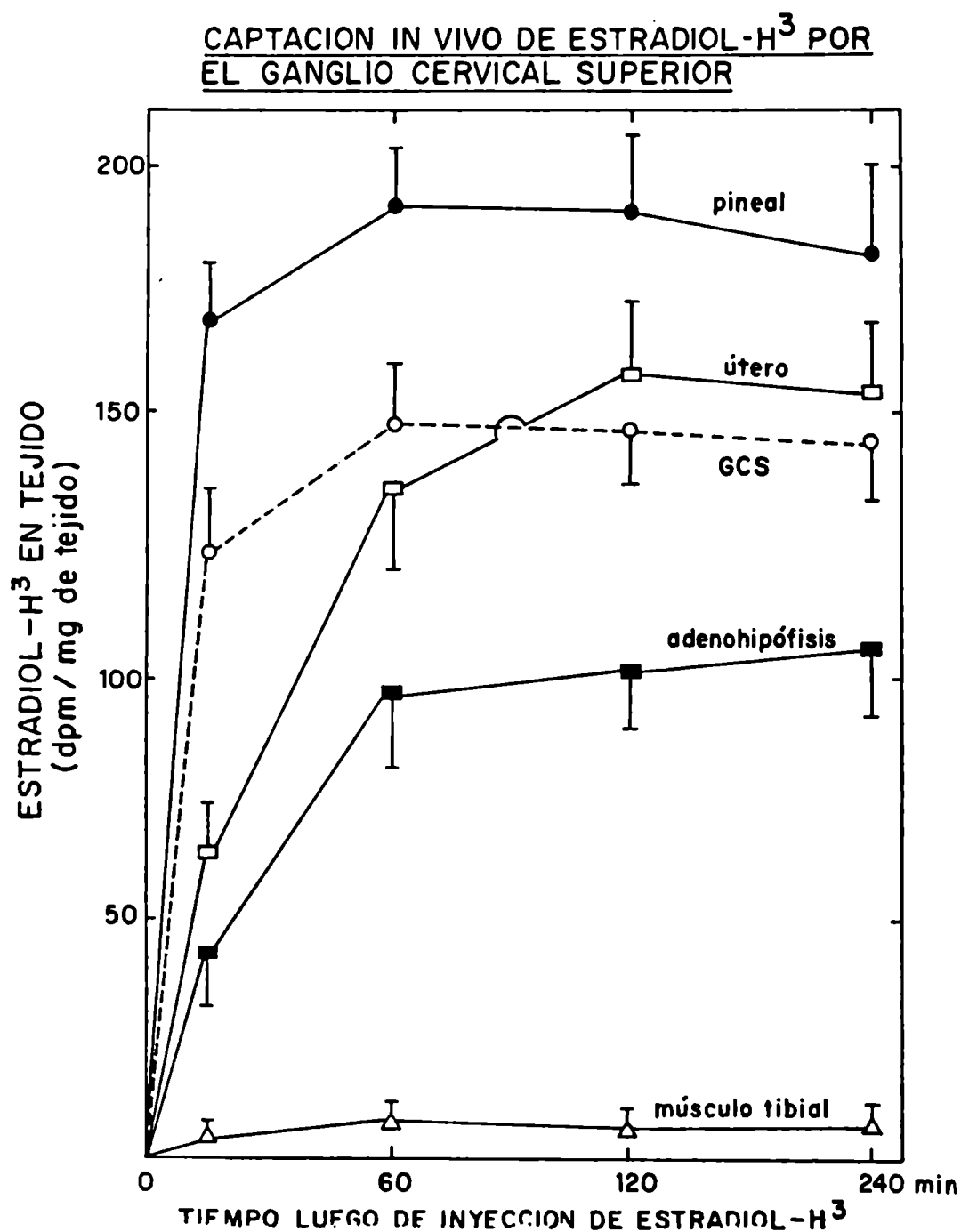


Fig. 32: Captación in vivo de ³H-estradiol por el GCS de rata. Se utilizaron ratas hembra castradas de 3 semanas inyectadas en forma s.c. con 40 uCi de ³H-estradiol a distintos tiempos antes del sacrificio. La captación y retención de radiactividad se determinó como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como Media ± ES (n = 6 en cada grupo).

Tabla XXII: Efecto de la inyección s.c. de estradiol 30 minutos antes del sacrificio sobre la captación in vitro de ^3H -estradiol por el GCS y la glándula pineal de rata ovariectomizada.

	Captación de ^3H -estradiol	
	<u>Control</u>	<u>Treat. con E_2</u>
GCS	1762 \pm 242 (10)	261 \pm 50 (10)**
Glándula pineal	2165 \pm 364 (10)	499 \pm 228 (9)**

*Las ratas se ovariectomizaron 3 semanas antes y recibieron una inyección s.c. de 2 ug de estradiol o vehículo 30 min. antes del sacrificio. Ambos tejidos se incubaron durante 1 h a 37 C en solución de Krebs-Ringer bicarbonato conteniendo 0.1 nM de ^3H -estradiol. La radiactividad captada se determinó como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como dpm/mg de tejido, Media \pm ES (n).

**Significativamente diferente de los controles ($p < 0.01$, test t de Student).

GANGLIO CERVICAL SUPERIOR

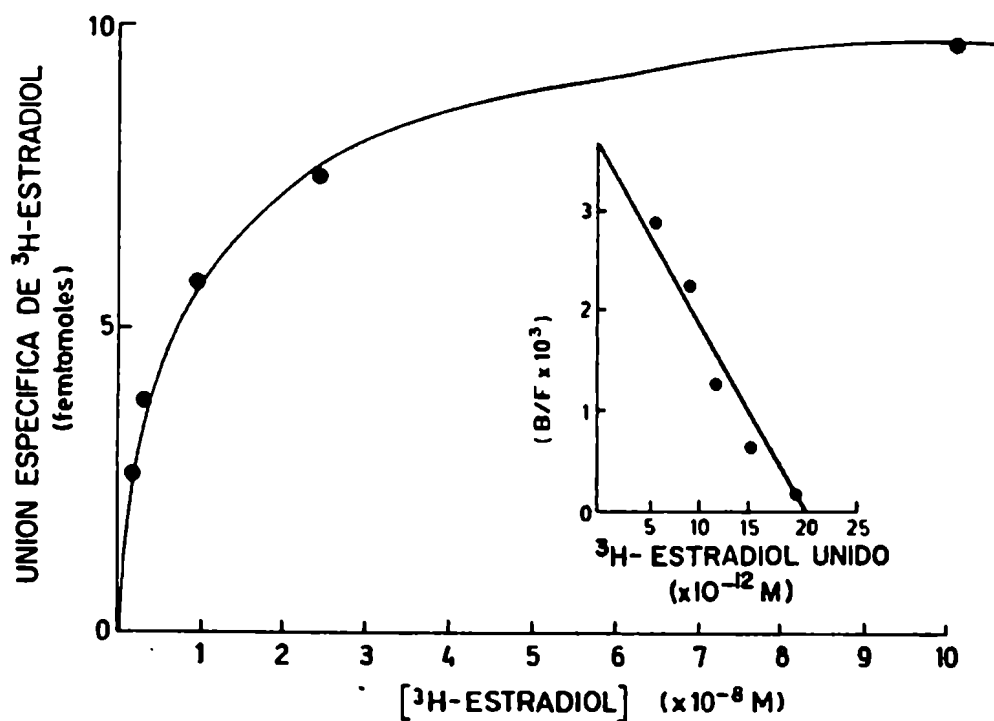


Fig. 33: Asociación de ^3H -estradiol al citosol de GCS de rata en función de concentraciones crecientes de ^3H -estradiol en el medio. La unión específica se determinó según se indica en Materiales y Métodos en alícuotas de citosol de GCS (1 mg proteína/ml) incubadas durante 8 h a 0 C. Cada punto es la media de 3 determinaciones. A la derecha se muestran los datos en un gráfico de Scatchard¹¹⁹.

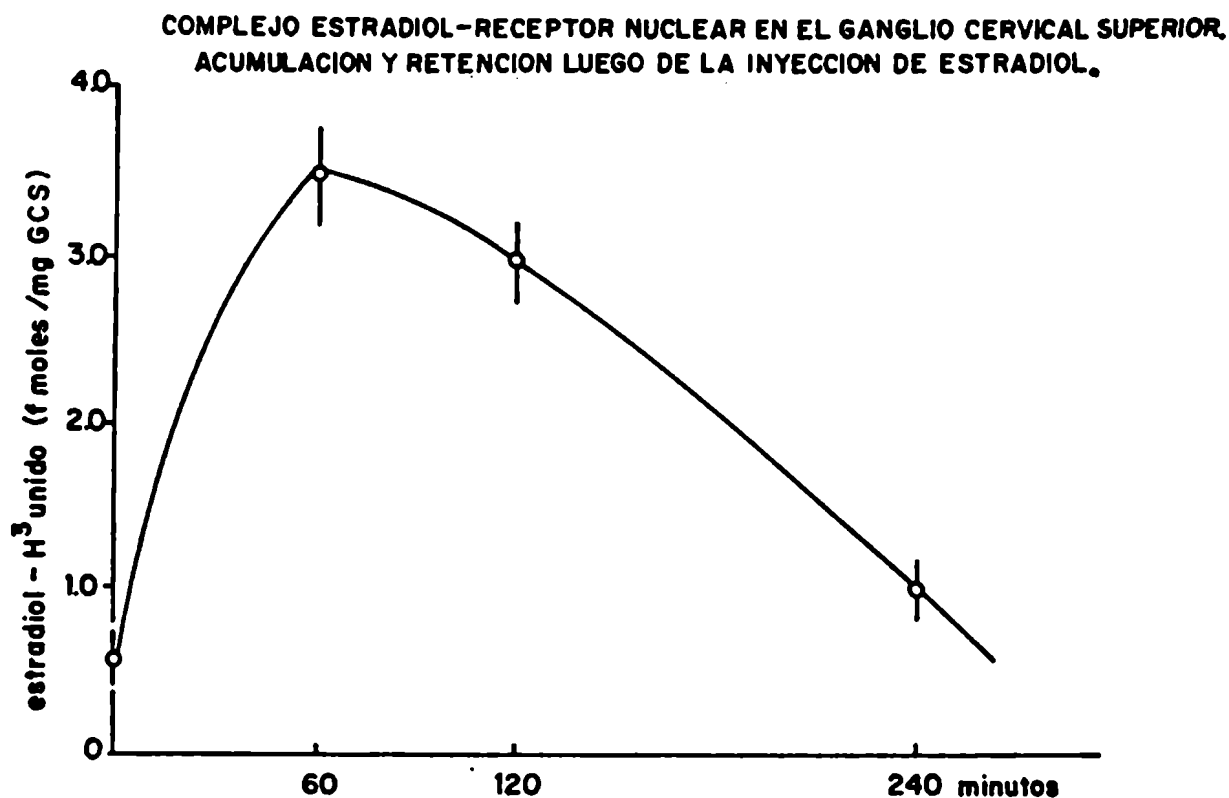


Fig. 34: Acumulación del complejo estradiol-receptor nuclear en el GCS en ratas inyectadas con 2 ug de estradiol. Grupos de 25 ratas ovariectomizadas se inyectaron en forma s.c. con 2 ug de estradiol y se sacrificaron a distintos tiempos. Se usaron los GCS de 5 ratas para cada punto y el complejo estradiol-receptor nuclear se determinó por la técnica de intercambio¹²⁶ como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como Media \pm ES de 5 determinaciones.

núcleo (Fig. 34), semejante a lo descrito para la glándula pineal¹²⁷. En conjunto, estos resultados sugieren la presencia de receptores citoplasmáticos y nucleares para el estradiol en el GCS y por lo tanto de fenómenos de transducción endócrino-neurales.

IV

DISCUSION

En los organismos más evolucionados dos tipos de señales, hormonales y neurales, median el proceso de comunicación entre las células de los diversos órganos y tejidos. En general, dichas señales operan dentro de los confines de los sistemas endócrino y neural y su interacción, que ocurre a varios niveles de organización celular, constituye el tema central de la Neuroendocrinología.

Como se analizó en la Introducción, una denominación operacional adecuada para tales procesos de interacción sería la siguiente:

- a) Transducción neuroendócrina
- b) Transducción endócrino-endócrina
- c) Transducción endócrino-neural

Si bien existen numerosas evidencias experimentales acerca del primero de ellos, no ocurre lo mismo con los otros dos fenómenos. Esto se debe a que los estudios en regiones neuroendócrinas relevantes del SNC, como el hipotálamo, tropiezan con la complejidad estructural intrínseca del tejido en cuestión. La multiplicidad de las vías neuronales y de los neurotransmisores involucrados, así como la baja densidad de los receptores hormonales, hacen difícil la caracterización de un determinado efecto hormonal ^{5,7}.

Para la elucidación de estos mecanismos resulta evidente la necesidad de un modelo experimental sencillo, de fácil manipulación y con las características de efector hormonal en donde se puedan medir, en un grupo celular relativamente homogéneo, efectos neuroendócrinos y cambios hormonales y/o neurales en respuesta a información hormonal (mecanismos: a), b) y c) respectivamente).

El objetivo central de este trabajo de tesis lo constituye la

proposición de la unidad funcional "glándula pineal - ganglio cervical superior" como modelo para el estudio de los mecanismos de interacción neuroendócrina. Los resultados de la sección III aportan diversos elementos en favor de tal hipótesis.

Es aceptado que los mecanismos bioquímicos por los cuales la NE liberada de los terminales nerviosos pineales desencadena la síntesis de melatonina, y en general mantiene la actividad metabólica del órgano, involucran la interacción del neurotransmisor con el receptor β -adrenérgico^{75,105}. Se asume que este paso es el inicial en el proceso de transducción neuroendócrina en los pinealocitos. Sin embargo, en los últimos años se han publicado esporádicamente observaciones que sugieren la existencia de efectos α -adrenérgicos de la NE en la glándula pineal. Por ejemplo, la estimulación de la síntesis de melatonina por NE se incrementa tanto in vivo como in vitro con agentes bloqueantes α -adrenérgicos^{118,133}.

Varias hipótesis pueden postularse para explicar de qué manera un efecto β -adrenérgico sobre las células pineales bien caracterizado, como es la estimulación de la síntesis de melatonina, puede alterarse por bloqueo adrenérgico α . Las células parenquimatosas pineales podrían poseer receptores α -adrenérgicos y tratarse éste de un efecto postsináptico; alternativamente, los agentes bloqueantes α podrían actuar presinápticamente a nivel de los terminales neurales, incrementando la liberación de NE. A estos receptores que modulan la liberación del neurotransmisor se los denomina α_2 , en contraposición con los α_1 , relacionados con los efectos postsinápticos¹⁵⁰.

Existen en la actualidad evidencias experimentales en favor de ambos mecanismos pineales. El efecto de la NE sobre el recambio de fosfatidil-inositol en la glándula pineal in vitro, el que es mediado

por un receptor de tipo α , no se altera por el tratamiento previo con 6-hidroxidopamina, neurotóxico que destruye los terminales simpáticos pineales¹³⁴. Tal observación plantea un mecanismo post-sináptico.

Por otra parte, los agentes agonistas o antagonistas de tipo α_2 afectan la liberación de $^3\text{H-NE}$ de las terminales nerviosas pineales in vitro, lo que sugiere un efecto presináptico¹³⁵. Es de destacar, sin embargo, que este último efecto puede también explicarse a través de una señal transináptica moduladora de la liberación de NE desencadenada por la interacción con un receptor de tipo α_2 postsináptico.

Los datos aquí presentados (sección III 1-1) constituyen la caracterización de dichos receptores α -adrenérgicos pineales por medio de procedimientos radioquímicos. Al igual que en otros tejidos (por ejemplo, cerebro y útero^{136,151}), la $^3\text{H-DHE}$ se une a sitios de membranas pineales bovinas o de rata con alta afinidad exhibiendo los gráficos de Scatchard y Hill una representación lineal, lo que indica que la $^3\text{H-DHE}$ interacciona con un solo tipo de sitios de unión.

Un criterio importante que apoya el carácter de receptor α -adrenérgico de los sitios de unión para $^3\text{H-DHE}$ detectados en la pineal es la potencia relativa de agonistas y antagonistas en competir con DHE, la cual es similar a la potencia de dichos agentes para provocar o prevenir respuestas acopladas a receptores α -adrenérgicos en tejidos efectores¹⁵¹.

La $^3\text{H-DHE}$ podría marcar teóricamente sitios α -adrenérgicos localizados: a) en los terminales nerviosos; b) sobre la superficie de células pineales (pinealocitos o células gliales); c) en ambos compartimientos, nervioso y glandular. Varias son las metodologías a aplicar para obtener información sobre este punto. Por ejemplo, se podría des-

truir uno de dichos compartimientos (el neural) por inyección del neurotóxico 6-hidroxidopamina, o por ablación de los cuerpos ganglionares simpáticos mediante gangliectomía cervical superior bilateral. Alternativamente podrían utilizarse cultivos celulares pineales que conducen a un enriquecimiento relativo de la población de células pineales, ya que los terminales neurales, al estar separados del cuerpo neuronal, degeneran. Por último, se podría recurrir al uso de agonistas y antagonistas relativamente específicos para receptores de tipo α_1 y α_2 (estos últimos de localización supuestamente presináptica)¹⁵⁰. En el presente trabajo se optó por la primera de dichas estrategias. Una semana después de la gangliectomía cervical bilateral, se observó en la rata un aumento significativo (53%) en la unión de ^3H -DHE a membranas pineales, sin cambios en la K_D de los sitios de unión. Es decir, estos resultados descartan la existencia de una población cuantitativamente importante de receptores α -adrenérgicos presinápticos (por ej., si se compara con la disminución del 40% observada en los sitios receptores α -adrenérgicos del corazón de ratas tratadas con 6-hidroxidopamina)¹⁵¹, e indican, por ende, que la densidad mayor es postsináptica. Es evidente que ello no niega totalmente la posibilidad que tales sitios presinápticos α -adrenérgicos estén presentes y el estudio en cultivos de GCS, donde sólo se desarrolla el equivalente de la población presináptica pineal sería útil en este aspecto.

Observaciones sobre la unión de antagonistas α - y β -adrenérgicos como DHE y dihidroalprenolol^{152,153} y de varias hormonas¹⁵⁴ han conducido a la hipótesis que los niveles endógenos de un agonista pueden regular la concentración y/o propiedades de unión de sus receptores sobre la superficie de las células efectoras. Los resultados aquí presentados, indican que luego de la gangliectomía el número de

receptores α -adrenérgicos se ve incrementado en la glándula pineal, sin modificar la afinidad del ligando radiactivo por su receptor. Por lo tanto, al igual que para otros órganos inervados simpáticamente, la desnervación pineal desarrollaría eventualmente una supersensibilidad postsináptica α -adrenérgica.

En resumen, los resultados de la sección III 1-1 avalan la conclusión que en el proceso de transducción neuroendócrina de la NE en la glándula pineal intervienen, no sólo receptores β - sino también α -adrenérgicos de localización fundamentalmente postsináptica.

Si bien históricamente el primer uso del modelo propuesto (la glándula pineal) ha sido para elucidar los procesos de transducción neuroendócrina, al cabo de los años y fundamentalmente luego de la identificación de diversos receptores hormonales en la glándula, se ha consolidado el concepto que dicha estructura posee también una exquisita sensibilidad hormonal¹².

La función pineal es modulada por secreciones hormonales de los distintos órganos efectores cuyas funciones afecta. Prueba de ello son los cambios en la síntesis y concentración plasmática de melatonina durante el ciclo estral en diversas especies como la rata, la oveja y la mujer⁷⁷.

Varios son los mecanismos que deben tenerse en cuenta al analizar en la glándula pineal u otra estructura neuroendócrina los cambios producidos por el tratamiento hormonal. Cabe preguntarse en primer lugar si éste actúa per se o a través de modificaciones en los niveles de otras hormonas, por ejemplo, la disminución inmediata de gonadotrofinas que se observa luego de inyectar estradiol o testosterona. Asimismo, un determinado efecto hormonal sobre tales estructuras neuroendócrinas no implica necesariamente un mecanismo directo de ac

ción sobre las mismas (transducción endócrino-endócrina) ya que puede ser mediado total o parcialmente por modificaciones en la actividad neuronal de las vías aferentes (transducción endócrino-neural). Por supuesto, una neurona puede actuar por más de un mecanismo a la vez o incluso en forma simultánea a través de todos ellos.

En el presente trabajo se han evaluado diversos aspectos de estas relaciones vinculados al efecto de las hormonas reproductivas: estradiol, testosterona, progesterona, LH, FSH y prolactina sobre la función pineal. En primer lugar se estudió la incorporación de aminoácidos marcados al insoluble en TCA como un índice de la síntesis de proteínas totales. Este parámetro, a pesar de su relativa insensibilidad, ya que sólo constituye una estimación global del proceso, y de contar con los inconvenientes discutidos en Materiales y Métodos, ha demostrado ser eficaz para detectar cambios por el tratamiento con hormonas⁹⁰.

Esto indujo a estudiar sus variaciones a lo largo del ciclo estral de la rata. La síntesis de proteínas totales no exhibió cambios noche-día. Esta observación avala lo arriba expuesto, ya que al menos en los procesos biosintéticos vinculados a la melatonina son de esperar grandes variaciones en la síntesis de proteínas. Sin embargo, a pesar de la insensibilidad intrínseca se observó una disminución significativa en la incorporación de aminoácidos en la tarde del proestro. Estos hallazgos se correlacionan con las marcadas modificaciones en los niveles circulantes de hormonas reproductivas que incluyen el máximo de estradiol plasmático durante la mañana del proestro y su disminución posterior, y la liberación de LH, FSH, prolactina y progesterona del período crítico^{109,139} (Fig. 15).

Por el contrario, la actividad de la serotonina-N-acetil trans-

ferasa no se vio afectada. Esta enzima, considerada clave para el incremento en la síntesis de melatonina que sigue a cambios en la iluminación ambiental o como reacción al stress^{9,72}, mostró los bien conocidos cambios diurnos^{12,118} con incrementos de 10 a 15 veces en su actividad durante la oscuridad, no observándose modificación de dicho ritmo en función del estado hormonal.

En vista de los cambios en la incorporación de aminoácidos a proteínas pineales durante el ciclo estral, se investigó en los experimentos subsiguientes, la participación de las hormonas reproductivas en la inducción de los mismos. El incremento detectado en la mañana del proestro es, probablemente, una consecuencia del efecto de la única hormona cuya concentración aumenta en plasma en ese momento: el estradiol, ya que previamente se ha verificado que la inyección de estrógenos a ratas castradas aumenta la síntesis de proteínas pineales⁹⁰. En relación a la disminución en la incorporación de aminoácidos marcados a proteínas pineales durante la tarde del proestro, la interpretación fue más compleja ya que, teóricamente, podía deberse a varios factores: a) el incremento en los niveles de progesterona, b) la disminución en los niveles de estradiol, c) el incremento en FSH, LH o prolactina y d) un sinergismo entre dos o más de estas hormonas¹⁰⁹.

Como primera estrategia para contestar a estos interrogantes se decidió utilizar como preparación a la rata hembra castrada inyectada durante 2 días con 0.5 y 50 ug de estradiol, esquema que, por sí mismo o luego de la administración de progesterona en la mañana del tercer día, reproduce la liberación de gonadotrofinas y prolactina de la tarde del proestro¹¹⁰. Sólo el tratamiento combinado produjo la esperada disminución de la síntesis proteica pineal

de las horas de la tarde; es decir, quedaba descartada la posibilidad de que el factor causal de dicho efecto fuera la caída en los niveles de estradiol que se produce en la tarde del proestro, o así mismo el incremento vespertino de LH, FSH o prolactina, el cual se sabe se induce tanto en los animales inyectados con estradiol como con estradiol-progesterona¹¹⁰.

Se planteaba entonces la posibilidad que fuese la progesterona per se o el sinergismo progesterona-gonadotrofinas-prolactina el responsable de la disminución de la síntesis proteica pineal de la tarde del proestro. Para responder a estos interrogantes se usó como preparación a la rata hembra castrada administrada con distintas dosis de progesterona 48 y 24 h antes del sacrificio, situación neuroendócrina en la que no se detectan cambios en la secreción de hormonas hipofisarias, ya que es un concepto neuroendócrino ampliamente aceptado que la progesterona requiere para actuar en dicho sentido la inyección previa o posterior de estradiol^{109,110,139}. En dichas condiciones la progesterona redujo la incorporación de aminoácidos marcados a proteínas pineales, así como neutralizó el aumento producido por la inyección simultánea de estradiol. Es decir, los resultados de la sección II-2-1 sugieren la existencia de fenómenos de transducción endócrino-endócrinos y/o endócrino-neurales para la progesterona en la glándula pineal y llevaron a investigar la presencia en el citosol pineal de una presunta proteína con las características de receptor para progestágenos.

Los resultados analizados en la sección III-2-2 indican que la glándula pineal bovina contiene una proteína citoplasmática que une la progesterona específicamente y con alta afinidad ($K_D = 1.62$ nM). Este componente muestra, en un medio de baja fuerza iónica, un coe-

ficiente aparente de sedimentación de 7-8 S, similar al descrito para el receptor de progesterona en útero¹⁵⁴, hipotálamo¹⁵⁵ y adenohipófisis¹⁵⁶. A pesar de ello, resultan aparentes algunas diferencias con los receptores para progestágenos de tales estructuras; por ejemplo, la asociación de la progesterona en la glándula pineal es de estabilidad inusual y la constante de afinidad es mayor que la descrita en útero para el ligando natural¹⁵⁴. En el hipotálamo, la caracterización del receptor se ha realizado mediante el progestágeno sintético R-5020, que presenta una afinidad mucho mayor que la progesterona por sus sitios de unión¹⁵⁵.

Tales características peculiares de la unión de la progesterona a la glándula pineal podrían dar cuenta del particular metabolismo de la hormona en la glándula, con retención prolongada del compuesto sin metabolizar⁸⁶. Asimismo, podrían explicar por qué la progesterona per se, sin requerir la presencia previa del estradiol, es capaz de afectar la función pineal.

En conjunto, estos resultados sumados a la demostración de los efectos inhibitorios directos de la progesterona sobre la liberación de melatonina por pineales en cultivo de órgano⁸⁶, constituyen la demostración que fenómenos de transducción endócrino-endócrina participan en los cambios pineales inducidos por la progesterona.

En la modulación de la función hipotalámica han sido descritos mecanismos de retroalimentación ultracortos. Así, por ejemplo, el hipotálamo libera LHRH y dicha señal no es recibida solamente por su efector primario, la adenohipófisis, sino por el hipotálamo; éste capta a su hormona y elabora una respuesta relevante para la subsiguiente secreción de LHRH.

Tal como se mencionara en la Introducción, la glándula pineal

también es capaz de responder con marcados cambios bioquímicos y morfológicos al tratamiento con la hormona pineal melatonina. Estos efectos de la hormona podrían ejercerse directamente sobre la glándula pineal o alternativamente a través de la liberación de una segunda hormona (p.ej., hipofisaria o gonadal). La observación realizada por Wurtman y col.¹⁴¹, según la cual la pineal es el tejido que exhibe la mayor captación de ³H-melatonina una hora después de su administración i.v. a gatos, sugiere un efecto directo de la hormona sobre la glándula. Por otra parte, se ha visto que la incubación con melatonina de cortes de pineal bovina incrementa la captación de tirosina¹⁵⁷. Todas estas evidencias condujeron a investigar la posibilidad que la pineal presentara receptores para melatonina igual que otras áreas cerebrales donde se observan efectos de la hormona⁶³.

Los resultados de la sección III-2-3 describen la presencia de sitios de unión de alta afinidad para melatonina en preparaciones crudas de membrana de glándula pineal bovina con máxima unión en la fracción de 27000 x g y aproximadamente 30% en la fracción nuclear cruda, datos que concuerdan con observaciones previas de distribución intracelular de ³H-melatonina de muy baja actividad específica en experimentos in vitro con glándula pineal de gato¹⁴¹.

Las características de esta unión son compatibles con aquéllas esperadas para un receptor de melatonina. La secuencia de actividad de los diversos análogos estudiados en los experimentos de competencia se asemeja, en cierta medida, a la encontrada en la preparación biológica mejor caracterizada para la melatonina: la piel de larvas de anfibios^{159, 160}. Es importante, sin embargo, destacar que la afinidad de la serotonina por los sitios de unión de la melatonina

es de alrededor de 1/13 de la de la hormona. En caso de existir en la glándula pineal de rata sitios de unión para la melatonina como los aquí descritos, y si tanto esta hormona como la serotonina están distribuidas dentro del mismo compartimiento celular, sería posible que las concentraciones elevadas de serotonina pineal durante el día (alrededor de 100 ng/glándula) pudieran interferir significativamente con la unión de melatonina a membranas pineales. En este sentido, los cambios significativos observados en la velocidad de recambio de serotonina pineal por tratamiento con hormonas reproductivas (sección III-3-1) se acompañarían presuntamente de modificaciones en la cantidad de melatonina unida a los presuntos autorreceptores.

Si bien las propiedades de los sitios de unión (especificidad, alta afinidad, baja capacidad, etc.) son un requisito sine qua non para la descripción de un receptor, debe acotarse que su demostración rigurosa implica el acoplamiento de dichos receptores específicos con la actividad biológica en la misma preparación subcelular. Sin embargo, antes que se pueda cumplir con este último requisito, se requiere aún más información acerca de los efectos bioquímicos desencadenados por la melatonina en la glándula pineal. Esta situación no es exclusiva de la melatonina puesto que se encuentran en estado semejante de descripción la mayoría de los "receptores" caracterizados hasta el momento. Una excepción relevante en este aspecto la constituyen las hormonas y neurotransmisores cuyo receptor de membrana se halla asociado a una adenilciclase^{140,161}.

Existe también la posibilidad que los sitios de unión de alta afinidad para la melatonina correspondan no a autorreceptores sino a sitios de almacenamiento pineal para la hormona. No hay, sin embargo, información acerca de un posible almacenamiento de melatonina en la

glándula y todos los datos disponibles, entre ellos varios inéditos de este laboratorio, sugieren que la hormona se libera tan pronto como se sintetiza en la glándula, probablemente por simple difusión a través de la membrana celular. Por otra parte, el hecho que la administración de melatonina no altere el "turnover" de NE en la glándula pineal⁸⁹ sugiere que los sitios de unión para la melatonina están localizados en los pinealocitos (autorreceptores) y no en los terminales nerviosos pineales.

Sí, efectivamente, estos sitios de unión son autorreceptores, su K_d es la adecuada para detectar las concentraciones de melatonina que normalmente se producen en la glándula pineal durante el ciclo diario de luz-oscuridad (0.5 - 0.01 μM) y se estaría ante la presencia de un verdadero mecanismo de retroalimentación ultracorto. Esto indica el grado en que en la glándula pineal se producen fenómenos neuroendócrinos de relevancia para la interpretación de la función hipotalámica.

En base a la descripción de estos presuntos autorreceptores para la melatonina se puede dar ahora una interpretación a las observaciones²⁸ según las cuales la inyección de melatonina libera prolactina sólo si la glándula pineal se halla intacta. Estos efectos podrían deberse a cambios en la actividad secretoria pineal inducidos por la melatonina que, al actuar sobre los autorreceptores, desencadena procesos de transducción endócrino-endócrina en la glándula que pueden llevar a la liberación de una segunda hormona⁵².

Con el objeto de completar el estudio del modelo propuesto se analizaron varios aspectos del tercer componente de la interrelación neuroendócrina, la transducción endócrino-neural.

En el hipotálamo, tanto el contenido como la velocidad de recambio de catecolaminas y serotonina, son afectados por el estado hormo-

nal del animal ^{162,163}. Esta fue, históricamente, la primera aproximación al estudio de los mecanismos celulares de integración neuroendócrina y constituyó la primera demostración fehaciente que el SNC debía considerarse un órgano efector hormonal, con componentes quimiorreceptores específicos.

En este sentido, la glándula pineal presenta una situación favorable muy particular. Su capacidad de síntesis y almacenamiento de serotonina y NE la han convertido en un modelo ideal para el estudio de la síntesis y metabolismo de monoaminas, del cual se ha extrapolado a neuronas serotoninérgicas y catecolaminérgicas respectivamente ^{69,163}. Pareció de interés, por lo tanto, examinar en la glándula pineal los efectos de diversas hormonas sobre mecanismos serotoninérgicos y noradrenérgicos, como una manera de obtener información sobre el proceso de transducción endócrino-neural en las vías que utilizan serotonina y NE como neurotransmisores.

Es de destacar que no existe información sobre el posible efecto de diversas hormonas reproductivas sobre la síntesis y metabolismo de serotonina pineal y los experimentos de la sección III-3-1 han tendido a complementar dicho objetivo. El énfasis en estos estudios fue puesto en los mecanismos generales de síntesis, deaminación oxidativa, almacenamiento y liberación de la serotonina, más que a los aspectos vinculados a su función como precursor de la hormona pineal melatonina.

Los niveles de serotonina en la glándula pineal son dos órdenes de magnitud mayores que en el resto del SNC ¹⁶⁴ y alrededor del 30% está localizada en las terminales adrenérgicas pineales a las que llega por captación desde los pinealocitos ¹⁶⁴ como lo sugiere la disminución significativa de serotonina pineal observada luego de la gangliectomía en los experimentos de la sección III-3-3.

En una primera serie de experimentos se analizaron los cambios inducidos por la castración y reemplazo hormonal en ratas macho y hembra. El contenido de serotonina aumentó significativamente luego de la orquidectomía, siendo revertido dicho efecto por la inyección de testosterona. Como se discutió anteriormente en forma general para los efectos hormonales sobre la glándula pineal, la testosterona puede actuar per se o a través de la disminución de FSH o LH circulantes. En favor de esta última posibilidad están los resultados de la Tabla IX que indican que la inyección de gonadotrofinas en el período inmediato post-castración (con niveles endógenos de FSH y LH relativamente bajos) incrementa la serotonina pineal. Con el fin de elucidar si la señal inhibitoria provista por el testículo (testosterona) era más potente que la estimuladora originada en la adenohipófisis (FSH, LH) se recurrió al uso de ratas hipofisectomizadas, en las que tanto las hormonas hipofisarias como las testiculares están disminuídas. Si bien la marcada labilidad de los animales impidió estudios más detallados los resultados de la Tabla X indican que la señal hipofisaria tiene mayor valor relativo que la gonadal, ya que se observó una reducción significativa de la concentración de la monoamina pineal probablemente como consecuencia de la desaparición de las gonadotrofinas circulantes. En experimentos realizados en ratas ovariectomizadas observamos que el estradiol disminuye, a semejanza de la testosterona, los niveles de serotonina pineal.

Para el análisis de estos resultados deben considerarse los diversos factores que contribuyen al mantenimiento de la concentración de serotonina en la glándula pineal (Fig. 35). Ellos incluyen la síntesis de la monoamina (a través de la captación del aminoácido precursor triptofano o de la regulación de la enzima limitante triptofano hidroxila-

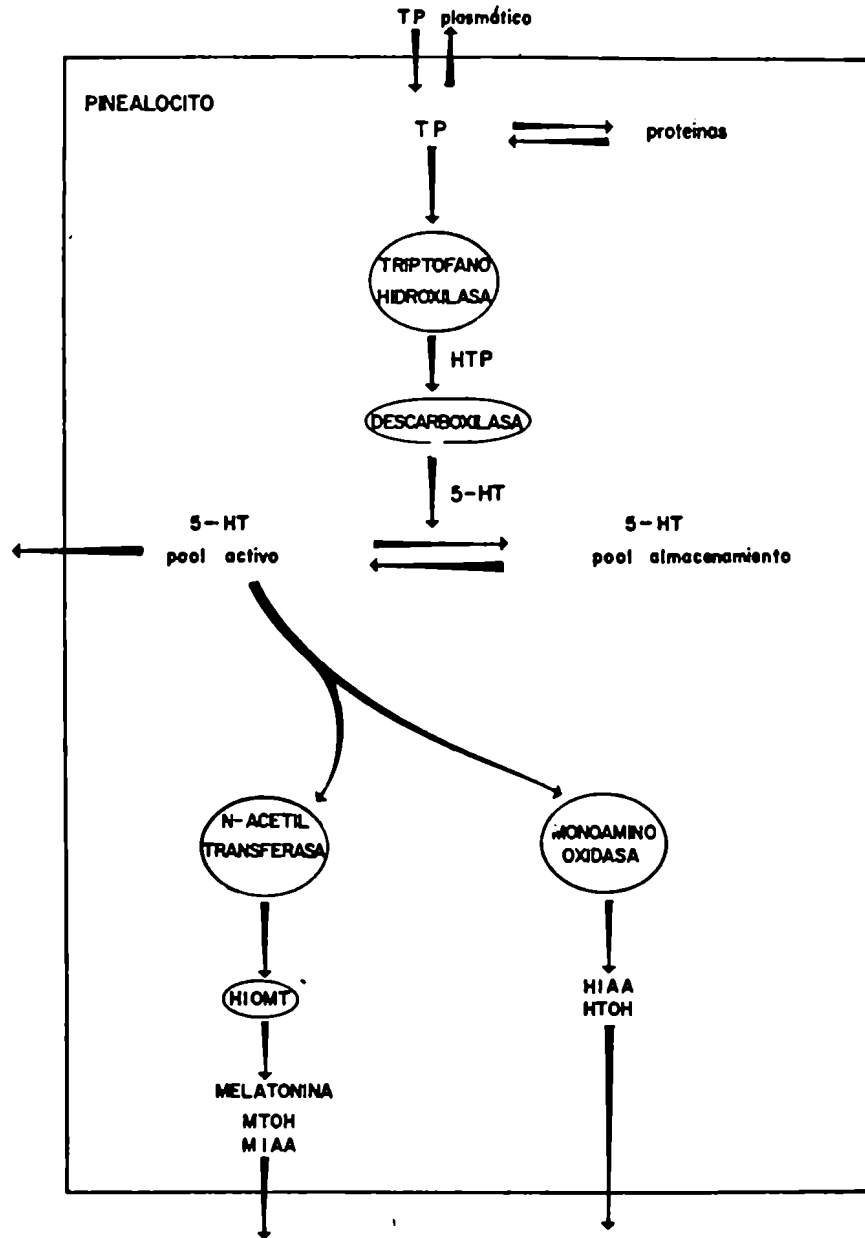


Fig. 35: Compartimentalización y metabolismo de la serotonina (5-HT) en la glándula pineal. Siglas como en la Fig. 9.

sa); la actividad de las enzimas metabolizantes de la serotonina y la disponibilidad de la monoamina a tales sistemas degradantes, a través de la regulación del equilibrio "serotonina granular (pool de almacenamiento) \rightleftharpoons serotonina citoplasmática (pool activo)" y del proceso de liberación. Los cambios observados en este trabajo como consecuencia del tratamiento hormonal revelan ciertamente modificaciones importantes en uno o varios de los sitios resumidos en la Fig. 35. Se decidió entonces examinar en los experimentos subsiguientes tales mecanismos.

En una primera serie de trabajos se utilizaron animales tratados con el inhibidor de la triptofano hidroxilasa, p-clorofenilalanina (PCPA) y se realizaron estudios cinéticos de la velocidad de caída de la monoamina en la glándula pineal. El uso de PCPA como indicador de la velocidad de recambio o "turnover" de serotonina se basa en que la droga produce inhibición total e inmediata de la enzima limitante triptofano hidroxilasa, y en que en diversos sistemas la droga no afecta ni la captación de triptofano ni la metabolización ulterior de la serotonina⁵⁴. Por lo tanto los cambios observados pueden considerarse el resultado de modificaciones reales en el metabolismo de la serotonina en función del estado hormonal.

Como en el caso del contenido de la monoamina, la castración en machos pero no en hembras produjo cambios significativos en la velocidad de recambio de la serotonina, observándose la disminución de dicho "turnover". El reemplazo hormonal por testosterona revirtió el efecto, resultando en aceleración de la velocidad de recambio de la serotonina pineal. Sin embargo en este caso, la actividad de la testosterona no puede explicarse primariamente a través de la disminución de las gonadotropinas circulantes, ya que la inyección de ambas trofinas hipofisarias o de prolactina también aceleró dicho "turnover". El tratamiento

con estradiol indujo una disminución discreta del "turnover" de serotonina pineal, hecho que indica una diferencia en los efectos pineales de andrógenos y estrógenos, y que sugiere que no puede explicarse toda la actividad de los primeros sobre la glándula pineal por su aromatización a estrógenos⁸³.

A partir de los mecanismos resumidos en la Fig. 35, los resultados de los experimentos con PCPA (en los que se descarta, por estar inhibida, la regulación a nivel de la síntesis) se pueden interpretar como: a) una alteración en la disponibilidad de la serotonina a sus enzimas metabolizantes, por desplazamiento del equilibrio intracelular; b) un aumento en la actividad de la MAO; c) un aumento de la actividad de N-acetil transferasa; d) un incremento en la liberación. Dado que los experimentos de la sección III-2-1 constituyeron un fuerte indicio acerca de la relativa insensibilidad de la N-acetil transferasa al medio hormonal, se consideró pertinente examinar la respuesta hormonal de la otra vía metabólica: la deaminación oxidativa por MAO.

Según datos obtenidos mediante el uso del inhibidor clorgilina, la enzima cerebral MAO puede considerarse como un sistema de isoenzimas sensibles (tipo A) o insensibles (tipo B) a la droga¹¹⁶. En la glándula pineal la MAO B se localiza en el pinealocito, mientras que la A es intraneuronal¹¹⁵ (lo que puede apreciarse también de los resultados obtenidos de este trabajo, ya que la gangliectomía cervical superior bilateral redujo marcadamente la MAO A pineal y no afectó la B). El tratamiento con testosterona incrementó la MAO B, mientras que FSH, LH, estradiol y prolactina disminuyeron una o ambas enzimas pineales. Es decir, los cambios en el "turnover" de serotonina en los animales tratados con testosterona se correlacionan con un incremento en la actividad MAO del pinealocito, y podrían así explicarse a través de la deami

nación oxidativa aumentada de la serotonina pineal. En el caso del estradiol una disminución en la MAO A (intraneuronal) podría jugar también un papel en la disminución del "turnover" de serotonina, ya que como se mencionó aproximadamente un 30% de la serotonina pineal se halla presente en las terminaciones nerviosas pineales. Por el contrario la disminución de una o ambas MAO luego de la inyección de FSH, LH o prolactina, no sólo no explican el "turnover" acelerado de serotonina observado en las ratas tratadas con la hormona, sino que constituyen un claro indicio de la disociación que puede existir entre los diversos mecanismos de la Fig. 35.

Ya que la actividad de la deaminación oxidativa no justifica el incremento en la velocidad de recambio de la serotonina pineal fue necesario evaluar los mecanismos que regulan la disponibilidad de la serotonina en el pinealocito y en particular los vinculados con la movilización de la serotonina de los gránulos de almacenamiento. Si FSH o LH actuaran directa o indirectamente sobre dicho equilibrio desplazando la serotonina hacia el "pool" citoplasmático, más monoamina estaría disponible para su liberación o metabolización por deaminación oxidativa, aún con la MAO disminuída (Fig. 35).

Existe consenso en la literatura en que el factor primordial, que regule el equilibrio "serotonina granular \rightleftharpoons serotonina libre" es la actividad de las fibras neuronales aferentes^{75,164}. Por ejemplo, el incremento en la actividad del sistema simpático cervical producido por la exposición de ratas a la fase de oscuridad del ciclo diario de iluminación, induce una rápida movilización de la serotonina de sus depósitos intragranulares pineales al citoplasma y espacio extracelular. Tanto la disponibilidad a la MAO, como dicha secreción son respuestas primarias de la disminución abrupta de los niveles de amina pine-

al (aproximadamente 20 ng/hora) ya que sólo una fracción mínima de este "turnover" es imputable a la vía biosintética de la melatonina, que comienza por el paso de la N-acetilación catalizada por la N-acetiltransferasa¹⁶⁴. A pesar del papel fundamental que juega la deaminación oxidativa por MAO en los cambios circadianos de la serotonina pineal, la actividad enzimática no se modifica, o aún tiende a disminuir, durante la fase de oscuridad (lo que es semejante a lo observado en las ratas inyectadas con gonadotrofinas) .

Se decidió evaluar entonces la actividad del sistema nervioso simpático cervical en la misma situación experimental, y se recurrió para ello al procedimiento que se acepta constituye la mejor estimación dinámica de la liberación de NE de los terminales neurales: la determinación del "turnover" de ³H-NE⁹⁹. Una dosis trazadora de ³H-NE es captada por los terminales simpáticos, entre ellos, los de la glándula pineal y el GCS y su desaparición del órgano es por lo tanto un índice de la liberación del neurotransmisor endógeno. Aplicando dicha metodología en animales tratados con FSH o LH se observó que ambas gonadotrofinas resultan en una disminución del "turnover" de NE de las terminales nerviosas pineales. Estos resultados sugieren que la aceleración en la velocidad de recambio de la serotonina pineal por FSH o LH no se debe a un efecto indirecto mediado por el incremento en la actividad del sistema simpático, sino que por el contrario se trata de un efecto primario de las gonadotrofinas sobre los pinealocitos.

Si FSH o LH modificaran en forma directa el equilibrio "serotonina granular \rightleftharpoons serotonina citoplasmática", con desplazamiento hacia el "pool" libre, ¿cuál sería el destino de la serotonina que escapa a la metabolización intracelular y se libera al espacio extracelular?. Existen sólidas evidencias experimentales, tanto morfológicas como bioquí-

micas, que indican que una fracción importante de la serotonina pineal movilizada a partir de los gránulos pasa al espacio extracelular y es captada por el terminal simpático, almacenándose en la misma vesícula sináptica adrenérgica que contiene NE⁵⁵. Un aumento en la liberación de serotonina por el pinealocito, y su consecuente entrada al terminal noradrenérgico resulta hipotéticamente en los siguientes efectos: a) competición con la NE por los sitios de almacenamiento en la vesícula de los terminales adrenérgicos; b) desplazamiento de la NE hacia el citoplasma del terminal, con inhibición alostérica de la tirosina hidroxilasa, enzima limitante en la biosíntesis de NE (Fig. 14), y la consiguiente inhibición de la actividad neuronal; c) menor liberación de NE ante el estímulo nervioso. Es posible que los mecanismos antedichos constituyan una regulación trans-sináptica negativa que tienda a compensar la hiperactividad del sistema durante la liberación de NE inducida por la oscuridad en el ciclo diurno normal¹⁶⁵.

Algunos de estos fenómenos se observaron en los experimentos que aquí se presentan. La inyección de FSH o LH produjo una disminución de la captación inicial de ³H-NE por los terminales adrenérgicos pineales, un presunto índice de la cantidad de serotonina que se ha incorporado a la vesícula adrenérgica. Asimismo ambas gonadotrofinas disminuyeron el "turnover" de NE en los terminales simpáticos, indicando que la regulación negativa de la actividad neuronal tuvo efecto. La aceleración del "turnover" de NE ganglionar producido por FSH y tal vez por LH están muy probablemente desvinculados de los efectos sobre el terminal neural pineal y son un indicador de la actividad de las inter-neuronas cromafines y terminales simpáticas de neuronas ganglionares provenientes de otras metámeras. Dicha aceleración indica una estimulación de la red neuronal en el GCS. la que dehiere, si el efecto prima-

rio hormonal fuera ganglionar, exteriorizarse en estimulación de la neurona ganglionar simpática y, por ende, en la velocidad de recambio de la NE en los terminales pineales. Por el contrario los resultados aquí presentados augieren en conjunto que el efecto primario de FSH y LH es a nivel de los pinealocitos con emisión de una señal transináptica.

Es decir, resumiendo hasta este punto las consideraciones realizadas, la hipótesis que más se adecua para interpretar los efectos de FSH y LH descritos en las secciones III-3-1 y III-3-2 es la siguiente: la administración de gonadotrofinas produce una modificación en el equilibrio "serotonina granular \rightleftharpoons serotonina citoplasmática" con desplazamiento a la derecha y resulta en los siguientes efectos:

- a) aumento del "turnover" de serotonina pineal
- b) liberación de serotonina al espacio extracelular
- c) captación de la serotonina liberada por el terminal adrenérgico
- d) inhibición del "turnover" de NE pineal

Los resultados aquí presentados indican que aquellas hormonas que aumentan el contenido de serotonina pineal (FSH, LH) frenan el "turnover" de NE en la vía aferente, mientras que las que disminuyen dicho contenido (como por ej., testosterona) lo aceleran⁸⁹. Es entonces ineludible preguntarse en qué medida la serotonina liberada no constituye la señal transináptica en estos fenómenos. Si, efectivamente, la serotonina pineal es la señal primaria para los cambios producidos por gonadotrofinas o testosterona, debiera por lo tanto expresarse aún en ausencia de la inervación, y la serie de experimentos de la sección III-3-3 avalan tal posibilidad.

La inyección de FSH, LH o testosterona a animales gangliectomizados y con degeneración completa de la vía simpática pineal produjo modificaciones en el contenido de serotonina pineal. La interacción "gangliectomía x hormona", detectada por análisis estadístico factorial en los animales inyectados con hormonas, constituye otra evidencia en favor de la modulación neural del efecto hormonal y, por lo tanto, de la necesidad de la presencia de ambos mecanismos, endócrino y neural, para la expresión final del efecto biológico.

Los cambios en el contenido de serotonina pineal, inducidos por gonadotrofinas o testosterona, se suprimen luego de la descentralización. Se plantea así la posibilidad de que las hormonas afecten también la actividad de las vías centrales del GCS. Esta posibilidad, obviamente, es más difícil de probar ya que implica estudios en el SNC donde la heterogeneidad de los componentes neuronales y gliales es máxima y justifica, como se ha mencionado en la Introducción, el desarrollo de un modelo adecuado como el discutido en esta tesis.

En la parte final de este trabajo, se presentan los estudios iniciales sobre captación y efectos del estradiol en el GCS los cuales sugieren que esta estructura es un modelo neuroendócrino útil para el análisis de las interacciones colinérgico-hormonales, de la misma forma que la glándula pineal (unidad anatómica pinealocitos-terminales nerviosas noradrenérgicas), según se desprende de las observaciones antes discutidas, es un paradigma adecuado para el estudio de las interacciones noradrenérgico-hormonales y serotoninérgico-hormonales.

Se eligió el estradiol ya que trabajos previos indican que el sistema simpático cervical modula las etapas tempranas de la acción de esta hormona en la glándula pineal¹²⁷. Además el tratamiento con

estradiol resulta en un incremento en la captación de $^3\text{H-NE}$ por el ganglio y en translocación del complejo estradiol-receptor nuclear en la glándula pineal, tanto en los animales control como en los descentralizados; este último efecto no se observa en los animales gangliectomizados¹²⁷. En conjunto, estos resultados ofrecen elementos de juicio en favor de un efecto localizado del estradiol a nivel del GCS y los experimentos de la sección III-3-4 tendieron a confirmar esta hipótesis.

Se estudiaron en el GCS intacto y desaferentado (descentralización) de ratas hembra castradas y administradas con estradiol, diversas actividades enzimáticas y componentes metabólicos vinculados a: 1) la biosíntesis del neurotransmisor NE: actividad de tirosina-hidroxilasa (TH); 2) su degradación: actividad de monoamino-oxidasa (MAO) y catecol-O-metiltransferasa (COMT) y 3) su liberación y recaptación: niveles de la proteína microtubular tubulina y captación de $^3\text{H-NE}$.

Algunos de los efectos del estradiol (cambios en la actividad de TH y en la captación de NE) persistieron en ausencia de la aferencia preganglionar colinérgica, mientras que otros (actividad de MAO y COMT) desaparecieron o fueron puestos en evidencia (contenido de tubulina). Es decir, existe modulación colinérgica para varios de los efectos del estradiol sobre el ganglio mientras que otros ocurren aún en ausencia de la vía neuronal aferente. En este último caso la hormona puede actuar en forma directa sobre el ganglio o a través de una segunda señal hormonal, por ejemplo, las gonadotropinas.

Si lo hace en forma directa, un requisito indispensable es la existencia de sitios receptores estrofilicos en el ganglio y los

Resultados de la sección III-3-4 indican que tales sitios son detectables en el citoplasma y núcleo de células ganglionares. La pregunta pertinente que surge aquí es en qué tipo celular ganglionar (neurona simpática, interneurona cromafín, célula glial) están presentes tales receptores estrofilicos, y una respuesta definitiva al problema sólo podrá darse con estudios autorradiográficos en animales inyectados con estradiol radiactivo.

En conjunto, los resultados de la sección III-3-4 muestran que el estradiol modifica y, a su vez, es modificado en su efecto por mecanismos colinérgicos en la vía simpática cervical. Como el hipotálamo ha sido, desde la época de Sherrington, considerado el "primer ganglio de la cadena simpática", es posible que el estudio detallado de la modulación neuroendócrina que ocurre a nivel del ganglio cervical superior arroje resultados extrapolables a regiones del SNC que por su complejidad estructural y bioquímica no sean accesibles a la metodología actual.

En conclusión, estos resultados indican que fenómenos de transducción endócrino-endócrina y endócrino-neural participan en la respuesta del sistema "glándula pineal-ganglio cervical superior" a diversas hormonas.

CONCLUSIONES

El objetivo del presente trabajo ha sido la postulación del sistema constituido por la glándula pineal y sus neuronas simpáticas aferentes como un modelo adecuado para el estudio de mecanismos básicos de integración neuroendócrina. Los resultados presentados indican que por lo menos tres interacciones principales ocurren en esta estructura:

- colinérgico-hormonal (ganglio cervical superior)
- adrenérgico-hormonal (glándula pineal)
- serotoninérgico-hormonal (glándula pineal) (Fig. 36).

Tres mecanismos básicos de transducción (neuroendócrina, endócrino-endócrina y endócrino-neural) y su respectiva interacción neurohumoral operan en el sistema glándula pineal-ganglio cervical superior. Los hallazgos que validan tal conclusión pueden resumirse de la siguiente forma:

- a) existencia de mecanismos α - y β -adrenérgicos en los pinealocitos vinculados a la secreción hormonal pineal.
- b) presencia de mecanismos serotoninérgicos pineales semejantes a los de neuronas serotoninérgicas centrales.
- c) existencia de receptores para varias hormonas en la glándula pineal.
- d) metabolismo de esteroides en la glándula pineal semejante al descrito en áreas neuroendócrinas hipotalámicas.
- e) control de receptores hormonales por la aferencia neural.
- f) supersensibilidad en la respuesta de receptores hormonales al neurotransmisor en pineales desnervadas¹²⁷.
- g) modificación de la actividad neuronal por hormonas.
- h) receptores hormonales en la vía neural.

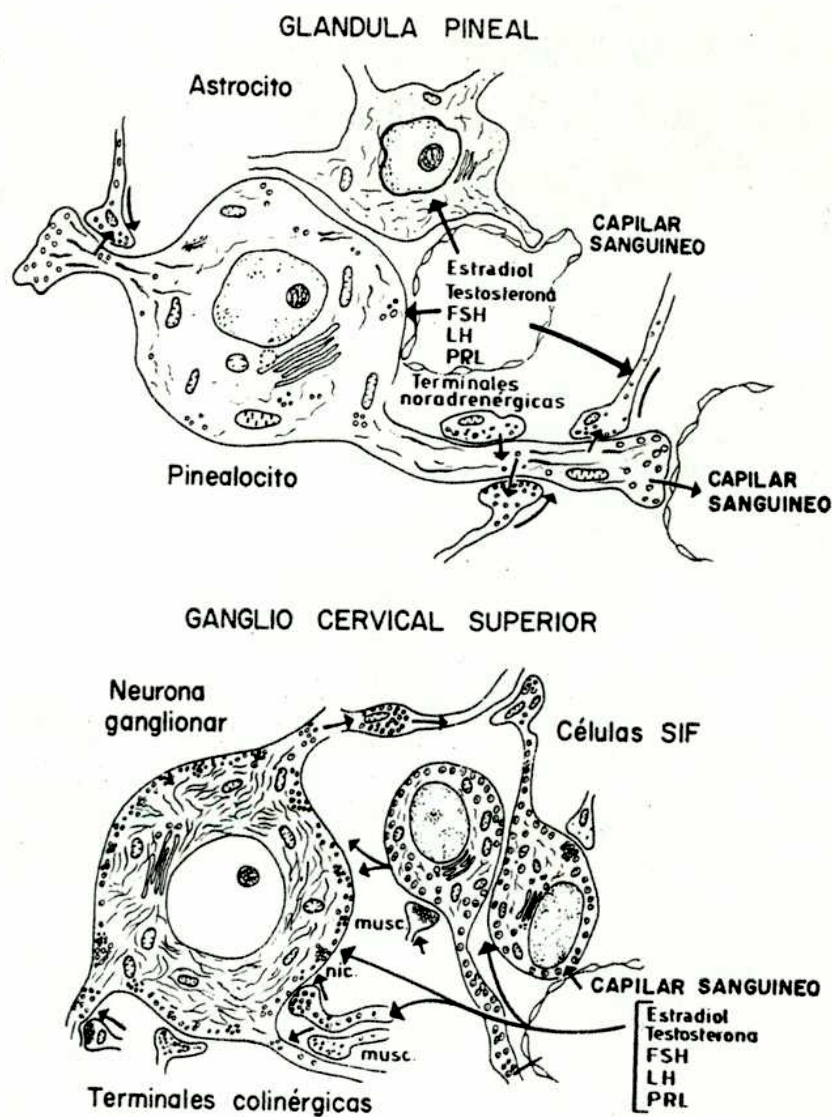
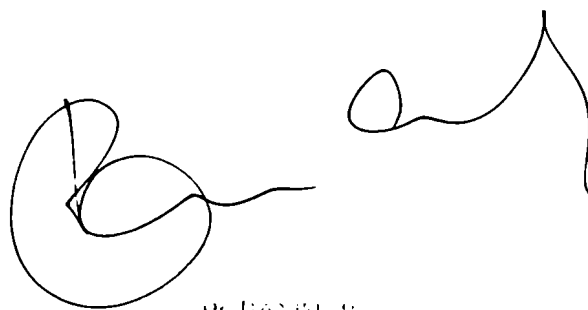


Fig. 36: Sitios teóricos de regulación de la función pineal por hormonas reproductivas. Como se discute en el texto, varios de estos efectos han sido demostrados experimentalmente.

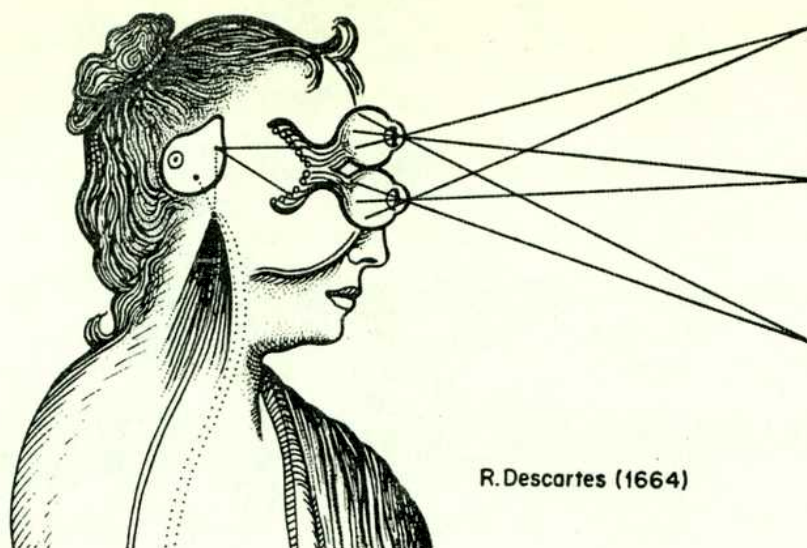
- i) correlación de la respuesta de la glándula pineal a hormonas con el estado funcional de la inervación.
- j) disociación de los efectos hormonales sobre los pinealocitos en aquéllos mediados o modulados por cambios en la actividad neural aferente y aquéllos relativamente independientes de la inervación.

Es de suponer que la totalidad o parte de estos fenómenos tienen lugar también en el hipotálamo. La profundización en el estudio de los diversos aspectos fisiológicos y farmacológicos del paradigma experimental propuesto permitirá un mayor conocimiento de los mecanismos de integración neuroendócrina.

María Triniñacas



Daniel B.



R. Descartes (1664)

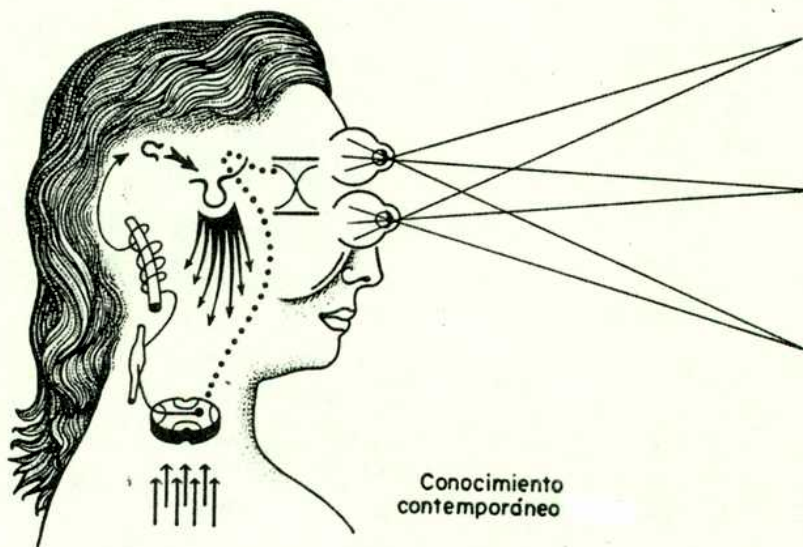
Conocimiento
contemporáneo

Fig. 37: Evolución del concepto sobre la función pineal. La figura superior es una ilustración del libro de René Descartes "Homine Figuris" (1664), quien atribuía al alma la causa de las funciones vitales y ubicaba su sitio de acción principalmente en la pineal. Según Descartes, los nervios eran tubos por los que circulaba el espíritu que, a través de la pineal, pasaba de la sangre al III ventrículo. El flujo de dicho espíritu dependía de la percepción visual que llegaba a la pineal por la vía óptica. La figura inferior resume el estado actual del conocimiento. La pineal traduce la información luminosa ambiental en respuesta endocrina. La luz afecta indirectamente a la pineal a través del sistema simpático. Sobre diversas estaciones de esta vía actúan otras señales, las hormonales. La pineal, con sus productos de secreción, contribuye al control del hipotálamo y a través de éste, de diversas trofinas hipofisarias.

VII

REFERENCIAS

1. Wurtman, R.J. (1973). Biogenic amines and endocrine function. Introduction: neuroendocrine transducers and monoamines. Fed. Proc., 32: 1769-1771.
2. Donoso, A.O. (1975). Neurotransmisores del sistema neuroendócrino. En: "Neuroendocrinología" (O. Schiaffini, A. Oriol Bosch, L. Martini y M. Motta, ed.) Ediciones Toray, Barcelona, pp. 75-108.
3. Sawyer, C.H. (1979). Electrophysiological correlates of endocrine functions. En: "Endocrinology", vol. 1 (L.J. De Groot, G.F. Cahill, W.D. Odell, L. Martini, J.T. Potts, D.H. Nelson, E. Steinberger, A.I. Winegrad, ed.). Grune-Stratton, N. York, pp. 15-20.
4. Kizer, J.S.; Palkovits, M.; Zivin, J.; Brownstein, M.; Saavedra, J.M. y Kopin, I.J. (1974). The effect of endocrinological manipulations on tyrosine hydroxylase and dopamine- β -hydroxylase activities in individual hypothalamic nuclei of the adult male rat. Endocrinology, 95: 799-812.
5. Mc. Ewen, B.S. (1979). Distribution and binding of hormones in different CNS areas. En: "Endocrinology", vol. 1 (L.J. De Groot, G.F. Cahill, W.D. Odell, L. Martini, J.T. Potts, D.H. Nelson, E. Steinberger, A.I. Winegrad, ed.). Grune-Stratton, N. York, pp. 35-40.
6. Stumpf, W.E. y Sar, M. (1977). Steroid hormone target cells in the periventricular brain: relationship to peptide hormone producing cells. Fed. Proc., 36: 1973-1977.

7. Iversen, L.L. (1979). The Chemistry of the Brain. Scientific American, 241: 118-129.
8. Lerner, A.B.; Case, J.D. y Heinzelman, R.V. Structure of melatonin. J. Am. Chem. Soc., 81: 6084.
9. Axelrod, J. (1974). The pineal gland: a neurochemical transducer. Science, 184: 1341-1348.
10. Kappers, J.A. (1976). The mammalian pineal gland: a survey. Acta Neurochirurgica, 34: 109-149.
11. Reiter, R.J. (ed.) (1978). "The Pineal and Reproduction". S. Karger, Basilea.
12. Nir, T.; Reiter, R.J. y Wurtman, R.J. (ed.) (1978). "The Pineal Gland". Springer-Verlag, Viena.
13. Cardinali, D.P. (1975). Melatonin and the endocrine role of the pineal organ. En: "Current topics in experimental endocrinology", Vol. 2 (V.H.T. James y L. Martini, ed.) Academic Press, Nueva York, pp. 107-128.
14. Río Hortega, P. del (1932). Pineal Gland. En: "Cytology and cellular pathology of the nervous system", Vol. 2 (W. Penfield, ed.) Hoeber, N. York, pp. 637-703.
15. Pévet, P. (1979). Secretory processes in the mammalian pinealocyte under natural and experimental conditions. Prog. Brain Res., 52: 149-192.
16. Pearse, A.G.E. (1976). Neurotransmission and the APUD concept. En: "Chromaffin, enterochromaffin and related cells" (Coupland, R.F. y Fujita, T., ed.) Elsevier, Amsterdam, pp.

- 147-154.
17. Moore, R.T. (1978). Neural control of pineal function in mammals and birds. J. Neural Trans., supl. 13: 47-58.
 18. Rusak, B. y Zucker, I. (1979). Neural regulation of circadian rhythms. Physiol. Rev., 59: 449-526.
 19. Cardinali, D.P. y Wurtman, R.J. (1975). Control of melatonin synthesis in the pineal organ. En: "Frontiers of pineal physiology." (Altschule, M.D., ed.). The MIT Press, Cambridge, pp. 12-41.
 20. Wolfe, D.E. (1965). The epiphyseal cell: An electron-microscopic study of its intercellular relationships and intracellular morphology in the pineal body of the albino rat. Prog. Brain Res., 10: 332-386.
 21. Rhodin, J.A.G. (ed.) (1974). "Histology" Oxford University Press, N. York.
 22. Cardinali, D.P. y Wurtman, R.J. (1975). Methods for assessing the biological activity of the pineal organ. En: "Methods in Enzymology, vol. 39, Hormone Action / part D. Isolated Cells, Tissues and Organ Systems". (B.W. O'Malley, J.G. Hardman, ed.). Academic Press, N. York, pp. 376-397.
 23. Klein, D.C. (1978). The pineal gland: a model of neuroendocrine regulation. En: "The Hypothalamus" (S. Reichlin, R.J. Baldessarini y J.B. Martin, ed.) Raven Press, N. York, pp. 303-329.
 24. Wurtman, R.J. y Cardinali, D.P. (1974). The pineal organ.

- En: Textbook of Endocrinology, 5ª edición (R. Williams, ed.), Saunders, Filadelfia, pp. 832-839.
25. Charlton, H.M.; Grocock, C.A. y Ostberg, A. (1976). The effects of pinealectomy and superior cervical ganglionectomy on the testes of the vole, Microtus agrestis. J. Reprod. Fertil., 48: 377-379.
 26. Thorpe, P.E. y Herberb, J. (1976). Studies on the duration of the breeding season and photorefractoriness in female ferrets pinealectomized or treated with melatonin. J. Endocrinol., 70: 255-262.
 27. Moguilevsky, J.; Faigón, M.R.; Scacchi, P. y Cardinali, D.P. (1979). Effect of melatonin and superior cervical ganglionectomy on luteinizing hormone release induced by estradiol-progesterone in castrated rats. Neuroendocrinology, 29: 163-168.
 28. Cardinali, D.P.; Faigón, M.R., Scacchi, P. y Moguilevsky, J. (1979). Failure of melatonin to increase plasma prolactin levels in ovariectomized rats subjected to superior cervical ganglionectomy or pinealectomy. J. Endocrinol., 82: 315-319.
 29. Barrel, G.K. y Lapwood, K.R. (1979). Effects of pinealectomy on secretion of luteinizing hormone, testosterone, and prolactin in rams exposed to various lighting regimes. J. Endocrinol., 80: 397-405.
 30. Roche, J.F.; Foster, D.L.; Karsch, F.J. y Dznick, P.J. (1970) Effect of castration and infusion of melatonin on levels of

- luteinizing hormone in sera and pituitaries of ewes. Endocrinology, 87: 1205-1210.
31. Brown, R.D.; Cowar, R.L. y Kavanaugh, J.F. (1978). Effect of pinealectomy on seasonal androgen titles, antler growth and food intake in white-tailed deer. J. Animal Sci., 47: 435-440.
 32. Rust, C.C. y Meyer, R.K. (1969). Hair color, molt and testes size in male, short-tailed weasels treated with melatonin. Science, 165: 921-922.
 33. Yamashita, K.; Mieno, M.; Shimizu, T. y Yamashita, E. (1978). Inhibition by melatonin of pituitary response to luteinizing hormone releasing hormone. J. Endocrinol., 76: 487-491.
 34. Menaker, M. y Zimmerman, N. (1976). Role of the pineal in the circadian system of birds. Amer. Zool., 16: 45-56.
 35. Cardinali, D.P.; Cuello, A.E.; Tramezzani, J.H. y Romer, J.M. (1971). Effects of pinealectomy on the testicular function of the adult male duck. Endocrinology, 89: 1082-1093.
 36. Cogburn, L.A. y Harrison, P.C. (1977). Retardation of sexual development in pinealectomized single and white leghorn cockerels. Poultry Sci., 56: 876-882.
 37. De Vlaming, V.L.; Vodicnik, M.J.; Meyer, R.A. y Meyer, M.H. (1979). The effect of pinealectomy on serum K^+ and Cl^- levels in the goldfish Carassius auratus. Gen. Comp. Endocr., 37: 131-134.
 38. Cardinali, D.P. (1975). Changes in hypothalamic neurotransmitter uptake following pinealectomy, superior cervical

- ganglionectomy or melatonin administration to rats. Neuroendocrinology, 19: 91-95.
39. Cardinali, D.P. y Freire, F. (1975). Melatonin effects on brain. Interaction with microtubule protein, inhibition of fast axoplasmic flow and induction of crystalloid and tubular formation in the hypothalamus. Mol. Cell. Endocrinol., 2: 317-330.
40. Gimeno, M.F.; Landa, A.; Sterin, N.S.; Cardinali, D.P. y Gimeno, A.L. (1980). Melatonin blocks in vitro generation of prostaglandins by the uterus and hypothalamus. Europ. J. Pharmacol., 62: 308-317.
41. Kao, L.W.L. y Weisz, J. (1977). Release of gonadotrophin-releasing hormone (Gh-Rh) from isolated, perfused medial basal hypothalamus by melatonin. Endocrinology, 100: 1723-1726.
42. Nir, I. (1978). Non-reproductive systems and the pineal gland. J. Neural Transm., supl. 13: 225-244.
43. Vriend, J. (1978). Testing the TRH hypothesis of pineal function. Med. Hypoth., 4: 376-380.
44. Karppanen, H. (1974). Effect of propranolol on the blood pressure of normotensive and pinealectomized hypertensive rats. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 281: 1-12.
45. Kitay, J.I., M.D. Altschule (1954). Effects of pineal extract administration on ovary weight in rats. Endocrinology, 55: 782-784.
46. Vaughan, M.K.; Reiter, R.J.; Mc. Kinney, T. y Vaughan, G.M.

- (1974). Inhibition of growth of gonadal dependent structures by arginine vasotocin and purified bovine pineal fractions in immature mice and hamsters. Int. J. Fertil., 19: 103-106.
47. Benson, B.; Mathews, M.J. y Rodin, A.E. (1971). A melatonin-free extract of bovine pineal with antigonadotropic activity. Life Sci., 10 (part I); 607-612.
48. Pavel, S.; Dumitru, I.; Klepsh, I. y Dorcescu, M. (1973). A gonadotropin inhibiting principle in the pineal of human fetuses. Neuroendocrinology, 13: 41-46.
49. Orts, R.J.; Benson, B. y Cook, B.F. (1974). Some antigonadotropic effects of melatonin-free bovine pineal extracts in rats. Acta Endocrinol., 76: 438-448.
50. Reiter, R.J. y Vaughan, M.K. (1977). Pineal antigonadotropic substance. Polypeptides and indoles. Life Sci., 21: 159-172.
51. Orts, R.J.; Cocan, K.M. y Yonushonis, W.P. (1975). Fertility control in female rats by bovine pineal extracts. Life Sci., 17: 531-538.
52. Pavel, S. (1978). Arginine vasotocin as a pineal hormone. J. Neural Trans., supl. 13: 135-156.
53. Nordlund, J.J. y Corner, A.B. (1977). Effects of oral melatonin on skin and on release of pituitary hormones. J. Clin. Endocr. Metab., 45: 768-774.
54. Neff, N.M.; Barret, R.E. y Costa, E. (1969). Kinetic and fluorescent histochemical analysis of the serotonin compartments in the rat pineal gland. Eur. J. Pharmac., 5: 348-356.

55. Jaim-Etcheverry, G. y Zieher, L.M. (1968). Cytochemistry of 5-hydroxytryptamine at the electron microscopic level. II. Localization in the autonomic nerves of the rat pineal gland. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat., 86: 393-400.
56. Wetterberg, L. (1978). Melatonin in humans. Physiological and clinical studies. J. Neural Transm., supl. 13: 289-310.
57. Arendt, J. (1978). Melatonin assays in body fluids. J. Neural Transm., supl. 13: 265-278.
58. Reppert, S.M.; Perlow, M.J.; Tamarkin, L. y Klein, D.C. (1979). Diurnal melatonin rhythm in primate cerebrospinal fluid. Endocrinology, 104: 295-301.
59. Hirata, F.; Hayaishi, O.; Tokuyama, T. y Senoh, S. (1974). In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. J. Biol. Chem., 249: 1311-1313.
60. Mullen, P.E.; Leone, R.M.; Hooper, J.; Smith, I.; Silman, R.E.; Finnie, M.; Carter, S. y Linsell, C. (1979). Pineal 5-methoxytryptophol in man. Psychoneuroendocrinology, 4: 117-126.
61. Martin, J.E. y Sattler, C. (1979). Developmental loss of the acute inhibitory effect of melatonin on the in vitro pituitary LH and FSH responses to LHRH. Endocrinology, 105: 1007-1012.
62. Cardinali, D.P.; Hyppä, M.T. y Wurtman, R.J. (1973). Fate of intracisternally injected melatonin by the rat brain. Neuroendocrinology, 12: 30-40.
63. Cardinali, D.P.; Vacas, M.I. y Estévez Boyer, E. (1979). Specific binding of melatonin in bovine brain. Endocrinology,

- 105: 437-441.
64. Anton-Tay, F. (1971). Pineal-brain relationships. En: "The Pineal Gland" (G.E.W. Wolstenholme, y J. Knight, ed). Churchill Livingstone, Londres; pp. 213-219.
 65. Cardinali, D.P.; Nagle, C.A. y Rosner, J.M. (1974). Incorporation of ³H-leucine into proteins in the hypothalamus and the anterior hypophysis. Effects of pinealectomy, superior cervical ganglionectomy and continuous exposure to light or darkness. Neuroendocrinology, 16: 74-83.
 66. Prevedello, M.R.; Ritta, M.N. y Cardinali, D.P. (1979). Fast axonal transport in rat sciatic nerve. Inhibition by pineal indoles. Neuroscience Lett., 13: 29-34.
 67. Ebels, I. y Prop, N. (1965). A study of the effect of melatonin on the gonads, the oestrus cycle and the pineal organ of the rat. Acta Endocrinologica, 49: 567-577.
 68. Fiske, V.M. y Huppert, L.C. (1968). Melatonin action on pineal varies with photoperiod. Science, 162: 279.
 69. Freire, F. y Cardinali, D.P. (1975). Effects of melatonin treatment and environmental lighting on the ultrastructural appearance, melatonin synthesis, norepinephrine turnover and microtubule protein content of the rat pineal gland. J. Neural Transm. 37: 237-257.
 70. El-Domeiri, A.A. y Das Gupta, T.K. (1976). The influence of pineal ablation and administration of melatonin on growth and spread of hamster melatonin. J. Surg. Oncol., 8: 197-205.
 71. Benson. B y Krasovich, M. (1977). Circadian rhythms in the

- number of granulated vesicles in mouse pinealocytes. Anat. Rec., 187: 536 (Resumen).
72. Lynch, H.J.; Eng, J.P. y Wurtman, R.J. (1973). Control of pineal indole biosynthesis by changes in sympathetic tone caused by factors other than environmental lighting. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70: 1704-1707.
73. Hyppä, M.T.; Cardinali, D.P. y Wurtman, R.J. (1973). Sex-dependent increase in pineal hydroxyindole-O-methyl-transferase activity after a single intraventricular injection of 6-hydroxydopamine to newborn rats. Neuroendocrinology, 12: 274-283.
74. Cardinali, D.P.; Ritta, M.N.; Speziale, N.S. y Gimeno, M.F. (1979). Release and specific binding of prostaglandins in bovine pineal gland. Prostaglandins, 18: 577-590.
75. Zatz, M. (1978). Sensitivity and cyclic nucleotides in the rat pineal gland. J. Neural Transm., supl. 13: 97-114.
76. Ozaki, Y.; Wurtman, R.J.; Alonso, R. y Lynch, H.J. (1978). Melatonin secretion decreases during the proestrous stage of the rat estrous cycle. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 75: 531-534.
77. Cardinali, D.P.; Nagle, C.A. y Rosner, J.M. (1974). Changes in the pineal indole metabolism and plasma progesterone levels during the estrous cycle in ewes. Steroids Lipids Res., 5: 308-315.
78. Wetterberg, L.; van Donserllar, W. y Heyden, T. (1976). Human serum melatonin changes during the menstrual cycle.

- J. Clin. Endocr. Metab., 42: 185-188.
79. Cardinali, D.P., Nagle, C.A. y Rosner, J.M. (1974). Metabolic fate of androgens in the pineal organ. Uptake, binding to cytoplasmic proteins and conversion of testosterone into 5 α -reduced metabolites. Endocrinology, 95: 179-187.
80. David, G.F.X.; Umberkoman, B.; Kumar, K. y anad Kumar, T.C. (1975). Neuroendocrine significance of the pineal. En: "Brain-Endocrine Interaction II." (K. Knigge, D. Scott, Y. Kobayashi y I. Ishii, ed.). S. Karger, Basilea, pp. 365-375.
81. Murthy, G.; Melber, A. y Roginsky, M.S. (1978). Sex steroid receptor activity in the rat pineal. En: "The Pineal Gland" (I. Nir, R.J. Reiter y R.J. Wurtman, ed.) Springer-Verlag, Viena, pp 384.
82. Ogren, L. y Woolley, D. (1976). Increase in ³H-estradiol binding in brain and pituitary with time after gonadectomy in adult male and female rats. Neuroendocrinology, 22: 259-265.
83. Cardinali, D.P., Nagle, C.A. y Rosner, J.M. (1974). Aromatization of androgens to estrogens by the rat pineal gland. Experientia, 30: 1022-1023.
84. Cardinali, D.P.; Nagle, C.A. y Rosner, J.M. (1975). Gonadal Steroids as modulators of the function of the pineal gland. Gen. Comp. Endocr., 26: 50-58.
85. Hanukoglu, I.; Karavolas, H.J. y Goy, R.W. (1977). Progesterone metabolism in the pineal gland, brain stem, thalamus and corpus callosum of the female rat. Brain Res., 125: 313-324.
86. Karavolas, H.J.; Hodges, D.R.; O'Brien, D.J. y Hanukoglu, I.

- (1978). Progesterone and 5 α -dihydroprogesterone uptake and metabolism in the pineal gland of female rats. En: "The Pineal Gland" (I. Nir; R.J. Reiter y R.J. Wurtman, ed.). Springer-Verlag, Viena, pp. 370-371.
87. Wilkinson, M. y Arendt, J. (1978). Effects of oestrogen and progesterone on rat pineal N-acetyltransferase activity and melatonin production. Experientia, 34: 667-669.
88. Quay, W.B. (1963). Circadian rhythm in rat pineal serotonin and its modifications by estrous cycle and photoperiods. Gen. comp. Endocr., 3: 473-479.
89. Cardinali, D.P.; Nagle, C.A.; Gómez, E. y Rosner, J.M. (1975). Norepinephrine turnover in the rat pineal gland. Acceleration by estradiol and testosterone. Life Sci., 16: 1717-1724.
90. Cardinali, D.P.; Gómez, E. y Rosner, J.M. (1976). Changes in ³H-leucine incorporation into pineal proteins following estradiol or testosterone administration: involvement of the sympathetic superior cervical ganglion. Endocrinology, 98: 849-858.
91. Nishi, S.; Karczmar, A.G. y Dun, N.J. (1978). Physiology and Pharmacology of ganglionic synapses as models for central transmission. En: "Advances in Pharmacology and Therapeutics", vol. 2, "Neurotransmitters" (P. Simon ed.) Pergamon Press, Paris, pp. 69-85.
92. Erankö, O. y Erankö, L. (1971). Small, intensely fluorescent granule-containing cells in sympathetic ganglion of the rat. En: "Histochemistry of Nervous Transmission" (O. Erankö, ed.) Elsevier Publishing Co., Amsterdam, pp. 39-51.
93. Kopin, I.J. y Silberstein, S.D. (1972). Axons of sympathetic

- neurons: transport of enzymes in vivo and properties of axonal sprouts in vitro. Pharmac. Rev., 24: 245-254.
94. Dehlstrom, A. (1971). Axoplasmic transport (with particular respect to adrenergic neurons). Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B., 261: 325-358.
95. Coyle, J.T. (1972). Tyrosine hydroxylase in rat brain. Cofactor requirements, regional and subcellular distribution. Biochem. Pharmacol., 21: 1935-1944.
96. Costa, E. y Neff, N.H. (1970). Estimation of turnover rates to study the metabolic regulation of the steady-state level of neuronal monoamines. En: "Handbook of Neurochemistry", vol. 4. (A. Lajtha, ed.). Plenum Press, N.Y., pp. 45-90.
97. Coyle, J.T. y Axelrod, J. (1972). Dopamine- β -hydroxylase in the rat brain: developmental characteristic. J. Neuropharm., 19: 449-459.
98. De Robertis, E. (1964). "Histophysiology of synapses and neurosecretion". Pergamon Press, Oxford.
99. Anton-Tay, F. y Wurtman, R.J. (1971). Brain monoamines and endocrine function. En: "Frontiers in Neuroendocrinology" (L. Martini y W.F. Ganong, ed.). Oxford University Press, Inc. pp. 45-66.
100. Euler, U.S. von (1972). Synthesis, uptake and storage of catecholamines in adrenergic nerves. The effects of drugs. En: "Catecholamines" Handb. Exp. Pharmk. vol. 33 (H. Blaschko y E. Muscholl, ed.) Springer-Verlag, Berlin, pp. 186-230.
101. Delorenzo, R.J. y Freedman, S.D. (1978). Calcium dependent neurotransmitter release and protein phosphorylation in synaptic

- vesicles. Biochem. Biophys. Res. Commun., 80: 183-192.
102. Thoa, N.B.; Wooten, G.F.; Axelrod, J. y Kopin, I.J. (1972). Inhibition of release of dopamine- β -hydroxylase and norepinephrine from sympathetic nerves by colchicine, vinblastine or cytochalasin-B. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash), 69: 520-522.
103. Ahlquist, P.R. (1979). Adrenoceptors. Trends in Pharm. Sci., 1: 16-18.
104. Strittmatter, W.J.; Davis, J.N. y Lefkowitz, R.J. (1977). α -adrenergic receptors in parotid cells. II. Desensitization of receptor binding sites and potassium release. J. Biol. Chem., 252: 5478-5482.
105. Kebebian, J.W.; Zatz, M.; Romero, J.A. y Axelrod, J. (1975). Rapid changes in rat pineal β -adrenergic receptor: alterations in ^3H -alprenolol binding and adenylate cyclase. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash), 72: 3735-3739.
106. Goridis, C. y Neff, N.H. (1971). Evidence for a specific monoamine oxidase associated with sympathetic nerves. Neuropharmacology, 10: 557-564.
107. Guldberg, H.C. y Marsden, Ch.A. (1975). Catechol-O-methyl transferase: pharmacological aspects and physiological role. Pharmacol. Rev., 27: 135-206.
108. Naik, D.V. y Sheriff, T.A.Q. (1975). An improved technique for transauricular hypophysectomy and autotransplant of isolated pieces of pars intermedia tissue in the evacuated pituitary capsule of the rat. Acta Endocr., 75: 677-687.
109. Neill, J.D. y Smith, M.S. (1974). Pituitary-ovarian interrelation-

- ships in the rat. En: "Current Topics in Experimental Endocrinology", vol 2 (V.H.T. James y L. Martini, ed.). Academic Press. N.Y., pp. 73-106.
110. Taleisnik, S.; Caligaris, L. y Andrada. J.J. (1971). Feedback effects of gonadal steroids on the release of gonadotropins. En: "Proc. 3rd. Int. Congr. on Hormonal Steroids". Int. Congr. Ser. 219 (V.H.T. James, y L. Martini, ed.). Excerpta, Amsterdam, pp. 699-707.
111. Kaufman, S. (1962). Phenylalanine Hydroxylase. En: "Methods in Enzymology", vol. 5 (S.P. Colowick y N.O. Kaplan, ed.) Academic Press, N.Y., pp. 809-816.
112. Jarrot, B. (1974). Methods for analyzing monoamine oxidase and catechol-O-methyltransferase in nervous tissue. En: "Research Methods in Neurochemistry", vol. 2 (N. Marks y R. Rodnight, ed.) Plenum Press, N.Y., pp. 377-388.
113. Erwin, V.G. and Dietrich, R.A. (1966). Brain Aldehyde Dehydrogenase. Localization, Purification and Properties. J. Biol. Chem. 241: 3533-3539.
114. Youdim, M.B.H.; Collins, G.G.S. y Sandler, M. (1969). Multiple forms of rat brain monoamine oxidase. Nature Lond., 223: 626-628.
115. Neff, N.H. y Yang, H.T. (1974). Another look at the monoamine oxidases and monoamine oxidase inhibition drugs. Life Sci., 14: 2061-2074.
116. Johnston, J.P. (1968). Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. Biochem. Pharmacol., 17: 1285-1297.

117. Yang, H.Y.T. y Neff, N.H. (1973). β -phenylethylamine: a specific substrate for type B monoamine oxidase of brain. J. Pharmacol. Exp. Ther., 187: 365-371.
118. Deguchi, T. y Axelrod, J. (1972). Induction and superinduction of serotonin-N-acetyltransferase by drugs and denervation of the rat pineal. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69: 2208-2211.
119. Scatchard, G. (1949). The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann. N.Y. Acad. Sci., 51: 560-670.
120. Cheng, Y-C. y Prusoff, W.H. (1973). Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. Biochem. Pharmacol., 22: 3099-3108.
121. Martin, R.G. y Ames, B.N. (1961). A Method for Determining the Sedimentation Behavior of Enzymes. Application to Protein Mixtures. J. Biol. Chem., 236: 1372-1379.
122. Bennet, J.P. Jr. y Snyder, S.H. (1975). Stereospecific binding of D-lisergic acid diethylamide (LSD) to brain membranes: relationship to serotonin receptors. Brain Res. 94: 507-518.
123. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275.
124. Ahlquist, R.P. (1948). Study of adrenotropic receptors. Am. J. Physiol., 153: 586-600.
125. Zatz, M. y O' Dea, R.F. (1977). Efflux of cyclic nucleotides from rat pineal: release of guanosine 3',5'-monophosphate from sympathetic nerve endings. Science, 197: 174-176.

126. Anderson, J.; Clark, J.H. y Peck, E.J. (1972). Oestrogen and nuclear binding sites. Determination of specific sites by ^3H -oestradiol exchange. Biochem. J., 126: 561-567.
127. Cardinali, D.P. (1977). Nuclear receptor estrogen complex in the pineal gland. Neuroendocrinology, 24: 333-346.
128. Silberstein, S.A.; Johnson, D.G.; Hanhaver, I.; Bloom, F.E. y Kopin, I.J. (1972). Axonal sprouts and ^3H -norepinephrine uptake by superior cervical ganglion in organ culture. Proc. Nat. Acad. Sci., 69: 1450-1454.
129. Laverty, R.Y. y Taylor, K.M. (1968). The fluorometric assay of catecholamines and related compounds. Improvements and extention to the hydroxyindole technique. Anal. Biochem., 22: 269-278.
130. Hyypää, M.T., Cardinali, D.P., Baumgarten, H.G. y Wurtman, R.J. (1973). Rapid accumulation of ^3H -serotonin in brains of rats receiving intraperitoneal ^3H -tryptophan: effects of 5,6-dihydroxytryptamine or female sex hormones. J. Neural Transm., 34: 111-125.
131. Meyerson, B. y Lewander, T. (1970). Serotonin synthesis inhibition and oestrous behavior in female rats. Life Sci., 9: 661-671.
132. Valenti, C., Vacas, M.I. y Cardinali, D.P. (1979). Effects of castration, estradiol and testosterone on tubulin levels of the medial basal hypothalamus and the adenohypophysis of the rat. Experientia, 35: 120-121.
133. Klein, D.C. y Weller, J.L. (1973). Adrenergic-adenosine 3',5'-monophosphate regulation of serotonin N-acetyltransferase activity to synthesis of ^3H -N-acetylserotonin and ^3H -melatonin in the cultured rat pineal gland. J. Pharmacol. Exp. Ther., 189:

516-527.

134. Smith, T.L.; Eichberg, J. y Hauser, G. (1979). Postsynaptic localization of the alpha receptor-mediated stimulation of phosphatidylinositol turnover in pineal gland. Life Sci., 24: 2179-2184.
135. Pelayo, F.; Dubocovich, M.L. y Langer, S.Z. (1977). Regulation of noradrenaline release in the rat pineal through a negative feedback mechanism mediated by presynaptic α -adrenoceptors. Europ. J. Pharmacol., 45: 317-318.
136. Davis, J.N.; Shittmatter, W.J.; Hoyler, E. y Lefkowitz, R.J. (1977). Dihydroergocryptine binding in rat brain. Brain Res., 132: 327-336.
137. Snedecor, G.W. y Cochran, W.G. (1967). "Statistical Methods". Iowa State. Universtity Press, Ames.
138. Cuatrecasas, P. y Hollenberg, M.D. (1976). Membrane receptors and hormone action. Adv. Protein Chem., 30: 251-451.
139. Brown-Grant, K. (1976). Control of gonadotropin secretion. En: "Subcellular Mechanisms in Reproductive Neuroendocrinology". (F. Naftolin, K.J. Ryan y J. Davies, ed.) Elsevier, Amsterdam, pp. 485-502.
140. Snyder, S.M. y Bennet, J.P. Jr. (1976). Neurotransmitter receptors in the brain. Biochemical identification. Ann. Rev. Physiol., 38: 153-175.
141. Wurtman, R.J.; Axelrod, J. y Potter, L.T. (1964). The uptake of ³H-melatonin in endocrine and nervous tissues and the effects of constant light exposure. J. Pharmacol. Exp. Ther., 143: 314-318.

142. Tukey, J.W. (1949). Comparing individual means in the analysis of variance. Biometrics, 5: 89-114.
143. Cardinali, D.P. y Wurtman, R.J. (1974). The pineal organ. En: "Research Methods in Neurochemistry", vol. 2 (M. Marks y R. Rodnight, ed.). Plenum Press, N.Y., pp. 389-407.
144. Brown-Grant, K. y Greig, F. (1975). A comparison of changes in the peripheral concentrations of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the rat. J. Endocr., 65: 389-397.
145. Brodie, B.B.; Costa, E.; DiLac, A; Neff, N.H. y Smookler, H.H. (1966). Application of steady-state kinetics to the estimation of synthesis rate and turnover time of tissue catecholamines. J. Pharmacol. Exp. Ther., 154: 493-498.
146. Brownstein, M.; Axelrod, J. (1974). Pineal gland: 24-hour rhythm in norepinephrine turnover. Science, 184: 163-165.
147. Elfvin, L.G.; Hökfelt, T. y Goldstein, M. (1975). Fluorescence microscopical, immunohistochemical and ultrastructural studies on sympathetic ganglia of the guinea pig, with special reference to the SIF cells and their catecholamine content. J. Ultrastruct. Res., 51: 377-396.
148. Dun, N. y Karczman, A.G. (1977). The presynaptic site of action of norepinephrine in the superior cervical ganglion of guinea pig. J. Pharmacol. Exp. Ther., 200: 328-335.
149. Li, C.C. (1964). "Introduction to experimental statistics" Mc. Graw Hill, New York.
150. Guicheney, P. y Meyer, P. (1979). Biochemical approach to pre- and post-synaptic α -adrenoceptors. Trends Pharmacol. Sci.,

1: 69-71.

151. Story, D.F., Brilay, M.S. y Langer, S.Z. (1979). Effect of 6-hydroxy dopamine treatment on the binding of ^3H -quinuclidinyl benzylate, ^3H -dihydroergocriptine and ^3H -WB 4101 to rat ventricle membranes. En: "Presynaptic Receptors" (S.Z. Langer, R. Starta y M.L. Dubocovich. ed.). Pergamon Press, Oxford, pp. 105-109.
152. Williams, L.T. y Lefkowitz (1978). "Receptor Binding Studies in Adrenergic Pharmacology". Raven Press, New York.
153. Hiley, C.R. (1978). Radioligands, adenylate cyclases and adrenoceptors. En: "Recent Advances in the Pharmacology of Adrenoceptors". (E. Szabadi; C.M. Bradshaw y P. Bevan, ed.) Elsevier, Amsterdam, pp. 99-132.
154. Vacas, M.I. y Cardinali, D.P. (1979). Diurnal changes in melatonin binding sites of hamster and rat brains. Correlation with neuroendocrine responsiveness to melatonin. Neuroscience Lett., 15: 259-264.
155. Vu Hai, M.T. and Milgrom, E. (1978). Characterization and assay of the progesterone receptor in the rat uterine cytosol. J. Endocr., 76: 21-31.
156. Kato, I. y Onouchi, T. (1977). Specific progesterone receptor in the hypothalamus and anterior hypophysis of the rat. Endocrinology, 101: 920-928.
157. Evans, R.W.; Sholiton, L.J. y Leavitt, W.W. (1978). Progesterone receptor in the rat anterior pituitary: effect of estrogen priming and adrenalectomy. Steroids, 31: 69-81.
158. Cady, P. y Dillman, R.O. (1971). Influence of catechol and

- indole amines upon pineal uptake of thyroxine. Neuroendocrinology, 8: 228-234.
159. Heward, C. y Hadley, M.E. (1975). Structure-activity relationships of melatonin and related indoleamines. Life Sci., 17: 1167
160. Messenger, E.A. y Warner, A.E. (1977). The action of melatonin on single amphibian pigment cells in tissue culture. Br. J. Pharmacol., 61: 607-614.
161. Charreau, E.H.; Dufau, M.L. y Catt, K.J. (1974). Multiple forms of solubilized gonadotropin receptors from the rat testis. J. Biol. Chem., 249: 4189-4195.
162. Anton-Tay, F.; Pelham, R.W. y Wurtman, R.J. (1969). Increased turnover of ³H-norepinephrine in rat brain following castration or treatment with ovine follicle-stimulating hormone. Endocrinology, 84: 1489-1492.
163. Mc. Cann, S.M. y Djeda, S.R. (1979). The role of brain monoamines, acetylcholine and prostaglandins in the control of anterior pituitary function. En: "Endocrinology", vol. 1 (L.J. De Groot, G.F. Cahill, W.D. Odell, L. Martini, J.T. Potts, D.H. Nelson, E. Steinberger, A.I. Winegrad, ed.). Grune-Stratton, N.Y., pp. 55-64.
164. Quay, W.B. (1974). "Pineal Chemistry". (C.C. Thomas, ed.). Springfield, Ill.
165. Rubio, M.C.; Jaim-Etcheverry, G. y Zieher, L.M. (1977). Tyrosine hydroxylase activity increases in pineal sympathetic nerves after depletion of neural serotonin. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 301: 75-78.