

Tesis de Posgrado

Prostaglandinas y función pineal : Su participación en la síntesis y mecanismo de acción de la hormona pineal melatonina

Ritta, Mónica Nora

1981

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:

Ritta, Mónica Nora. (1981). Prostaglandinas y función pineal : Su participación en la síntesis y mecanismo de acción de la hormona pineal melatonina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1675_Ritta.pdf

Cita tipo Chicago:

Ritta, Mónica Nora. "Prostaglandinas y función pineal : Su participación en la síntesis y mecanismo de acción de la hormona pineal melatonina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1981.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1675_Ritta.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Prostaglandinas y función pineal.
Su participación en la síntesis y mecanismo de
acción de la hormona pineal melatonina.

Autor: Lic. Mónica Nora Ritta.

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

-- 1981 --

1675

E. S.
-

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Daniel P. Cardinali, por haberme brindado constantemente su apoyo, su estímulo y sus consejos.

Al Dr. Carlos P. Lantos, quien hizo posible el inicio de mi tarea en el campo de la investigación.

A la Lic. Ana María Fuentes, por su generosa asistencia en la preparación de este texto.

A mis compañeros de laboratorio, que me brindaron directa o indirectamente su apoyo y colaboración haciendo posible este trabajo.

Al Centro de Estudios Farmacológicos y de Principios Naturales (CEFAPRIN), por permitir que se llevara a cabo esta investigación.

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

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

A mis padres

ABREVIATURAS

ACTH	Adrenocorticotrofina
ADP	Adenosina difosfato
A.E.	Actividad específica
AMP _c	Adenosina monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
C	Grados centígrados
¹⁴ C	Carbono 14
C.E.	Concentración efectiva 50
Ci	Curie
CoA	Coenzima A
COMT	Catecol-O-metiltransferasa
Corticosterona	11 β ,21-dihidroxi-4-pregнено-3,20-diona
DOPA	3,4-dihidroxifenilalanina
Dopamina (DA)	3,4-dihidroxifeniletilamina
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
ES	Error standard
Estradiol	1,3,5 (10)-estratrieno-3,17 β -diol
fmol	FemtomoL
FSH	Hormona folículo estimulante
GABA	Ácido gamma-amino butírico
GCS	Ganglio cervical superior
h	Hora
³ H	Tritio

hCG	Gonadotropina coriónica humana
HETE	Ácido hidroxieicosatetraenoico
HHT	Ácido 12-hidroxi-5,8,10-heptadecadienoico
HIOMT	Hidroxindol-O-metiltransferasa
HMB	Hipotálamo mediobasal
HPETE	Ácido hidroxiperoxieicosatetraenoico
Indometacina	(N-p- [clorobenzoil] -2-metil-5-metoxindol-3- acético
K_d	Constante de disociación
K_i	Constante de inhibición
KRB	Krebs-Ringer-Bicarbonato
LH	Hormona luteinizante
LHRH	Hormona liberadora de LH
M	Molar
MAO	Monoaminoxidasa
mCi	Millicurie
uCi	Microcurie
MDA	Ácido malondialdehído
Melatonina	N-acetil-5-metoxitriptamina
mg	Miligramo
ug	Microgramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mmol	Milimol
N	Normal
nM	Nanomolar

Norepinefrina (NE)	3,4-dihidroxifeniletanolamina
pg	Picogrammo
PG(s)	Prostaglandina (s)
PMS	Suero de yegua preñada
PRL	Prolactina
RPM	Revoluciones por minuto
SAM	S-adenosilmetionina
s.c.	Subcutánea
Serotonina (5-HT)	5-hidroxitriptamina
SNAT	Serotonina-N-acetiltransferasa
SNC	Sistema nervioso central
TCA	Acido tricloroacético
TCI	Tensión contráctil isométrica
Testosterona	17 β -hidroxi-5 α -androstan-3-ona
TRIS	Tris (hidroximetil)-aminometano
TSH	Tirotrófina
Tx	Tromboxano

INDICE DE CONTENIDO

I - INTRODUCCION

<u>I.1.- La Glándula Pineal</u>	<u>Pág</u>
I.1.1 - Conceptos generales y aspectos morfológicos	1
I.1.2 - Biosíntesis y metabolismo de la melatonina	9
I.1.3 - Control neural de la actividad pineal	17
I.1.4 - Efectos biológicos de la melatonina	23
<u>I.2 - Participación de las Prostaglandinas en los Mecanismos Neurales Adrenérgicos Centrales y Periféricos</u>	
I.2.1 - Biosíntesis y metabolismo de las prostaglandinas	36
I.2.2 - La unión neuroefectora adrenérgica	42
I.2.3 - Función de las prostaglandinas en los mecanismos adrenérgicos	47
<u>I.3 - Objetivos</u>	52
<u>II - MATERIALES Y METODOS</u>	
II.1 - Animales y Tejidos	53
II.2 - Producción de prostaglandinas <u>in vitro</u> por glándula pineal y HMB bovino y HMB de rata	55
II.3 - Estudio de sitios de unión específicos para prostaglandinas en la glándula pineal bovina	57
II.4 - Determinación de sitios de unión específicos para AMP _c en la glándula pineal de rata	61

	<u>Paq.</u>
II.5 - Determinación de actividades enzimáticas	
II.5.1 - Catecol-O-metiltransferasa	62
II.5.2 - Monoamino oxidasa	62
II.5.3 - Serotonina-N-acetiltransferasa	63
II.5.4 - Hidroxindol-O-metiltransferasa	64
II.6 - Determinaciones por análisis de saturación de melatonina, PGE ₂ y AMP _c	
II.6.1 - Melatonina	66
II.6.2 - Prostaglandina E ₂	67
II.6.3 - AMP _c	68
II.7 - Determinación de la liberación de NE por glándula pineal de rata <u>in vitro</u>	70
II.8 - Determinación de la actividad contráctil del útero	71
II.9 - Determinación de la agregación plaquetaria	73
II.10- Reactivos utilizados	74
II.11- Estadística	76

III - RESULTADOS

III.1 - Participación de las Prostaglandinas en el control noreadrenérgico de la glándula pineal	77
III.1.1 - Producción de prostaglandinas por la glándula pineal bovina <u>in vitro</u>	78
III.1.2 - Caracterización de sitios de unión <u>es</u> pecíficos para prostaglandinas en la glándula pineal bovina	81

III.1.3 - Efectos de la indometacina sobre la síntesis de melatonina y metabolismo monoaminérgico de la glándula pineal de rata	92
III.1.4 - Efecto de las prostaglandinas sobre la actividad de SNAT en la glándula pineal de rata <u>in vitro</u>	98
III.1.5 - Efecto de PGE ₂ sobre la acumulación de AMP _c y su unión a sitios receptores intracelulares en la glándula pineal de rata <u>in vitro</u>	101
III.1.6 - Efecto de PGE ₂ , NE y bloqueantes de la síntesis de prostaglandinas sobre la liberación de melatonina por la glándula pineal de rata <u>in vitro</u>	105
III.1.7 - Efecto de PGE ₂ sobre la liberación de NE- ³ H por la glándula pineal de rata <u>in vitro</u>	108
III.2 - Participación de las prostaglandinas en el mecanismo de acción de la hormona pineal melatonina	110
III.2.1 - Inhibición por melatonina de la producción de prostaglandinas en HMB <u>bo</u> vino y de rata	111
III.2.2 - Inhibición por melatonina de efectos vinculados a la liberación de prostaglandinas en útero de rata y plaquetas humanas	116

IV - DISCUSION

120

V - CONCLUSIONES

142

VI - REFERENCIAS

144

INDICE DE FIGURAS

	<u>Pág.</u>
<u>Fig. 1</u> : Corte sagital de la región epitalámica en los mamíferos. Relaciones anatómicas de la glándula pineal.	4
<u>Fig. 2</u> : Relaciones celulares en la glándula pineal de mamíferos.	6
<u>Fig. 3</u> : Inervación simpática de la glándula pineal de los mamíferos.	8
<u>Fig. 4</u> : Vía neuronal y secuencia metabólica de control de la síntesis de melatonina por la luz ambiental.	10
<u>Fig. 5</u> : Biosíntesis y metabolismo de la melatonina.	12
<u>Fig. 6</u> : Vía neural para el control de la función pineal.	20
<u>Fig. 7</u> : Vía metabólica del ácido araquidónico.	38
<u>Fig. 8</u> : Vías metabólicas de síntesis y metabolismo de NE.	43
<u>Fig. 9</u> : Representación esquemática de la unión neuroefectora simpática.	46
<u>Fig. 10</u> : Efecto de la NE sobre la producción de PGE y PGF por glándula pineal bovina <u>in vitro</u> .	79

- Fig. 11: Asociación de $\text{PGF}_{2\alpha}^{-3}\text{H}$ y $\text{PGE}_2^{-3}\text{H}$ al sobrenadante de 900 x g de glándulas pineales bovinas en función del tiempo de incubación. 83
- Fig. 12: Efecto del Ca^{++} sobre la unión específica de PGs^{-3}H a preparaciones crudas de membranas pineales. 84
- Fig. 13: Unión de $\text{PGE}_2^{-3}\text{H}$ a membranas de glándula pineal bovina como función de concentraciones crecientes de $\text{PGE}_2^{-3}\text{H}$ en el medio. 85
- Fig. 14: Unión de $\text{PGF}_{2\alpha}^{-3}\text{H}$ a membranas de glándula pineal bovina como función de concentraciones crecientes de $\text{PGF}_{2\alpha}^{-3}\text{H}$ en el medio. 86
- Fig. 15: Efecto del tratamiento con indometacina sobre la actividad de SNAT y contenido de melatonina pineal durante el período de oscuridad. 97
- Fig. 16: Efecto de las PGs sobre la actividad de SNAT de glándula pineal de rata in vitro. 99
- Fig. 17: Efecto de las PGs sobre la actividad de SNAT de glándula pineal de rata in vitro. 100
- Fig. 18: Efecto de las PGs sobre la acumulación de AMP_c in vitro. 102
- Fig. 19: Efecto de PGE_2 sobre la asociación de $\text{AMP}_c^{-3}\text{H}$ a la quinasa de proteínas de glándula pineal de rata in vitro (sitios de unión de ocupados). 103

	<u>Pág.</u>
<u>Fig. 20:</u> Efecto de PGE ₂ sobre la asociación de AMP _c - ³ H a la quinasa de proteínas de glándula pineal de rata <u>in vitro</u> (sitios de unión <u>to</u> tales).	104
<u>Fig. 21:</u> Efecto de la melatonina sobre la liberación inducida por NE de PGE ₂ por HMB de rata <u>in vitro</u> .	115
<u>Fig. 22:</u> Tensión isométrica desarrollada por útero de rata castrada en función del tiempo de exposición a distintas concentraciones de melatonina <u>in vitro</u> .	118
<u>Fig. 23:</u> Fórmulas estructurales de la melatonina y de la indometacina.	126
<u>Fig. 24:</u> Control neural de la actividad pineal y mecanismos celulares que participan en la síntesis de melatonina.	135
<u>Fig. 25:</u> Posibles sitios de acción de la melatonina en neuronas del SNC.	141

INDICE DE TABLAS

	<u>Pág.</u>
<u>Tabla 1:</u> Cambios endócrinos producidos por la administración de melatonina en mamíferos.	29
<u>Tabla 2:</u> Otros efectos de la melatonina en mamíferos.	34
<u>Tabla 3:</u> Efecto de la melatonina sobre la producción y liberación de PGs por explantos de glándula pineal bovina <u>in vitro</u> .	80
<u>Tabla 4:</u> Efectos de la preincubación con tripsina, exposición a alta temperatura o incubación en ausencia de indometacina sobre la unión de $\text{PGE}_2\text{-}^3\text{H}$ y $\text{PGF}_{2\alpha}\text{-}^3\text{H}$ a sitios específicos en glándula pineal bovina.	87
<u>Tabla 5:</u> Distribución subcelular de los sitios de unión para $\text{PGs-}^3\text{H}$ en glándula pineal bovina.	88
<u>Tabla 6:</u> CE_{50} y K_1 de una variedad de PGs en los estudios de competencia por los sitios de unión para $\text{PGE}_2\text{-}^3\text{H}$ (A) y $\text{PGF}_{2\alpha}\text{-}^3\text{H}$ (B) en membranas de glándula pineal bovina.	90
<u>Tabla 7:</u> Efecto de la indometacina sobre las actividades de MAD tipo A y tipo B en glándula pineal de rata.	94
<u>Tabla 8:</u> Efectos de la indometacina sobre las actividades de COMT y HIOMT en glándula pineal de rata.	95

<u>Tabla 9:</u>	Efectos de la indometacina sobre las actividades de MAO tipo A y tipo B y COMT en HMB de rata.	96
<u>Tabla 10:</u>	Efecto de la PGE ₂ sobre la liberación de melatonina al medio de incubación de glándulas pineales de rata.	106
<u>Tabla 11:</u>	Efecto de la NE, en presencia o ausencia de indometacina, ácido acetilsalicílico o ácido mefenámico sobre la liberación de melatonina al medio de incubación de glándulas pineales de rata.	107
<u>Tabla 12:</u>	Efecto de la PGE ₂ sobre la liberación de NE- ³ H por glándula pineal de rata <u>in vitro</u> .	109
<u>Tabla 13:</u>	Efecto de la melatonina sobre la producción y liberación de PGs por explantos de HMB bovino <u>in vitro</u> .	113
<u>Tabla 14:</u>	Efectos de concentraciones submicromolares de melatonina sobre la liberación espontánea de PGE ₂ por HMB de rata <u>in vitro</u> .	114
<u>Tabla 15:</u>	Inhibición por melatonina de la agregación de plaquetas inducida por ADP.	119

I. INTRODUCCION

I.1 - LA GLANDULA PINEAL

I.1.1 Conceptos generales y aspectos morfológicos

Si se acepta la ubicuidad de acción como sinónimo de importancia y se consideran como existentes las interacciones descriptas de la glándula pineal con otros órganos y sistemas, la pineal es, sin duda, una de las glándulas endócrinas de mayor influencia fisiológica. La primera descripción de este órgano se remonta al siglo III A.C. y es adjudicada a Herófilo de Alejandría. Este consideró a la glándula como una válvula reguladora del flujo en los ventrículos cerebrales. En el siglo II de nuestra era, Galeno de Pérgamo la describió detalladamente y la llamó Kornarium (del griego, pinya). Para Galeno la glándula pineal constituía el sostén de un grupo de venas cerebrales (las llamadas posteriormente "venas de Galeno").

En 1682, el anatomista inglés Thomas Gibson la denominó glándula pineal (de "penis", por su situación sobre y entre los tubérculos cuadrigéminos inferiores o "testes"). Para Descartes (1596-1650) en la glándula pineal tendría su expresión principal el alma. Esta idea influyó en la vinculación alegada de la glándula pineal con enfermedades mentales, que ha persistido hasta nuestros días.

En poco más de una década (1954-1965) el desarrollo de la investigación pineal transformó en axiomática su participación en la regulación neuroendócrina. Kitay y Altschule recopilaron en su libro "The Pineal Gland" (1954) la información en conjunto que sugería el papel de la glándula en la regulación de la función gonadal, en

la respuesta de los pigmentos de la piel de anfibios a la luz y en la conducta animal.

La hormona pineal melatonina (5-metoxi-N-acetilriptamina) fue aislada e identificada en extractos de glándulas pineales bovinas por Lerner y col. (1959), como consecuencia de la purificación del factor pineal aclarador de la piel de los anfibios. La melatonina es el prototipo de una familia de compuestos biológicamente activos, los metoxindoles, producidos por la glándula pineal de todas las especies de vertebrados conocidos, incluido el hombre. Su descubrimiento y las investigaciones subsecuentes que generó proveyeron los primeros elementos bioquímicos para el análisis experimental de la función pineal. La melatonina fue la primera sustancia que reprodujo los efectos biológicos de los extractos pineales y que revirtió las secuelas endócrinas de la pinealectomía.

Un año después del descubrimiento de Lerner y col., Axelrod y Weissbach (1960) describieron la vía biosintética de la melatonina y confirmaron que la pineal de mamíferos y vertebrados inferiores contiene todos los componentes necesarios para dicha síntesis.

Estudios bioquímicos y anatómicos llevados a cabo en varios laboratorios, demostraron un vínculo entre las variaciones de la luz ambiental y la síntesis de melatonina. En 1965, Hoffman y Reiter observaron que los fotoperíodos cortos inducían cambios gonadales en el hamster, los que eran suprimidos por la pinealectomía. En este mismo año Wurtman y Axelrod (1965) introdujeron el término "transductor neuroendócrino" para definir a la glándula pineal (es decir como a un órgano capaz de convertir una señal neural en respuesta endócrina). El cúmulo de información obtenido durante la ú

tima década indica que la glándula pineal es un "regulador de reguladores" a nivel jerárquico superior de otros procesos de control neuroendócrino (Reiter, 1980; Cardinali, 1981).

Embriológicamente, la glándula pineal proviene de una evaginación del techo del diencéfalo y está ubicada entre las comisuras habenuar y posterior; en el hombre tal evaginación se evidencia ya en el 2º mes de vida intrauterina (Fig. 1). La glándula pineal se caracteriza por una gran variabilidad anatómica a través de la escala zoológica (Ralph y col., 1979). En peces, anfibios y reptiles lacértidos contiene células fotorreceptoras semejantes a las retinianas; éstas se observan también en los órganos parapineales presentes en algunos reptiles, anuros y lacértidos. Por el contrario, la pineal de los mamíferos es típicamente endócrina y carece de fotorreceptores desarrollados, observándose rudimentos de éstos en serpientes y aves. Como órgano circunventricular la pineal está constituida por células con funciones neurosecretorias, los pinealocitos que, si bien no pueden considerarse estrictamente células nerviosas, derivan del neuroepitelio embrionario.

Los restantes representantes del grupo de órganos circunventriculares son: la eminencia media, la neurohipófisis, el área postrema y los órganos subfornical, subcomisural y vasculoso de la lámina terminal.

Los pinealocitos representan el 85% de la masa pineal; el resto está constituido por células con función de sostén (glia) y por terminales nerviosos. Los pinealocitos emiten prolongaciones que contactan en forma de pies terminales con los espacios perivasculares o, en menor proporción, con el receso pineal o su-

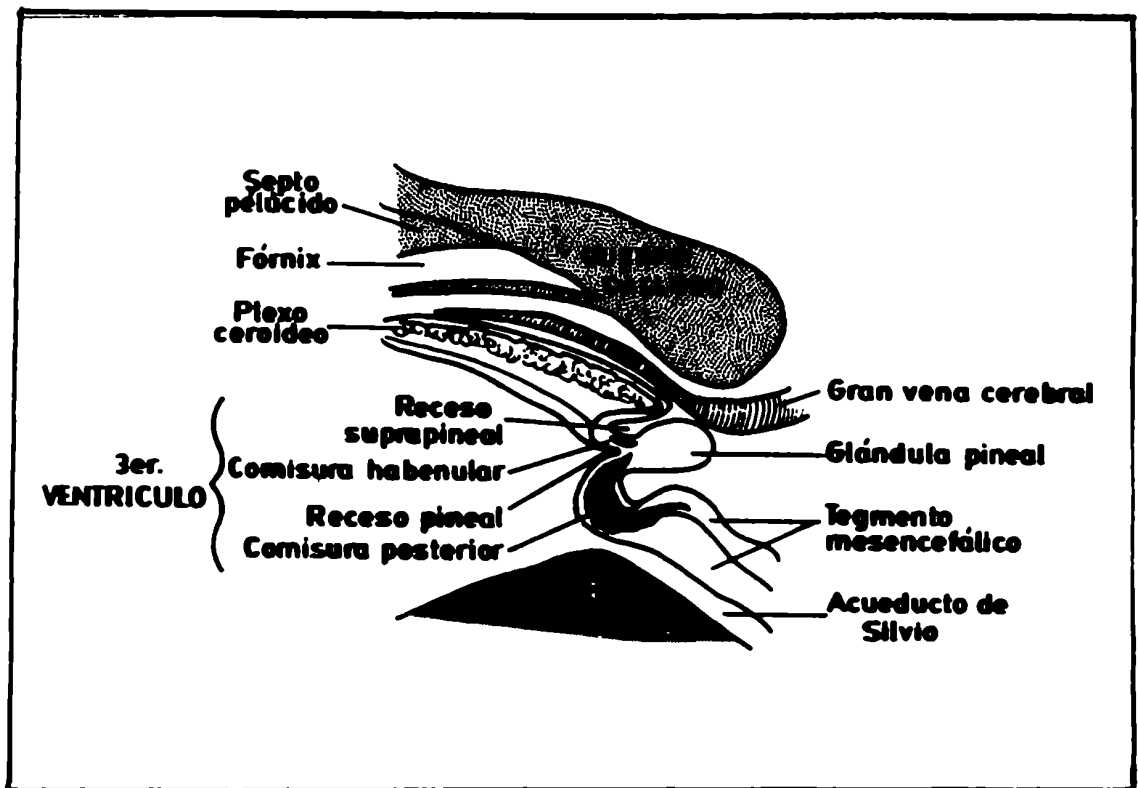


Fig. 1: Corte sagital de la región epitalámica en los mamíferos. Relaciones anatómicas de la glándula pineal. (modificado de Quay, 1974).

prapineal (Wartenberg, 1968; Gregorek y col., 1977; Matsushima y Reiter, 1977, 1978) (Fig. 2). A través de estos últimos pueden alcanzar la cavidad ventricular. No está aún aclarado el compartimiento, vascular o ventricular, hacia el cual la pineal secreta sus productos.

El flujo sanguíneo de la glándula pineal es uno de los más elevados del organismo, lo que de por sí niega la naturaleza vestigial que se le atribuyó durante años. Esta idea tuvo origen en la calcificación de la pineal humana, observada desde el desarrollo intrauterino. Los depósitos calcáreos no afectan, sin embargo, la función pineal, existiendo producción normal de melatonina en seres humanos que presentan calcificación pineal avanzada (Wurtman y Cardinali, 1974).

Uno de los principales problemas no resueltos por los anatomistas es la identificación del sitio intracelular de producción y almacenamiento de las hormonas pineales (Pévet, 1979). Se acepta en forma general que 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 del sistema simpático (Pévet, 1979). Si bien se ha propuesto que tales vesículas son el sitio de almacenamiento del o de los principios endócrinos pineales, no existe aún prueba experimental al respecto. La posibilidad de que la vesícula secretoria contenga tanto la sustancia proteica como un derivado indólico (melatonina o serotonina) constituye la extensión al pinealocito del concepto de célula APUD y paraneurona

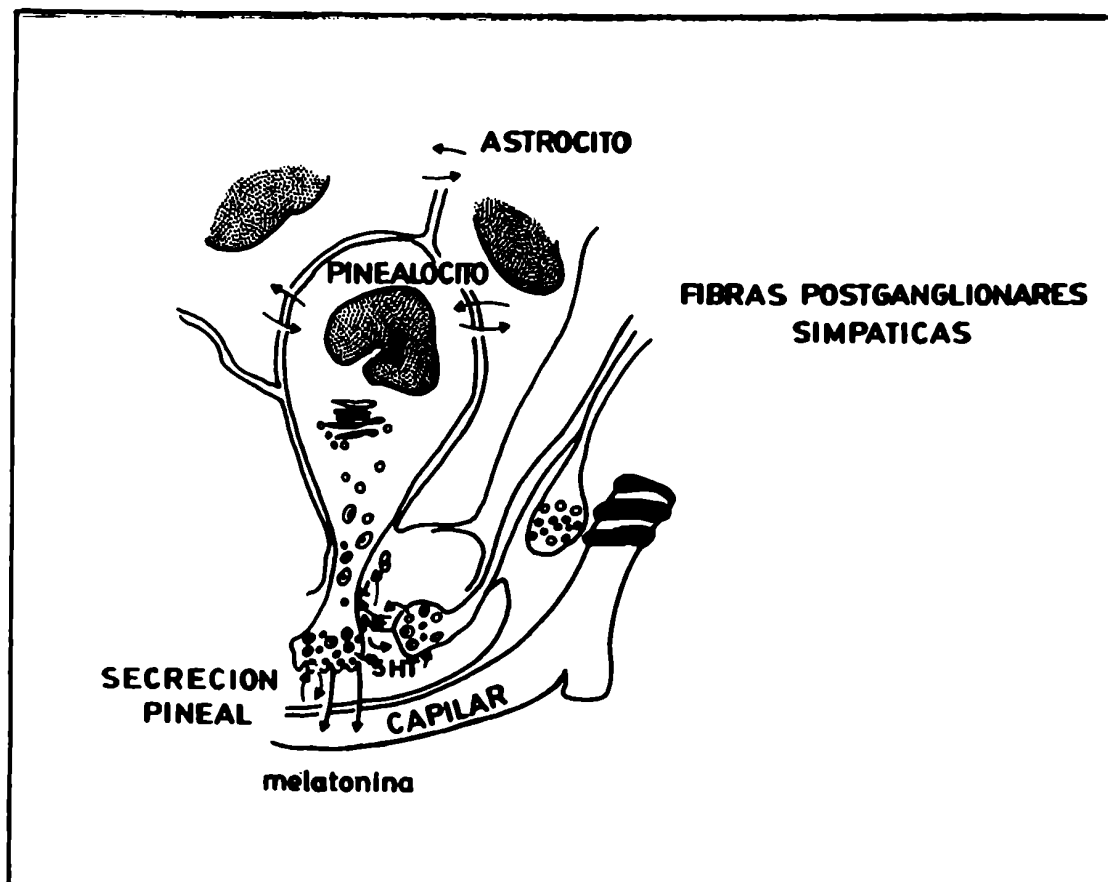


Fig. 2: Relaciones celulares en la glándula pineal de mamíferos.

NE: norepinefrina; 5-HT: serotonina; α, β : receptores adrenérgicos α y β . (modificado de Quay, 1974).

(Fujita y Kogayashi, 1979). En efecto, existen evidencias autorradiográficas que apoyan una localización preferencial de la serotonina en la matriz de las vesículas secretorias de las células parenquimatosas pineales (Pévet, 1979).

La inervación pineal de los mamíferos sigue dos disposiciones anatómicas fundamentales. En la forma más simple, fibras simpáticas postganglionares originadas en el ganglio cervical superior alcanzan a la glándula por dos vías. Un grupo (nº 1 de la Fig. 3) sigue la distribución de los vasos sanguíneos y termina en el espacio perivascular, en las cercanías de los procesos de los pinealocitos; otro grupo penetra en la glándula por el polo caudal formando los nervios conarios (nº 2 de la Fig. 3). Estos terminales tienen una distribución parenquimatosa y perivascular. Dicho tipo de inervación, que se describirá en detalle en la sección I.1.3 es la forma más común en mamíferos y existe en los roedores.

La segunda disposición de la inervación es la encontrada en los primates y lagomorfos (conejo). Consiste en una combinación de la inervación simpática anteriormente mencionada y una inervación parasimpática constituida por fibras preganglionares que nacen en el núcleo salival superior y siguen el curso de los nervios petrosos superiores y del nervio facial. Algunas de dichas fibras hacen sinapsis en pequeños ganglios ubicados en los nervios, mientras que otras terminan en neuronas ubicadas dentro de la glándula pineal. La distribución de las fibras postganglionares parasimpáticas es semejante a las simpáticas, terminando la mayoría en los espacios pericapilares. Los estudios sobre el papel de la inervación en la regulación de la función glandular discutidos en la sec

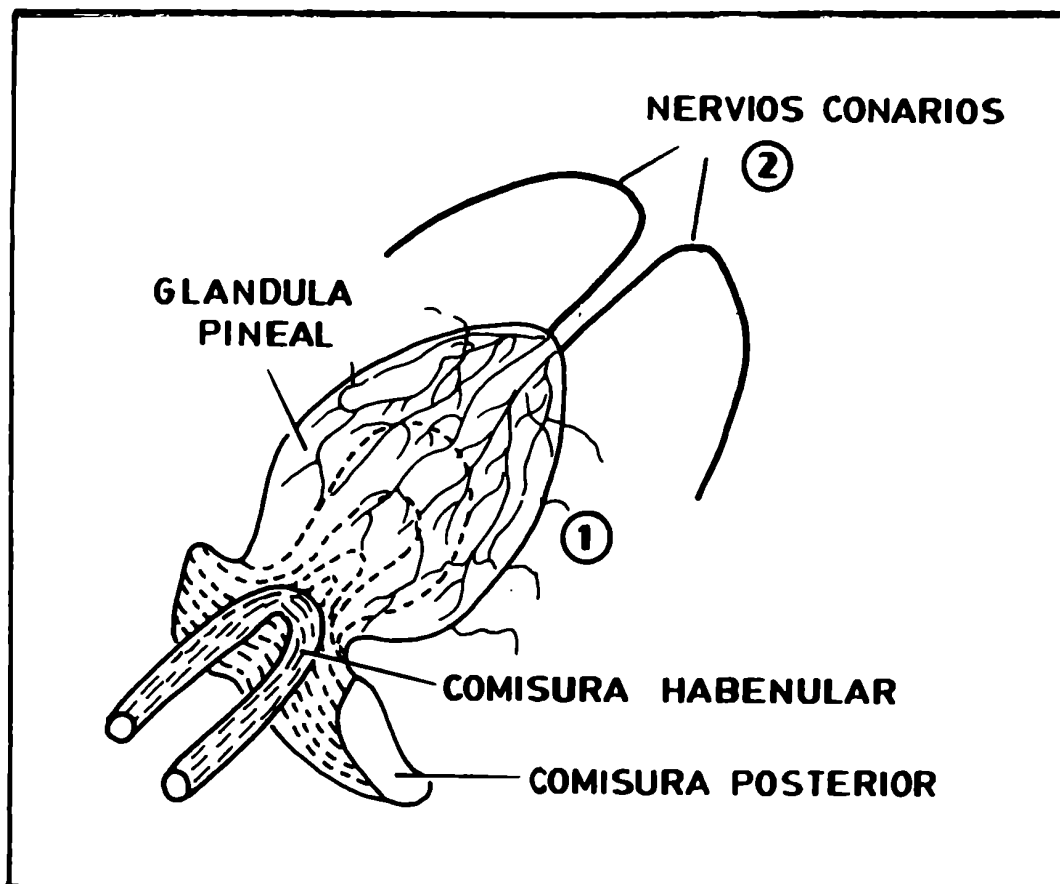


Fig. 3: Inervación simpática de la glándula pineal de los mamíferos.

Las fibras provenientes del ganglio cervical superior llegan a la glándula pineal por la pared de los vasos sanguíneos (nº 1) o a través de los nervios conarios (nº 2). (modificado de Quay, 1974).

ción I.1.3, han sido realizados en forma casi exclusiva en especies que, como la rata y el hamster, cuentan con el primer tipo de distribución.

I.1.2 Biosíntesis y metabolismo de la melatonina

La biosíntesis del derivado indólico melatonina comienza en los pinealocitos con la captación del triptofano de la circulación (Cardinali y Wurtman, 1975; Minnemann y Wurtman, 1976; Wurtman y Moskowitz, 1977) (Fig. 4 y 5). El aumento diurno del triptofano pineal precede al aumento del aminoácido libre o total sérico, hecho que sugiere que la glándula lo capta activamente (Sugden, 1979). Una vez en el pinealocito, parte del triptofano es utilizado para la síntesis proteica, mientras una fracción mayor es metabolizada a través de la vía de los indoles. La ruta metabólica principal de la serotonina es la oxidación del ciclo pirrólico a quinurenamina por la enzima 2,3-dioxigenasa (Fujiwara y col., 1978) (Fig. 4).

El triptofano es convertido en 5-hidroxitriptofano por acción de la enzima triptofano hidroxilasa (Sitaram y Lees, 1978). En contraste con otras regiones del cerebro, la triptofano hidroxilasa pineal está saturada por su sustrato (Sugden, 1979).

La descarboxilación del 5-hidroxitriptofano a serotonina es catalizada por una descarboxilasa de relativa especificidad, que participa también en la biosíntesis de catecolaminas. La serotonina es el indol presente en mayor concentración en el tejido pineal y su contenido y velocidad de recambio ("turnover") es mayor en la glándula que en otras áreas del sistema nervioso central (SNC) (Quay, 1974). Uno de los factores que determinan estas altas

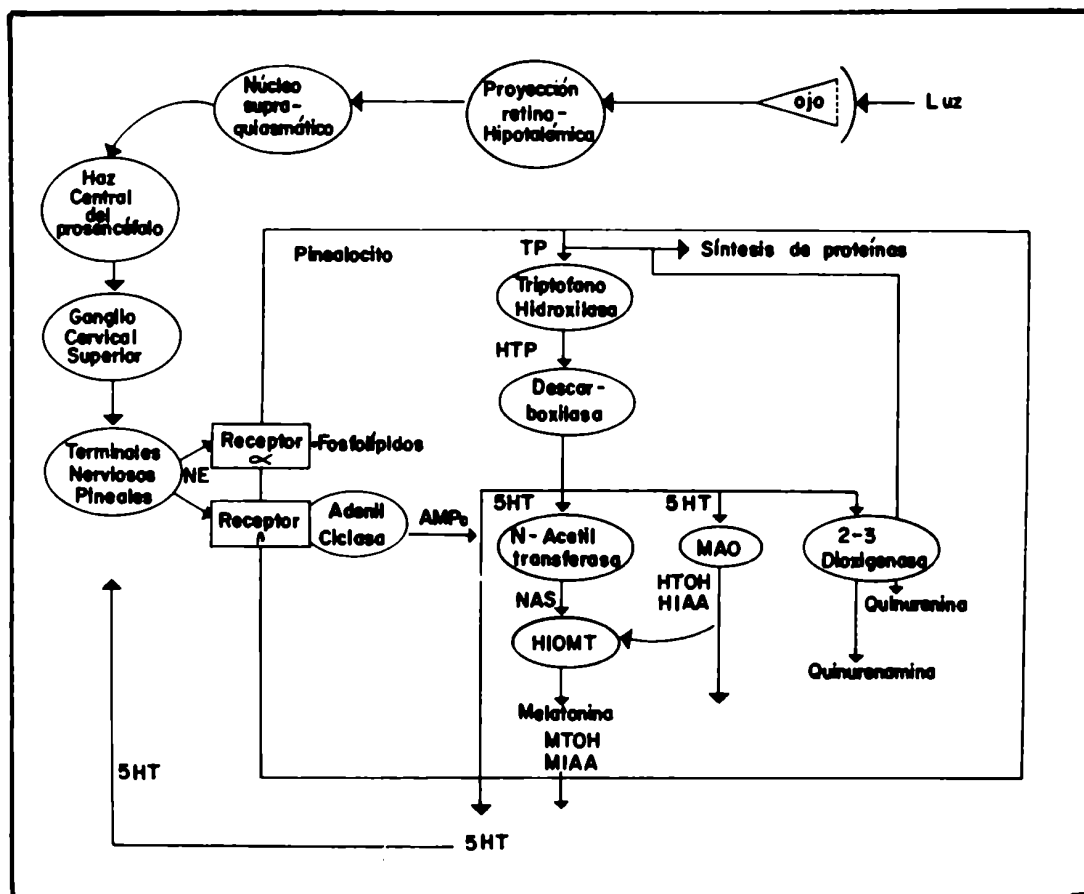


Fig. 4: Vía neuronal y secuencia metabólica de control de la síntesis de melatonina por la luz ambiental.

TP: triptofano; HTP: 5-hidroxitriptofano; 5-HT: serotonina; HIAA: ácido 5-hidroxindolacético; HTOH: 5-hidroxitriptofol; NAS: N-acetilserotonina; MTOH: 5-metoxitriptofol; MIAA: ácido 5-metoxindolacético; HIOMT: hidroxindol-O-metiltransferasa; MAO: monoaminoxidasa.

concentraciones de serotonina en la pineal es la gran actividad de la triptofano hidroxilasa glandular (Sitaram y Lees, 1978). Alrededor del 30% del total de la serotonina almacenada en la pineal de rata está localizada en los terminales nerviosos simpáticos; sin embargo, sólo los pinealocitos son capaces de producir serotonina, la que luego es captada por los terminales (Jaim-Etcheverry y Zieher, 1968). La serotonina pineal es el precursor de compuestos biológicamente activos como la melatonina y el 5-metoxitriptofol. La serotonina liberada al espacio vascular puede, asimismo, tener efectos propios (Quay, 1974).

La disminución del contenido de serotonina que se observa en la fase de oscuridad es consecuencia de cuatro vías metabólicas independientes: 1) desaminación oxidativa por la monoamino-oxidasa (MAO), 2) N-metilación, 3) oxidación por 2,3-dioxigenasa, 4) liberación al espacio extracelular (Fig. 4). La disponibilidad de la serotonina para cualquiera de estas rutas depende del equilibrio "serotonina granular \rightleftharpoons serotonina libre". Sólo la segunda está sujeta a la metabolización.

La MAO convierte a la serotonina en 5-hidroxiindol acetaldehído, un intermediario inestable que es oxidado a ácido 5-hidroxiindol acético, o reducido a 5-hidroxitriptofol por una alcohol deshidrogenasa (Fig. 4). Como se verá más adelante, se han descrito en el SNC dos isoenzimas MAO, denominadas A y B por su especificidad de sustrato. En la glándula pineal coexisten también ambas isoenzimas (Neff y Yang, 1974). La enzima tipo A es dependiente de la innervación simpática intacta, ya que su actividad desaparece después de la gangliectomía cervical superior, mientras que la MAO

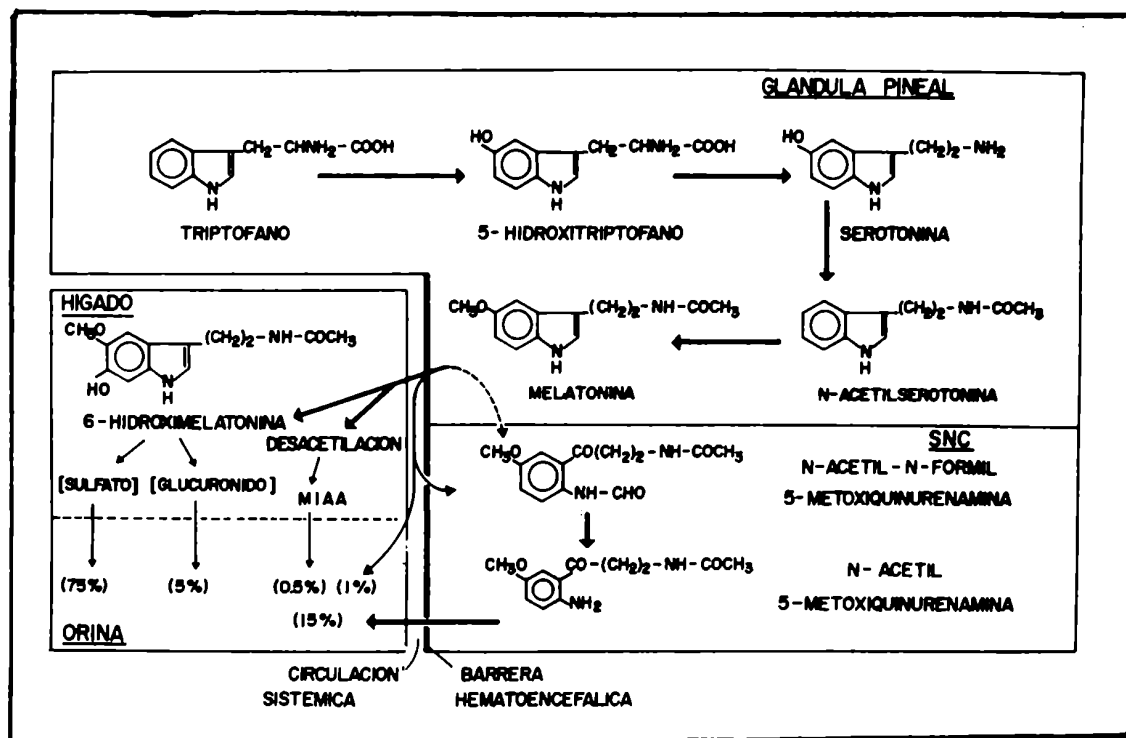


Fig. 5: Biosíntesis y metabolismo de la melatonina.

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 la sección I.1.2; MIAA: ácido 5-metoxindolacético.

tipo B permanece inalterada (Neff y Yang, 1974; Vacas y Cardinali, 1979a). Esta observación ha sido interpretada como localización neuronal y extraneuronal de la MAO A y B respectivamente.

La conversión de serotonina en melatonina involucra dos pasos enzimáticos (Fig. 4 y 5). El primero es la N-acetilación por una N-acetiltransferasa (serotonina-N-acetiltransferasa, SNAT) relativamente inespecífica para dar N-acetilserotonina (Klein, 1978). El grupo acetilo proviene del cofactor acetilcoenzima A (acetil-CoA) cuya concentración es controlada por una activa acetil-CoA-hidroxilasa (Namboodiri y col., 1979). Luego un grupo metilo es transferido de la S-adenosil-metionina (SAM) al grupo 5-hidroxi de la N-acetilserotonina, obteniéndose así melatonina; esta reacción es catalizada por la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) (Axelrod y Weissbach, 1960). Los niveles elevados del cofactor S-adenosil-metionina se deben a las altas concentraciones de la enzima L-metionina-S-adenosiltransferasa pineal, que cataliza, a partir de ATP y L-metionina, la formación de S-adenosil-metionina (Guchhait y Grau, 1978). Además de la N-acetil-serotonina, la HIOMT puede metilar al ácido 5-hidroxiindolacético, 5-hidroxitriptofol y 5-hidroxitriptofano (Fig. 4). Uno de los productos formados, 5-metoxitriptofol, es considerado como una hormona pineal presente en la circulación (Mullen y col., 1979).

La síntesis de la melatonina en los mamíferos no está restringida a la glándula pineal. La descripción inicial de posibles fuentes extrapineales de melatonina, basada en el aislamiento de HIOMT en la retina y glándula paratiroidea de roedores (Cardinali y Wurtman, 1972) y en la conversión in vitro de serotonina en melatonina por retina (Cardinali y Rosner, 1971) ha sido verificada

inmunohistoquímicamente (Bubenik y col., 1978). Luego de la pinealectomía se detectan niveles residuales de melatonina circulante en rata (Ozaki y Lynch, 1976) y oveja (Kennaway y col., 1977). Al menos en uno de los tejidos citados más arriba, la retina, la melatonina puede tener una función regulatoria sobre la migración del pigmento en las células pigmentarias retinianas (Cardinali, 1974; Pang y Yew, 1979). Las dos enzimas retinianas que catalizan la conversión de serotonina en melatonina son sensibles a la luz.

La melatonina parece ser secretada por la glándula pineal mediante simple difusión y no se ha descrito un mecanismo activo de secreción. El consenso general es que la melatonina presente en la pineal es un reflejo directo de la síntesis de la hormona (Minneman y Wurtman, 1976; Wurtman y Moskowitz, 1977; Reiter, 1980). Durante los últimos 5 años se han dedicado importantes esfuerzos al desarrollo de un radioinmunoanálisis específico para la determinación de melatonina en tejidos y fluidos biológicos (Wurtman y Moskowitz, 1977; Arendt, 1978). La aplicación de esta técnica junto a la cromatografía gaseosa asociada a espectrometría de masa (Wilson, 1978) permitió la descripción de un ritmo diario en la secreción de melatonina en todos los vertebrados estudiados hasta el momento actual (unas 40 especies). Se estableció así que la concentración de melatonina en plasma, líquido cefalorraquídeo y orina es máxima durante el período de oscuridad, sea la especie estudiada de actividad diurna o nocturna (Ozaki y Lynch, 1976; Kennaway y col., 1977; Wurtman y Moskowitz, 1977; Arendt, 1978; Rollag y col., 1978; Mullen y col., 1979; Withyachumnarnkul y Knigge, 1980).

En el hombre, la concentración máxima de melatonina plasmá-

tica es prepuberal (Silman y col., 1979). En los adultos existen también ritmos circanuales de la melatonina circulante (Arendt, 1978).

Como ya se ha mencionado, está en discusión el compartimiento primario (vascular o líquido cefalorraquídeo) al cual la pineal de mamíferos secreta la melatonina (Fig. 5). En la rata, durante el período de oscuridad hay un incremento precoz de la concentración de melatonina circulante, mientras que los niveles de la hormona en el líquido cefalorraquídeo aumentan más tarde (Withyachumnarnkul y Knigge, 1980). Evidencias anatómicas en diferentes especies tienden también a considerar como minoritaria la posible vía de secreción hacia las cavidades ventriculares cerebrales (Gregorek y col., 1977).

Alrededor del 60-70% de la melatonina presente en el plasma está asociada a albúmina (Cardinali y col., 1972). Por lo tanto, sólo el 40% correspondiente a la hormona libre es capaz de llegar al líquido cefalorraquídeo atravesando la barrera hematoencefálica. Sin embargo, datos recientes indican que la melatonina asociada a la albúmina puede también ser transportada hacia el cerebro (Pardridge y Mietus, 1980). El primer paso en el transporte de la hormona hacia el líquido cefalorraquídeo sería su acumulación en el plexo coroideo (Trentini y col., 1979; Smulders y Wright, 1980).

La degradación metabólica de la melatonina ha sido estudiada luego de la administración sistémica o intracerebral de la hormona radiactiva. La inyección intravenosa resultó en una rápida desaparición de la melatonina radiactiva del torrente sanguíneo

(Kopin y col., 1961; Wurtman y col., 1964; Reppert y col., 1979; Cardinali, 1981).

El hígado es el principal sitio de inactivación. El metoxindol se hidroxila a un compuesto carente de actividad biológica, la 6-hidroximelatonina, el que se conjuga luego con ácido glucurónico o sulfúrico, forma excretada por orina y heces (Cardinali, 1974; Kappers y Pévet, 1979)(Fig. 5). Alrededor de un 70-80% de la melatonina urinaria corresponde a sulfatos y el 5% a glucurónido. La melatonina remanente permanece inalterada (< 1%), como ácido 5-metoxindolacético (0.5%) o como un metabolito no indólico (15%), identificado como N-acetil-5-metoxiquinurenamina (Hirata y col., 1974). El ácido 5-metoxindolacético es producido periféricamente en el hígado por desacetilación de la melatonina (Rogawski y col., 1979).

Fue en la rata donde se realizaron por primera vez los estudios cinéticos del metabolismo cerebral de la melatonina (Cardinali y col., 1973 a). Después de una única inyección intracisternal, la melatonina desaparece rápidamente del cerebro, detectándose sólo un 5% de la dosis administrada 5 min después. Este dato sugiere un rápido intercambio de la hormona del líquido cefalorraquídeo con la del compartimiento vascular.

La concentración de melatonina en el hipotálamo es 4 a 5 veces mayor que en el resto del cerebro, tanto después de la inyección intraventricular como intracisternal del compuesto radiactivo (Anton-Tay y Wurtman, 1969; Cardinali y col., 1973 a). El metabolismo de la melatonina en el cerebro es activo: 1 h después de la inyección intracisternal, sólo un 30-40% del compuesto original

está presente en el cerebro (Cardinali y col., 1973 a). Estudios llevados a cabo tanto in vitro como in vivo indican que la melatonina cerebral es oxidada a N-acetil-5-metoxiquinurenamina, formándose como metabolito intermedio N-formil-5-metoxiquinurenamina (Hirata y col., 1974)(Fig. 5).

I.1.3 Control neural de la actividad pineal

Las vías neurales a través de las cuales el cerebro controla la función pineal se estudiaron en relación a los mecanismos que median los efectos de la luz ambiental sobre la actividad de la glándula (Cardinali y Wurtman, 1975; Minneman y Wurtman, 1976; Wurtman y Moskowitz, 1977; Reiter, 1980; Cardinali, 1981). Si bien en algunos reptiles y aves la glándula pineal (y probablemente otras zonas del SNC) responde directamente a la información lumínica que penetra a través de la calota craneana, en los mamíferos la fotorrecepción ha quedado restringida exclusivamente a los ojos. Ya que la actividad pineal en los mamíferos está aún bajo dependencia del fotoperíodo ambiental, fue necesario que se desarrollara una conexión humoral o neural entre la retina y la glándula, responsable de la transmisión de la información fótica. De las dos posibilidades teóricas (humoral o neural), en los mamíferos se desarrolló la segunda. Ya hemos analizado en la sección I.1.1 algunas de las características morfológicas de la neurona final de dicha vía. Comprende axones simpáticos periféricos originados en el ganglio cervical superior que arriban a la pineal por la pared de sus arterias irrigantes y forman los nervios conarios del polo caudal de la misma (Kappers, 1960, 1965) (Fig. 3). Como hemos visto, en

la pineal las fibras terminan primariamente en los espacios perivasculares (Wartemberg, 1968; Matsushima y Reiter, 1977) y en las cercanías de los elementos del parénquima (Matsushima y Reiter, 1978) (Fig. 2).

A través de estos terminales neurales, la luz inhibe la producción de melatonina. La exposición de los animales a la luz disminuye la actividad neural en los terminales, mientras que lo opuesto se observa durante la fase de oscuridad (Klein, 1978). Cualquier maniobra experimental que cause una activación importante del sistema nervioso simpático puede eliminar el efecto inhibitorio de la luz y así estimular la síntesis de melatonina, siempre que tal estímulo se aplique en el momento apropiado del día. El ciclo diario de luz y oscuridad, al cual la mayoría de los animales están expuestos, genera un ritmo paralelo en las funciones metabólicas pineales relacionadas con la síntesis de melatonina. Estas comprenden: el "turnover" de norepinefrina (NE) en las terminales nerviosas (Brownstein y Axelrod, 1974), receptores α - (Vacas, 1980) y β -adrenérgicos (Romero y col., 1975), actividad eléctrica pineal (Semm y Vollrath, 1979), niveles de adenilciclase y AMP_c (Oleshansky y Neff, 1978; Zetz, 1978), fosfodiesterasa (Oleshansky y Neff, 1978), triptofano hidroxilasa (Siteram y Lees, 1978), HIOMT (Wurtman y Moskowitz, 1977), SNAT (Klein, 1978), serotonina (Quay, 1974) y contenido de melatonina (Reiter, 1980), así también como la concentración de la hormona pineal en plasma y líquido cefalorraquídeo (Ozaki y Lynch, 1976; Arendt y col., 1977; Wurtman y Moskowitz, 1977; Arendt, 1978; Rollag y col., 1978; Vaughan y col., 1978; Wilson, 1978; Mullen y col., 1979; Reppert

y col., 1979; Withyachumnarnkul y Knigge, 1980).

Los globos oculares deben estar presentes para que la pineal responda a la iluminación ambiental, lo que indica que el fotorreceptor reside en el ojo. Sin embargo, los elementos fotorreceptores clásicos de la retina parecen tener poca importancia; por ejemplo, la pineal de rata en la cual los bastones han sido destruídos por exposición continua a la luz, es capaz de responder normalmente a cambios en el fotoperíodo (Reiter y Klein, 1971). Si las retinas son lesionadas quirúrgicamente, pero el resto del ojo se mantiene intacto, la función pineal no se inhibe por la luz (Reiter y Johnson, 1974).

La vía neural que vincula la retina con la glándula pineal está resumida en la Fig. 6. Los impulsos neurales que proceden de la retina con destino a la glándula pineal llegan al cerebro a través de axones de las células ganglionares retinianas que terminan en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (haz retino-hipotalámico)(nº 1 de la Fig. 6). Esta proyección directa desde la retina hasta el núcleo supraquiasmático parece ser un componente general del sistema de la visión de los mamíferos (Moore, 1973; Reiter, 1980). Las vías neurales eferentes del núcleo supraquiasmático, que se proyectan a través del hipotálamo, han sido caracterizadas topográficamente por estudios de lesiones estereotáxicas. Tales lesiones indican que los haces de fibras descendentes o ascendentes en el área lateral del hipotálamo son críticos para la función normal de la pineal (Moore y col., 1968; Reiter, 1972; Reiter, 1980). La información neural es transferida desde el núcleo supraquiasmático hacia el segmento torácico de la médula es

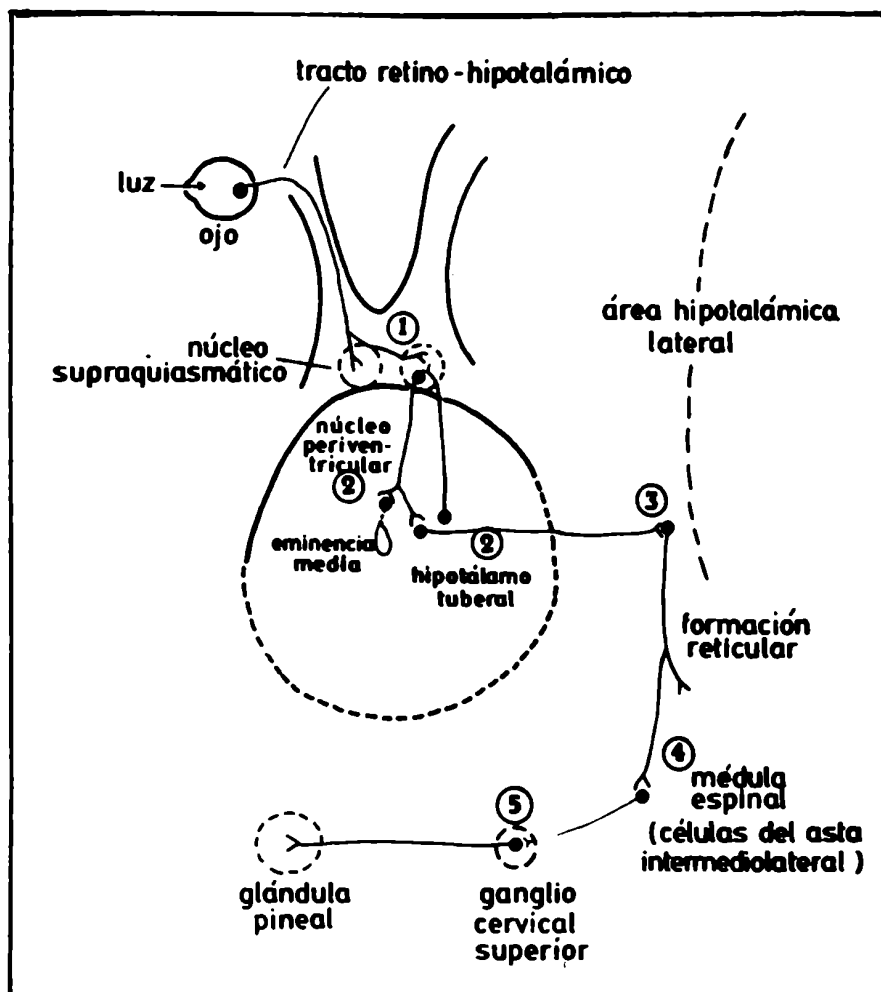


Fig. 6: Vía neural para el control de la función pineal.

Los números designan las distintas etapas de la vía neural descritas en el texto (pág. 19).

pinal por una vía que se proyecta caudalmente a las áreas periventricular y tuberal del hipotálamo (nº 2 de la Fig. 6)(Szentagothai y col., 1968; Swanson y Cowan, 1975). Los axones del área ventrotuberal se proyectan al hipotálamo lateral (nº 3 de la Fig. 6) y finalmente neuronas de esta localización proyectan sus axones a través del tallo cerebral directamente sobre células del asta intermediolateral de la médula espinal torácica (neuronas simpáticas preganglionares)(nº 4 de la Fig. 6)(Saper y col., 1976). Esta secuencia de neuronas tiene como última estación neuronal al ganglio cervical superior (nº 5 de la Fig. 6)(Moore, 1978). Trabajos recientes sugieren que la porción central de esta vía neural es susceptible a la manipulación farmacológica ya que la infusión de drogas colinérgicas en la zona del núcleo supraquiasmático o la inyección de agentes α -adrenérgicos en los ventrículos cerebrales modifican la síntesis de melatonina en la pineal de rata (Alphs y col., 1980; Zatz, 1980).

La glándula pineal de rata constituye un excelente modelo para estudiar el control neural de las respuestas celulares. La estimulación β -adrenérgica producida por la liberación de NE de los terminales neurales pineales desencadena una secuencia de fenómenos que conducen al incremento de la síntesis de hormonas pineales. Tal cascada metabólica comprende: cambios en el potencial de membrana (Sakai y Marks, 1972), incremento en actividad de adenilciclase (Davis, 1978; Weiss y Crayton, 1970) y niveles de AMP_c (Deguchi, 1973), fosforilación de histonas (Zatz, 1978), aumento en la síntesis de ARN (Cardinali y col., 1973b; Zatz, 1978) y proteínas (Wurtman y col., 1969) y activación de las enzimas que sintetiz

zen melatonina, SNAT (Klein y Weller, 1970) y HIOMT (Cardinali y col., 1973). Estos cambios bioquímicos explican el aumento de melatonina en líquido cefalorraquídeo y plasma que sigue a la exposición de los animales a la oscuridad (Hedlund y col., 1977). En el presente trabajo de tesis se estudia la participación de las prostaglandinas (PGs) en dicha secuencia metabólica. Como antecedente de dichos estudios debe citarse la comunicación preliminar de Szabo y Friedhoff (1976) en la que la inyección de indometacina, comúnmente utilizada para inhibir la síntesis de PGs, bloquea la estimulación de SNAT durante la oscuridad.

La inducción de SNAT que ocurre tempranamente durante la fase de oscuridad se puede reproducir en cultivos de pineal por el agregado de dibutiril-AMP_c o agonistas β -adrenérgicos. Durante la transición de la oscuridad a la luz, el "turnover" de NE disminuye y hay una caída marcada de la actividad de SNAT. Aún no se conocen los mecanismos involucrados en tal disminución. Las evidencias disponibles demuestran que la reducción de la actividad enzimática después de una exposición fugaz a la luz o luego de la administración del antagonista β -adrenérgico propranolol es muy rápida (5 min). Por el contrario, la vida media de la SNAT, determinada usando un inhibidor de la síntesis proteica, como la cicloheximida, es larga (alrededor de 60 min). Una posible explicación de esta discrepancia fue dada en cultivos celulares de pinealocitos donde se comprobó que la rápida reducción que sigue a la exposición a la luz depende de la disminución abrupta de los niveles de AMP_c (Klein, 1978). Por consiguiente, el AMP_c regula los niveles de SNAT no sólo actuando a nivel de la transcripción y transduc-

ción sino en el mantenimiento de la actividad enzimática durante el período de oscuridad.

Numerosas evidencias experimentales indican que la glándula pineal puede ser super o subsensible a la estimulación por NE (Minneman y Wurtman, 1976; Klein, 1978; Oleshansky y Neff, 1978; Zatz, 1978). Tal respuesta está determinada por el grado y duración de la exposición previa al transmisor. La incubación de la glándula pineal con agonistas β -adrenérgicos resulta en una rápida pérdida de la capacidad pineal para responder a la estimulación adrenérgica subsecuente con aumento de la actividad SNAT. Cuanto mayor es la interacción del agonista con el receptor, ya sea por exposición prolongada in vivo o in vitro, menos sensible se torna el sistema a una posterior estimulación. Los mecanismos responsables del control de estos cambios en sensibilidad involucran tanto al sistema de la adenilciclase como a los pasos bioquímicos posteriores a la síntesis de AMP_c, de tal manera que la efectividad del AMP_c generado es relativamente mayor en glándulas supersensibles que subsensibles. (Minneman y Wurtman, 1976; Zatz, 1977; Klein, 1978; Oleshansky y Neff, 1978; Zatz, 1978).

I.1.4 Efectos biológicos de la melatonina

La melatonina secretada por la glándula pineal participa en numerosos mecanismos neurales y neuroendócrinos, entre ellos el control de las funciones gonadal, adrenal y tiroidea, el sueño y varios ritmos biológicos. La pineal constituye un componente esencial del sistema neuroendócrino, regulador de ritmos circanuales en la actividad endócrina, especialmente el de la reproducción. Si hamsters, de ambos sexos, son privados de luz ya sea por ex -

tirpación ocular o exponiéndolos a fotoperíodos de menos de 12.5 h de luz por día, éstos presentan regresión gonadal en 8-10 semanas (Hoffman y Reiter, 1965; Berndtson y Desjardina, 1974; Tamarkin y col., 1976 a, 1976 b; Reiter, 1980). En hamsters pinealectomizados la regresión gonadal asociada al fotoperíodo no se observa, indicando que los efectos de la oscuridad sobre el aparato neuroendócrino son mediados por la pineal (Hoffman y Reiter, 1965; Blask y col., 1979; Turek, 1979; Reiter, 1980).

Ratas pinealectomizadas sometidas a 12-14 h de luz por día no presentan, salvo excepción, cambios endócrinos permanentes. Estas observaciones sugieren que, en la rata, la ausencia de la glándula pineal es compensada por el desarrollo de un nuevo estado de equilibrio entre las señales que modulan la función hipotalámica. Según Reiter (1977, 1978, 1979, 1980) la rata, un animal de hábitos nocturnos en su hábitat natural está, en las condiciones de luz del laboratorio (12-14 h de luz) sujeta a fotoperíodos que determinan una depresión artificial de la actividad pineal. En ciertas condiciones experimentales, como la desnutrición, anosmia o el tratamiento neonatal con esteroides, el hipotálamo de la rata es más sensible a la melatonina endógena o a la administrada en forma exógena (Reiter, 1977, 1978, 1979, 1980; Cardinali, 1981).

En las Tablas 1 y 2 se resumen los efectos de la melatonina sobre las distintas funciones fisiológicas en mamíferos (Cardinali, 1981). En el hamster, hurón y, probablemente, la rata, la melatonina es capaz de contrarrestar los efectos de la pinealectomía si es inyectada en el momento apropiado del día; por ejemplo el hamster es insensible a la hormona exógena durante la primera etapa del

período de luz (Tamarkin y col., 1976 a, 1976 b; Goldman y col., 1979). Wurtman y col. (1963) llevaron a cabo los primeros estudios sobre la participación de la melatonina en la fisiología gonadal de los mamíferos, demostrando que en ratas hembra inyectadas con melatonina existe hipotrofia e hipofuncionalidad ovárica. A partir de este hallazgo, numerosos estudios en diversas situaciones neuroendócrinas revelaron que el tratamiento con melatonina atrasa la apertura vaginal e inhibe (si es inyectada durante el proestro) la liberación de LH y la ovulación. Este y otros efectos de la melatonina sobre la actividad neuroendócrina están enumerados en la Tabla 1 (pág. 29).

Aún no han sido aclarados definitivamente el sitio o los mecanismos celulares que median la acción neuroendócrina de la melatonina. Se acepta que el cerebro constituye el principal sitio de acción, sin excluirse sitios periféricos como las glándulas endócrinas y tejidos efectores de la hormona. Una serie de funciones metabólicas centrales son modificadas por el tratamiento con melatonina (Tablas 1 y 2). Estas son: la síntesis de proteínas (Cardinali y col., 1974a), contenido de serotonina y ácido gamma aminobutírico (GABA) (Anton-Tay, 1971), la liberación y recaptación sinaptosomal de neurotransmisores, en especial de serotonina (Cardinali, 1975; Cardinali y col., 1975 a), la liberación y contenido hipotalámico de LHRH (Kao y Weisz, 1977; Leonardelli y col., 1978). Tales observaciones bioquímicas se han acompañado de estudios ultraestructurales que indican alteración por el tratamiento con melatonina en la eminencia media y glándula pineal (Cardinali y Freire, 1975; Freire y Cardinali, 1975; El-Domeiri y Das Gupta,

1976; Benson y Krasovich, 1977).

Si se inyecta melatonina-³H en la circulación general, la hormona penetra en todos los tejidos, inclusive en el SNC (Wurtman y col., 1964). Cuando el compuesto marcado se administra en el líquido cefalorraquídeo por inyección intraventricular o intracisternal la melatonina se concentra en el hipotálamo y mesencéfalo (Cardinali y col., 1973a). Por cromatografía gaseosa asociada a espectroscopía de masa (Koslow y Green, 1973) e inmunohistoquímica (Bubenik y col., 1976) se ha identificado melatonina en el hipotálamo de la rata.

La descripción de mecanismos de captación saturables para melatonina en el cerebro de la rata (Cardinali y col., 1979a) planteó la posible existencia de receptores neurales para la hormona. Recientemente se han descrito tales sitios de unión específicos para melatonina en preparaciones de membrana de cerebro, particularmente en el hipotálamo mediobasal (HMB) (Cardinali y col., 1978; Cardinali y col., 1979a). El "binding" de melatonina resultó dependiente del entorno iónico, ya que el agregado de K^+ y Na^+ inhibió dicha asociación mientras que el Ca^{++} la incrementó. Los ensayos con compuestos análogos de la melatonina indicaron que el grupo 5-metoxi es necesario para que la unión sea significativa, excepto en el caso de estar presente una amina primaria (Cardinali y col., 1979a). La unión de melatonina a diversas zonas del cerebro es compatible con los efectos farmacológicos del indol pineal sobre el SNC, resumidos en las Tablas 1 y 2. Una de estas regiones es la glándula pineal donde también se detectan receptores específicos para la hormona (Vacas y Cardinali, 1980).

Si bien para la descripción de un receptor las propiedades de los sitios de unión (especificidad, alta afinidad, baja capacidad, etc.) son un requisito sine qua non, es importante además la caracterización de una actividad biológica asociada a los mismos en la misma preparación celular. En el caso de la melatonina, la consideración de los sitios de unión como receptores se ha basado en estudios correlativos con la respuesta neuroendócrina a la hormona. Vacas y Cardinali (1979 b) demostraron que el cerebro de hamster y rata la concentración de los sitios de unión varía durante el día en forma concomitante con la sensibilidad neuroendócrina a la hormona. De acuerdo con los datos neuroendócrinos (Tabla 1) que indican que la melatonina es activa en horas de la tarde, el número total de sitios de unión de melatonina en cerebros de rata y hamster fue, a las 2000 h, 34-56% mayor que a las 0700 h, sin que la afinidad se modificase. Ya que se estimaron los sitios totales, ocupados y desocupados, estos resultados indican que hay una mayor disponibilidad de sitios receptores para la melatonina durante el período de sensibilidad neuroendócrina a la hormona.

Un importante factor regulatorio de la concentración de los sitios es probablemente la secreción endógena de melatonina. La exposición a altas concentraciones de melatonina durante la fase de oscuridad determina la pérdida de sensibilidad del sistema neuroendócrino a la hormona endógena por desensibilización ("down regulation") de los sitios receptores, mientras que durante el período de luz el número de sitios aumenta (ya que los niveles de la hormona son bajos) hasta restaurarse la sensibilidad hacia el final de este período (Vacas y Cardinali, 1979 b; Reiter, 1980).

Estas diferencias en el número de receptores desaparecen ante cualquier alteración en el ritmo diario de secreción de melatonina, así como lo hacen las respuestas neuroendócrinas (Vacas y Cardinali, 1979 b).

En el presente trabajo de tesis se estudia la participación de las PGs en el mecanismo de acción de la melatonina. Tal hipótesis fue elaborada a partir de la observación que la melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) y la indometacina (N-p- [clorobenzoil]-2-metil-5-metoxindol-3-acético) presentan similitud estructural, tienen propiedades antigénicas en común (Levine y Riceberg, 1975) y muestran destacable coincidencia en sus efectos neuroendócrinos (Tabla I, Mc Cann y col., 1976). Específicamente se trató de elucidar si la melatonina afecta la síntesis de PGs en el HMB en las concentraciones efectivas para saturar sus sitios receptores cerebrales.

Tabla 1Cambios endócrinos producidos por la administración de melatonina en mamíferos.1. Función GonadalHamster

- Inyectada en la última parte del período de luz o de oscuridad produce regresión gonadal y disminución de la liberación de LH, PRL y FSH en machos (Tamarkin y col., 1976 b; Goldman y col., 1979). En hembras altera el ciclo e inhibe las descargas de LH y FSH en la tarde del proestro (Tamarkin y col., 1976 a; Andre y Parrish, 1979).
- Implantada s.c. previene la regresión gonadal debida a exposición a fotoperíodos cortos (Hoffman, 1979; Reiter, 1980).
- Pubertad retrasada en machos (Rissman, 1980).

Rata

- Apertura vaginal retardada (Collu y col., 1971). Inhibición de la ovulación inducida por suero de yegua preñada (PMS) en ratas inmaduras (Longnecker y Gallo, 1971).
- Disminución del peso testicular (Mas y col., 1979), de la espermatogénesis (Konig y Rega, 1978) y de la testosterona plasmática (Kinson y Peat, 1971). Inhibición de la esteroidogénesis testicular in vitro (Ellis, 1972) y de los efectos androgénicos de la testosterona (Alonso y col., 1978).
- Disminución del peso ovárico y uterino (Wurtman y col., 1963).
- Inhibe la respuesta hipofisaria de LH y FSH a LHRH in vitro en ratas prepuberales (Martin y col., 1977). No afec

ta la respuesta a LHRH en ratas adultas (Moguilevsky y col., 1976; Martin y col., 1977).

- Inyectada al final de la fase de luz aumenta la regresión gonadal en ratas desnutridas o anósmicas (Blask y Nodelman, 1980; Blask y col., 1980; Reiter y col., 1980).
- Inyectada simultáneamente con testosterona inhibe la androgenización de ratas hembra recién nacidas (Reiter y col., 1975).
- Una inyección aguda o tratamientos cortos aumentan la secreción de PRL (Kamberi, 1973; Lu y Meites, 1973; Kramer y Ben-David, 1978; Vaughan y col., 1978 b; Cardinali y col., 1979 b). La administración diaria en forma crónica a ratas anósmicas inhibe la liberación de PRL (Blask y Nodelman, 1980; Reiter y col., 1980).
- Inhibe la liberación de LH y la ovulación en ratas con ciclos normales (Ying y Greep, 1973). Aumenta el contenido hipotalámico de LHRH (Leonardelli y col., 1978). Efecto dependiente de la dosis sobre la liberación de LH en ratas hembra castradas inyectadas con esternidos (Moguilevsky y col., 1979). Disminuye la FSH plasmática en machos (Mas y col., 1979).
- Revierte los efectos de la pinealectomía sobre la liberación de LH y PRL durante la lactancia tardía. Acorta el período de gestación (Nir y Hirschmann, 1979).
- Induce la liberación de LH en ratas con ciclos anovulatorios por exposición permanente a la luz (Mess y col., 1979).

Hurón

- Regresión gonadal (Thorpe y Herbert, 1976).

Otros mamíferos

- Bloqueo del incremento postcastración de LH plasmático en

la oveja (Roche y col., 1970); no modifica los niveles de PRL (Driver y col., 1979).

- Inhibición de la liberación de PRL después de la inyección intrayugular en bovinos (Padmanabhan y col., 1979).
- No modifica la liberación de PRL por células hipofisarias bovinas in vitro (Padmanabhan y col., 1979).
- Inhibe la respuesta de LH a LHRH en perros (Yamashita y col., 1978).
- Inhibe la estimulación de la síntesis de esteroides en folículos ováricos por hCG (coneja) (Young, 1979).
- Disminuye (Nordlund y Lerner, 1977) o no modifica (Fideleff y col., 1976; Weinberg y col., 1980) la liberación de LH en el hombre.
- Retrasa el comienzo o elimina la secreción luteal de progesterona en monos (Fiske y Mc Donald, 1975).
- Involución gonadal en meriones (Vaughan y col., 1976), ratón (Lynch y Epstein, 1976), foca (Rust y Meyer, 1969) y liebre (Küderling y col., 1979).

2. Otras funciones hipotálamo-hipofisarias

Rata

- Disminuye la síntesis de proteínas hipotalámicas (Cardinali y col., 1974a). Revierte el incremento inducido por la pinealectomía del contenido hipotalámico de tubulina. Produce cambios ultraestructurales en eminencia media compatibles con neurosecreción y transporte axonal (Cardinali y Freire, 1975).
- Aumenta el contenido hipotalámico de serotonina y GABA (Anton-Tay y col., 1968; Anton-Tay, 1974). Restaura el ritmo de la serotonina hipotalámica en hurones pinealectomiza

dos (Yates y Herbert, 1979). Deprime la actividad de la MAD hipotalámica (Urry y Ellis, 1975). Deprime la captación de serotonina, NE, dopamina y glutamato por sinaptosomas hipotalámicos (Cardinali, 1975; Cardinali y col., 1975a). Aumenta la liberación de hormonas hipofisiotropas (Hollander y col., 1977; Kao y Weisz, 1977) o no la afecta (Brammer, 1979).

- Revierte el efecto estimulador del 5-hidroxitriptofano sobre la liberación de hormona de crecimiento (Smythe y Lazarus, 1973).
- En el hombre, la premedicación con melatonina reduce la respuesta de la hormona de crecimiento a L-triptofano (Koulo y Lammintausta, 1979) o a la hipoglucemia insulínica (Smythe y Lazarus, 1974).
- Contrarresta los cambios inducidos por la pinealectomía en la captación de estradiol (Cardinali y col., 1974b; Pedroza García y col., 1974). Modifica (Frehn y col., 1974) o no afecta (Mas y col., 1979) la 5 α -reductasa hipotalámica. Aumenta la liberación de vasopresina por la neurohipófisis (Lemay y col., 1979).

3. Función Tiroidea

Hamster

- Deprime los niveles de tiroxina plasmática y el índice de tiroxina libre. No se modifica la triyodotironina (Vriend y col., 1979).

Rata

- La inyección intraventricular de melatonina deprime la liberación de TSH (Relkin, 1978). En hipófisis in vitro no afecta la liberación de TSH (Brammer y col., 1979). Disminuye el contenido de AMP_c tiroideo y la liberación de tiroxina (Nir y col., 1978).

4. Función Adrenal

Rata

- Disminuye el peso adrenal (Reiter y col., 1975). Disminuye la corticosterona plasmática (Motta y col., 1971). Inhibe la producción de corticosterona in vitro (Ogle y Kitay, 1978); estimula la vía de la 5Δ -reductasa (Ogle y Kitay, 1978). Contrarresta la hipertensión en ratas pinealectomizadas (Holmes y Sudgen, 1975).

5. Páncreas

Rata

- Bloquea la liberación de insulina in vitro (Bailey y col., 1974). En el mono aumenta la glucemia (Burns, 1973).

6. Pineal

- Contrarresta los cambios inducidos por la luz de los lípidos de pineal (Ebels y Prop, 1965). Modifica los ritmos diarios de serotonina pineal (Fiske y Huppert, 1968). **Modificación ultraestructural de los pinealocitos (rata: Freire y Cardinali, 1975; ratón: Benson y Krasovich, 1977; hamster: El-Domeiri y Das Gupta, 1976).** Aumenta el contenido pineal de tubulina (Freire y Cardinali, 1975).
- Aumenta la liberación de arginina vasotocina pineal (Pavel y Godstein, 1979). Inhibe la captación de tiroxina por slices de pineales bovinas in vitro (Cady y Dillman, 1971).

Tabla 2Otros efectos de la melatonina en mamíferos

- Sedación, inducción del sueño; cambios electroencefalográficos (rata, gato, mono, hombre) (Anton-Tay, 1974; Sampson, 1975; Brailowsky, 1976; Küderling y col., 1979). Deprime la actividad motriz en ratas ciegas y anósmicas (Sackman y Reiter, 1977). Abolición de las crisis epileptiformes inducidas por estimulación sensorial en el gato (Farriello y Bubenik, 1976). La aplicación del anticuerpo anti-melatonina en la superficie cerebral desencadena convulsiones (rata) (Farriello y col., 1977).
- Aumento de la incidencia y duración de la hibernación en ardillas (Palmer y Riedsel, 1976). Respuesta homeostática aumentada ante cambios en la temperatura corporal (Hagelstein y Folk, 1979). Cambios en tejido adiposo pardo en ratón (Lynch y Epstein, 1976) y rata (Hagelstein y Folk, 1979). Aumenta la hipotermia inducida por D-anfetamina en rata (Ye huda y Frommer, 1977). Deprime la síntesis de ácidos grasos y oxidación de la glucosa en grasa perirrenal de conejo (Murthy y Modesto, 1975).
- Deprime la actividad del músculo liso (duodeno de rata, Quaste y Rahamimoff, 1965).
- Inhibe la melanogénesis en folículo piloso de hamster in vitro (Logan y Weatherhead, 1980).
- Deprime el contenido del factor de crecimiento nervioso en glándula submaxilar de ratón (Pérez-Polo y col., 1978).
- Prolonga el tiempo de sobrevida en ratas hembra pinealectomizadas portadoras de sarcoma de Yoshida (Lapin, 1979). Posterga la aparición del sarcoma inducido por metilcolantreno en ratón; deprime el crecimiento de tumores mamarios inducidos por dimetil-bencil-antraceno en rata (Aubert y col.,

1980). Deprime el crecimiento tumoral en hamsters inyectados con células neoplásicas de melanoma (El-Domeiri y Das Gupta, 1976). Actividad antimitótica in vitro sólo en algunas pruebas para drogas antimitóticas (Banerjee y col., 1972; Banerjee y Margulis, 1973; Fitzgerald y Veal, 1976; Poffenbarger y Fuller, 1976). No compite con la colchicina por los sitios de unión en la tubulina (Cardinali y Freire, 1975; Poffenbarger y Fuller, 1976). Inhibición de procesos dependientes de proteínas contráctiles como el transporte axonal (Cardinali y Freire, 1975; Prevedello y col., 1979) y el movimiento de gránulos pigmentarios (Malawista, 1973; Pang y Yew, 1979).

I.2 - PARTICIPACION DE LAS PROSTAGLANDINAS EN LOS MECANISMOS NEURALES ADRENERGICOS CENTRALES Y PERIFERICOS.

I.2.1 Biosíntesis y metabolismo de las prostaglandinas

Las prostaglandinas (PGs) constituyen un grupo de compuestos derivados de ácidos grasos de amplia distribución en gran número de tejidos. Fueron descritas a principios de la década del 30 y son hoy una de las familias de compuestos biológicamente activos más estudiadas. La actividad contráctil del útero humano inducida por semen de la misma especie descrita por Kurzrob y Lieb en 1930 fue la primera demostración de un efecto biológico asociado a las PGs. Años más tarde, Von Euler (1934, 1935) y Guldblatt (1933, 1935) describieron con más detalle tal acción farmacológica del plasma seminal humano sobre el músculo liso. Von Euler también describió los efectos producidos por el fluido seminal de mono, oveja y cabra y por extractos de vesículas seminales ovinas, adjudicándolos a un material liposoluble al que denominó "prostaglandina".

Recién en 1957 fue posible aislar en forma cristalina dos PGs, actualmente conocidas como PGE_1 y $PGF_{1\alpha}$ (Bergström y Sjövall, 1957). Por ultramicroanálisis y espectroscopía de masa se determinaron sus fórmulas empíricas y la estructura completa se elucidó por espectroscopía de masa asociada con cromatografía gaseosa (Bergström y col., 1963).

Las PGs son sintetizadas a partir de ácidos grasos insaturados (Sprecher, 1977). De acuerdo con el ácido graso precursor

se biosintetizan las PGs mono, bi y trienoicas, según los distintos grados de insaturación (Lands, 1979):

- la serie 1, con una doble ligadura en la cadena lateral, deriva del ácido graso esencial dihomo-gamma-linolénico (ácido 8,11,14-eicosatrienoico);
- la serie 2, con dos dobles ligaduras en la cadena lateral, deriva del ácido graso esencial araquidónico (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico);
- la serie 3, con tres dobles ligaduras, se forma a partir del ácido graso no esencial 5,8,11,14,17-eicosapentenoico.

El ácido araquidónico, precursor de las PGs dienoicas, es el más ampliamente distribuido en los fosfolípidos de membrana y en el SNC y proviene de la dieta y de la desaturación y elongación de la cadena lateral del ácido linoleico (Fig. 7).

La molécula de PGs está formada por un ciclopentano y dos cadenas laterales (Fig. 7). De acuerdo con los sustituyentes del anillo, las PGs se clasifican en seis grupos: A, B, C, D, E y F, de las cuales las más estudiadas en sus efectos biológicos son la E y F.

La biosíntesis de PGs ha sido estudiada utilizando precursores radiactivos, identificándose los metabolitos cromatográficamente. La producción endógena ha sido evaluada por ensayo biológico, cromatografía en fase gaseosa, espectrometría de masa y radioinmunoanálisis. Mediante estos métodos se determinó que la mayoría de los tejidos animales producen PGs, con una única excepción constituida por los glóbulos rojos maduros (Harris y Ramwell, 1979).

Las células de mamíferos liberan PGs en respuesta a estímulo

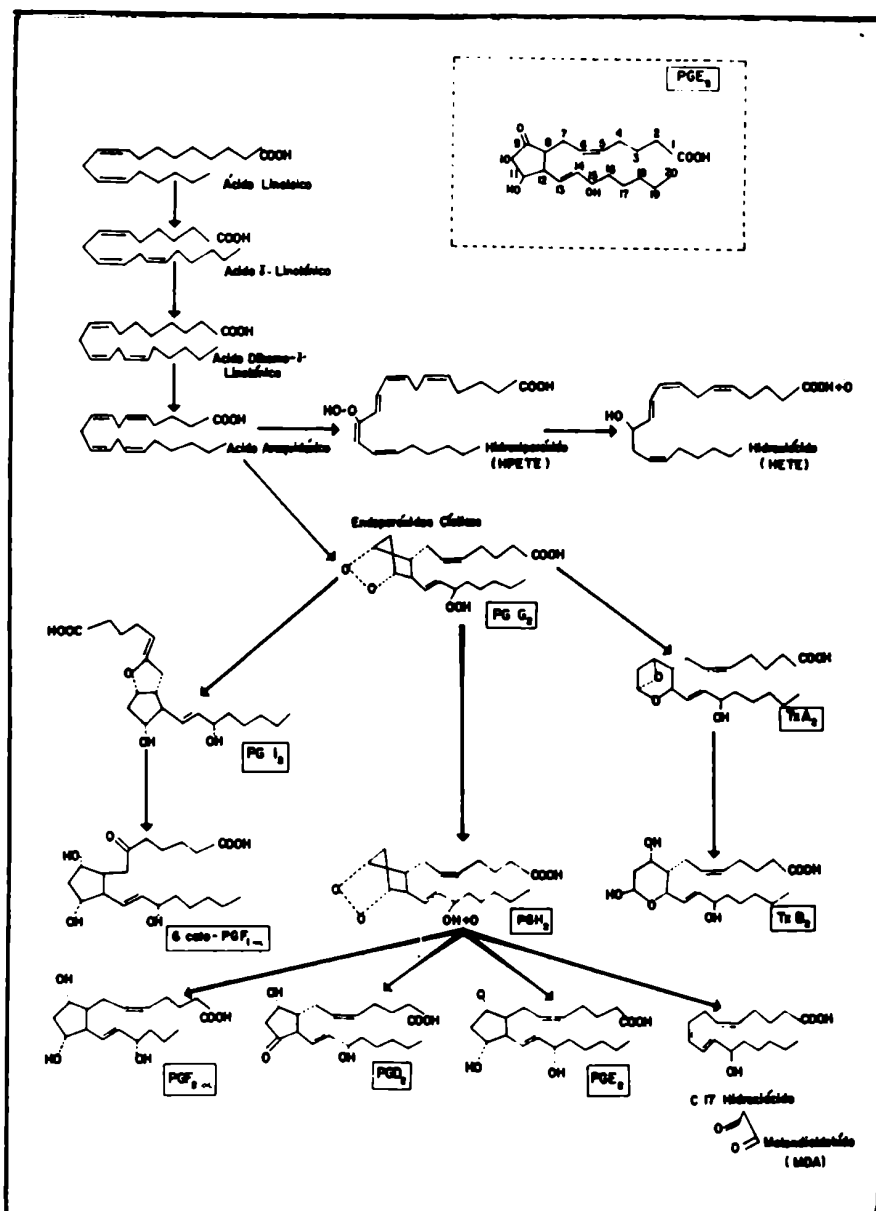


Fig. 7: Vía metabólica del ácido araquidónico

los fisiológicos, farmacológicos y patológicos y, dado que las PGs no son almacenadas en las células, su biosíntesis precede en forma inmediata a su liberación. Por lo tanto, la determinación de productos en el medio de incubación es un indicador sensible de su biosíntesis.

La forma no esterificada de los ácidos grasos poli-insaturados constituye el sustrato para la síntesis de PGs (Bergström y col., 1964; Moncada y Vane, 1978). Los ácidos grasos se hallan en la membrana celular como ésteres del colesterol, mono, di y triglicéridos y lípidos fosfatídicos (Ramwell y col., 1977) y deben liberarse por acción de la fosfolipasa A_2 . Esta lipasa hidroliza selectivamente el enlace del carbono 2 de los fosfoglicéridos. Por ejemplo, en la corteza suprarrenal y glándula tiroides el ácido araquidónico es liberado de fosfolípidos por un mecanismo dependiente de Ca^{++} estimulado por ACTH (Laychock y col., 1977) y tirotrófina (Haye y Jacquemin, 1977). Más adelante se discutirá la liberación de PGs en respuesta a estimulación nerviosa en el SNC y periférico.

Una vez liberado el ácido araquidónico no esterificado es metabolizado por dos tipos de enzimas: lipoxigenasa y complejo PG-sintetasa (Bergström y col., 1964; Dorp y col., 1954; Lands, 1979). La lipoxigenasa cataliza la peroxidación del ácido araquidónico en carbono 5 dando origen a hidroperóxidos inestables (hidroxiperoxi-eicosatetraenoico, HPETE), que se convierten en hidroxiaácidos estables (hidroxieicosatetraenoico, HETE). Esta vía metabólica paralela a la formación de PGs tiene como productos a los recientemente descritos leucotrienos (Borgeat y Samuelsson, 1979). Yamamoto

y col. (1977) demostraron que el sistema PG-sintetasa es de localización microsomal y consta de dos fracciones: 1) ciclooxigenasa, que cataliza la conversión de ácido araquidónico en el endoperóxido PGG_2 y éste último en PGH_2 (Fig. 7) y 2) endoperoxidasa, que cataliza la conversión de PGH_2 en los productos estables PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGD_2 , un hidroxiaácido de 17 carbonos (12-hidroxi-5,8,10-heptadecadienoico, HHT) y el ácido malondialdehído (MDA) (Fig. 7).

A pesar de ser PGG_2 el primer producto formado a partir del ácido araquidónico y oxígeno molecular, es su derivado 15-hidroxiado (PGH_2) el producto acumulado en mayor proporción por acción de la ciclooxigenasa. Esta reducción es catalizada por una peroxidasa. El endoperóxido PGH_2 , sustrato de dos isomerasas (11-ceto y endoperóxido sintetasa), una reductasa y dos sintetosas, da origen a las distintas PGs de la serie 2 (Fig. 7).

En 1971, Vane describió la acción inhibitoria sobre la síntesis de PGs de drogas antiinflamatorias no esteroideas como aspirina e indometacina. Actualmente, se considera que los efectos antipiréticos, analgésicos y antiinflamatorios de estas sustancias están mediados por la inhibición de la síntesis de PGs a nivel de la ciclooxigenasa. Además de los conocidos efectos terapéuticos, las drogas tipo aspirina tienen en el hombre y otras especies efectos colaterales como el daño renal e inhibición de la segunda fase de agregación plaquetaria (Moncada y Vane, 1979). Estos efectos han sido adjudicados a una inhibición de la ciclooxigenasa. Dado que la indometacina previene la síntesis de todas las PGs conocidas, esta droga ha sido utilizada ampliamente para estudiar la participación de las PGs en fenómenos fisiológicos y patológicos.

Debe destacarse, sin embargo, que la droga tiene otros efectos sobre distintas actividades enzimáticas tales como fosfolipasa, fosfodiesterasa y quinasa de proteínas dependiente de AMP_c (Flower, 1974; Kantor y Hampton, 1978), a los que es necesario considerar en la interpretación de los resultados experimentales.

El endoperóxido cíclico PGH₂ es también sustrato de otra enzima distinta de la ciclooxigenasa, que ha sido aislada de plaquetas humanas y equinas (Moncada y col., 1976), la tromboxano-sintetasa (Fig. 7). Los productos de esta reacción son compuestos heterocíclicos que incluyen a uno de los átomos de oxígeno, mientras que el segundo forma la unión éter entre los carbonos 9 y 11. El intermediario inestable es el TxA₂ y el compuesto estable el TxB₂.

Por acción de otra enzima, la prostaciclina-sintetasa, los endoperóxidos se convierten en PGI₂ o prostaciclina (Fig. 7). En resumen, los endoperóxidos pueden seguir tres caminos: PGs estables, tromboxanos y prostaciclina. En la circulación general las PGs son de vida media muy corta y pierden su actividad biológica como consecuencia de una oxidación seguida por reducción o por una hidrólisis espontánea a nivel pulmonar. Tal degradación es mucho más lenta en los tejidos, particularmente in vitro, representando las PGs acumuladas en el medio de incubación un indicador confiable de su síntesis y liberación.

I.2.2 La unión neuroefectora adrenérgica

Tanto en estructuras periféricas (sistema nervioso autónomo simpático) como en el SNC existen vías neuronales, definidas como adrenérgicas, que emplean como neurotransmisores a las catecolaminas. Los neurotransmisores catecolaminérgicos de localización central o periférica son sintetizados según la vía representada en la Fig. 8. La síntesis de las enzimas ocurre en el cuerpo neuronal y por un proceso de transporte denominado axoplasmático las enzimas migran a lo largo del axón hasta llegar a los terminales neurales (Kopin y Silberstein, 1972; Ocha y Worth, 1978).

La tirosina es captada de la circulación por un mecanismo de transporte activo y se concentra en el SNC. En las neuronas adrenérgicas es hidroxilada por la tirosina hidroxilasa para formar dihidroxifenilalanina (DOPA) (Levitt y col., 1965; Mayer, 1980). Esta enzima es específica para la L-tirosina, se halla bajo control regulatorio inhibitorio por el producto final NE y cataliza el paso limitante tanto en la síntesis central como periférica de NE (Levitt y col., 1965; Costa y Neff, 1970; Mayer, 1980). El segundo paso biosintético, la descarboxilación de L-DOPA a dopamina es catalizada por la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos con poca especificidad de sustrato y capaz de descarboxilar también a otros aminoácidos levógiros (Mayer, 1980). Por último, la dopamina es convertida en NE dentro de las vesículas de los terminales noradrenérgicos, por acción de la dopamina- β -hidroxilasa o dopamina- β -oxidasa asociada a dichas vesículas. Su especificidad por el sustrato es baja y puede oxidar cualquier feniletilamina a su correspondiente feniletanolamina (Coyle y

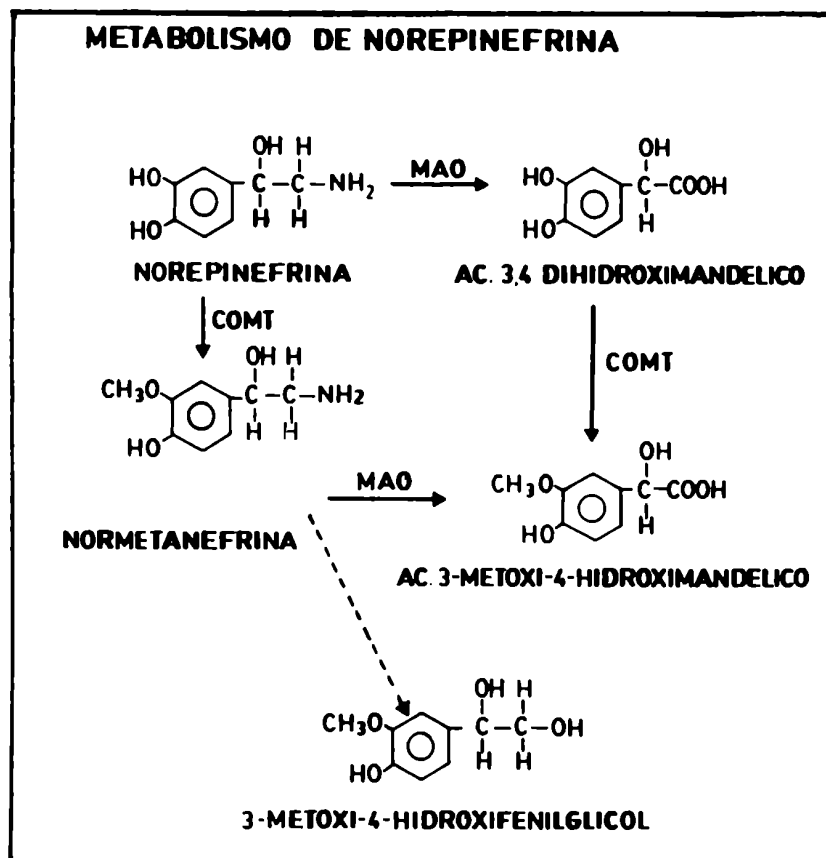
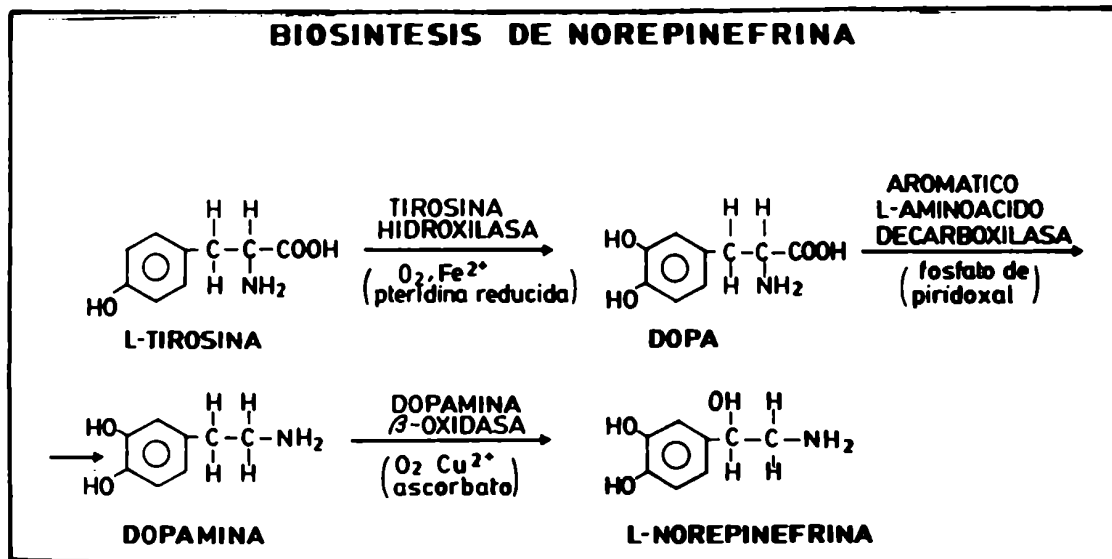


Fig. 8: Vías metabólicas de síntesis y metabolismo de NE.

Axelrod, 1972; Rosenberg y Lovenberg, 1980).

Una vez sintetizada, la NE se almacena en las vesículas sinápticas donde forma un complejo estable con el ATP y proteínas específicas, genéricamente llamadas cromograninas. Estas vesículas se hallan presentes en gran número en los terminales nerviosos y previenen la difusión de NE al espacio sináptico y su metabolización por la enzima degradativa intraneuronal MAO (Fig. 9) (Anton-Tay y Wurtman, 1971; Euler, 1972; Trendelenburg, 1979).

Hasta el presente no ha sido totalmente esclarecido el mecanismo por el cual los impulsos neurales producen la liberación de NE. Al despolarizarse la membrana por la llegada de potencial de acción propagado a lo largo del axón, aumenta la permeabilidad del terminal a los iones, entre ellos al Ca^{++} . El incremento del Ca^{++} intracelular es el primer paso en la secuencia que lleva a la liberación del neurotransmisor (Kirpekar y Miao, 1967; Westfall, 1977; Zinder y Pollard, 1980).

Aparentemente las catecolaminas son liberadas de los terminales simpáticos periféricos y centrales por un proceso conocido como exocitosis (Zinder y Pollard, 1980). Este fenómeno consiste en la fusión de las vesículas con la membrana celular y la descarga de su contenido al espacio extracelular.

La NE liberada tiene 5 caminos posibles a seguir (Fig. 9):

- 1) interactuar con sus receptores específicos postsinápticos (Ahlfquist, 1948; Minneman y col., 1979).
- 2) ser recaptada por el terminal simpático (recaptación neuronal o uptake I) y almacenada en las vesículas (Iversen, 1967; Trendelenburg, 1979).

- 3) ser convertida en normetanefrina por acción de la COMT antes de pasar a la circulación (captación extraneuronal o uptake II) (Iversen, 1967; Guldborg y Marsden, 1975).
- 4) sufrir desaminación oxidativa por acción de la MAO, de localización pre o postsináptica.
- 5) en el caso de los terminales periféricos o en zonas fuera de la barrera hematoencefálica pasar a la circulación como NE libre. En el caso de zonas dentro de la barrera hematoencefálica no hay difusión a la circulación.

En el cerebro de mamíferos se distinguen dos tipos de MAO con diferente afinidad por sustratos y que son inhibidas selectivamente por distintas drogas. La MAO tipo A utiliza como sustratos a la NE y serotonina y es inhibida por la clorgilina. La MAO tipo B degrada preferentemente a la feniletilamina y el deprenil es su inhibidor selectivo (Johnstone, 1968). Otras aminas como dopamina, triptamina, histamina y tiramina son buenos sustratos para ambas isoenzimas. Por su localización en la cara externa de las mitocondrias, la MAO parece regular la concentración de catecolaminas libres en el citoplasma, tanto de las que acceden por captación como las sintetizadas en el terminal y que no están protegidas en las vesículas de almacenamiento. Como ya se ha mencionado en la sección I.1.2, la desnervación pineal por gangliectomía cervical superior determina la reducción o pérdida de la actividad de la MAO en los terminales (MAO A) mientras que la MAO B permanece inalterada (Snyder y col., 1965; Goridis y Neff, 1972; Vacas y Cardinali, 1979 a; Vacas, 1980).

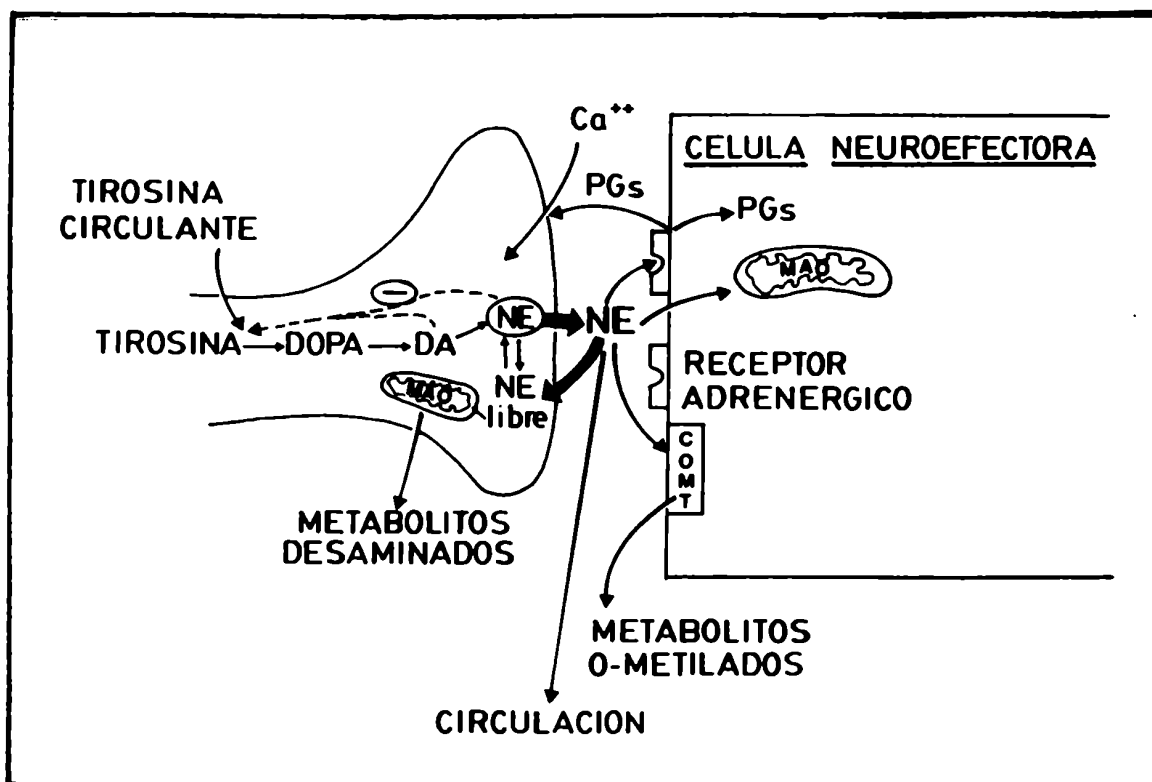


Fig. 9: Representación esquemática de la unión neuroefectora simpática.

COMT: catecol-O-metiltransferasa; DA: dopamina; DOPA: dihidroxifenilalanina; MAO: monoamino-oxidasa; NE: norepinefrina; PGs: prostaglandinas.

I.2.3 Función de las Prostaglandinas en los Mecanismos Adrenérgicos

Como mecanismo adicional a la retroalimentación que los neurotransmisores ejercen sobre su propia síntesis y liberación, otras sustancias liberadas por las neuronas adrenérgicas, o postsinápticamente por la acción del neurotransmisor, actúan como moduladoras de transmisión neural (Westfall, 1977). Numerosas evidencias apoyan la participación de las PGe como reguladores locales en la unión neuroefectora adrenérgica (Fig. 9). Estas actúan de dos maneras: 1) modificando la liberación del neurotransmisor (Bergström y col., 1973; Westfall, 1977); 2) como mediadores de los efectos postsinápticos del neurotransmisor (Hoffer y col., 1969; Partington y col., 1980). En el presente trabajo de tesis se estudia la influencia de las PGe pineales como moduladores locales sobre la unión neuroefectora adrenérgica en los pinealocitos. Como antecedente de los presentes estudios nos referiremos en primer lugar al efecto que las PGe tienen sobre la liberación de NE por los terminales simpáticos en diversos tejidos periféricos.

En tejidos con inervación simpática ha sido demostrada la acción inhibitoria presináptica de las PGe, en particular las de la serie E. La reducción del eflujo efectivo de NE de los tejidos estimulados eléctricamente se interpretó en una primera instancia como debida al efecto estimulador sobre la degradación metabólica de la catecolamina. Sin embargo, estudios posteriores en corazón de cobayo, no demostraron alteraciones en las actividades de MAD o COMT por tratamiento con PGE₂ (Hedqvist, 1976). Se dedujo entonces que el aumento del metabolismo de NE por PGE₂ se debía a una mayor disponibilidad de la catecolamina a las enzimas degra

dantes, probablemente por inhibición de la recaptación neuronal o uptake I (Lands, 1979). Tal interpretación se vió avalada por los datos experimentales derivados de varios sistemas (por ejemplo, bazo de gato), cuyos depósitos endógenos de NE fueron marcados con NE-³H (Hedqvist, 1976).

Como ya se ha analizado, la liberación de NE por impulsos nerviosos es un proceso dependiente de Ca^{++} ; incrementando la concentración de este catión se revierte la inhibición por PGE_2 de la liberación de NE que sigue a la estimulación nerviosa en bazo de gato y conducto deferente de cobayo (Hedqvist, 1974). Por otro lado, la liberación de NE por tiramina, proceso independiente del Ca^{++} y debido al desplazamiento de la NE de las vesículas adrenérgicas (Baldessarini y Fischer, 1978), no es afectada por PGE_2 en modelos como el bazo de gato (Westfall y Brated, 1974) o el corazón de cobayo (Hedqvist, 1970 a). Estos resultados augieren que la PGE_2 inhibe la liberación de NE modificando la disponibilidad de Ca^{++} , probablemente ocluyendo los canales de la membrana axónica (Hedqvist, 1970 b) (Fig. 9).

El sitio de síntesis de las PGs endógenas que participan en la regulación local de la liberación del neurotransmisor adrenérgico no está bien establecido. Pueden ser liberadas directamente por los nervios adrenérgicos como resultado de la liberación del neurotransmisor; en ese caso la NE actuaría sobre la presinapsis liberando a las PGs o tal liberación sería simultánea con la de NE. Otra alternativa es que la NE actúe sobre la célula neuroefectora postsináptica y produzca PGs como consecuencia de la interacción del neurotransmisor con su receptor. Los resultados experimenta

tales obtenidos hasta el momento tienden a avalar este último mecanismo.

Una serie de evidencias indican que la postsinapsis es el sitio de síntesis de las PGs: a) la liberación de PGs pueden darse en respuesta a diversos estímulos que no sean nerviosos. Estos incluyen neurohormonas, estimulación mecánica asociada a la contracción y aún hipoxia (Westfall, 1977), b) la administración de epinefrina es timula la liberación de PGs en bazo desnervado (Gilmore y col., 1968). Por otro lado, algunos datos sugieren que las PGs pueden ser liberadas también presinápticamente por las neuronas adrenérgicas: a) se aislaron PGs de tejido nervioso puro como los troncos del vago y esplénico (Hedqvist, 1976); b) propranolol y fenoxibenzamina en concentraciones suficientes como para bloquear la respuesta mecánica a la NE (respuesta postsináptica), no inhiben la liberación de PGs inducida por la cs tecolamina (Westfall, 1977).

En relación al segundo de los mecanismos posibles por los cuales las PGs actúan en la unión neuroefectora, es decir, como mediadores postsinápticos del efecto de la NE, un ejemplo es ofrecido por los órganos del aparato genital. El agregado simultáneo de PGs de las se ries E y F al medio de incubación con epinefrina o NE, determina una potenciación del efecto de ambos agentes adrenérgicos sobre el útero aislado de rata (Clegg, 1966; Borda y col., 1981). En el caso concre to de la sensibilidad a agonistas α -adrenérgicos, se observó que $\text{PGF}_2\alpha$, PGE_1 y PGE_2 no sólo son capaces de restaurar la respuesta a metoxamina en úteros pretratados con indometacina (o sea tejidos que tienen bloqueada la síntesis de PGs), sino que también está potenciada la acción estimuladora de agentes α -adrenérgicos respec

to a la observada en útero de animales ovariectomizados que no fueron pretratados con indometacina (Borda y col., 1981). Aparentemente y de acuerdo con los datos disponibles hasta el momento, tanto las PGs como las catecolaminas ejercen su acción sobre el útero a través de un efecto primario a nivel de la adenilciclase, con el consecuente aumento del contenido tisular de AMP_c (Vesin y Harbon, 1974).

Estos dos mecanismos por los cuales las PGs afectan la unión neuroefectora adrenérgica periférica (liberación del neurotransmisor o mediación de su efecto postsináptico) están mucho menos estudiados a nivel del SNC. Tal hecho se debe a la marcada complejidad estructural del SNC y a la imposibilidad de eliminar en forma efectiva y única los componentes pre o postsinápticos. En los últimos años se demostró la participación de las PGs en el control fisiológico del SNC, pero permanecen oscuros los mecanismos de acción a través de los cuales ejercen su efecto. Se detectaron PGs en diversas áreas del cerebro de mamíferos, especialmente en homogenatos de zonas ricas en terminales nerviosos (Kataoka y col., 1967) y su liberación por corteza cerebral (Bradley y col., 1969); Ramwell y Shaw, 1966), cerebelo (Coceani y Wolfe, 1965) y médula espinal (Coceani y col., 1971). Enzimas participantes en la síntesis de PGs han sido también detectadas histoquímicamente en las células de Purkinje del cerebelo (Westfall, 1977).

Avanzino y col. (1966) fueron los primeros en observar la acción directa de las PGs sobre neuronas centrales y, años más tarde, Hoffer y col. (1969) demostraron que PGE₁ y PGE₂ aplicadas directamente en células de Purkinje antagonizaban la reducción de la velo

cidad de descarga inducida por NE pero no por AMP_c (Folco y col., 1976). PGE₁ y PGE₂, pero no PGF_{2α}, estimulan la síntesis de AMP_c, usando como marcador isotópico adenosina-³H, en slices de corteza cerebral, efecto potenciado por la teofilina, inhibidor de la fosfodiesterasa (Partington y col., 1980). Estos autores también demostraron una disminución en la acumulación de AMP_c sintetizado en respuesta a la NE en "slices" de hipotálamo y corteza cerebral de rata incubados en presencia del inhibidor de la síntesis de PGs, indometacina.

En conjunto, los resultados discutidos sugieren que a semejanza de lo que ocurre en la unión neuroefectora autonómica periférica, las PGs parecen ejercer una función significativa en la regulación de la transmisión sináptica en el SNC. Desde el punto de vista neuroendócrino, esta relación es particularmente relevante en el hipotálamo donde las neuronas liberadoras de LHRH del HMB están controladas por NE a través de la liberación de PGs de la serie E (Ojeda y col., 1979 b). En el presente estudio se analizan las interrelaciones entre la estimulación por NE de la liberación de PGE₂ en HMB y diversas concentraciones de melatonina en el medio de incubación.

I.3 - OBJETIVOS

El presente trabajo de tesis examina diversos aspectos de la relación existente entre las PGs y la función pineal. Son dos los objetivos principales de los experimentos presentados a continuación:

- 1.- Estudiar la participación de las PGs en la secuencia de fenómenos metabólicos que vincula a la NE liberada de los terminales neurales pineales con la síntesis de la hormona pineal melatonina.
- 2.- Analizar la posible participación de las PGs en el mecanismo de acción de la hormona pineal melatonina en diversos tejidos efectores, particularmente en el hipotálamo mediobasal (HMB).

II. MATERIALES Y METODOS

II.1 - Animales y tejidos

Se utilizaron ratas Wiistar adultas (180-250 g), mantenidas en un 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.

Las glándulas pineales y adrenales y los HMB bovinos se obtuvieron en un matadero de la zona dentro de los 20-30 min después del sacrificio del animal. Para los experimentos de "binding" se congelaron en hielo seco hasta el momento de usarlos (normalmente dentro de las 24 h). Para los experimentos de liberación de PGs los tejidos se transportaron al laboratorio en buffer Krebs-Ringer-bicarbonato (KRB), pH 7.4.

La sangre humana fue obtenida de donantes que no habían ingerido aspirina durante la semana anterior a la venopuntura. El plasma rico en plaquetas se obtuvo por centrifugación de la sangre durante 10 min a 200xg y se ajustó la dilución a 250000 plaquetas/mm³.

Gangliectomía cervical superior bilateral

Se realizó bajo anestesia etérea de la rata una semana antes del sacrificio (a fin de asegurarse la degeneración de los terminales neurales una vez que han sido separados 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 ganglio cervical superior fue identificado en la bifurcación carotídea entre sus ramas interna y externa y ambos ganglios, derecho e izquierdo, fueron totalmente resecados.

Overiectomía bilateral

La overiectomía bilateral se practicó 20 días antes del sacrificio (castración crónica) bajo anestesia etérea. Se realizó una incisión longitudinal medio-lateral, se ubicó el ovario y el extremo uterino proximal a éste. Se ligó con hilo de cirugía a unos 5 mm de dicho extremo y se cortó el cuerno, extrayendo así el ovario y oviducto y respetando el útero adyacente.

II.2 - Producción de prostaglandinas in vitro por glándula pineal y HMB bovino y HMB de rata

II.2.1 - Glándula pineal y HMB bovinos

La liberación de PGs por glándula pineal y HMB bovinos fue estudiada in vitro. Los tejidos se incubaron durante 1 h en buffer KRB, pH 7.4, en presencia de 0.1% de ácido ascórbico y distintas concentraciones de NE (1-1000 μ M) o melatonina (0.01-1 nM). Las incubaciones se realizaron a 37 C bajo atmósfera de carbógeno (95% O₂-5% CO₂) y se interrumpieron por separación y congelación inmediata del medio de incubación. Dicho medio fue acidificado a pH 3 con ClH 1 N y extraído dos veces con 1 volumen de acetato de etilo, el que se evaporó bajo vacío en un evaporador rotatorio a 40 C. El residuo se resuspendió en 10 ml de buffer fosfato de potasio pH 8, acidificándose la fase acuosa combinada a pH 3 con ClH 1 N. Los ácidos grasos fueron luego extractados en 1 volumen de cloroformo, repitiéndose la operación dos veces más. La fase cloroformica fue evaporada y el residuo se resuspendió en cloroformo-metanol (4:1) y fue aplicado en el origen de una placa de cromatografía recubierta con sílica gel G. La cromatografía se desarrolló en un sistema de solventes cloroformo-metanol-ácido acético-agua (90:9:1:0.65), corriéndose paralelamente placas con PGE₂ y PGF_{2 α} como standards. La posición de las PGs de referencia fue visualizada luego de rociar las placas secas con una solución de ácido fosfomolibdico al 15% en etanol y sometiéndolas a 120 C durante 15 min; los R_f para PGE₂ y PGF_{2 α} fueron 0.61 y 0.42 respectivamente. Las zonas de las placas con extractos del medio de incubación correspondientes a los R_f de los standards fueron eluidas con cloroformo-metanol

(4:1) y llevadas a sequedad bajo vacío. La actividad PG de estas fracciones fue estimada por el procedimiento de Vane (1964). Los extractos se resuspendieron en 0.2 ml de KRB y se ensayaron en ti ras de estómago y colon de rata superfundidos con KRB que contenía una mezcla de antagonistas para las siguientes sustancias activas: acetilcolina, serotonina, catecolaminas e histamina. También se agregó indometacina (1 ug/ml) a fin de prevenir la producción endógena de PGs. Las concentraciones fueron medidas con un transductor isométrico y registradas en un polígrafo. La actividad PG fue expresada en equivalentes de PGE_2 o $PGF_{2\alpha}$ como pg/mg de tejido seco/h de incubación. Las muestras experimentales y sus controles fueron analizados siempre en la misma preparación. La recuperación luego de la extracción y cromatografía fue 40-50%, con un coeficiente de variación interensayo de menos del 10%.

Este procedimiento biológico para la determinación de PGs fue utilizado en las etapas iniciales del presente trabajo, antes de contarse con el método radioinmunológico. Ambos procedimientos, biológico y radioinmunológico, se usan actualmente para el dosaje de PGs (Vane, 1964; Maclouf y col., 1975).

II.2.2 - HMB de rata

Se incubaron en forma individual HMB de rata (3.5 - 4.4 mg peso húmedo) en 500 ul de buffer KRB, pH 7.4, que contenía glucosa (1 mg/ml) y 0.06 mM de ácido ascórbico, a 37 C y bajo atmósfera de carbógeno (Ojeda y col., 1979 b). Los tejidos fueron preincubados du rante 15 min, al cabo de los cuales se reemplazó el medio por uno fresco que contenía melatonina (10^{-4} - 10^{-8} M). Después de 30 min de incubación, se tomaron alícuotas (100 ul) del medio para evaluar la concentración de PGs mediante radioinmunoanálisis (ver sección II. 6.2).

II.3 - Estudio de sitios de unión específicos para prostaglandinas en glándula pineal bovina

La presencia de sitios de unión específicos para PGs en la glándula pineal bovina fue investigada en el sobrenadante de 900 x g según el procedimiento descrito por Kimball y Wyngarden (1975) para el miometrio de hamster. Las pineales congeladas fueron seccionadas en trozos pequeños y homogeneizadas en buffer fosfato 0.02 M, pH 7.4, en presencia de sacarosa 0.25 M, CaCl_2 2 mM y 10 $\mu\text{g/ml}$ de indometacina (buffer BI). El homogenato se centrifugó a 900 x g durante 15 min a 0 C y alícuotas del sobrenadante fueron incubadas en triplicado con PG marcada. Las incubaciones se llevaron a cabo en tubos de poliestireno para evitar la adsorción de las $\text{PGE}_2\text{-}^3\text{H}$ al vidrio. Se utilizaron los siguientes radioisótopos: $\text{PGE}_2\text{-}^3\text{H}$ (A.E. 150 Ci/mmol) y $\text{PGF}_{2\alpha}\text{-}^3\text{H}$ (A.E. 120 Ci/mmol), cuya pureza radioquímica fue verificada por cromatografía en capa delgada en el sistema descrito en la sección II.2.1. La reacción típica de asociación ("binding") se llevó a cabo en un volumen total de 210 μl conteniendo 200 μl de sobrenadante (3-9 mg de proteínas), $\text{PGE}_2\text{-}^3\text{H}$ (0.2 μCi , 1.5×10^{-12} mol) o $\text{PGF}_{2\alpha}\text{-}^3\text{H}$ (0.2 μCi , 1.7×10^{-12} mol) disueltas en 5 μl de etanol-BI (1:7, vol/vol), más PG no marcada (1×10^{-9} mol en 5 μl de etanol-BI, 1:50 vol/vol) o 5 μl de BI. La concentración proteica fue determinada por el método de Lowry y col. (1951). En cada experimento se incluyó una serie paralela de mezclas de reacción sin tejido. A menos que se consigne lo contrario, el tiempo de incubación fue de 1 hora a 37 C.

La separación de las PGs libres y unidas se realizó por adsorción en carbón-gelatina (Kimball y Wyngarden, 1975). A cada mues-

tra se agregó 0.5 ml de una suspensión de carbón (2.5% de carbón Norit A y 0.1% de gelatina en buffer BI) y luego de 10 minutos se centrifugó a 3000 x g durante 15 min a 0 C, tras lo cual se traspasó el sobrenadante a viales de centelleo. El ^3H fue cuantificado por espectrometría de centelleo líquido, previo agregado de su solución de centelleo tolueno-fósforo (4 g de 2,5-difeniloxazol y 50 mg de p-bis-2(5-feniloxazolil)-benceno por litro de tolueno) con 30% (v/v) de Tritón X-100.

La corrección de "quenching" fue realizada automáticamente por medio de un standard externo; en estas condiciones la eficiencia varió entre 50 y 60%. La diferencia entre la PG- ^3H unida en ausencia y en presencia de PG no marcada fue considerada una estimación de la PG unida específicamente. La unión específica constituyó un 54-62% de la total.

En una serie de experimentos preliminares se establecieron las condiciones óptimas de adsorción.

La separación de PG libre de unida se realizó, en otra serie de experimentos, por filtrado rápido en papel de fibra de vidrio Whatman GFB bajo vacío parcial (Bennet y Snyder, 1975). Luego de lavados con un total de 10 ml de buffer BI a 4 C, la radiactividad remanente en el filtro fue determinada por espectrometría de centelleo líquido. Los resultados obtenidos utilizando como método de separación la filtración rápida en papel de fibra de vidrio fueron esencialmente iguales a los de adsorción en carbón-gelatina.

Las constantes de equilibrio de la unión de alta afinidad de PGs a componentes pinales fueron determinadas por incubación en triplicado de sobrenadantes de 900 x g con distintas concentra-

ciones de $\text{PGE}_2\text{-}^3\text{H}$ o $\text{PGF}_{2\alpha}\text{-}^3\text{H}$. Luego de la transformación de los datos (Scatchard, 1949) la pendiente e intersecciones fueron calculados por análisis de regresión. En otro experimento se determinaron las afinidades relativas de diversos análogos para los sitios de alta afinidad de $\text{PGF}_{2\alpha}$ o PGE_2 . Por lo menos 4 concentraciones del análogo fueron utilizadas en cada caso.

Los valores de radiactividad unida específicamente se graficaron en papel log-probitos y se calcularon las concentraciones de los agentes que producen una inhibición del 50% de la unión de $\text{PG-}^3\text{H}$ (CE_{50} : concentración 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: $K_i = \text{CE}_{50} / 1 + (^3\text{H-PG})/K_D$, donde K_D es la constante de disociación de los $\text{PG-}^3\text{H}$ calculadas a partir del gráfico de Scatchard.

La naturaleza de la radiactividad unida a proteínas se verificó luego de ser extraída tres veces con 5 ml de acetato de etilo acidificado. Los extractos se llevaron a sequedad bajo N_2 y los residuos se resuspendieron en cloroformo-metanol (4:1, vol/vol) y cromatografiaron en capa delgada de sílica gel G, usando como eluyente el sistema cloroformo:metanol:ácido acético:agua (90:9:1:0.65). Más del 98% de la radiactividad corrió paralela a los estándares de PGs.

Con el objeto de estudiar la distribución intracelular de los sitios de unión para PGs en la glándula pineal, los homogenatos fueron procesados 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) y 4) fracción citosólica (105000 x g, sobrenadante). Alícuotas de las suspensiones de estas fracciones se in cubaron con las PG-³H como ya ha sido descrito y se determinó la concentración proteica por el método de Lowry y col. (1951), con serosalbúmina bovina como standard.

II.4 - Determinación de los sitios de unión específicos para AMP_c en la glándula pineal de rata

Las glándulas pineales se preincubaron durante 10 min en buffer KRB a 37 C, como ya ha sido descrito. Luego de esta preincubación, las glándulas fueron incubadas durante 15 min en el mismo buffer en presencia de PGE₂ 50 nM. La determinación de la unión del nucleótido cíclico a la quíntasa de proteínas se realizó según la técnica descrita por Dufau y col. (1977).

Los estudios de unión de AMP_c se llevaron a cabo incubando alícuotas de 100 ul (34-51 ug de proteínas) del sobrenadante de 900 x g de homogenatos de pineales preparados en buffer fosfato de potasio 80 mM, pH 6.8, conteniendo acetato de magnesio 10 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM y 1-metil-3-isobutil-xantina 1 mM, en presencia de AMP_c-³H (A.E. 40 Ci/mmol) en concentraciones que variaron entre 0.1 nM y 0.1 uM. La incubación se efectuó a 6 C, durante 2 horas para determinar los sitios disponibles, o durante 16 horas para la evaluación de sitios totales. Finalizada la incubación, se agregaron 2 ml del buffer Tris-ClH y se filtró a través de papel Whatman GF8.

La radiactividad remanente en los filtros se determinó por espectrometría de centelleo líquido, previo agregado de 2.5 ml de solución de centelleo. La unión inespecífica determinada para cada concentración del nucleótido cíclico-³H en presencia de 5 uM de AMP_c no marcado fue restada del valor de unión total para obtener así la unión específica que fue, en todos los casos, mayor de un 80%. Los resultados fueron referidos a mg de proteínas que se determinaron según el método de Lowry y col. (1951). Los datos fueron analizados según el método de Scatchard (1949).

II.5 - Determinación de actividades enzimáticas

II.5.1 Catecol-O-metiltransferasa

La catecol-O-metiltransferasa (COMT), así como la monoamino-oxidasa (MAO), son las enzimas responsables del metabolismo de dopamina y NE (Fig. 8). La COMT, enzima citosólica, cataliza la transferencia del grupo metilo de la S-adenosilmetionina (SAM), en presencia de cationes divalentes como cofactores, a uno de los grupos fenólicos de las catecolaminas para formar el derivado metoxifenol y S-adenosilhomocisteína. La actividad de COMT fue determinada mediante la estimación de la transferencia de grupos metilo-¹⁴C de la SAM-¹⁴C al ácido 3,4-dihidroxibenzoico (Jarrot, 1974).

Los tejidos (glándula pineal e HMB de rata) se homogeneizaron en 250 μ l de medio hipotónico de fosfato de sodio 10 mM, pH 8.2. Se incubaron alícuotas de 70 μ l durante 1 h a 37 C con ácido dihidroxibenzoico 1 mM, SAM-¹⁴C 2.7×10^{-5} M (A.E. 47 Ci/mmol) en presencia de MgCl₂ 5 mM y en un medio buffer de fosfato de potasio 80 mM, pH 8.0. La reacción se detuvo mediante el agregado de 50 μ l de ClH 2 N. El producto metilado se extrajo con 500 μ l de acetato de etilo y se lavó con 100 μ l de ClH 0.3 N. Finalmente se evaluó la radioactividad en una alícuota de 250 μ l de fase orgánica por espectrometría de centelleo líquido, previo agregado de solución de centelleo. Los resultados se expresaron en pmoles de producto/h mg de proteína. Las proteínas se evaluaron según el método de Lowry y col. (1951).

II.5.2 Monoamino-oxidasa

La monoamino-oxidasa (MAO) (Fig. 8), enzima mitocondrial, dees

mina un amplio espectro de aminas que poseen el carbono- α -metileno vecino a la amina no sustituida, dando así el aldehído correspondiente. Este compuesto se reduce rápidamente a alcohol o se oxida a ácido. En experimentos in vitro, alrededor del 80% del producto se halla como ácido, lo que sugiere que ese producto formado por la MAO es oxidado a ácido por la aldehído deshidrogenasa. Dada la distribución mitocondrial de esta enzima, análoga a la de la MAO, se sugirió que ambas estarían acopladas.

Las glándulas pineales o HMB individuales se homogeneizaron en 180 μ l de buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 8.2; se incubaron alícuotas de 50 μ l durante 30 min a 37 C en presencia de 0.15 mM de bioxalato de serotonina- 14 C (0.1 Ci/5 μ l) o 0.1 mM de feniletilemina- 14 C (0.05 Ci/5 μ l), sustrato de la MAO tipo A y MAO tipo B respectivamente. Luego de detener la reacción con 50 μ l de ClH 2 N, los productos desaminados se extrajeron con 500 μ l de acetato de etilo y se lavaron con 100 μ l de ClH 0.3 N según el método descrito por Jarrot (1974). Los productos formados se evaluaron por espectrometría de centelleo líquido en 250 μ l de la fase orgánica, previo agregado de 2.5 ml de la solución de centelleo.

Los resultados se expresaron como pmoles de producto formado/h/mg de proteínas. Estas últimas se evaluaron de acuerdo con el método descrito por Lowry y col. (1951).

II.5.3 Serotonina-N-acetiltransferasa

La serotonina-N-acetiltransferasa (SNAT), es una de las dos enzimas involucradas en la síntesis de melatonina pineal a partir de serotonina (Fig. 6). Su actividad se evalúa por la transferencia del grupo acetilo- 14 C de la acetil-CoA marcada (A.E. 45 Ci/

mol) a la triptamina para formar la N-acetil-triptamina-¹⁴C, producto extraído por partición de solventes según el método descrito por Deguchi y Axelrod (1972). Las pineales se homogeneizaron en forma individual en 100 ul de buffer fosfato de potasio 36 mM, pH 6.5, que contenía 0.1 umol de triptamina. Luego de una incubación de 10 min a 37 C en presencia de 3.4 nmoles de acetil-CoA-¹⁴C, la reacción se detuvo por el agregado de 500 ul de buffer borato 0.5 M pH 10, y el producto formado por la transferencia enzimática del grupo ¹⁴C-acetilo a la triptamina se extrajo con 6 ml de tolueno: alcohol isoamílico (100:1; vol:vol). Se lavó dos veces con 500 ul de buffer borato y una alícuota de 5 ml de la fase orgánica se cuantificó por espectrometría de centelleo líquido, luego del agregado de 10 ml de solución de centelleo.

Los resultados se expresaron como pmoles de producto formado/h/mg de proteína o por glándula. En los experimentos en que los resultados se expresaron por mg de proteína, éstas fueron evaluadas según el método descrito por Lowry y col. (1951).

II.3.4 Hidroxindol-O-metiltransferasa

La hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT), es la enzima responsable de la transferencia del grupo metilo de la S-adenosilmetionina a la N-acetilserotonina, dando como producto la melatonina (Fig. 6).

La actividad HIOMT fue determinada por el procedimiento descrito por Axelrod y Weissbach (1960). Glándulas pineales individuales se homogeneizaron en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7.9 y alícuotas de 100 ul se incubaron en presencia de 1 mM de N-ace-

tilserotonina y 30 μ M de SAM- 14 C. Luego de 30 min de incubación a 37 C, la reacción se detuvo mediante el agregado de buffer borato 0.5 M, pH 10. La melatonina- 14 C formada, se extrajo con 8 ml de cloroformo, el que se lavó dos veces con 1 ml de buffer borato. Se tomaron 6 ml de la fase orgánica y se llevaron a sequedad en estufa (80 C). El residuo se resuspendió en 500 μ l de etanol, agregándose 10 ml de mezcla de centelleo y cuantificándose el producto radiactivo formado por espectrometría de centelleo líquido, previo agregado de 10 ml de solución de centelleo.

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

II.6 - Determinaciones por análisis de saturación de melatonina, PGE₂ y AMP_c

II.6.1 - Melatonina

La concentración de melatonina en la glándula pineal o en el medio de incubación de pineales in vitro fue determinada por radioinmunoanálisis, utilizando el antisuero desarrollado por inyección a conejos del inmunógeno indometacina-albúmina sérica humana (Levine y Riceberg, 1975) (donación del Dr. Levine, Brandeis University, MA, EE UU). El tejido se homogeneizó en 1 ml de ClH 0.1 N y se extrajo con 6 ml de cloroformo, el que fue lavado con 2 ml de NaHCO₃ 2 % y 2 ml de agua tridestilada, llevándose a sequedad bajo vacío. En el caso de los medios de incubación de glándulas pineales, alícuotas de 0.5 ml fueron extraídas con 6 ml de cloroformo, realizándose los mismos lavados sucesivos que para los extractos pineales. El residuo fue resuspendido en 0.5 ml de cloroformo y se lo sometió a una partición cloroformo-n-heptano-agua, luego de agregar 1 ml de buffer Tris-ClH, pH 7.4 y 5 ml de n-heptano; en estas condiciones la melatonina pasa a la fase acuosa. Para el radioinmunoanálisis se utilizaron alícuotas de dicha fase acuosa que se incubaron con el antisuero y de acuerdo con el método desarrollado por Levine y Riceberg (1975). En un volumen final de 0.3 ml se incubaron durante 1 h a 37 C, volúmenes iguales de melatonina fría (en el caso de la curva standard que abarcó un rango de 300-10000 pg/ml) o muestra, antisuero y melatonina-³H.

Luego de detener la reacción colocando los tubos a 0 C durante 10 min, se separó el complejo inmune formado mediante el agrega-

do de 1 ml de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (ss), incubación de 8 h a 4 C y posterior centrifugación a 2500 RPM. El precipitado obtenido se resuspendió en 0.2 ml de NaOH 0.1 N y la radiactividad se valoró por espectrometría de centelleo líquido, previo agregado de solución de centelleo.

La sensibilidad del ensayo fue de 30 pg/muestra; los coeficientes de variación intra e inter ensayo para muestras de 100 pg fueron 3 y 5% respectivamente.

II.6.2 Prostaglandina E₂

El radioinmunoanálisis se llevó a cabo con el antisuero del Instituto Pasteur de París.

En un volumen final de 0.3 ml se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente y 20-24 h a 0 C, volúmenes iguales de PGE₂ (en el caso de la curva standard, cuyo rango abarcó 30-1000 pg/ml), muestra, antisuero y PGE₂-³H (aproximadamente 12 pg/tubo). Luego de esta incubación se separó la PGE₂ unida de la libre mediante el agregado de una suspensión de carbón-dextrán (250 mg de carbón, 25 mg de Dextrán en 100 ml de buffer fosfato di-monopotásico 0.1 M, pH 7.4, 0.1% de gelatina), incubación a 4 C por 10 min y posterior centrifugación (1500xg) a la misma temperatura, durante 10 min.

El sobrenadante se cuantificó por espectrometría de centelleo líquido, previo agregado de solución de centelleo.

La sensibilidad del ensayo es de 30 pg PGE₂/tubo; los coeficientes intra e interensayo para muestras de 100 pg fueron 3 y 7% respectivamente.

II.6.3 AMP_c

Se incubaron en forma individual glándulas pineales de rata durante 10 min a 37 C en 200 ul de buffer KRB, pH 7.4, que contenía 122 mM NaCl, 4.9 mM KCl, 10.3 mM Na₂HPO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 0.5 mM CaCl₂, 11.8 mM glucosa, 1.1 mM ácido ascórbico, 0.13 mM EDTA y 0.01 mM de indometacina. Luego de esta preincubación las glándulas fueron incubadas durante 15 min en el mismo medio que contenía las diferentes PGs en concentraciones que variaron entre 1 nM y 1 uM. Al finalizar la incubación las pineales se homogeneizaron en ácido tricloroacético (TCA) 5%; el homogenato se centrifugó a 1000 x g por 20 min a 0 C y el sobrenadante se lavó 4 veces con 2 ml de dietiléter con el fin de eliminar el TCA. El AMP_c fue determinado por triplicado en la fase acuosa libre de TCA de acuerdo con la técnica de Brown y col. (1971).

La quinasas de proteínas fue aislada de glándulas adrenales bovinas. Luego de la separación de la médula, las cortezas adrenales fueron homogeneizadas en un homogeneizador tipo Polytron (Brickmann) a 0 C, con 1.5 volúmenes de buffer Tris-ClH, 50 mM, pH 7.4, conteniendo sacarosa 0.25 M; KCl 25 mM y MgCl₂ 5 mM. Este homogenato se centrifugó a 2000 x g durante 5 min y el sobrenadante a 5000 x g durante 15 min. El sobrenadante de esta última centrifugación se fraccionó en alícuotas de 0.5 ml, que se almacenaron a -20 C. Esta preparación fue descongelada y diluida con el buffer de ensayo (Tris-ClH 50 mM, pH 7.4, conteniendo teofilina 8 mM y 2-mercaptoetanol 6 mM, en el momento de cada determinación. Este buffer se utilizó en todos los pasos posteriores.

Cada tubo contenía 50 ul de la dilución apropiada de la enzima (1:8), 100 ul de una cantidad conocida de AMP_c (entre 0.039 y 20 pmoles) o de homogenato de tejido y 50 ul de AMP_c-³H (aproximadamente 3000 cpm). La cantidad de enzima era tal que unía aproximadamente el 40% del AMP_c marcado.

La incubación se realizó a 4 C durante 90 minutos. El AMP_c libre se separó por el agregado de 200 ul de una suspensión de carbón-BSA (Sigma, Fracción V) (500 mg de carbón:100 mg de BSA, para 10 ml de buffer de ensayo). La radiactividad se determinó por espectrometría de centelleo líquido, previo agregado de solución de centelleo.

II.7 - Determinación de la liberación de NE-³H por glándula pineal de rata in vitro.

Se utilizó el procedimiento descrito por Pelayo y col. (1977), consistente en la incubación de glándula pineal de rata in vitro con NE-³H y la estimulación de su liberación por 80 mM de K⁺. Se incubaron cuatro pineales por grupo en un cilindro de poliestireno cerrado en su parte inferior con una malla de acero inoxidable. El buffer de incubación consistió en una solución de Tyrode con la siguiente composición (mM): NaCl: 137; KCl: 2.68; CaCl₂: 1.78; MgCl₂: 1.04; Na₂HPO₄: 0.42; NaHCO₃: 11.9; glucosa: 5.5; Na₂EDTA: 0.069; ácido ascórbico: 0.061. La temperatura se mantuvo a 37°C, burbujeándose la solución con carbogéno. Los depósitos intraneuronales de NE-³H se marcaron por incubación de las glándulas en presencia de 0.5 μ M de \pm NE-³H (5 Ci/mmol) durante 30 min. Las pineales fueron incubadas durante 50 min más en nuevas fracciones de buffer sin el radioisótopo, y cuando el flujo espontáneo de NE-³H alcanzó el equilibrio, se estimuló la liberación de NE por exposición a 80 mM de K⁺. El intervalo entre la primera estimulación por K⁺ (S₁) y la segunda (S₂) fue de 35 min. Se agregó PGE₂ (10 - 100 nM) o vehículo al medio de incubación 20 min antes de S₂. Los resultados se expresaron como "liberación fraccional", o sea el % de la radiactividad tisular liberada luego del estímulo (S₁ y S₂). Asimismo se estableció la relación S₂/S₁ como un índice de la inhibición de la liberación producida por PGE₂.

II.8 - Determinación de la actividad contráctil del útero

Los estudios se realizaron in vitro con cuernos uterinos de ratas vírgenes ovariectomizadas, ya que en experimentos piloto éstas resultaron más sensibles al tratamiento con melatonina que las multiparas. Cada cuerno disecado se abrió longitudinalmente siguiendo la línea del mesometrio. Finalmente se cortaron trozos transversales de útero de aproximadamente 3-4 mm de longitud. El tejido se fijó a un soporte tisular por el extremo inferior, y el extremo superior se conectó a un transductor capaz de transformar la actividad mecánica del tejido en una señal eléctrica. La salida de este transductor se conectó a un amplificador acoplado a un inscriptor, de modo de registrar en forma inmediata y continua la actividad mecánica del tejido.

Como medio de incubación se utilizó una solución buffer KRB, pH 7.4, que contenía 11 mM de glucosa como sustrato metabólico. Una vez montado el tejido se aplicó una tensión basal de 500 mg, luego de lo cual se registró su actividad contráctil por un período de 60 min, considerándose los 10 primeros como control interno de dicha actividad y los 50 últimos como período experimental. La hora de experimentación fue analizada en períodos de 10 min y las variaciones observadas se expresaron como % de cambio respecto de los 10 primeros min control, que fueron considerados como el 100% de actividad. En las series de experimentos en las que se estudió el efecto de la melatonina, el metoxindol estuvo presente en el medio de incubación desde el comienzo de la hora de experimentación.

Para valorar la actividad contráctil del útero de rata ovariectomizada de 20 días se tuvo en cuenta la tensión contráctil isomé-

trica (TCI): medida desde el nivel de tensión de reposo hasta el punto de mayor tensión desarrollada (tensión pico); se consideró la TCI promedio de las contracciones registradas en 10 min.

II.9 - Determinación de la agregación plaquetaria

Se preincubaron 400 μ l de plasma rico en plaquetas durante 30 min en presencia de distintas concentraciones de melatonina (50-100-200 μ M). La actividad de la hormona pineal sobre la agregación plaquetaria se evaluó en un agregómetro y se utilizó como agente agregante ADP (concentración final 5 μ M).

La agregación inducida por 5 μ M de ADP en ausencia de melatonina fue considerada como el máximo valor de agregación (100% de transmitancia).

II.10 - REACTIVOS UTILIZADOS

Sigma Chemical Co.:

- acetilsalicílico, ácido
- N-acetilserotonina
- adenosina difosfato (ADP)
- adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMP_c)
- ascórbico, ácido
- 2,5-difeniloxazol
- 3,4-dihidroxibenzoico, ácido
- p-bis-2(5-feniloxazolil)-benceno
- indometacina
- melatonina
- 1-metil-3-isobutil-xantina
- L-norepinefrina, bitartrato
- seroalbúmina bovina (fracción V)
- sílica gel G
- teofilina

Pharmacia Fine Chemicals Co.:

- Dextrán T 70

Amend Drug and Chemical Co.:

- Carbón Norit A, neutro

Las prostaglandinas (PGE₂, PGE₁, PGF_{2α}, 15-ceto-PGF_{2α}, PGI₂) fueron cedidas por el Dr. John Pikee, Upjohn Co., Kalamazoo, Michigan, EEUU.

El ácido mefenámico fue cedido por el Dr. Casareto, Parke Davis.

Las sales y solventes utilizados fueron de grado analítico (Carlo Erba, Mallinckrodt, Merck).

New England Nuclear, Mass., EEUU:

- acetil-coenzima A, (1-acetil-¹⁴C)-, A.E.: 45 Ci/mmol
- N-acetil-5-metoxitriptamina, (2-aminoetil-³H)-, A.E.: 31.5 Ci/mmol
- S-adenosil-L-metionina, (metil-¹⁴C), A.E.: 47.0 Ci/mmol
- adenosina 3',5' fosfato cíclico, sal de amonio [³H(G)] , A.E.:
42.5 Ci/mmol
- β-feniletilamina, (1-etil-¹⁴C), HCl, A.E.: 47 mCi/mmol
- 5-hidroxitriptamina, (2-¹⁴C), bioxalato, A.E.: 47.2 mCi/mmol
- L-norepinefrina, 7-³H(N) , A.E.: 5 Ci/mmol
- Prostaglandina E₂ [5,6,8,11,12,14,15-³H(N)] , A.E.: 150 Ci/mmol
- Prostaglandina F_{2α} [5,6,8,9,11,12,14,15-³H(N)] , A.E.: 120 Ci/mmol

II.11 - ESTADISTICA

Para los análisis estadísticos se utilizaron los tests de Student y de Dunnet en el caso de dos muestras y el test de Scheffé (1959) o test de Tukey (1949) para comparaciones múltiples.

III. RESULTADOS

III.1 - PARTICIPACION DE LAS PROSTAGLANDINAS EN EL CONTROL NORADRE- NERGICO DE LA GLANDULA PINEAL

Como se ha analizado en la Introducción (Sección I.2.2), las PGs desempeñan un papel significativo en la modulación de la liberación y efecto postsináptico del neurotransmisor en diversas uniones neuroefectoras adrenérgicas (Fig. 9). Constituyendo la glándula pineal un modelo por excelencia de tales uniones neuroefectoras (Vacas, 1980), se decidió examinar el papel de las PGs en ese sistema. Ya hemos mencionado como antecedente del presente estudio la nota preliminar de Szabo y Friedhoff (1976) describiendo el efecto de la indometacina sobre la inducción de SNAT en ratas durante el período de oscuridad.

III.1.1 - Producción de prostaglandinas por la glándula pineal bovina "in vitro"

El objetivo de la primera serie de experimentos fue determinar si la glándula pineal in vitro producía PGs y si esta producción se modificaba por la exposición al neurotransmisor NE.

En la Fig. 10 se muestra la liberación de PGE y PGF por explantos de glándulas pineales bovinas. La liberación espontánea o inducida por NE de PGF resultó aproximadamente el doble que la de PGE. El agregado de 10^{-4} - 10^{-6} M de NE al medio de incubación produjo un incremento significativo en la liberación de ambas PGs.

En los experimentos en los que se incubaron las glándulas pineales bovinas en presencia de melatonina (1 mM) se observó una disminución del 52% y 88% de la liberación de PGF_{2 α} y PGE₂ respectivamente (Tabla 3), resultados que evidencian el efecto inhibitorio del metoxindol pineal sobre la producción de PGs.

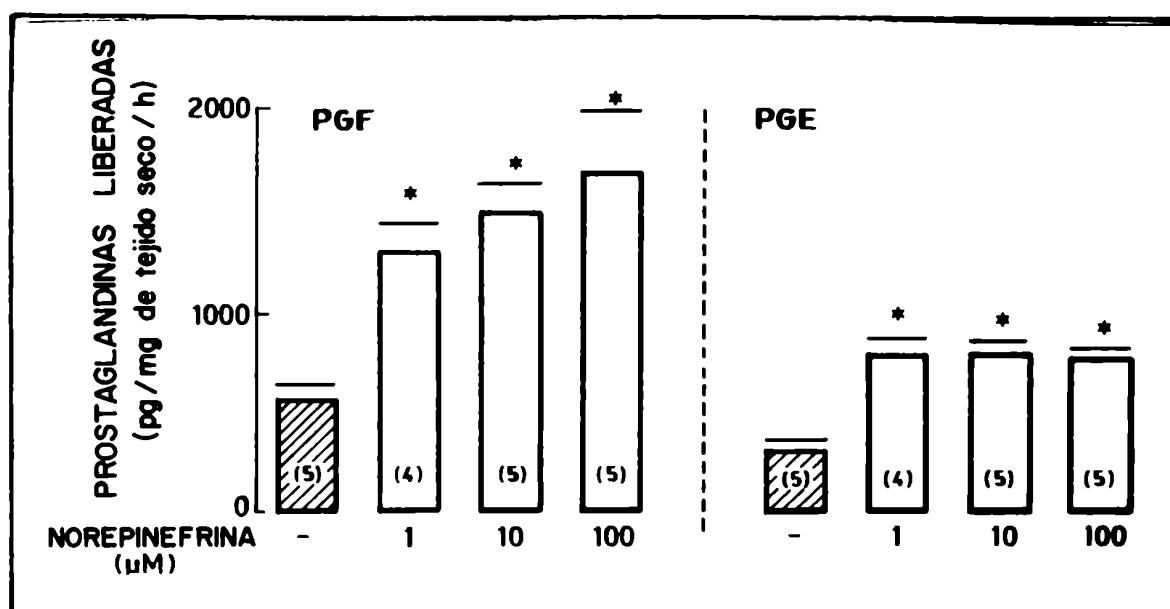


Fig. 10: Efecto de la NE sobre la producción de PGE y PGF por glándula pineal bovina in vitro.

Glándulas pineales bovinas fueron incubadas en presencia o ausencia de NE (10^{-4} - 10^{-6} M) durante 1 h a 37 C. Los resultados se expresan en pg/mg de tejido seco, Media \pm \pm ES (n).

* p < 0.01 en relación al control (test de Dunnet).

Tabla 3: Efecto de la melatonina sobre la producción y liberación de PGs por explantos de glándula pineal bovina in vitro*

	PGF _{2α}	PGE ₂
Control	526.1 ± 15.6 (5)	248.6 ± 49.8 (5)
Melatonina 10 ⁻³ M	250.4 ± 63.2 (5)**	30.9 ± 19.2 (5)**

*Glándulas pineales bovinas fueron incubadas durante 1 h a 37 C en presencia o ausencia de melatonina (10⁻³M). Los resultados se expresan en pg/mg tejido seco (Media ± ES, n).

**p < 0.05 en relación al control (test de Student).

III.1.2 - Caracterización de sitios de unión específicos para prostaglandinas en la glándula pineal bovina.

El objetivo de la segunda serie de experimentos fue la evaluación de la posible existencia de sitios receptores para PGs en glándula pineal bovina. Se utilizaron para ello sobrenadantes de 900 x g de homogenatos pineales en un buffer que contenía indometacina (a fin de inhibir la producción endógena de PGs, la que aumenta marcadamente como consecuencia del fraccionamiento subcelular) (Kimball y Wyngarden, 1975).

En la Fig. 11 se resume el experimento de tiempo para la asociación específica de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y PGE_2 a sus sitios de unión en glándula pineal bovina. A 37 C el "plateau" fue alcanzado en 30 min para ambas PGs. La unión aumentó aproximadamente al doble luego de incrementar la concentración de Ca^{++} de 0 hasta 2 mM (Fig. 12).

Con el objeto de obtener información sobre la naturaleza de los sitios de unión se preincubaron las muestras con tripsina. La enzima proteolítica afectó la unión de $\text{PGE}_2\text{-}^3\text{H}$ y $\text{PGF}_{2\alpha}\text{-}^3\text{H}$, disminuyéndola a 16-17% respecto de los controles. Asimismo, el calentamiento de los sobrenadantes a ebullición, previo a la reacción, destruyó los sitios de unión para ambas PGs. En el caso de preparar los sobrenadantes con buffer que no contenía indometacina, el "binding" de las $\text{PGs-}^3\text{H}$ disminuyó hasta prácticamente anularse (Tabla 4).

La posible metabolización de $\text{PGE}_2\text{-}^3\text{H}$ y $\text{PGF}_{2\alpha}\text{-}^3\text{H}$ luego de su asociación a los sitios receptores fue examinada por medio del sistema cromatográfico descrito en Materiales y Métodos (Sección II. 1). En todos los casos, más del 98% de la radiactividad co-cromatografió con los compuestos puros de referencia, lo que indica

que los sitios estudiados no corresponden a un sistema enzimático de degradación de las PGs.

En la Tabla 5 se resumen los resultados de los experimentos de localización subcelular de los sitios pineales de alta afinidad para PGs. La unión fue máxima en la fracción cruda mitocondrial, donde precipitan también vesículas y restos de membranas.

La saturación de los sitios de unión para PGE_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$ en glándula pineal fue examinada en los experimentos resumidos en las Figuras 13 y 14. El análisis de Scatchard (1949) reveló una única población de sitios de unión para PGE_2 - ^3H con una $K_d = 1.2 \text{ nM}$ y una concentración de sitios de 1-2 fmoles/mg de proteína (Fig. 13). En forma semejante, los experimentos de saturación utilizando $\text{PGF}_{2\alpha}$ - ^3H revelaron una única población de sitios de unión con $K_d = 1.7 \text{ nM}$ y concentración de sitios de 2 fmoles/mg de proteína (Fig. 14).

Con el objeto de establecer la especificidad de la unión observada, se incubaron cantidades constantes de PGE_2 - ^3H y $\text{PGF}_{2\alpha}$ - ^3H con distintas concentraciones (como mínimo 4) de PGE_1 , PGE_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$ no radiactivas. La concentración efectiva capaz de disminuir al 50% la unión (CE_{50}) de las PGs- ^3H y la constante de disociación para los distintos inhibidores (K_i) se calcularon de acuerdo con el procedimiento ya descrito en Materiales y Métodos (Sección II.3). PGE_1 y PGE_2 desplazaron en forma igualmente efectiva a PGE_2 - ^3H de sus sitios de unión, pero fueron 2-3 órdenes de magnitud menos potentes en sus efectos sobre la unión de $\text{PGF}_{2\alpha}$ - ^3H a sus sitios respectivos. Por su parte, $\text{PGF}_{2\alpha}$ fue unos 3 órdenes de magnitud menos eficaz que las PGs de la serie E para desplazar a la PGE_2 - ^3H de sus sitios de unión (Tabla 6). Estos resultados indican que los sitios de unión de PGE (PGE_1 y PGE_2) son una entidad distinta a los de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

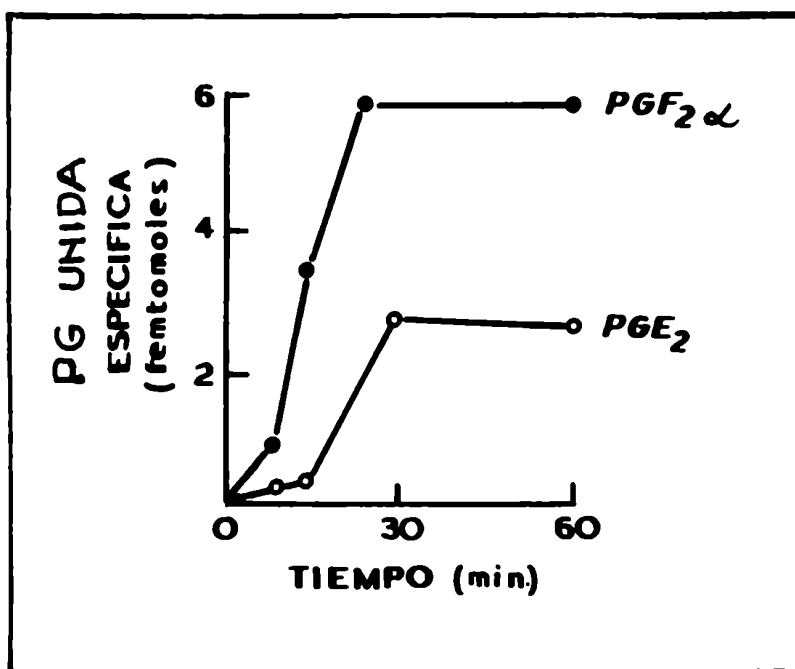


Fig. 11: Asociación de $PGF_{2\alpha}^{-3}H$ y $PGE_2^{-3}H$ al sobrenadante de 900 x g de glándulas pineales bovinas en función del tiempo de incubación.

La unión específica de $PGs^{-3}H$ se determinó como se describe en Materiales y Métodos luego de incubar alícuotas de 200 μ l del sobrenadante de 900 x g de pineal bovina en presencia de $PGs^{-3}H$ a 37 C durante los periodos de tiempo indicados en la figura.

Cada punto es la Media de 4 determinaciones.

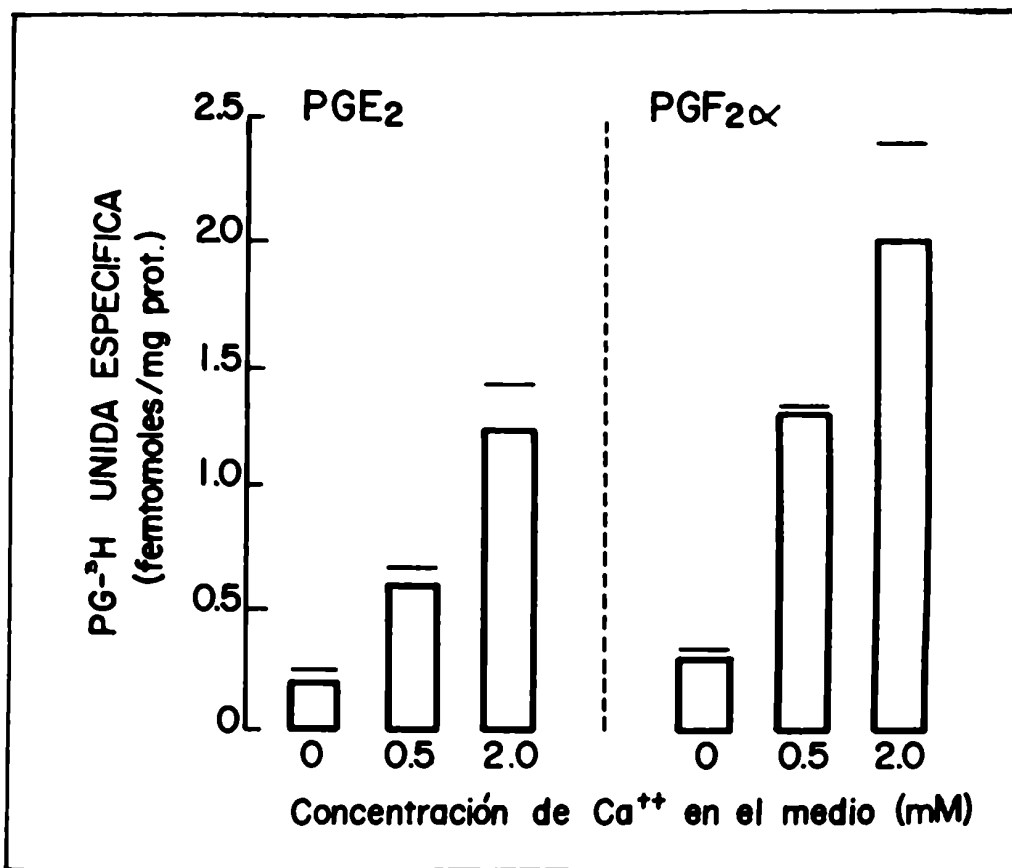


Fig. 12: Efecto del Ca⁺⁺ sobre la unión específica de PGE₂-³H a preparaciones crudas de membranas pineales.

Alicuotas de las preparaciones de membranas se incubaron como se describe en Materiales y Métodos en ausencia y en presencia de 0.5 o 2 mM de Ca⁺⁺. Los resultados se expresan como Media ± ES (n = 4 en cada grupo). Los datos fueron analizados por análisis de varianza seguido por el test de Dunnet para comparaciones múltiples. La variación interensayo fue menor que el 10%.

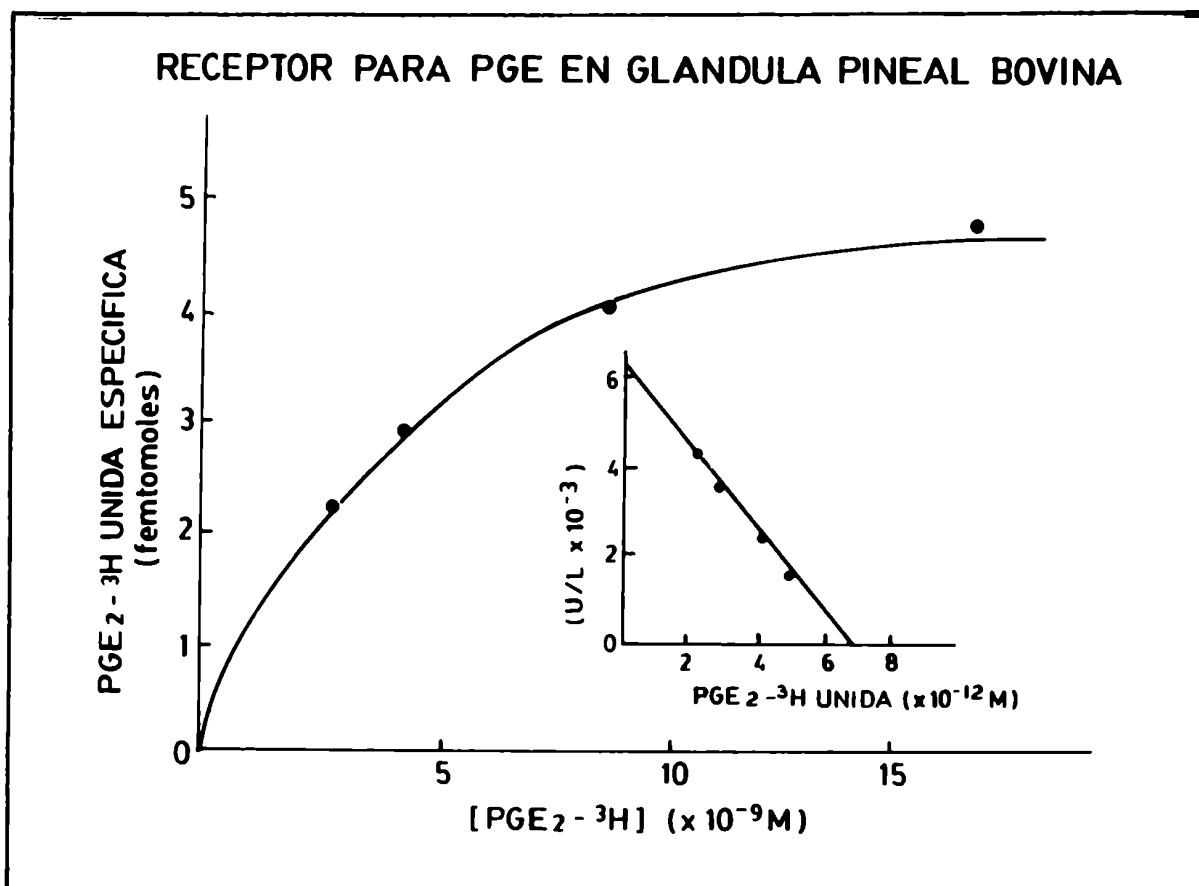


Fig. 13: Unión de PGE_2-^3H a membranas de glándula pineal bovina como función de concentraciones crecientes de PGE_2-^3H en el medio.

Cada punto es la Media de cuadruplicados de muestra. A la derecha se muestra el gráfico de Scatchard.

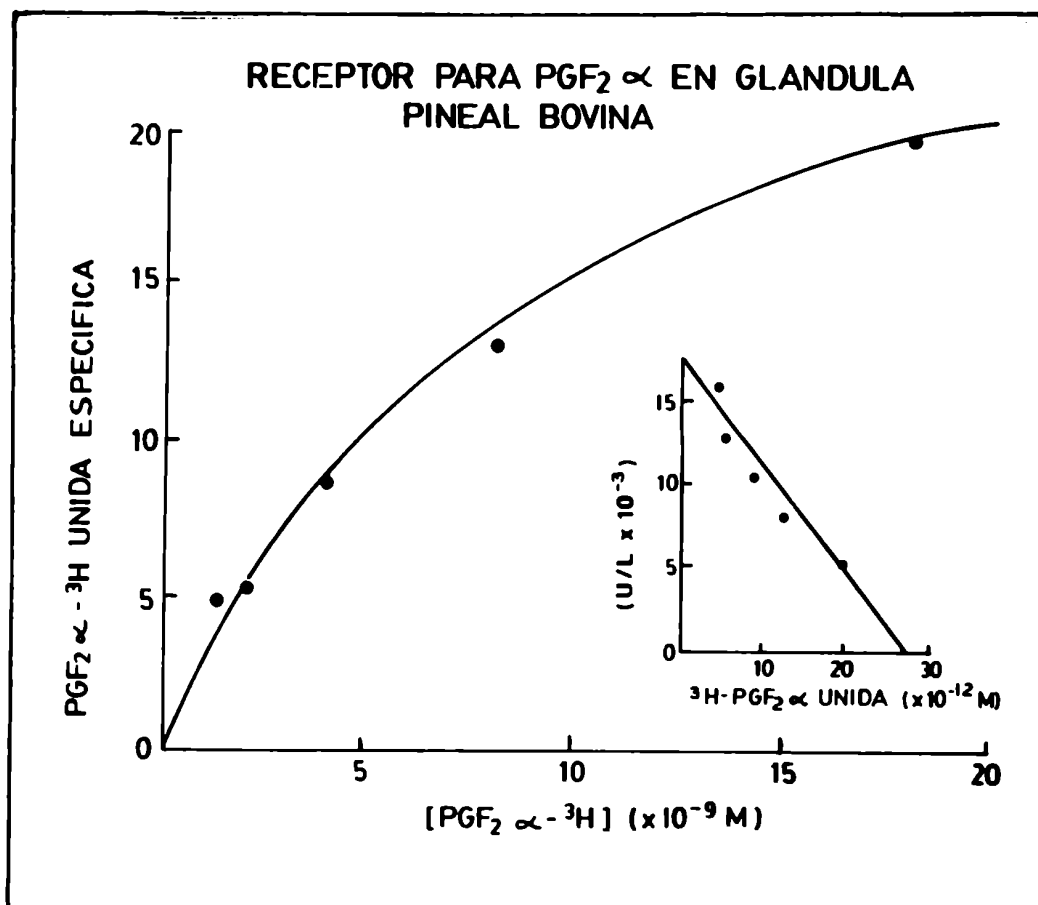


Fig. 14: Unión de $\text{PGF}_{2\alpha}^{-3}\text{H}$ a membranas de glándula pineal bovina en como función de concentraciones crecientes de $\text{PGF}_{2\alpha}^{-3}\text{H}$ en el medio.

Cada punto es la Media de cuadruplicados de muestra. A la derecha se muestra el gráfico de Scatchard.

Tabla 4: Efectos de la preincubación con tripsina, exposición a alta temperatura o incubación en ausencia de indometacina sobre la unión de $\text{PGE}_2\text{-}^3\text{H}$ y $\text{PGF}_{2\alpha}\text{-}^3\text{H}$ a sitios específicos en glándula pineal bovina*.

	% DE INHIBICION	
	$\text{PGE}_2\text{-}^3\text{H}$	$\text{PGF}_{2\alpha}\text{-}^3\text{H}$
Tripsina	83 ± 10	84 ± 9
Calor (100 C, 10 min)	88 ± 10	98 ± 12
Sin indometacina	95 ± 9	100

*Las muestras fueron preincubadas a 100 C durante 10 min o con 10 mg de tripsina a 37 C durante 15 min. Los controles fueron preincubados a 37 C en ausencia de enzima proteolítica. Los datos se presentan como Media ± ES (n = 4).

Tabla 5: Distribución subcelular de los sitios de unión para PGs-³H en glándula pineal bovina*.

PGE ₂ - ³ H	PG- ³ H UNIDA ESPECIFICA			% del total
	fmoles/mg prot	fmoles/100 mg tejido húmedo		
900 x g pellet	0.19 ± 0.02	0.77 ± 0.08		18
27000 x g pellet	2.32 ± 0.21***	1.79 ± 0.14		42
105000 x g pellet	0.52 ± 0.05**	1.44 ± 0.15		33
Citosol	0.65 ± 0.07	0.28 ± 0.03		7
PGF _{2α} - ³ H				
900 x g pellet	2.30 ± 0.23	0.95 ± 0.10		11
27000 x g pellet	4.51 ± 0.50	3.35 ± 0.30		41
105000 x g pellet	0.80 ± 0.07	2.40 ± 0.30		29
Citosol	3.64 ± 0.05	1.57 ± 0.20		19

(continúa en la siguiente página).

Tabla 5 (continuación)

*Los homogenatos de glándula pineal bovina se fraccionaron por centrifugación diferencial y, en las distintas fracciones, se midió la unión específica de $\text{PGs-}^3\text{H}$ según se describe en Materiales y Métodos. Aliquotas de 200 μl de las distintas fracciones se incubaron durante 1 h a 37 C con 10^{-12}M de $\text{PG-}^3\text{H}$ en presencia o ausencia de 1 nM de PGs no marcadas.

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 (1949) para comparaciones múltiples.

**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 y el precipitado de 105000 x g (p < 0.01).

Tabla 6: CE_{50} y K_1 de una variedad de PGs en los estudios de competencia por los sitios de unión para PGE_2 - 3H (A) y $PGF_{2\alpha}$ - 3H (B) en membranas de glándula pineal bovina*.

(A) PGE_2 - 3H

PG	CE_{50} (nM)	K_1 (nM)
E_1	5	0.65
E_2	2	0.26
$F_{2\alpha}$	1000	130

(B) $PGF_{2\alpha}$ - 3H

PG	CE_{50} (nM)	K_1 (nM)
E_1	125	22.5
E_2	1000	180
$F_{2\alpha}$	1.2	0.22

(continúa en la siguiente página).

Tabla 6 (continuación)

*Las preparaciones de membrana se incubaron durante 1 h a 37 C con cantidades constantes de $\text{PGE}_2\text{-}^3\text{H}$ y $\text{PGF}_{2\alpha}\text{-}^3\text{H}$ con distintas concentraciones (como mínimo 4) de PGE_1 , PGE_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$ no marcadas. Los datos de unión específica obtenidos se graficaron en papel log-probitos para determinar la concentración de la PG que causa una inhibición del 50% de la unión máxima de $\text{PG-}^3\text{H}$ (CE_{50}). Las pendientes e intersecciones se calcularon por análisis de regresión. La K_i , constante de disociación del agente inhibidor de la unión de $\text{PG-}^3\text{H}$, fue calculada a partir de la fórmula: $K_i = \text{CE}_{50}/1 + (\text{PG-}^3\text{H})/K_d$, donde K_d es la constante de disociación para la $\text{PG-}^3\text{H}$ respectiva.

III.1.3 - Efectos de la indometacina sobre la síntesis de melatonina y el metabolismo monoaminérgico de la glándula pineal de rata

El efecto estimulador de la NE sobre la liberación de PGs pineales descrito en la Sección III.1.1 planteó la posibilidad que éstas actúen en la secuencia de fenómenos desencadenados por la liberación del neurotransmisor de los terminales pineales y que conducen a la estimulación pineal.

El objetivo de esta serie de experimentos fue determinar si la inhibición de la síntesis de PGs in vivo afecta distintos parámetros de la función pineal. Como los efectos de las PGs pueden ser pre o postsinápticos, se utilizaron como indicadores diversas actividades enzimáticas, representativas de uno u otro sector, en animales inyectados con indometacina, un conocido inhibidor de la síntesis de PGs (ver Sección I.2.1).

En una primera serie de experimentos los animales fueron inyectados con indometacina (5 mg/kg) o vehículo a las 1800 h del día previo y a las 0900 h del día del experimento y fueron sacrificados 1 h más tarde.

El tratamiento con la droga resultó en un incremento del 55% de la actividad de NAC tipo A (presináptica) y una disminución del 37% de la actividad de MAD tipo B (postsináptica) (Tabla 7).

En la Tabla 8 se resumen los cambios en las actividades de HIOMT y COMT después de la inyección de indometacina. La actividad de COMT no se afectó mientras que la de HIOMT resultó disminuida en un 79%. A título de comparación se resumen en la Tabla 9 los cambios de dichas enzimas en el HMB de los mismos animales. Sólo

la actividad de MAO tipo A resultó modificada por el tratamiento con indometacina, observándose un incremento del 66% ($p < 0.01$). Las actividades de la MAO tipo B y de la COMT no se afectaron por el tratamiento.

Con el fin de examinar el efecto de la indometacina sobre la activación de la síntesis de melatonina pineal durante la fase de oscuridad del ciclo diario, los animales recibieron una única dosis de la droga (5 mg/kg) o el vehículo 1 h antes de finalizar el período de luz y fueron sacrificados en la cuarta hora de oscuridad (0100 h), momento en el cual la actividad SNAT y el contenido de melatonina alcanzan los valores máximos (Wilkinson y col., 1977).

La inyección de indometacina produjo una disminución significativa del 60% de la actividad de SNAT inducida por la oscuridad y redujo en un 27% el contenido de melatonina pineal ($p < 0.05$) (Fig. 15).

Tabla 7: Efecto de la indometacina sobre las actividades de MAO tipo A y tipo B en glándula pineal de rata*.

	MAO	
	tipo A	tipo B
VEHICULO	2450 \pm 281 (8)	12621 \pm 1800 (6)
INDOMETACINA	3791 \pm 364 (7)**	7932 \pm 1578 (7)**

*Grupos de ratas recibieron indometacina (5 mg/kg s.c.) a las 1800 h del día anterior y a las 0900 h del día del sacrificio y fueron sacrificadas 1 h más tarde. Los resultados se expresan en pmolea/mg prot./h, Media \pm ES (n).

**p < 0.02 en relación al inyectado con vehículo (test de Student)

Tabla 8: Efectos de la indometacina sobre las actividades de COMT y HIOMT en glándula pineal de rata*.

	COMT	HIOMT
VEHICULO	784 ± 185 (6)	127 ± 67 (6)
INDOMETACINA	915 ± 249 (4)	27 ± 13 (5)**

*Las ratas fueron tratadas como en el experimento de la Tabla 7.

Los resultados se expresan en pmoles/mg prot./h, Media ± ES (n).

**p < 0.01 en relación al inyectado con vehículo (test de Student).

Table 9: Efectos de la indometacina sobre las actividades de MAD tipo A y tipo B y COMT en HMB de rata*.

	MAD A	MAD B	COMT
VEHICULO	17611.1 ± 1117.6 (8)	24700.4 ± 1192.0 (8)	3051.0 ± 403.9 (7)
INDOMETACINA	29521.3 ± 2774.5 (8)**	24459.8 ± 1653.1 (8)	4249.4 ± 364.7 (8)

*Las ratas fueron tratadas como en el experimento de la Tabla 13. Los resultados se expresan como pmoles/mg prot./h, Media ± ES (n).

**p < 0.01 en relación al inyectado con vehículo con vehículo (test de Student).

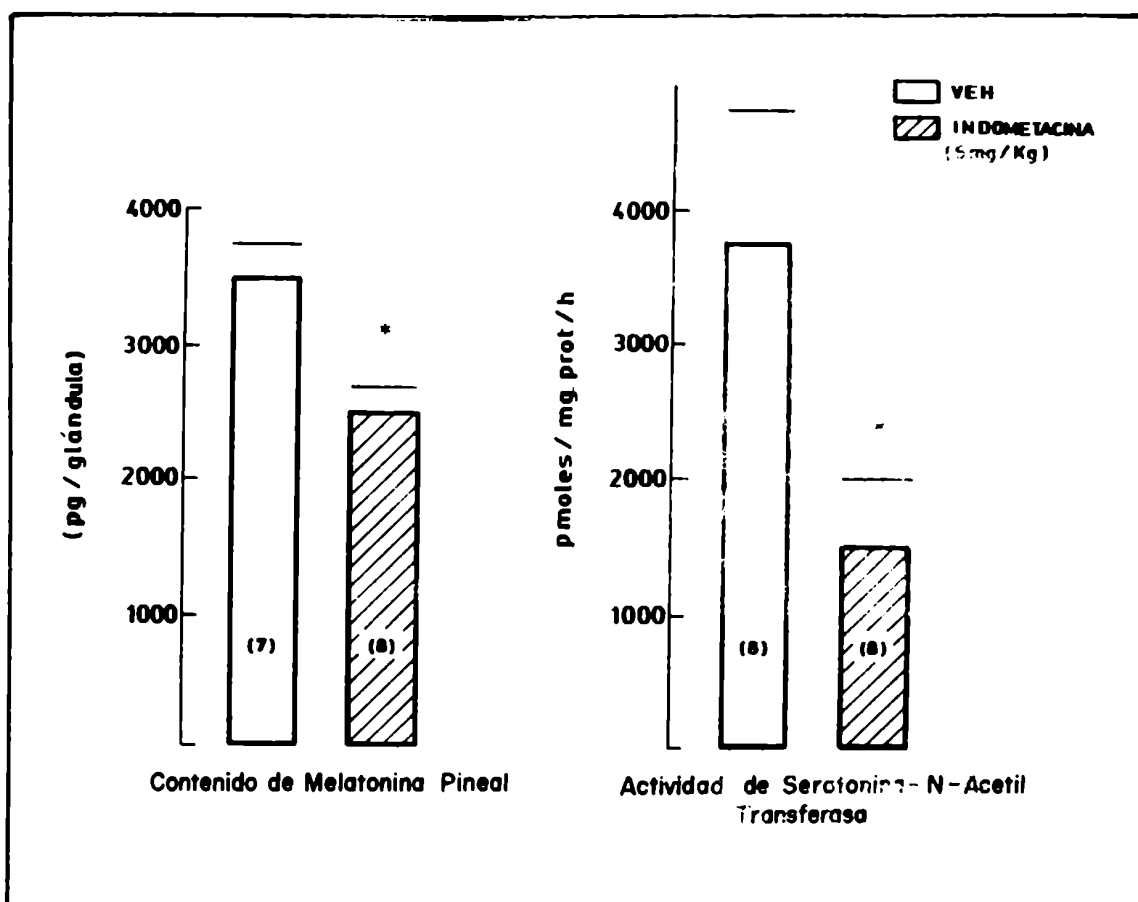


Fig. 15: Efecto del tratamiento con indometacina sobre la actividad de SNAT y contenido de melstonina pineal durante el periodo de oscuridad.

Las ratas fueron inyectadas con indometacina (5 mg/kg) a las 2000 h y sacrificadas a las 0200 h del día siguiente.

Los resultados se expresan como Media \pm ES (n).

$p < 0.05$ en relación al inyectado con vehiculo (test de Student).

III.1.4 - Efecto de las prostaglandinas sobre la actividad de SNAT en la glándula pineal de rata "in vitro"

El objetivo de esta serie de experimentos fue la caracterización del efecto de las PGs sobre la síntesis de melatonina in vitro. Se utilizó para ello el parámetro más sensible, la actividad SNAT, la que se inhibió por indometacina en un 80%, mientras que el contenido de melatonina cambió sólo en un 27% (Fig. 15).

En la Fig. 16 se resumen los efectos de las distintas PGs sobre la actividad de SNAT. Sólo PGE_2 la incrementó a todas las concentraciones estudiadas, presentando una curva en campana con máximo en 0.1 μM . PGE_1 sólo tuvo efecto a la máxima dosis usada (1 μM).

Con el objeto de determinar si el efecto estimulador de PGE_2 sobre la actividad de SNAT requiere la integridad presináptica, se incubaron glándulas pineales de ratas sometidas a gangliectomía cervical superior 7 días antes, en presencia de distintas concentraciones de PGE_2 . A todas las dosis estudiadas (0.01 - 1 μM) el efecto estimulador de PGE_2 fue significativamente mayor en las pineales desnervadas que en las glándulas de animales controles (Fig. 17).

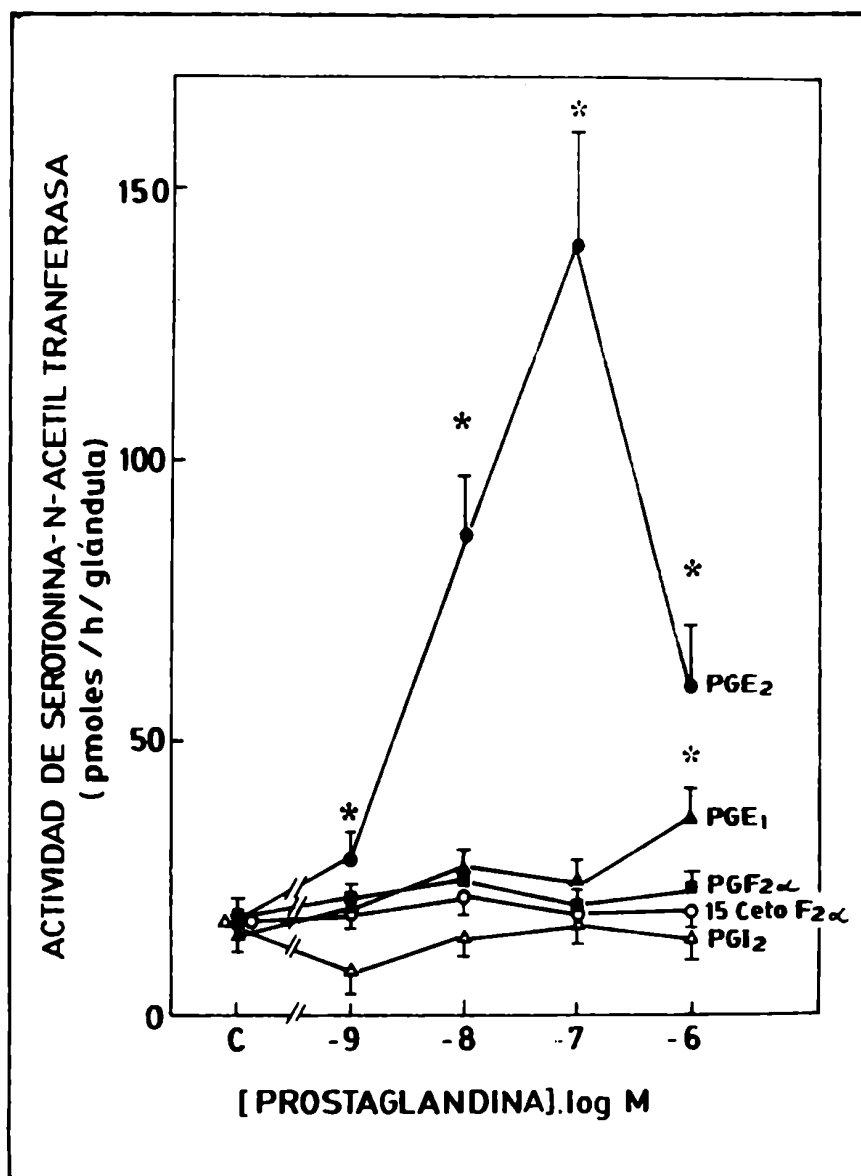


Fig. 16: Efecto de las PGs sobre la actividad de SNAT de glándula pineal de rata in vitro.

Las glándulas pineales se incubaron durante 6 h en medio TC 199 en presencia de las distintas PGs. La actividad SNAT se determinó como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como Media \pm ES (n = 7 en cada grupo experimental).

*p < 0.05 en relación al grupo control (C) (test de Dunnet).

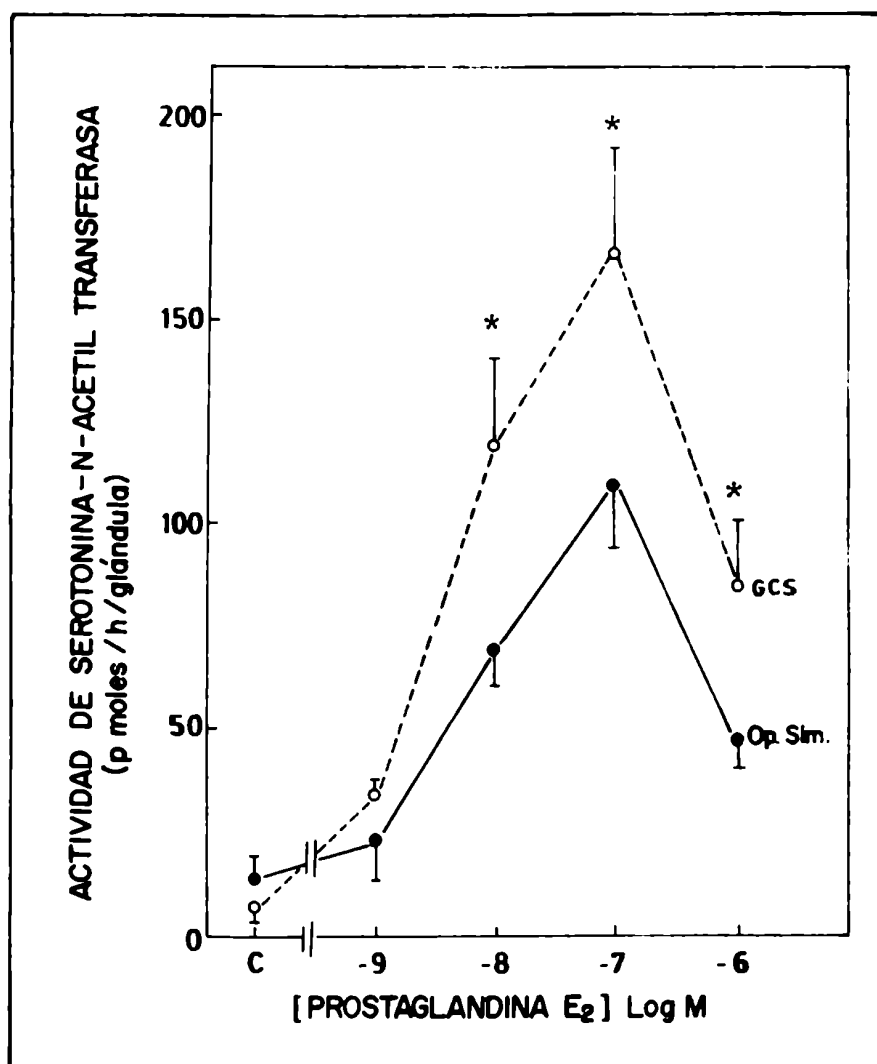


Fig. 17: Efecto de las PGs sobre la actividad de SNAT de glándula pineal de rata in vitro.

Las glándulas pineales, obtenidas de animales gangliectomizados o sometidos a operación simulada 7 días antes del experimento, se incubaron durante 6 h en medio TC 199 en presencia de PGE₂ como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como Media \pm ES (n = 7 en cada grupo experimental).

*p < 0.01 en relación al grupo control (C) (test de Student

III.1.5 - Efecto de PGE₂ sobre la acumulación de AMP_c y su unión a sitios receptores intracelulares en la glándula pineal de rata "in vitro".

Como ya fue discutido en la Introducción (Sección I.1.3) la inducción de la SNAT está mediada por la activación de una adenil ciclasa; en respuesta a la estimulación β -adrenérgica se produce un incremento del contenido de AMP_c pineal (Cleshansky y Neff, 1978; Zatz, 1978). Ya que la PGE₂ produjo activación de la SNAT y ante la posibilidad de que dicho fenómeno fuese mediado por AMP_c se estudió el efecto de la misma sobre el contenido glandular del nucleótido cíclico y su asociación a la subunidad reguladora de la quinasa de proteínas.

En la Fig. 18 se resumen los efectos de las distintas PGs sobre la acumulación de AMP_c glandular. Sólo PGE₂ incrementó significativamente el contenido del nucleótido cíclico en un rango de concentraciones que varió entre 0.01 y 1 μ M. PGE₃ (0.1 μ M) determinó una disminución significativa de los niveles de AMP_c.

La incubación de glándulas pineales con 0.05 μ M de PGE₂ determinó una disminución del 37% en los sitios de unión desocupados de la quinasa de proteínas, sin modificar la afinidad de esta unión (Fig. 19). Las constantes de disociación ($K_D = 34-58$ nM) son del orden de las descritas para diversos tejidos (Sanborn y col., 1973; Talmadge y col., 1975; Marcus y col., 1979).

Bajo condiciones de incubación similares, el número total de sitios de unión para AMP_c no fue alterado por la presencia de PGE₂. Sin embargo, la concentración de sitios en ambos grupos se redujo a un tercio después de 16 h de incubación a 5 C (Fig. 20).

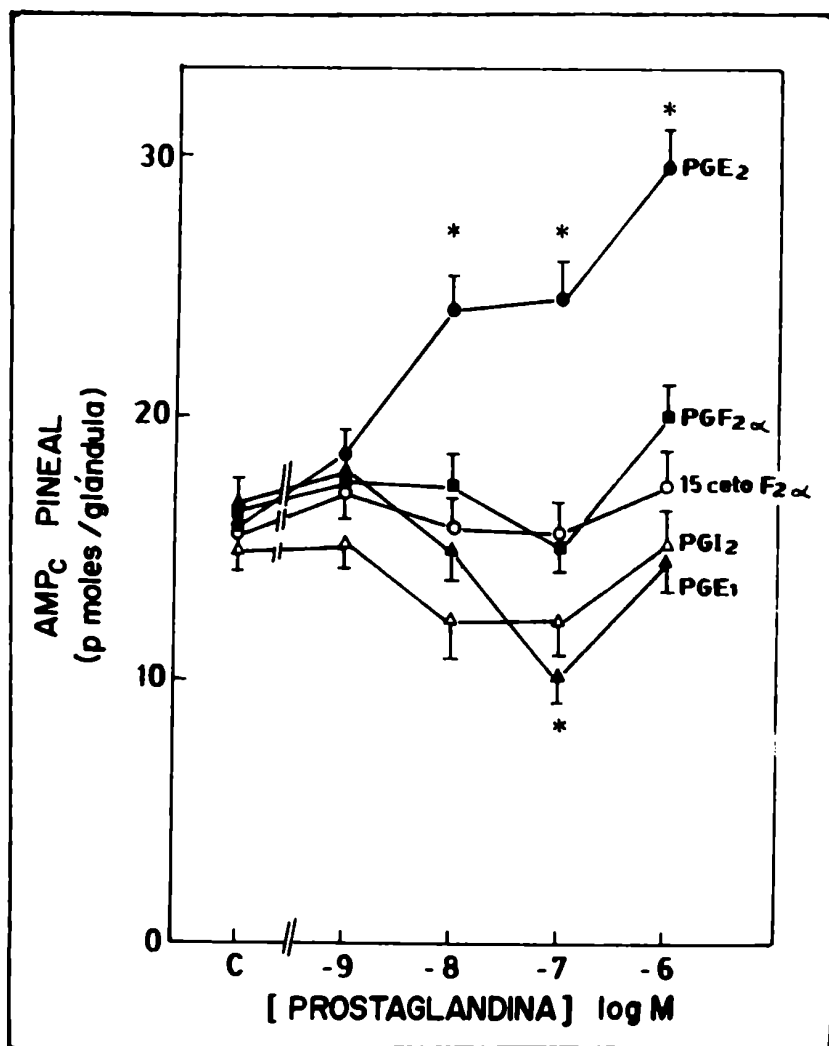


Fig. 18: Efecto de las PGs sobre la acumulación de AMP_c pineal in vitro.

Las glándulas pineales se incubaron durante 15 min en presencia de las distintas PGs y la concentración de AMP_c se determinó por el procedimiento de unión a la quinasa de proteínas descrito en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como Media \pm ES (n = 7 para cada grupo experimental).

*p < 0.05 en relación al grupo control (análisis de varianza, test de Dunnet).

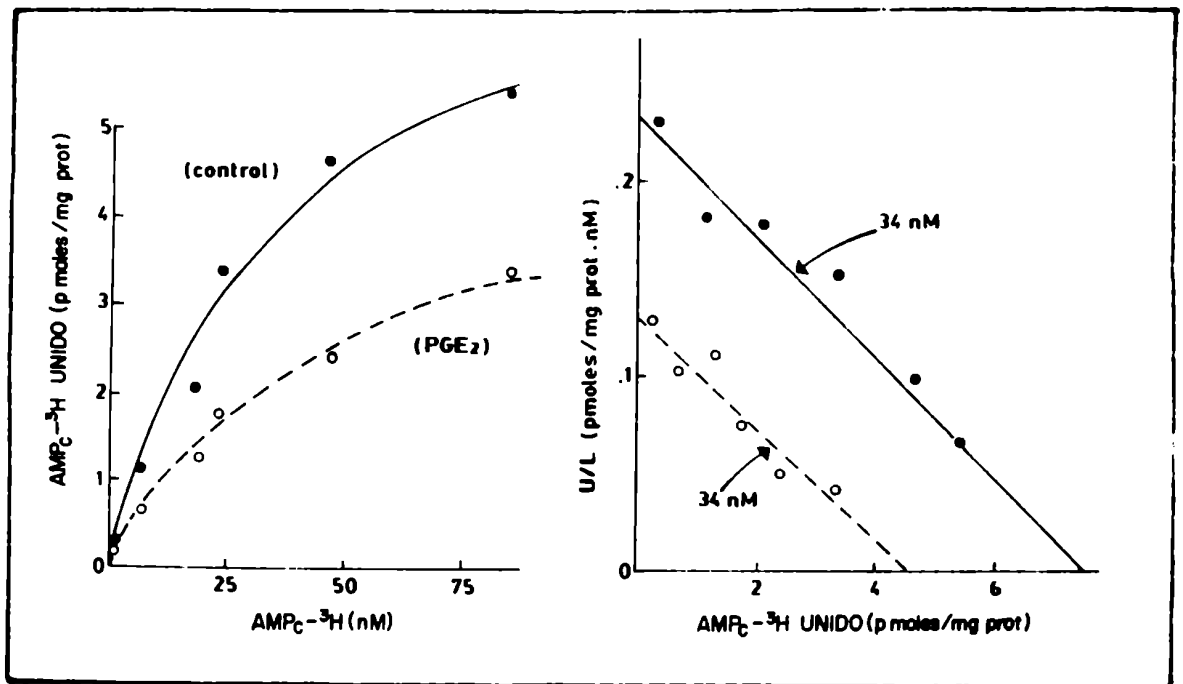


Fig. 19: Efecto de PGE_2 sobre la asociación de AMP_c-^3H a la quinasa de proteínas de glándula pineal de rata in vitro. Las glándulas pineales se incubaron durante 15 min en presencia de $0.05 \mu M$ de PGE_2 y los sitios de unión desocupados para AMP_c se determinaron en el sobrenadante de $900 \times g$ según se describe en Materiales y Métodos. En el panel de la izquierda se muestra la unión de AMP_c-^3H a sitios desocupados en función de concentraciones crecientes de AMP_c-^3H . En el panel de la derecha el gráfico de Scatchard permite el cálculo de las K_d y las concentraciones máximas de sitios de unión desocupados. Cada punto representa la Media ($n=3$)

* $p < 0.01$ según el análisis de covarianza (Snedecor y Cochran, 1967).

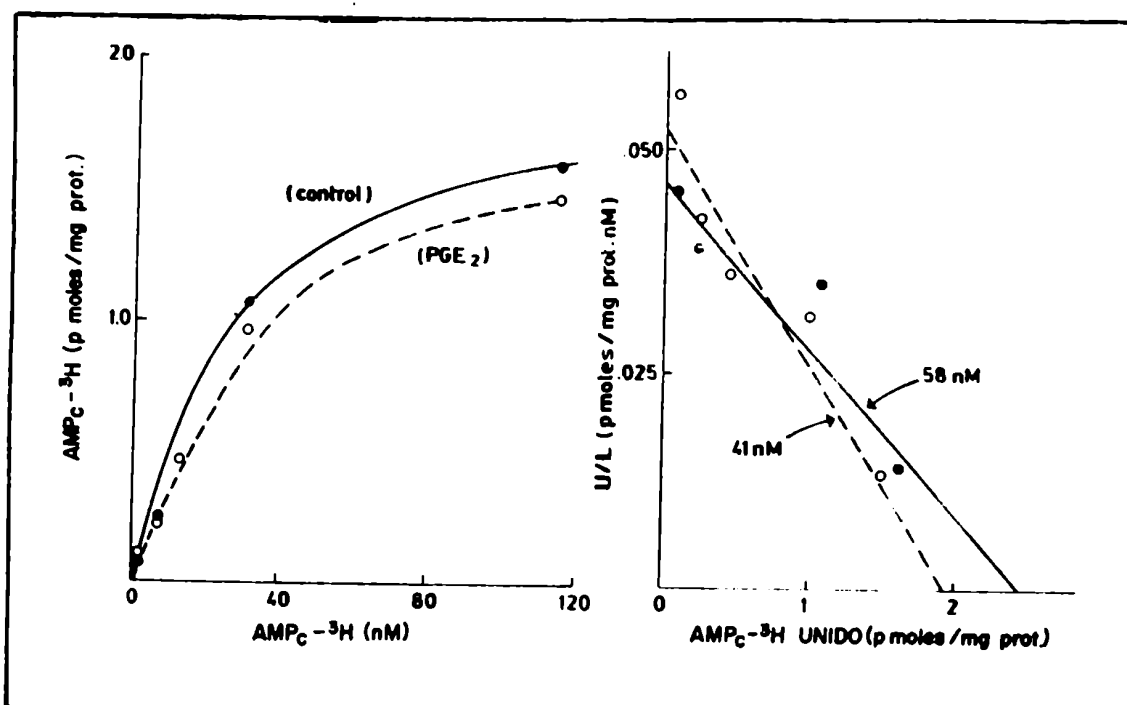


Fig. 20: Efecto de PGE_2 sobre la asociación de AMP_c-^3H a la quina-
sa de proteínas de glándula pineal de rata in vitro.

Las glándulas pineales se incubaron durante 15 min en pre-
sencia de $0.05 \mu M$ de PGE_2 y los sitios de unión totales
para AMP_c se determinaron en el sobrenadante de $900 \times g$
según se describe en Materiales y Métodos. En el panel
de la izquierda se muestra la unión de AMP_c-^3H a sitios
totales en función de concentraciones crecientes de AMP_c-^3H .
En el panel de la derecha el gráfico de Scatchard
permite el cálculo de las K_d y las concentraciones de si-
tios de unión totales. Cada punto representa la Media
($n=3$)

III.1.6 - Efecto de la PGE₂, NE y bloqueantes de la síntesis de prostaglandinas sobre la liberación de melatonina por la glándula pineal de la rata in vitro.

La siguiente serie de experimentos fue realizada con el objeto de caracterizar: a) el efecto de la PGE₂ sobre la liberación de melatonina, producto final de la secuencia estudiada en las secciones III.1.3 a III.1.5; b) la interferencia, por tres agentes con actividad inhibitoria de la síntesis de PGs, en el estímulo adrenérgico de la liberación de melatonina in vitro.

En la Tabla 10 se resumen los resultados de la curva dosis-respuesta para distintas concentraciones de PGE₂. Dicha PG incrementó en forma significativa la concentración de melatonina liberada al medio de incubación a partir de concentraciones 10⁻⁹M.

El agregado de NE (10⁻⁵M) al medio de incubación de glándulas pineales aumentó en aproximadamente 20 veces la liberación de melatonina (Tabla 11). Este efecto fue inhibido en forma significativa, aunque parcial, por 10⁻⁴M de indometacina, ácido acetilsalicílico o ácido mefenámico. A estas concentraciones los 3 agentes inhiben en forma total la síntesis de PGs (Flower, 1974).

Tabla 10: Efecto de la PGE_2 sobre la liberación de melatonina al medio de incubación de glándulas pineales de rata*.

	pg de melatonina liberados/p _i neal/6 h de incubación
CONTROL	2592 ± 707 (6)**
PGE_2 $10^{-9}M$	7372 ± 923 (7)
$10^{-8}M$	5859 ± 501 (10)
$10^{-7}M$	4969 ± 312 (5)
$10^{-6}M$	4486 ± 431 (7)

*Glándulas pineales de rata fueron incubadas durante 6 h a 37 C en medio TC 199 en presencia de PGE_2 (10^{-6} - $10^{-9}M$). Los resultados se expresan como Media ± ES (n).

**p < 0.01, difiere en forma significativa de los grupos con PGE_2 , análisis de varianzas (test de Scheffé).

Tabla 11: Efecto de la NE, en presencia o ausencia de indometacina, ácido acetilsalicílico o ácido mefenámico sobre la liberación de melatonina al medio de incubación de glándulas pineales de rata*.

	pg de melatonina liberados/ pinea/6 h de incubación*
CONTROL	1229 ± 331
NE 10 ⁻⁵ M	25344 ± 3168**
NE 10 ⁻⁵ M, indometacina 10 ⁻⁴ M	11136 ± 958***
NE 10 ⁻⁵ M, ácido acetilsalicílico 10 ⁻⁴ M	8832 ± 556***
NE 10 ⁻⁵ M, ácido mefenámico 10 ⁻⁴ M	13440 ± 1290***

*Glándulas pineales de rata se incubaron durante 6 h a 37 C en medio TC 199 en presencia de las distintas drogas. Los resultados se expresan como Media ± ES (n = 5 para cada grupo).

**Difiere en forma significativa de los demás grupos (análisis de varianza, test de Scheffé, p < 0.01).

***p < 0.01, difiere en forma significativa del grupo control, análisis de varianza (test de Scheffé).

III.1.7 - Efecto de la PGE₂ sobre la liberación de NE-³H por glándula pineal de rata in vitro

El objetivo de esta serie de experimentos fue examinar el efecto de PGE₂ en concentraciones fisiológicas sobre la liberación de NE-³H por la glándula pineal. Existe concluyente demostración que luego de una inyección in vivo de NE-³H (Cardinali y col., 1975 c) o de la incubación in vitro con el compuesto marcado (Pelayo y col., 1977), el neurotransmisor es captado por los terminales adrenérgicos. Ante un estímulo eléctrico o luego de la exposición de la glándula a una solución de ClK 80 mM (que despolariza a los terminales), el neurotransmisor se libera por un proceso semejante al fisiológico.

Los resultados de este experimento se resumen en la Tabla 12. La PGE₂ (10⁻⁷M) resultó en inhibición de la liberación de NE. La incubación con cantidades menores de PGE₂ (10⁻⁸M) no alteró la liberación de neurotransmisor producida por 80 mM de K⁺ en el medio.

Tabla 12: Efecto de la PGE_2 sobre la liberación de $\text{NE-}^3\text{H}$ por glándula pineal de rata in vitro*.

	Liberación fraccional ($\times 10^{-3}$)		
	S_1	S_2	S_2/S_1
Control	20.9 ± 2.4	13.3 ± 2.2	0.64 ± 0.09
PGE_2 10^{-8}M	21.4 ± 3.0	13.2 ± 3.0	0.61 ± 0.10
PGE_2 10^{-7}M	20.9 ± 2.9	$6.9 \pm 1.3^{**}$	$0.33 \pm 0.05^{**}$

*Los depósitos de NE en los terminales simpáticos fueron marcados por incubación con $0.5 \mu\text{M}$ de $\text{NE-}^3\text{H}$ durante 30 min. Luego de producirse el equilibrio en el eflujo espontáneo de radiactividad, la liberación de neurotransmisor se estimuló por exposición durante 1 min a 80 mM de K^+ . S_1 corresponde a la primera exposición y S_2 a la segunda, 35 min más tarde. La PGE_2 o vehículo se agregó al medio de incubación durante los 20 min previos a S_2 . Los resultados se expresan como Media \pm ES de 6 determinaciones.

** $p < 0.05$ en relación al control.

III. 2 - PARTICIPACION DE LAS PROSTAGLANDINAS EN EL MECANISMO DE ACCION DE LA HORMONA PINEAL MELATONINA

Los experimentos a analizar a continuación se originaron a partir de la hipótesis que la melatonina y la indometacina no sólo comparten similitudes estructurales e inmunogénicas (Levine y Riceberg, 1975), sino también un mecanismo bioquímico, la inhibición de la síntesis de PGs. Tal mecanismo mediaría los efectos neuroendócrinos de ambas sustancias de notable semejanza. Esta hipótesis está avalada por las observaciones resumidas en la Tabla 3.

El agregado de la hormona pineal melatonina inhibió, como la indometacina, la síntesis de PGs en la glándula pineal. Dichos resultados sugieren la presencia de una retro-alimentación de la vía biosintética de la melatonina a través de la síntesis de PGs.

III.2.1 - Inhibición por melatonina de la producción de prostaglandinas en HMB bovino y de rata "in vitro".

Con el fin de verificar la presunta participación de las PGs en el mecanismo de acción de la melatonina se incubaron HMB bovino y de rata en presencia de distintas concentraciones de la hormona pineal.

Se llevaron a cabo tres series de experimentos. En la Tabla 13 se resumen los efectos del agregado de melatonina al buffer de incubación sobre la producción de PGE y PGF por el HMB bovino, evaluada por ensayo biológico. Luego del agregado de 1 mM de melatonina se detectó un marcado efecto inhibitorio del eflujo de ambos tipos de PGs. En presencia de 0.1 mM y 0.01 mM no se observó tal efecto inhibitorio (Tabla 13).

La concentración a la cual la melatonina es activa en el HMB bovino es varios órdenes de magnitud mayor que la K_d de los sitios receptores detectados en la misma preparación (Cardinali y col., 1979 a). Este hecho planteó la cuestionabilidad del significado biológico de tal hallazgo. Decidimos entonces utilizar una preparación experimental de HMB de rata, descrita por Ojeda y col. (1979 b), como sensible para detectar cambios en el eflujo de PGE_2 producido en respuesta a distintas catecolaminas. Asimismo, en esos experimentos se evaluó la concentración de PGE por un radioinmunoanálisis específico.

En la Tabla 14 se resumen los efectos de concentraciones submicromolares de melatonina sobre la liberación espontánea de PGE_2 por HMB de rata. La melatonina (0.01 - 100 μ M) disminuyó un 47-64% dicha liberación.

En otra serie de experimentos se estudió el efecto de distintas concentraciones de melatonina sobre la liberación de PGE_2 inducida por NE en HMB de rata (Fig. 21). Se utilizaron dos concentraciones de NE (1 y 100 μM) y distintas concentraciones (0.1 - 1000 μM) de melatonina. Como ya fuese demostrado por Ojeda y col. (1979 a), el agregado de 1 μM de NE no afectó la liberación de PGE_2 por el HMB; sin embargo, en presencia de esa concentración de neurotransmisor, la melatonina fue menos efectiva para disminuir la generación de PGE por HMB (compárese con la Tabla 14).

Cuando las incubaciones se llevaron a cabo en presencia de 100 μM de NE, la liberación de PGE_2 aumentó al doble y la melatonina revirtió tal efecto estimulador. La dosis efectiva mínima de melatonina fue 0.1 - 1 μM , según los experimentos.

Tabla 13: Efecto de la melatonina sobre la producción y liberación de PGs por explantos de HMB bovino in vitro°.

	PGF _{2α}	PGE ₂
CONTROL	917 ± 150 (6)	269 ± 38 (6)
Melatonina 10 ⁻³ M	248 ± 39 (6)**	69 ± 29 (6)***
Melstonina 10 ⁻⁴ M	812 ± 96 (5)	287 ± 92 (6)
Melatonina 10 ⁻⁵ M	915 ± 132 (6)	313 ± 79 (6)

°HMB bovinos fueron incubados durante 1 h a 37 C en presencia o ausencia de melatonina (10⁻³ - 10⁻⁵M). Los resultados se expresan en pg/mg de tejido seco (Media ± ES, n).

**p < 0.01 en relación al control (test de Student).

***p < 0.05 en relación al control (test de Student).

Tabla 14: Efectos de concentraciones submicromolares de melatonina sobre la liberación espontánea de PGE₂ por HMB de rata in vitro*.

	PGE ₂ liberada (pg/mg HMB)
Buffer	19.9 ± 2.3 (10)**
Melatonina 10 ⁻⁸ M	10.6 ± 1.9 (9)
Melatonina 10 ⁻⁶ M	7.4 ± 1.4 (7)
Melatonina 10 ⁻⁴ M	9.2 ± 1.4 (11)

*Los HMB se incubaron durante 30 min a 37 C en presencia de melatonina, previa preincubación de 15 min en buffer KR8. La PGE₂ liberada se determinó por radioinmunoanálisis en 100 ul de medio de incubación. Los resultados se expresan como Media ± ES (n).

**p < 0.01, diferencia significativa respecto de los grupos con melatonina (análisis de varianza, test de Scheffé).

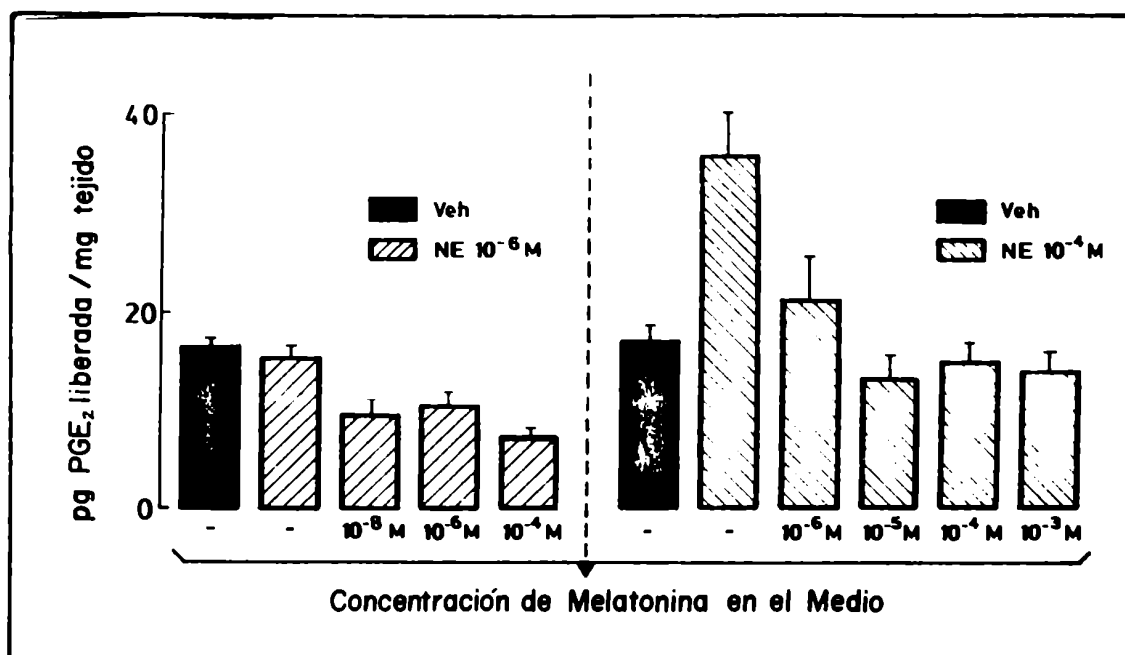


Fig. 21: Efecto de la melatonina sobre la liberación inducida por NE de PGE₂ por HMB de rata in vitro.

Se agregó melatonina (10^{-3} - 10^{-8} M) al medio de incubación de los HMB de rata que contenía 10^{-6} M de NE (Exp. 1) o 10^{-4} M de NE (Exp. 2). Los resultados se expresan como Media \pm ES (n = 5 en cada grupo experimental).

Exp. 1 (panel izquierdo): las diferencias entre el grupo tratado con NE y aquellos incubados con NE más melatonina son significativas. ($p < 0.05$, análisis de varianza, test de Dunnet).

Exp. 2 (panel derecho): las diferencias entre el grupo tratado con NE y los restantes fue significativa ($p < 0.01$, análisis de varianza, test de Dunnet).

III.2.2 - Inhibición por la melatonina de efectos vinculados a la liberación de prostaglandinas en útero de rata y plaquetas humanas.

Con el objeto de evaluar la hipótesis que la melatonina inhibe la síntesis de PGs en varios tejidos, se utilizaron otras dos preparaciones, útero de rata y plaquetas humanas, en las cuales ciertos efectos biológicos están mediados por las PGs. La vinculación de la motilidad uterina con la síntesis de PGs ha sido fehacientemente establecida en los últimos 10 años. El útero de diversas especies sintetiza y contiene PGs de distintos tipos (Pickles y col., 1965; Karim y Devlin, 1967; Caspo y col., 1973; Goldberg y Ramwell, 1975). El aumento de la liberación de PGs es paralelo al desarrollo de la motilidad espontánea del útero (Vane y Williams, 1973; Harney y col., 1974) y sugiere la participación de las PGs endógenas en los mecanismos que desencadenan tal motilidad (Williams y col., 1974).

Asimismo los inhibidores de la síntesis de PGs bloquean simultáneamente la liberación y la motilidad uterina, fenómenos que son revertidos por el agregado de PGE_2 (Gimeno y col., 1979).

De acuerdo con estos conceptos, el útero constituye un excelente sistema para examinar cambios biológicos vinculados a la liberación de PGs en presencia de melatonina.

Concentraciones de melatonina superiores a $10^{-7}M$ deprimieron la tensión isométrica desarrollada por el útero de ratas castradas en función del tiempo de exposición al metoxindol (Fig. 22).

Otro sistema utilizado para examinar el efecto de la melatonina sobre mecanismos biológicos mediados por PGs fue el de las pla-

quetas. En 1973, Smith y col., demostraron que el ácido araquidónico inducía la agregación plaquetaria y que tal efecto era revertido por aspirina o indometacina (Silver y col., 1973). Estos efectos de los inhibidores de la síntesis de PGs sugieren la participación de algún intermediario de la cascada del ácido araquidónico en el proceso de agregación plaquetaria. De los compuestos cuyas fórmulas se muestran en la Fig. 7, los que inducen agregación plaquetaria son: PGG_2 y PGH_2 (Hamberg y col., 1974), PGE_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Salzman y col., 1976), tromboxano A_2 (Smith y col., 1977).

En 1977, Salzman y col. estudiaron el mecanismo de agregación en plasma humano rico en plaquetas y comprobaron que tal proceso era inducido en ese sistema por PGG_2 .

De acuerdo con estos datos, el plasma humano rico en plaquetas constituye otro modelo óptimo para el estudio de los efectos de la melatonina sobre mecanismos dependientes de la síntesis de PGs.

En la Tabla 15 se resume el efecto de la melatonina sobre la agregación de plaquetas humanas inducida por ADP. La hormona pineal produjo una inhibición significativa de tal agregación en concentraciones de 10^{-4}M , sugiriendo que el metoxindol inhibe la síntesis de PGs y compuestos relacionados en esta preparación.

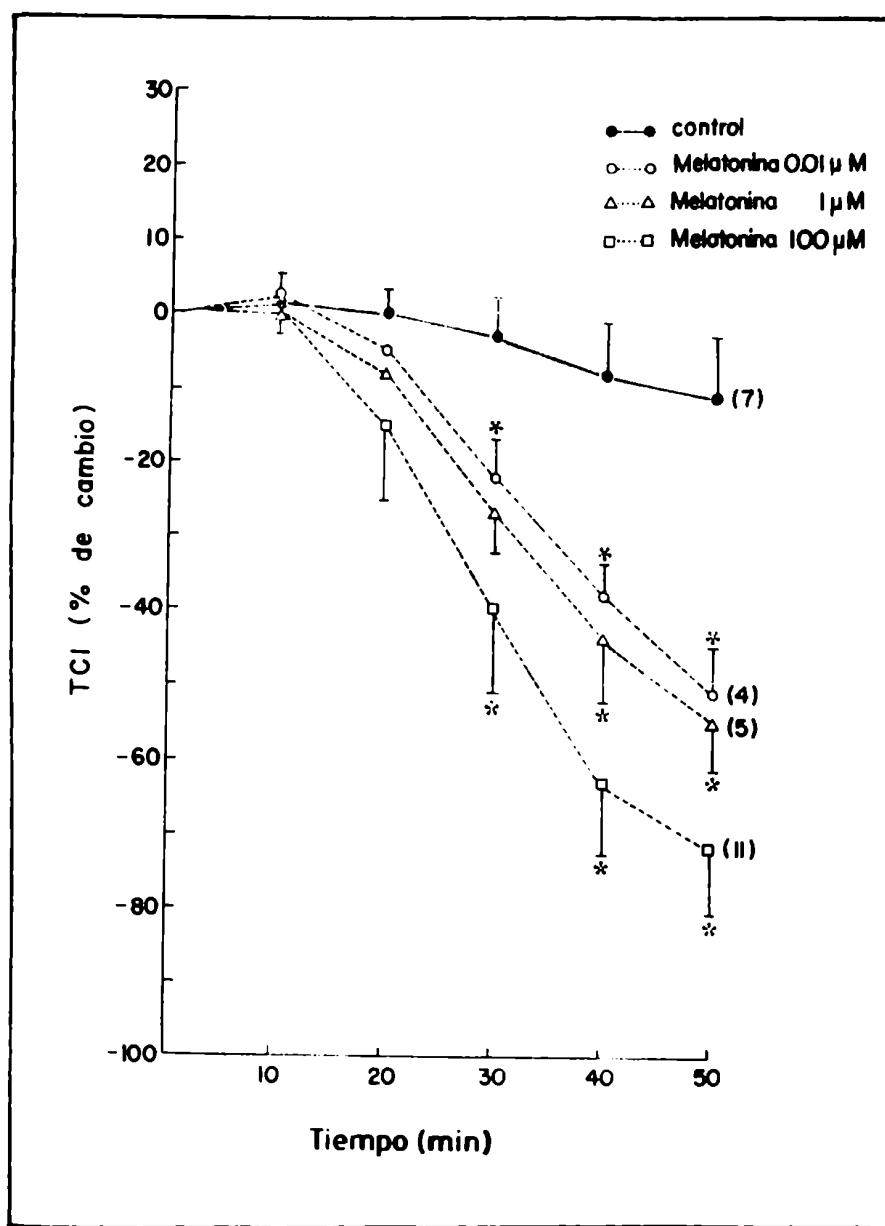


Fig. 22: Tensión isométrica desarrollada por útero de rata castrada en función del tiempo de exposición a distintas concentraciones de melatonina in vitro.

Los resultados se expresan como Media \pm ES de los % de cambio respecto de los valores iniciales de TCI.

* $p < 0.05$, diferencia significativa respecto del control

Tabla 15: Inhibición por melatonina de la agregación de plaquetas humanas inducida por ADP*.

Concentración de melatonina	% de Transmitancia
-----	100
0.05 mM	100
0.1 mM	73.5 ± 4.9**
0.2 mM	49.2 ± 8.9**

*El plasma rico en plaquetas obtenido según se describe en Materiales y Métodos, se preincubó durante 30 min con melatonina antes del agregado de 5 μ M de ADP. Los resultados se expresan como Media \pm ES (n = 4).

**p < 0.05, diferencia significativa respecto del control (test de Student).

IV. DISCUSSION

En la glándula pineal, como en toda estructura inervada por el sistema simpático, las PGs pueden participar en la secuencia de fenómenos metabólicos desencadenada por el neurotransmisor. Como se ha analizado en la Introducción (sección I.2.2), existe abundante evidencia experimental que indica que las PGs son liberadas en la vecindad de la unión neuroefectora autonómica tanto en forma espontánea como en respuesta a estímulos diversos y que estos compuestos afectan presinápticamente la liberación del neurotransmisor y postsinápticamente sus efectos biológicos (Westfall, 1977). Los experimentos descritos en la sección III.1.1 fueron diseñados para responder a las siguientes preguntas:

- ¿Se liberan PGs luego de la incubación de glándulas pineales con NE?
- ¿Existen sitios específicos de unión para las PGs en la glándula pineal?
- ¿Modifica la inhibición de la síntesis de PGs indicadores pre- y postsinápticos de la actividad pineal?
- ¿Tienen las PGs efectos directos sobre los pinealocitos in vitro?
- ¿Afectan los inhibidores de la síntesis de PGs el efecto estimulador de la NE sobre la producción de melatonina in vitro?
- ¿Modifica la PGE₂ la liberación de NE por los terminales adrenérgicos pineales?

Los resultados obtenidos demuestran que la NE libera PGs de las series E y F de la glándula pineal en forma parcialmente dependiente de la dosis y en concentraciones consideradas como fisioló-

gicas. La liberación de PGs por NE descrita por primera vez en este trabajo, ha sido previamente observada en otras regiones inervadas simpáticamente, por ej., riñón y bazo perfundidos de gato (Gilmore y col., 1968; Dunham y Zimmerman, 1970; Ferreira y col., 1973); corazón perfundido de conejo (Junstad y Wennmalm, 1973) y preparación de nervio frénico-diafragma (Ramwell y col., 1965) y de gresa epididimaria de rata (Shaw y Ramwell, 1968).

Las concentraciones de NE utilizadas (10^{-6} M en adelante) son las mismas que aumentan la síntesis de melatonina in vitro (Klein, 1978) y por lo tanto sugieren que el efecto observado es fisiológico.

Estos resultados satisfacen, por lo tanto, un primer criterio importante para la demostración de la participación de las PGs en la secuencia de efectos metabólicos desencadenada por la interacción de la NE con receptores β -adrenérgicos de los pinealocitos.

La siguiente serie de experimentos tuvo como objetivo determinar la presencia de sitios de unión específicos para PGs en la glándula pineal bovina. En 1972, Muehl y Humes ofrecieron la primera evidencia experimental sobre un receptor para PGs en tejidos de mamíferos, demostrando la unión específica de PGE_1 - ^3H en una fracción particulada obtenida de homogenatos de hepatocitos de rata. Posteriormente se observó la existencia de receptores para PGs en los siguientes tejidos: útero de hamster (Wakeling y col., 1973), membranas de hígado de rata (Smigel y Fleisher, 1974), cuerpos lúteos bovinos (Rao, 1973; Powell y col., 1975), ovinos (Powell y col., 1974 a) y humanos (Powell y col., 1974 b), glándula tiroidea bovina (Moore y Wolfe, 1974) y oviducto de conejo (Wakeling y

Spilman, 1973).

En la glándula pineal bovina la concentración de sitios receptores fue máxima en la fracción precipitada a $27000 \times g$, correspondiente a membranas y mitocondrias y aumentó mediante el agregado de Ca^{++} (lo que también apoya la naturaleza membranosa de los sitios de unión). Tales componentes capaces de unir a las PGs con alta afinidad y especificidad fueron sensibles a la preincubación con tripsina, indicando que en su constitución participa una importante fracción proteica.

Los resultados obtenidos en ausencia del agregado de indometacina al buffer de incubación indica que las PGs endógenas liberadas durante la homogeneización ocupan en forma efectiva los sitios de unión disponibles en membranas de glándula pineal. Esto resulta en una depresión del "binding" de la $PG-^3H$ correspondiente.

El análisis de saturación de los sitios pineales indicó una población homogénea de sitios de unión para $PGF_{2\alpha}$ y PGE_2 con K_d semejante (1-2 nM) y dentro del orden de los detectados en otros tejidos. Estos sitios receptores fueron específicos para las series E y F, por lo que, aparentemente, constituyen entidades separadas. El "binding" de PGE_2-^3H fue dependiente de la presencia de un grupo cetónico en carbono-9 y no se modificó en ausencia de la doble ligadura 5,6-cis; es decir, debe hablarse estrictamente de un receptor para PGE. Sin embargo, existe en el SNC suficiente información como para sostener que son las PGs dienoicas, producidas a partir del ácido araquidónico, las que se sintetizan en forma casi exclusiva (Westfall, 1977); por lo tanto, el presunto ligando endó

geno de los sitios específicos pineales detectados es probablemente la PGE₂. En el caso del "binding" de PGF_{2α}-³H en glándula pineal, éste requirió un hidroxilo en la posición α del carbono 9 y por lo tanto la actividad de las PGE₁ y PGE₂ fue despreciable.

Analizados en conjunto, los resultados de la sección III.1.2 indican que existen receptores celulares para las PGs en los pinealocitos y constituyen la primera demostración de sitios específicos de unión para las PGs en región alguna del SNC.

Como se analizó en la Introducción (sección I.2.2), las PGs ejercen efectos pre y postsinápticos sobre la unión neuroefectora autonómica. Estos efectos son en general inhibitorios sobre la presinapsis y estimulatorios sobre la postsinapsis. La siguiente serie de experimentos tuvo como objetivo obtener información sobre tales fenómenos en la glándula pineal.

En los experimentos in vivo se recurrió a la inyección de un inhibidor de la síntesis de PGs, la indometacina, dado que los efectos de las PGs inyectadas por vía sistémica son efímeros (unos pocos minutos) (Blackwell y col., 1975 a; Blackwell y col., 1975 b) y, por lo tanto, pasibles de no detección en situaciones fisiológicas que requieren de la persistencia de la PG asociada a su sitio receptor.

Desde el descubrimiento, en 1971, que la indometacina inhibe la síntesis de PGs (Ferreira y col., 1971), se ha acumulado abundante información experimental sobre la inhibición de la PG-sintetasa por drogas antiinflamatorias no esteroideas (por ej., indometacina, ácido mefenámico). El prototipo de este grupo es la indo-

metacina y ha sido ampliamente usada para elucidar el papel de las PGs en diversos procesos fisiológicos y patológicos (Flower, 1974; Vane, 1978). En los presentes experimentos in vivo se administró indometacina a ratas en dosis que producen una inhibición completa de la síntesis de PGs (Vane, 1976; Flower, 1978). Tal tratamiento fue realizado en dos situaciones experimentales: a) durante el día, para evaluar los cambios en enzimas vinculadas a la degradación de la NE, como la MAO y COMT; b) previamente al comienzo del período de oscuridad, momento en que se desencadenan los fenómenos metabólicos que conducen a un aumento de 20 a 30 veces en la biosíntesis de melatonina pineal.

Luego de la inyección de indometacina se observaron cambios en parámetros pineales presinápticos (aumento en la actividad de MAO tipo A) y postsinápticos (como la depresión de las actividades de SNAT, HIOMT y MAO tipo B y la concentración de melatonina glandular). Estos efectos pueden depender de una acción pineal de la droga o de su actividad sobre cualquiera de las etapas de la vía neuronal descrita en las Fig. 4 y 6. Asimismo, la indometacina podría, teóricamente, afectar la liberación de ciertas hormonas, siendo estas últimas las responsables de los cambios observados.

Suponiendo que el sitio primario de acción de la indometacina sea pineal, el efecto observado podría resultar de una acción sobre la pre o postsinapsis, o sobre ambos sectores. Por ejemplo, la inhibición por indometacina de la síntesis de melatonina en el pinealocito puede ser consecuencia exclusiva de una liberación disminuida de NE por aumento de la MAO tipo A intraneuronal o alternatively el resultado de la supresión de una señal moduladora trans-

sináptica (por ej. PGs) originada en la postsinapsis como consecuencia de la interacción de la NE con su receptor.

Varios son los mecanismos bioquímicos que explicarían los efectos de la indometacina sobre la glándula pineal. En primer lugar, si se considera que los efectos de esta droga están limitados a la inhibición de la síntesis de las PGs, los resultados descritos en la sección III.1.3 sugieren que la pre y/o postsinapsis son posibles sitios de acción de las PGs liberadas en la glándula pineal por acción del neurotransmisor. Sin embargo, y como se ha señalado en la Introducción (pág 41), la indometacina en concentraciones submicromolares modifica diversas enzimas, tales como fosfolipasa, fosfodiesterasa y quinasa de proteínas dependiente de AMP_c (Flower, 1974; Kantor y Hampton, 1978). Por lo tanto, un segundo mecanismo de acción posible de la indometacina consiste en efectos de la misma sobre sistemas enzimáticos no vinculados a las PGs.

Una tercera posibilidad es que la indometacina, como consecuencia de su similitud estructural con la melatonina (Fig. 23), interfiera en la unión de la misma a sus sitios receptores específicos en la glándula pineal y modifique el mecanismo de retroalimentación sugerido por los resultados de este trabajo y los resumidos en la Tabla I (Freire y Cardinali, 1975).

Resultados previos (Vecsa y Cardinali, datos no publicados), no apoyan tal posibilidad, ya que la indometacina no fue un competidor efectivo de la asociación de melatonina a sitios de unión en membranas pineales.

Un hecho que merece ser destacado es que a pesar de haberse usado una dosis de indometacina que inhiba completamente a la PG-

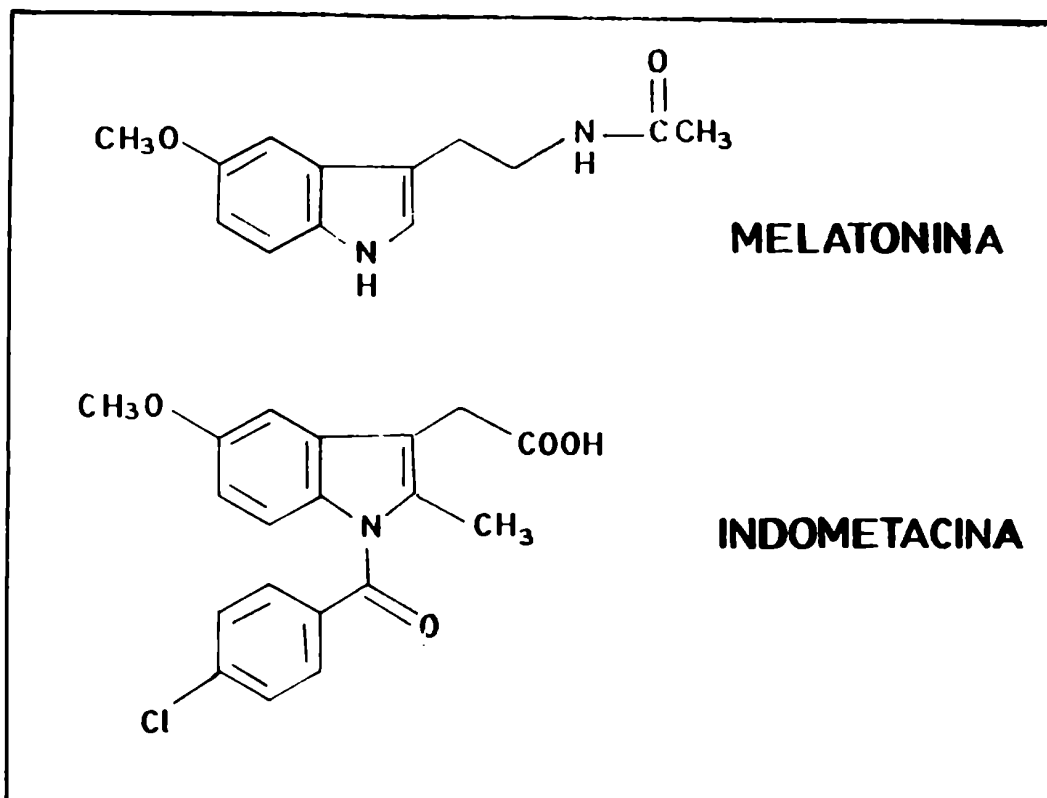


Fig. 23: Fórmulas estructurales de la melatonina y la indometacina

sinetasa (Vane, 1976; Flower, 1978), la síntesis de melatonina sólo resultó parcialmente afectada. Esta observación sugiere que otros mecanismos alternativos, en los que no participan las PGs, median la activación inducida por NE de la síntesis de melatonina pineal, hecho corroborado en experimentos posteriores de esta Tesis (sección III.1.6) en los que concentraciones supramáximas de indometacina, ácido acetilsalicílico o ácido mefenámico sólo inhiben parcialmente el efecto estimulador de NE sobre la liberación de melatonina.

La demostración definitiva del efecto de las PGs en la glándula pineal implica necesariamente el examen de tales fenómenos in vitro y en las concentraciones efectivas para la saturación de los sitios receptores previamente descritos. Tal fue el objetivo de los experimentos cuyos resultados se resumen en la sección III.1.4. Se utilizó como preparación experimental el cultivo organotípico de glándula pineal de rata, el que ha sido empleado en éste y otros laboratorios con objetivos tan diversos como la elucidación de la síntesis de melatonina (Klein, 1978), el estudio de la potencialidad fotorreceptora glandular (Cardinali y col., 1973 a) o la regulación de la translocación de receptores estrofilicos del compartimiento citoplasmático al nuclear (Cardinali, 1977). En los presentes experimentos la incubación con PGE_2 aumentó la actividad de SNAT de la glándula pineal de rata in vitro a partir de concentraciones 1 nM. Tal efecto presentó una curva en campana con rango efectivo entre 10^{-9} y 10^{-6} M y máximo en 10^{-7} M (Fig. 16). Esta observación sobre la actividad enzimática se vió corroborada por experimentos adicionales en los que el producto final melatonina fue de-

terminado en el medio de incubación (Tabla 10). También en este caso PGE_2 (10^{-9} - 10^{-6}M) modificó el parámetro estudiado; sin embargo, no se observó el efecto en campana detectable en la actividad SNAT.

Por lo tanto, nuestros resultados demuestran en conjunto un efecto de PGE_2 sobre la síntesis de melatonina pineal en la concentración del K_d de los receptores, compatible con los resultados obtenidos luego de inyectar indometacina in vivo o de agregar indometacina, ácido acetilsalicílico o ácido mefenámico in vitro.

Un hecho de interés en el presente trabajo es la carencia relativa de efectos de la PGE_1 sobre la SNAT en relación a la PGE_2 . Como lo indican los resultados de la sección III.1.2, ambas PGs se asocian a un sitio de unión común con igual afinidad aparente. Sin embargo, desde el punto de vista del efecto biológico, la presencia de la doble ligadura 5,6-cis otorga una actividad 10^3 veces mayor a la PGE_2 . Esta diferencia puede depender de distintos factores, entre ellos una distinta velocidad de inactivación por las enzimas degradantes in vivo.

Como ya se ha señalado, el efecto de PGE_2 sobre la actividad de SNAT fue significativamente mayor en glándulas pineales desnervadas por gangliectomía cervical superior. Esta observación indica que el efecto estimulador de las PGs sobre la unión neuroefectora pineal no requiere un componente presináptico y es por lo tanto predominantemente postsináptico. La potenciación del efecto de la PGE_2 por la gangliectomía cervical superior a todas las dosis estudiadas demuestra que el desarrollo de supersensibilidad que sigue a la desnervación no está restringido exclusivamente a los mecanismos mediados por re

ceptores β -adrenérgicos.

Nuestros resultados están en concordancia con experimentos previos en que se utilizó toxina colérica para activar a la adenilci-clasa mediante un mecanismo independiente del receptor β -adrenérgico (Zatz, 1977). En dichos experimentos la toxina colérica produjo un incremento mayor de la actividad de SNAT en glándulas pineales en las cuales se había desarrollado supersensibilidad.

Es asimismo de interés comparar la supersensibilidad a PGE_2 observada en nuestros experimentos con la descrita para el receptor β -adrenérgico por Deguchi y Axelrod (1973). Estos autores observaron que glándulas pineales intactas cultivadas en presencia de NE presentaron el incremento máximo en actividad de SNAT a una concentración de 10 μM , mientras que en las glándulas pineales desnervadas tal máximo se detectó a una concentración unas 200 veces inferior (20 nM). A diferencia de lo observado en la Fig. 17, o de lo descrito para la toxina colérica (Zatz, 1977), la máxima actividad SNAT inducida por NE en pineales intactas o desnervadas fue la misma. Tales observaciones indican la singularidad de la vía metabólica de activación de la SNAT en que participan las PGs, en comparación a la mediada por el sistema receptor β -adrenérgico-adenilciclasa. Una prueba adicional de que ambas vías pueden ser independientes lo constituye la inhibición parcial del efecto de NE sobre la liberación de melatonina en presencia de concentraciones supremáximas (para inhibir la síntesis de PGs) de indometacina, ácido acetilsalicílico o ácido mefenámico. (Tabla 11).

Si bien, como los resultados en animales gangliectomizados lo demuestran, el efecto estimulador de la PGE_2 sobre la síntesis de

melatonina pineal es ejercido a nivel postsináptico, la PGE_2 actúa también a nivel presináptico. Tal efecto, inhibitorio de la liberación de NE, está demostrado por los experimentos de la Tabla 12, donde 100 nM de PGE_2 deprimió en un 49% la liberación de NE inducida por un estímulo despolarizante de K^+ . De predominar este efecto presináptico, el resultado final sería una inhibición de la síntesis de melatonina, ya que tal síntesis es estimulada por el neurotransmisor. Sin embargo, 10^{-8} M de PGE_2 , una concentración que ya ejerce el efecto estimulatorio de la producción de melatonina, carece de actividad sobre la liberación de NE por los terminales adrenérgicos. Esta observación está en concordancia con los resultados obtenidos in vivo luego de inyectar indometacina y avala la conclusión que de los dos efectos contrapuestos de las PGs en la unión neuroefectora pineal (inhibición presináptica de la liberación de NE; mediación postsináptica del efecto estimulatorio del neurotransmisor) éste último es el que predomina.

Como fue analizado en la Introducción (sección I.2.2) aún no se han aclarado los mecanismos moleculares a través de los cuales las PGs actúan en el SNC. Tales agentes participan aparentemente en la regulación del sistema adenilciclase- AMP_c , ya sea directamente a través de un receptor vinculado a la activación de la enzima (Wolfe y Coceani, 1979) o indirectamente modificando la liberación del neurotransmisor (Westfall, 1977).

En nuestra preparación de glándula pineal de rata in vitro la PGE_2 determinó un incremento del contenido pineal de AMP_c a partir de una concentración de 10 nM. Ya que existe un vínculo demostrado

entre el sistema adenilciclase- AMP_c y la inducción de SNAT (Klein y Weller, 1970; Weisa y Crayton, 1970; Deguchi, 1973; Davis, 1978) es posible que los resultados obtenidos luego del agregado de PGE_2 al medio (aumento de la acumulación de AMP_c y de actividad SNAT de glándula pineal in vitro) estén causalmente relacionados. Como en el caso de la actividad SNAT, también en el efecto sobre el AMP_c se observó una disociación entre la actividad de la PGE_2 y de la PGE_1 .

En 1968, Walsh y col. demostraron que el mecanismo a través del cual el AMP_c regula el metabolismo glucolítico en el músculo liso incluye la activación de quinasas de proteínas dependientes de AMP_c . En 1970, Kuo y Greengard demostraron la presencia de dichas quinasas en prácticamente todos los tejidos de mamíferos. El AMP_c , una vez sintetizado, puede ser hidrolizado por una fosfodiesterasa a adenosina-5'-monofosfato o bien activar a la quinasa que fosfori la proteínas o enzimas afectadas a diversas funciones celulares. Estas quinasas que han sido aisladas de distintos tejidos, son tetrámeros constituidos por dos subunidades regulatorias y dos subunidades catalíticas (Rubin y Rosen, 1975; Krebs y Beavo, 1979). En una célula no estimulada ambas subunidades forman un complejo inactivo. A través de un proceso de autofosforilación (Greengard, 1978), la subunidad catalítica fosforila a la regulatoria mediante una reacción intramolecular. Al aumentar los niveles de AMP_c intracelular éste se une a la subunidad regulatoria, lo que disocia al complejo subunidad catalítica-subunidad regulatoria y la subunidad catalítica, ahora libre, es capaz de catalizar la fosforilación de protei-

nas. Con estos antecedentes se decidió explorar la unión del AMP_c a sus sitios receptores intracelulares (subunidad reguladora de la quinasa de proteínas) luego de la incubación con PGE₂. Hasta el momento no existían datos sobre las características cinéticas de la asociación de AMP_c a sitios intracelulares en la glándula pineal.

El análisis de la unión del AMP_c a fracción sobrenadante de 900 x g en glándula pineal de rata reveló la existencia de una única población de sitios con una constante de afinidad ($K_D = 34-58$ nM) del orden de la descrita para diversos tejidos (Sanborn y col., 1973; Talmadge y col., 1975; Marcus y col., 1979). Es de destacar que publicaciones recientes indican que la quinasa de proteínas presenta dos poblaciones distintas de sitios de unión para AMP_c, siendo detectable sólo una de ellas por el ensayo de filtración utilizado en el presente trabajo (Øgreid y Døskeland, 1980). Luego de la incubación con 0.05 μ M de PGE₂, el número de sitios libres disminuyó en un 37% sin modificarse el número de sitios totales. Es decir, el AMP_c sintetizado por acción de la PGE₂ in vitro se une a continuación a sus sitios receptores intracelulares para desencadenar los efectos fisiológicos que culminan con el aumento de la síntesis de melatonina. A pesar de la estimulación cercana al máximo de la síntesis de AMP_c producida por 0.05 μ M de PGE₂, persistió una fracción residual elevada de sitios libres en la subunidad reguladora de la quinasa de proteínas. Una explicación posible para este hallazgo es que una fracción importante de los sitios de unión para AMP_c permaneció en compartimientos celulares no accesibles al AMP_c recién formado. Otra posibilidad es que sólo una fracción de las células pinea

les sea sensible a las PGs. Por último, tal "binding" residual podría también deberse al intercambio del AMP_c endógeno unido con AMP_c-³H durante el período de incubación. Una observación semejante a la del presente trabajo fue publicada por Marcus y col. (1979), quienes detectaron 20-50% de sitios libres para AMP_c en células óseas en cultivo luego de estimulación supramáxima de la adenilciclasa por PGE₁ u hormona paratiroidea.

En conjunto los resultados discutidos hasta aquí y presentados en la sección III.1, indican que las PGs participan en la secuencia de fenómenos desencadenados por la interacción de la NE con receptores β -adrenérgicos en la glándula pineal. La NE libera PGE y PGF de la glándula pineal, las que se unen a receptores celulares específicos ubicados en los pinealocitos y probablemente en los terminales neurales. La PGE₂ estimula, en las concentraciones efectivas para saturar sus sitios de unión, la síntesis de AMP_c, la actividad de SNAT y la liberación de melatonina observándose concomitantemente un aumento en la ocupación de sitios receptores para AMP_c en la subunidad reguladora de la quinasa de proteínas. A una concentración 100 veces mayor que el umbral de la estimulación de la síntesis de melatonina, la PGE₂ ejerce un efecto inhibitorio sobre la liberación de NE; quizás esta actividad inhibitoria constituya una señal negativa de control que frena el sistema de producción de PGE₂ inducido por NE, una vez alcanzada cierta concentración límite de PGE₂ en la brecha sináptica.

El papel estimulatorio de las PGs en la síntesis de melatonina pineal se ve avalado in vivo por la inhibición que sigue a la administración de indometacina, un bloqueante de la síntesis de PGs,

e in vitro por la inhibición del efecto estimulador de la NE sobre la liberación de melatonina luego de la incubación en presencia de indometacina, ácido acetilsalicílico o ácido mefenámico.

La Fig. 24 es una reelaboración de la Fig. 4 y resume los mecanismos celulares que participan en la síntesis de melatonina a la luz de los hallazgos del presente trabajo de tesis.

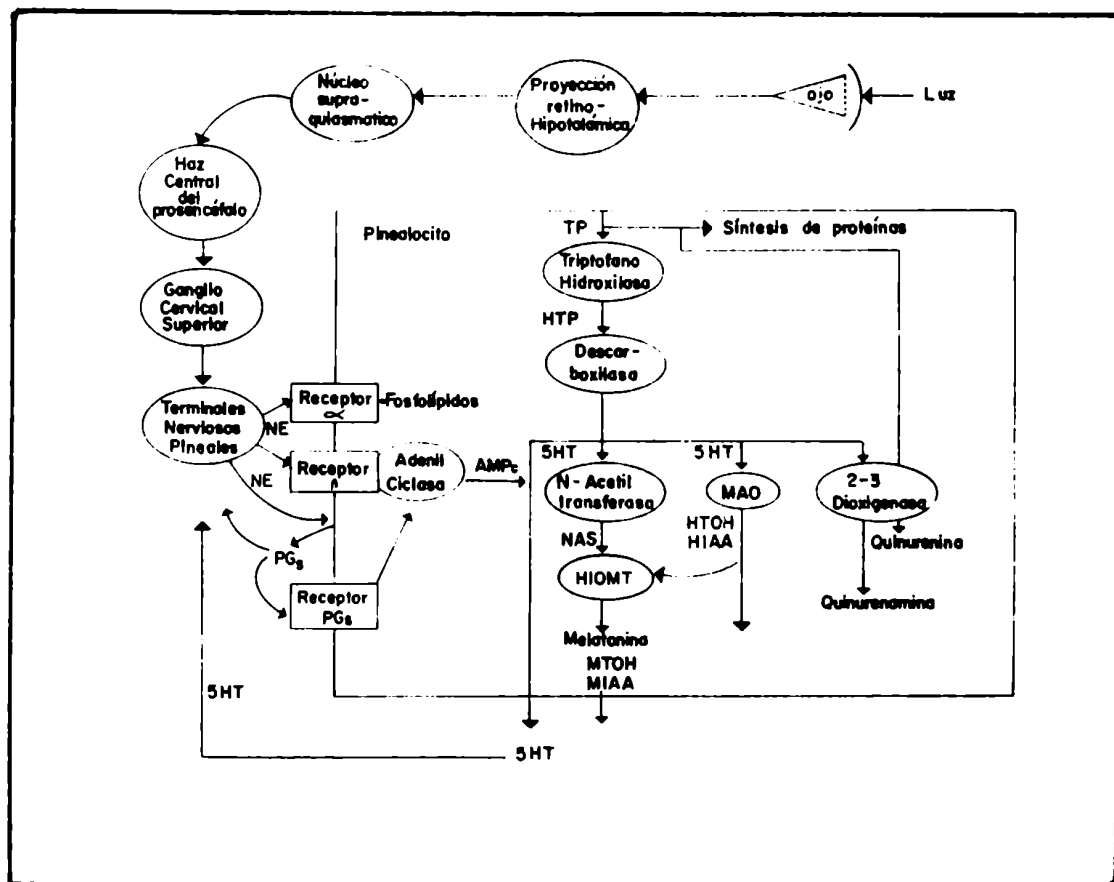


Fig. 24: Control neural de actividad pineal y mecanismos celulares que participan en la síntesis de melatonina

En la segunda parte de este trabajo de tesis se evaluó otro aspecto del vínculo entre PGs y función pineal: su participación en el mecanismo de acción de la hormona pineal melatonina.

Como se ha analizado en la Introducción (sección I.1.4), desconocemos aún el mecanismo íntimo de acción de la melatonina. Dicha hormona actúa a nivel de sitios receptores del SNC (Cardinali y col., 1978, 1979a) en particular en el hipotálamo y desencadena una serie de fenómenos que conducen a la modificación funcional del eje hipotálamo-hipofisario (Tabla 1).

En la Fig. 23 puede apreciarse la similitud estructural entre la melatonina y el inhibidor de la síntesis de PGs, indometacina. Como ya se ha expresado, tal similitud se manifiesta en la actividad inmunogénica cruzada cuando estas moléculas se acoplan a la albúmina. Así, por ejemplo, el antisuero utilizado para el radioinmunoanálisis de melatonina en el presente trabajo ha sido desarrollado mediante la inyección del complejo indometacina-albúmina (Levine y Riceberg, 1975).

Otra indicación de la posible similitud en mecanismos de acción de la melatonina e indometacina la constituye la sorprendente semejanza que presentan sus efectos neuroendócrinos. Ambas drogas inhiben la liberación de LH inducida por estrógenos (Tamerkin y col., 1976 a; Mc Cann y col., 1976; André y Parrish, 1979), la liberación postcastración de LH (Roche y col., 1970; Mc Cann y col., 1976) y el ritmo pulsátil de liberación de LH en ratas castradas (Mc Cann y col., 1976; Moguilevsky y col., 1979).

Dos son las posibles interpretaciones que pueden ofrecerse pa

re esta semejanza en los efectos neuroendócrinos de ambas sustancias:

- a) la melatonina y la indometacina inhiben en forma semejante la síntesis de PGs a nivel del eje hipotálamo-hipofisario;
- b) la indometacina es un agonista efectivo de la melatonina a nivel de los sitios receptores para la hormona en el HMB. Esta última posibilidad fue descartada por resultados previos de este Laboratorio ya que la competencia de indometacina por el "binding" de melatonina a sus sitios receptores cerebrales fue despreciable (Cardinali y col., 1979 a).

Decidimos entonces someter a verificación la primera de las hipótesis, determinando en distintas preparaciones de HMB y tejidos periféricos el efecto de la melatonina sobre la producción y fenómenos vinculados a las PGs.

En la glándula pineal y en el HMB bovinos, la melatonina inhibe la liberación de PGs E y F. En el HMB de rata, tal efecto se observó a concentraciones submicromolares de la hormona, en el orden del K_D de los sitios receptores para melatonina. Tal efecto en el HMB de rata fue observado tanto para la liberación espontánea de PGE_2 como para la inducida por NE.

En el HMB el papel de las PGs en los mecanismos que regulan la liberación de gonadotrofinas ha sido ampliamente documentado (Labrie y col., 1976; Mc Cann y col., 1976; Ojeda y col., 1979 a). Las observaciones iniciales fueron realizadas por Armstrong y Greenwich (1972); Orczyk y Behrman (1972) y Tsafiriri y col. (1972) quienes demostraron que el bloqueo de la ovulación por la administración

de indometacina, era revertido por el tratamiento con LH o PGs. Asimismo, Behrman y col. (1972) demostraron que el LHRH también revertía el bloqueo de la ovulación por la administración de indometacina en el día del proestro. La observación que la inyección intraventricular (pero no intrahipofisaria) de PGE_2 determina un aumento en los niveles circulantes de LH en ratas ovariectomizadas, sugirió que el principal sitio de acción de las PGs para estimular la liberación de LH era el SNC (Harms y col., 1974). Esta hipótesis se comprobó en animales en diversas situaciones hormonales (ratas intactas castradas de ambos sexos, ratas hembra prepúberes y ratas castradas tratadas con estrógenos) en los que también se demostró liberación de LH luego de la inyección intraventricular de PGE_2 (Ojeda y col., 1979a).

En experimentos in vitro Ojeda y col. (1979b) comprobaron que dopamina y NE estimulan la liberación de LHRH por HMB. Tal efecto no se observó en el caso de agregar indometacina al medio de incubación, mientras que el agregado de PGE_2 produjo la liberación de LHRH. Este efecto estimulador de PGE_2 sobre la liberación de LHRH es aparentemente ejercido sobre las neuronas productoras de LHRH y no sobre las aferencias catecolaminérgicas, ya que distintos bloqueantes adrenérgicos no modificaron la liberación de LH inducida por la inyección intraventricular de PGs (Mc Cann y col., 1976; Ojeda y Mc Cann, 1978). Como en nuestros experimentos la melatonina inhibió en bajas concentraciones la liberación de PGE_2 producida por NE en explantos de HMB, y en vista de los resultados discutidos precedentemente sobre el papel de PGE_2 como intermediario en el me-

canismo por el cual NE libera LHRH en el HMB, se propone como hipótesis que el conocido efecto antigonal central de la melatonina (Tabla 1) depende de una inhibición de la síntesis de PGs a nivel hipotalámico. Datos previos de este Laboratorio (Cardinali y col., 1975 a) indican que la melatonina aumenta la liberación de varios neurotransmisores, entre ellos NE, en terminales simpáticos aislados de hipotálamo de rata. Este efecto puede depender también de una inhibición de la síntesis de PGE_2 , ya que como se ha analizado en detalle en la Introducción (sección I.2.3), y se demuestra en los experimentos de la Tabla 12), las PGs de la serie E constituyen una señal transináptica negativa para la liberación de NE a nivel de diversas sinapsis adrenérgicas. Por lo tanto, las consecuencias de la inhibición de la síntesis de PGE_2 a nivel del HMB producidas por la melatonina son complejas e implicarían tanto un aumento en la liberación de NE como el bloqueo del efecto de este transmisor a nivel de la neurona productora de LHRH (Fig. 9 y 25).

Otra zona del SNC donde se evaluó el posible efecto de la melatonina sobre la síntesis de PGs fue la glándula pineal. 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 pineales (Ebels y Prop, 1965), modifica los niveles de serotonina pineal (Fiske y Huppert, 1968) y produce cambios ultraestructurales en la glándula pineal de varias especies (Freire y Cardinali, 1975; El-Domeiri y Das Gupta, 1976; Benson y Krasovich, 1977).

Recientemente se ha descrito en este Laboratorio la existencia de sitios receptores para la melatonina en la glándula pineal

bovina (Vacas y Cardinali, 1980). Los resultados de la sección III. 1.1 indican que la melatonina afecta, en altas concentraciones (1 mM), la síntesis de PGs en pineales bovinas. Si bien estas concentraciones son farmacológicas, debe destacarse que es de esperar en el sitio de producción una concentración de hormona mucho mayor que en los tejidos efectores centrales y periféricos. En conjunto los resultados previos y las presentes observaciones sugieren que la melatonina puede controlar a través de un mecanismo de retroalimentación su propia síntesis en la glándula pineal. A semejanza de lo que ocurre en el aparato neuroendócrino, la melatonina inhibió también dos efectos vinculados a la síntesis de PGs en tejidos periféricos, como la motilidad uterina y la agregación plaquetaria.

En conjunto, los resultados de la sección III.2 avalan la hipótesis que la inhibición de la síntesis de PGs es el mecanismo común que media los efectos de la indometacina y melatonina en diversas preparaciones celulares. Esta observación es particularmente relevante en el SNC, sitio primario de acción de la melatonina para modificar diversos fenómenos neurales y neuroendócrinos (Tablas 1 y 2). En concentraciones compatibles con el K_D de los sitios receptores específicos para melatonina descritos en el SNC (Cardinali y col., 1978, 1979 a; Vacas y Cardinali, 1979), la melatonina inhibe la síntesis de PGE_2 . A través de los efectos pre y postsinápticos de esta inhibición pueden explicarse varias de las secuelas neuroendócrinas que siguen a la inyección de la hormona pineal (Fig. 25).

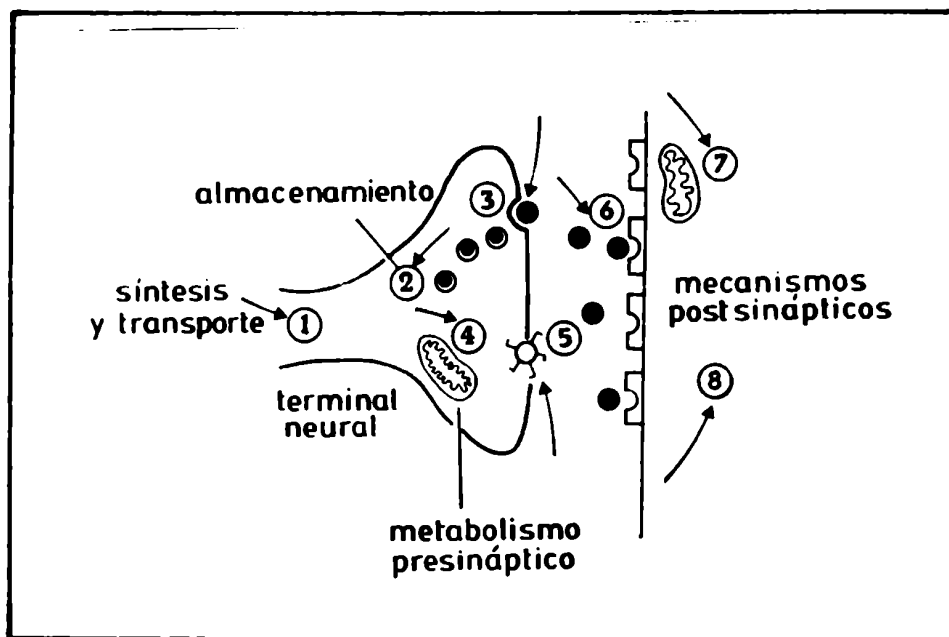


Fig. 25: Posibles sitios de acción de la melatonina en neuronas del SNC

La melatonina puede afectar la síntesis y transporte de sustancias a lo largo del axón (1), el almacenamiento (2) y liberación excitotóxica del transmisor (3), su metabolismo presináptico (4), su recaptación neuronal (5), la interacción con el receptor (6), el metabolismo postsináptico del transmisor (7) y, por último, los fenómenos intracelulares desencadenados por el neurotransmisor en la postsinapsis (8).

V. CONCLUSIONES

1. Las PGs participan en la secuencia de fenómenos metabólicos que vincula a la NE liberada de los terminales neurales con la síntesis de la hormona pineal melatonina porque:
 - NE libera PGE y PGF de explantos pineales bovinos.
 - existen sitios receptores para PGE y $PGF_{2\alpha}$ en fracciones libres de núcleos de homogenatos pineales bovinos.
 - el bloqueo de la síntesis de PGs in vivo por inyección de indometacina inhibe la activación de la síntesis de melatonina durante la fase de oscuridad del ciclo diario en la rata.
 - el bloqueo de la síntesis de PGs in vitro por incubaciones con concentraciones supramáximas de indometacina, ácido acetil salicílico o ácido mefenámico inhibe la estimulación por NE de la liberación de melatonina pineal.
 - el agregado de PGE_2 al medio de incubación y en concentraciones fisiológicas aumenta la síntesis de AMP_c , la ocupación de la subunidad reguladora de la quinasa de proteínas dependiente de AMP_c , la actividad de SNAT y la liberación de melatonina por la glándula pineal.
 - el agregado de PGE_2 en concentración 100 veces mayor que el umbral para estimular la síntesis de melatonina produce inhibición de la liberación de NE de los terminales adrenérgicos pineales.
2. Las PGs participan en el mecanismo de acción de la hormona pineal melatonina en tejidos efectores porque:

- la melatonina, en concentraciones farmacológicas, inhibe la liberación espontánea de PGE y PGF en HMB y glándula pineal bovinas.
- la melatonina inhibe, en concentraciones fisiológicas, la liberación espontánea de PGE₂ en HMB de rata.
- la melatonina inhibe, en concentraciones fisiológicas, la liberación de PGE₂ inducida por NE en el HMB de rata.
- la melatonina inhibe los efectos fisiológicos atribuidos a las PGs en dos preparaciones utilizadas para evaluar la síntesis de PGs (motilidad uterina y agregación plaquetaria).

PC y .

Muhilte

VI.REFERENCIAS

- Ahlquist R.P. (1948). A study of the adrenotropic receptors. Am. J. Physiol., 153: 586.
- Alonso R., Prieto L., Hernández C. y Mas M. (1978). Antiandrogenic effects of pineal gland and melatonin in castrated and intact pre-puberal male rats. J. Endocr., 79: 77.
- Alphas L., Heller A. y Lovenberg W. (1980). Adrenergic regulation of the reduction in acetyl coenzyme A: arylamine-N-acetyl-transferase activity in the rat pineal. J. Neurochem., 34: 83.
- André J.S. y Parrish J. (1979). Inhibition of estrous ciclicity in golden hamsters by melatonin administration on the day of proestrus. J. Exp. Zool., 207: 61.
- Anton-Tay F. (1971). Pineal brain relationships. En: The Pineal Gland. G.E.W. Wolstenholme, J. Knight (ed), Churchill, Londres, p. 213.
- Anton-Tay F. (1974). Melatonin: effects on brain function. Adv. Biochem. Psychopharmacol., 11: 315.
- Anton-Tay F., Chou C., Anton S. y Wurtman R.J. (1968). Brain serotonin concentration: elevation following intraperitoneal administration of melatonin. Science, 162: 277.
- Anton-Tay F. y Wurtman R.J. (1969). Regional uptake of ³H-melatonin from blood or cerebrospinal fluid by rat brain. Nature, 221: 474.
- Arendt J. (1978). Melatonin assays in body fluids. J. Neural Transm., suppl. 13: 265.
- Arendt J., Wetterberg L., Heyden T. Sizonenko P.C. y Paunier L. (1977). Radioimmunoassay of melatonin: human serum and cerebrospinal

- nal fluid. J. Neural Transm., supl. 13: 265.
- Armstrong D. y Grinwich D. (1972). Blockade of spontaneous and LH induced ovulation in rats by indomethacin, an inhibitor of prostaglandin biosynthesis. Prostaglandins, 1: 21.
 - Aubert Ch., Janiaud P. y Lecalvez J. (1980). Effect of pinealectomy and melatonin on mammary tumor growth in Sprague-Dawley rats under different conditions of lighting. J. Neural Transm., 47: 121.
 - Avanzino G. L., Bradley P. y Wolstencroft J. (1966). Actions of prostaglandins E₁, E₂ y F_{2α} on brain stem neurones. Br. J. Pharmacol., 27 : 157.
 - Axelrod J. y Weissbach H. (1960). Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. Science, 131: 1312.
 - Bailey C., Atkins T. y Matty A. (1974). Melatonin inhibition of insulin secretion in the rat and mouse. Hormone Res., 5: 21.
 - Baldessarini R. y Fischer J. (1978). Trace amines and alternative neurotransmitters in the central nervous system. Biochem. Pharmacol., 27: 621.
 - Banerjee S., Ken V., Winston M., Kelleher J. y Margulis L. (1972). Melatonin: inhibitor of microtubule-based oral morphogenesis in Stentor-coeruleus. J. Protozol., 19: 108.
 - Banerjee S. y Margulis L. (1973). Mitotic arrest by melatonin. Exp. Cell. Res., 78: 314.
 - Behrman H., Orcyk G. y Greep R. (1972). Effect of synthetic gonadotropin-releasing hormone (Gn-RH) on ovulation blockade by aspirin

- and indomethacin. Prostaglandins, 4: 245.
- Bennet J.P. y Snyder S.H. (1975). Stereospecific binding of D-lysergic acid diethylamide (LSD) to brain membranes: relationships to serotonin receptors. Brain Res., 94: 507.
 - Benson B. y Krasovich M. (1977). Circadian rhythms in the numbers of granulated vesicles in mouse pinealocytes. Anat. Rec., 187: 536.
 - Bergström S., Danielsson H., Klenberg D. y Samuelsson B. (1964). The enzymatic conversion of essential fatty acids into prostaglandins. J. Biol. Chem., 239: PC 4006.
 - Bergström S., Ryhage R., Samuelsson B. y Sjövall J. (1963). The structure of prostaglandin E₁, F_{1α} and F_{1β}. J. Biol. Chem., 238: 3555.
 - Bergström S. y Sjövall J. (1957). The isolation of prostaglandins. Acta Chem. Scand., 11: 1086.
 - Bergström S., Farnabo L. y Fuxe K. (1973). Effect of prostaglandin E₂ on central and peripheral catecholamine neurones. Eur. J. Pharmacol., 21: 362.
 - Berndtson W.E. y Desjardins C. (1974). Circulating LH y FSH levels and testicular function in hamsters during light deprivation and subsequent photoperiodic stimulation. Endocrinology, 95: 195.
 - Blackwell G.J., Flower R.J., Parson M. y Vane J. (1975 b). Factors influencing the turnover of PG. Brit. J. Pharmacol., 53: 467.
 - Blackwell G.J., Flower R.J. y Vane J.R. (1975 a). Rapid reduction of PG-15-hydroxygenase activity in rat tissues after treatment

- with protein synthesis inhibitors. Brit. J. Pharmacol., 55: 233.
- Blask D.E. y Nodelman J.L. (1980). An interaction between the pineal gland and olfactory deprivation in potentiating the effects of melatonin on the gonads, accessory sex organs, and prolactin in male rats. J. Neurosci. Res., 5: 129.
 - Blask D.E., Nodelman J.L., Leadem C.A., Richardson B.A. (1980). Influence of exogenously administered melatonin on the reproductive system and prolactin levels in underfed male rats. Biol. Reprod., 22: 507.
 - Borda E., Agostini M., Sterin-Borda L., Gimeno M. y Gimeno A. (1981). Inhibitory effects of some catecholamines on contractions of uterine strips isolated from estrous and spayed rats. Influence of endogenous and exogenous prostaglandins on the action of methoxamine. Europ. J. Pharmacol., 69: 55.
 - Borgeat P. y Samuelsson B. (1979). Metabolism of arachidonic acid in polymorphonuclear leukocytes. Structural analysis of novel hydroxylated compounds. J. Biol. Chem., 254: 7865.
 - Bradley P.B., Samuels G.M. and Shaw J.E. (1969). Correlation of prostaglandins release from the cerebral cortex of cats with the electrocorticogram, following stimulation of the reticular formation. Brit. J. Pharmacol., 37: 151.
 - Breilowsky S. (1976). Effects of melatonin on the photosensitive epilepsy of the baboon, Papio papio. Electroencephal. Clin. Neurophysiol., 41: 314.
 - Brammer G.L., Morley J.E., Geller E., Yurvilier A. y Hersham J.M.

- (1979). Hypothalamus-pituitary-thyroid axis interactions with pineal gland in the rat. Amer. J. Physiol., 236: E 416.
- Brown D.A., Albano J., Ekins R., Sgherzi A. y Tampion W. (1971). A simple and sensitive saturation assay method for the measurement of adenosine-3',5'-cyclic monophosphate. Biochem. J., 121: 561.
 - Brownstein M.J. y Axelrod J. (1974). Pineal gland: a 24-hour rhythm in norepinephrine turnover. Science, 184: 163.
 - Bubenik G.A., Brown G.H. y Grotta L.J. (1976). Differential localization of N-acetylated indolealkylamines in CNS and the Harderian gland using immunohistology. Brain Res., 118: 417.
 - Bubenik G.A., Purtil R.A., Brown G.M. y Grotta L.J. (1978). Melatonin in the retina and the Harderian gland. Ontogeny, diurnal variations and melatonin treatment. Exp. Eye Res., 27: 323.
 - Burns J.K. (1973). Serum sodium and potassium and blood glucose levels in cynomolgus monkeys after administration of melatonin. J. Physiol., 232: 84 P.
 - Cady P. y Dillman R.O. (1971). Influence of catechol and indole amines upon pineal uptake of thyroxine. Neuroendocrinology, 8: 228.
 - Cardinali D.P. (1974). Melatonin and the endocrine role of the pineal organ. Curr. Top. Exp. Endocr., 2: 107.
 - Cardinali D.P. (1975). Changes in hypothalamic neurotransmitter uptake following pinealectomy, superior cervical ganglionectomy or melatonin administration to rats. Neuroendocrinology, 19: 91.
 - Cardinali D.P. (1977). Nuclear receptor-estrogen complex in the pineal gland. Modulation by sympathetic nerves. Neuroendocrinology,

24, 333.

- Cardinali D.P. (1981). Melatonin. A mammalian pineal hormone. Endocrine Rev. (en prensa).
- Cardinali D.P., Faigón M.R., Scachi P. y Moguilevsky J. (1979 b). Failure of melatonin to increase plasma prolactin levels in ovariectomized rats subjected to superior cervical ganglionectomy or pinealectomy. J. Endocrinol., 82: 315.
- 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.
- Cardinali D.P., Freire F., Nagle C.A. y Rosner J.M. (1975 b). Effects of environmental lighting, superior cervical ganglionectomy and adrenergic drugs on microtubule proteins levels of the rat hypothalamus. Neuroendocrinology, 19: 44.
- Cardinali D.P., Hyyppä M.T. y Wurtman R.J. (1973 a). Fate of intracisternally injected melatonin in the rat brain. Neuroendocrinology, 12: 30.
- Cardinali D.P., Lynch H.J. y Wurtman R.J. (1972). Binding of melatonin to human and rat plasma proteins. Endocrinology, 91: 1213.
- Cardinali D.P., Nagle C.A., Denari J.H., Bedes G.D.P., Rosner J.M. (1973 b). Lack of effects of light on the rat pineal in organ culture. Gen. Comp. Endocr., 21: 573.
- Cardinali D.P., Nagle C.A., Freire F. y Rosner J.M. (1975 a). Effects of melatonin on neurotransmitter uptake and release by

- synaptosome-rich homogenates of the rat hypothalamus. Neuroendocrinology, 18: 72.
- Cardinali D.P., Nagle C.A. y Rosner J.M. (1974 b). Effects of pinealectomy, superior cervical sympathectomy and melatonin administration on the uptake of estradiol by the rat neurohypophysis. Acta Physiol. Latinoamer., 24: 89.
 - Cardinali D.P., Nagle C.A. y Rosner J.M. (1974 a). Incorporation of ³H-leucine into proteins in the hypothalamus and the anterior hypophysis. Effects of pinealectomy, superior cervical ganglionectomy and continuous exposure to light and darkness. Neuroendocrinology, 16: 74.
 - Cardinali D.P., Nagle C., Gómez E. y Rosner J.M. (1975 c). Norepinephrine turnover in the pineal gland. Acceleration by estradiol and testosterone. Life Sci., 16: 1717.
 - Cardinali D.P. y Rosner J.M. (1971). Metabolism of serotonin by the rat retina in vitro. J. Neurochem., 18: 1769.
 - Cardinali D.P., Vacas M.I. y Estevez Boyer E. (1978). High affinity binding of melatonin in bovine medial basal hypothalamus. IRCS Med. Sci., 6: 357.
 - Cardinali D.P., Vacas M.I. y Estevez Boyer E. (1979 a). Specific binding of melatonin in bovine brain. Endocrinology, 103: 437.
 - Cardinali D.P. y Wurtman R.J. (1972). Hydroxyindole-O-methyltransferase in rat pineal, retina and Harderian gland. Endocrinology, 91: 247.
 - Cardinali D.P. y Wurtman R.J. (1975). Control of melatonin synthesis in the pineal organ. En: Frontiers in Pineal Physiology. M.D.

- Altschule (ed). The MIT Press, Cambridge, Mass, p. 12.
- Clegg P.C. (1966). The effect of prostaglandins on the response of isolated smooth muscle preparation of sympathomimetic substances. En: Endogenous substances affecting the myometrium. V. Pickles y R. Fitzpatrick (eds), p. 122.
 - Coceani F., Puglisi L. and Laversa B. (1971). Prostaglandins and neuronal activity in spinal cord and cuneate nucleus. Am. N.Y. Acad. Sci., 180: 289.
 - Coceani F. and Wolfe L.S. (1965). Prostaglandins in brain and the release of prostaglandin-like compounds from the cat cerebellar cortex. Can. J. Physiol., Pharmacol., 43: 445.
 - Collu R., Fraschini F. y Martini L. (1971). The effect of pineal methoxyindoles on rat vaginal opening time. J. Endocrinol., 50: 679.
 - 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. A. Lajtha (ed). Plenum Press, New York, p. 45.
 - Coyle J.T. y Axelrod J. (1972). Dopamine- β -hydroxylase in the rat brain: developmental characteristic. J. Neuropharmacol., 19: 449.
 - Csapo A., Csapo E., Fay E., Henze M. y Salau G. (1973). The delay of spontaneous labor by naproxen in the rat model. Prostaglandins, 3: 827.
 - Davis G.A. (1978). The response of adenosine-3',5'-monophosphate

- to norepinephrine in the hypothalamus and pineal organ of female rats in proestrus or diestrus. Endocrinology, 103: 1048.
- Deguchi T. (1973). Role of the β -adrenergic receptor in the elevation of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and induction of serotonin-N-acetyltransferase in the rat pineal gland. Mol. Pharmacol., 9: 184.
 - 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, 51: 660.
 - Dorp D.A. Van, Beerthuis R.K., Nugteren D.H. and Vonkeman H. (1964). The biosynthesis of prostaglandins. Biochim. Biophys. Acta, 90: 204.
 - Driver P.M., Forbes J.M. y Scanes C.G. (1979). Hormones, feeding and temperature in the sheep following cerebroventricular injections of neurotransmitters and carbachol. J. Physiol., 290: 399.
 - Dufau M., Tsuruhara T., Horner K., Podestá E. y Catt J. (1977). Intermediate role of adenosine-3',5'-cycle monophosphate and protein kinase during gonadotropin-induced steroidogenesis in testicular interstitial cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74: 3419.
 - Dunham E.W. y Zimmerman B.G. (1970). Release of prostaglandin-like material from dog kidney during nerve stimulation. Am. J. Physiol., 219: 1279.
 - Ebels I. y Prop N. (1965). A study of the effect of melatonin on the gonads, the oestrous cycle and the pineal organ of the rat. Acta Endocr., 49: 567.
 - 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 melanoma. J. Surg. Oncol., 8: 197.
- Ellis L.C. (1972). Inhibition of rat testicular androgen synthesis in vitro by melatonin and serotonin. Endocrinology, 90: 17.
 - Euler U.S. Von (1934). Zur kenntnis der pharmakologischen wirkungen von nativsekreten und extrackten männlicher accessorischer geschlechtsdrüsen. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol., 175: 78.
 - Euler U.S. Von (1935). A depressor substance in the vesicular gland. J. Physiol., 84: 21 P.
 - Euler U.S. Von (1972). Synthesis, uptake and storage of catecholamines in adrenergic nerves. The effects of drugs. En: Catecholamines. Handb. Exp. Pharm. H. Blaschko y E. Muscholl (eds), p. 186.
 - Farriello R.G., Bubenik G.A., Brown G.M. y Grote L.J. (1977). Epileptogenic action of intraventricularly injected antimelatonin antibody. Neurology, 27: 567.
 - Ferreira S., Moncada S. y Vane J. (1971). Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from the spleen. Nature New Biol., 231: 237.
 - Ferreira S., Moncada S. y Vane J. (1973). Some effects of inhibiting endogenous prostaglandin formation on the responses of the cat spleen. Brit. J. Pharmacol., 47: 48.
 - Fideleff H., Aparicio N.J., Guitelman A., Debeljuk L., Mancini A. y Cramer C. (1976). Effect of melatonin on the basal and stimulated gonadotropin levels in normal men and postmenopausal women. J. Clin. Endocr. Metab., 42: 1014.

- Fiske V.M. y Huppert L.C. (1968). Melatonin action on pineal varies with photoperiod. Science, 162: 279.
- Fiske V.M. y Mac Donald G.S. (1975). Estrogen secretion and its relation to corpus luteum formation in monkeys (Macaca fascicularis) given melatonin. Fertil. Steril., 26: 609.
- Fitzgerald T.J. y Veal A. (1976). Melatonin antagonizes colchicine-induced mitotic arrest. Experientia, 32: 372.
- Flower R. (1974). Drugs which inhibit prostaglandin biosynthesis. Pharmacol. Rev., 26: 33.
- Flower R. (1978). Steroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of phospholipase A₂. En: Adv. in Prostaglandin and Thromboxane Res. R. Paoletti y B. Samuelsson (eds). Academic Press, N.Y., 3, p. 105.
- Folco G., Longiave D., Berti F., Fumagalli R. y Paoletti R. (1976). Prostaglandin E₂ and central cyclic nucleotides. Adv. in Prostaglandins and Thromboxane Res. R. Paoletti y B. Samuelsson (eds), Academic Press, N.Y., 1, p. 305.
- Frehn J.L., Urry R.L. y Ellis L.C. (1974). Effect of melatonin and short photoperiod on Δ^4 -reductase activity in the liver and hypothalamus of the hamster and the rat. J. Endocr., 60: 507.
- Freire F. y Cardinali D.P. (1975). Effects of melatonin treatment and environmental lighting on the ultrastructural appearance turnover and microtubule protein content of the rat pineal gland. J. Neural Transm., 37: 237.
- Fujita M. y Kogayashi T. (1979): Current views on the paraneurone

- concept. Trends Neurosci., 2: 27.
- Fujiwara M., Shibata M., Watanabe Y., Nukiwa T., Hirata F., Mizuno N. y Hayaishi O. (1978). Indoleamine 2,3-dioxygenase formation of L-kynurenine from L-tryptophan in cultured rabbit pineal gland. J. Biol. Chem., 253: 6081.
 - Gilmore N., Vane J.R. y Wyllie J.H. (1968). Prostaglandin release by the spleen. Nature, 218: 1135.
 - Gimeno M.F., Sterin-Speziale N., Landa A., Bonacossa A. y Gimeno A. (1979). Is the spontaneous motility of isolated rat uterus controlled by Prostaglandin E?. Prostaglandins, 17: 673.
 - Goldberg V.J. y Ramwell P.W. (1975). Role of prostaglandins in reproduction. Physiol. Rev., 55: 325.
 - Goldblatt M.W. (1933). A depressor substance in seminal fluid. J. Soc. Chem. Ind., 52: 1056.
 - Goldblatt M.W. (1935). Properties of human seminal plasma. J. Physiol., 84: 208.
 - Goldman B., Hall V., Hollister C., Roychoudhury P., Tamarkin L. y Westrom W. (1979). Effects of melatonin on the reproductive system in intact and pinealectomized male hamsters maintained under various photoperiods. Endocrinology, 104: 82.
 - Goridis C. y Neff N.H. (1972). Evidence for specific monoamine oxidases in human sympathetic nerve and pineal gland. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 140: 573.
 - Greengard P. (1978). En: Cyclic Nucleotides, phosphorylated proteins and neuronal function, 1: 41.

- Gregorek J.C., Seibel H.R. y Reiter R.J. (1977). The pineal complex and its relationships to other epithalamic structures. Acta Anat., 90: 425.
- Guchhait R.B. y Grau J.E. (1978). Biosynthesis of S-adenosyl-L-methionine in the rat pineal gland. J. Neurochem., 31: 921.
- Guldberg H. y Marsden M. (1975). Catechol-O-methyltransferase: Pharmacological aspects and Physiological role. Pharmacol. Rev., 27: 135.
- Hagelstein K.A. y Folk G.E. (1979). Effects of photoperiod, cold acclimation and melatonin on the white rat. Comp. Biochem. Physiol., 62 C: 225.
- Hamberg M., Svensson J. y Samuelsson B. (1975). Thromboxanes: A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 72: 2994-2998.
- Hamberg M., Svensson J., Wakabayashi T. y Samuelsson B. (1974). Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that cause platelet aggregation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71: 345.
- Harms P., Djeda S. y Mc Cann S. (1974). Prostaglandin induced release of pituitary gonadotropins: central nervous system and pituitary sites of action. Endocrinology, 94: 1459.
- Harney P.J., Sneddon J.M. y Williams K.I. (1974). The influence of ovarian hormones upon the motility and prostaglandin production of the pregnant rat uterus in vitro. J. Endocr., 60: 343.
- Harris R. y Ramwell P. (1979). Cellular mechanisms of prostaglandin action. Ann. Rev. Physiol., 41: 653.
- Haye B. y Jacquemin C. (1977). Incorporation of [¹⁴C] arachidonate

- in pig thyroid lipids and prostaglandins. Biochim. Biophys. Acta, 487: 231.
- Hedlund L., Lischko M.M., Rollag M.D. y Niswender G.D. (1977). Melatonin daily cycle in plasma and cerebrospinal fluid of calves. Science, 195: 686.
 - Hedqvist P. (1970 a). Studies on the effect of prostaglandins E_1 and E_2 on the sympathetic neuromuscular transmission in some animal tissues. Acta Physiol. Scand., suppl. 345: 1.
 - Hedqvist P. (1970 b). Antagonism by calcium of the inhibitory action of prostaglandin E_2 on sympathetic neurotransmission in the cat spleen. Acta Physiol. Scand., 80: 269.
 - Hedqvist P. (1974). Interaction between prostaglandins and calcium ions on noradrenaline release from the stimulated guinea pig vas deferens. Acta Physiol. Scand., 90: 153.
 - Hedqvist P. (1976). Effects of prostaglandins on autonomic neurotransmission. En: Prostaglandins: Physiological, Pharmacological and Pathological Aspects. S.M.M. Karim (ed). Baltimore University Park Press, p. 37.
 - Hirsta F., Hayaishi O., Fukuyama T. y Senoh S. (1974). In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. J. Biol. Chem., 249: 1311.
 - Hoffer B.J., Diggins G.R. and Bloom F.E. (1969). Prostaglandins E_1 and E_2 antagonize norepinephrine effects on cerebellar Purkinje cells: microelectrophoretic study. Science, 166: 1418.
 - Hoffmann K. (1979). Photoperiod, pineal melatonin and reproduction

- in hamsters. Prog. Brain Res., 52: 397.
- Hoffman R.A. y Reiter R.J. (1965). Pineal gland: influence on gonads of male hamsters. Science, 148: 1609.
 - Hollander C.S., Prasad R., Richardson S., Hirooka Y. y Suzuki S. (1977). Melatonin modulates hormonal release from organ cultures of rat hypothalamus. J. Neural Transm., supl. 13: 369.
 - Holmes S.W. y Sugden D. (1975). The effect of melatonin on pinealectomy-induced hypertension in the rat. Brit. J. Pharmacol., 56: 360 P.
 - Iversen L. (1967). The uptake and storage of noradrenaline in sympathetic nerves. Cambridge University Press, Cambridge.
 - Jaim-Etcheverry G. y Zieher L.M. (1968). Cytochemistry of 5-hydroxy tryptamine at the electron microscope level II. Localization in the autonomic nerves of the rat pineal gland. Z. Zellforsch., 86: 393.
 - Jarrot B. (1974). Methods for analyzing monoamine oxidase and catechol-O-methyltransferase in nervous tissues. En: Research Methods in Neurochemistry, vol. 2 (N. Marks y R. Rodnight, eds.). Plenum Press, N.Y., p. 377.
 - Johnston J.P. (1968). Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. Biochem. Pharmacol., 17: 1285.
 - Junstad M. y Wennmalm A. (1973). Prostaglandin mediated inhibition of noradrenaline release at different nerve impulse frequencies. Acta Physiol. Scand., 89: 544.
 - Kamberi J.A. (1973). The role of brain monoamines and pineal indo

- les in secretion of gonadotrophins and gonadotrophin-releasing factors. Prog. Brain Res., 39: 261.
- Kantor H. y Hampton M. (1978). Indomethacin in submicromolar concentrations inhibits cAMP-dependent protein kinase. Nature, 276: 841.
 - Kao L.W.L. y Weisz J. (1977). Release of gonadotrophin-releasing hormone (Gn-RH) from isolated, perfused medial basal hypothalamus by melatonin. Endocrinology, 100: 1723.
 - Kappers J.A. (1960). The development, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. Zeitschrift für zellforschung und mikroskopische anatomie, 52: 163.
 - Kappers J.A. (1965). Survey of the innervation of the epiphysis cerebri and the accessory pineal organ of vertebrates. En: Structure and function of the epiphysis cerebri. J.A. Kappers y J.P. Schade (eds.). Elsevier, Amsterdam, p. 87.
 - Kappers J.A. y Pévet P. (1979). The pineal gland of vertebrates including man, Elsevier, Amsterdam, p. 64.
 - Karim S.M.M. y Devlin J. (1967). Prostaglandin content of amniotic fluid during pregnancy and labour. J. Obstet. Gynaecol. Brit. Commonw., 74: 230.
 - Kataoka K., Ramwell P.W. y Jessup S. (1967). Prostaglandins: localization in subcellular particles of rat cerebral cortex. Science, 157: 187.
 - Kennaway D.J., Frith R.G., Phillipou G., Matthews C.D. y Seamark R.F. (1977). A specific radioimmunoassay for melatonin in biologi-

- cal tissue and its validation by gas chromatography-mass spectrometry. Endocrinology, 101: 119.
- Kimball F.A. y Wyngarden L.J. (1975). Prostaglandin specific binding in hamster myometrial low speed supernatant. Prostaglandins, 9: 413.
 - Kinson G.A. y Peat F. (1971). The influences of illumination, melatonin and pinealectomy on testicular function in the rat. Life Sci., 10: 259.
 - Kirpekar S. y Misu Y. (1967). Release of noradrenaline by splenic nerve stimulation and its dependence on calcium. J.Physiol., 199: 219.
 - Klein D.C. (1978). The pineal gland: a model of neuroendocrine regulation. En: The Hypothalamus. S.Reichelín, R.J.Baldessarini, J.B. Martin (eds.). Raven Press, N.Y., p. 303.
 - Klein D.C. y Weller J.L. (1970). Melatonin synthesis: adenosine-3',5'-monophosphate and norepinephrine stimulate N-acetyltransferase. Science, 168: 978.
 - König A. y Rega R. (1978). Effect of melatonin on the spermatogenesis of unilaterally orchidectomized puberal rats. J. Neural Transm., supl. 13: 373.
 - Kitay y Atschule (1954). The Pineal Gland. Cambridge, Mass.: Harvard University Press.
 - Kopin J.J., Pare C.M.B., Axelrod J. y Weissbach H. (1961). The fate of melatonin in animals. J. Biol. Chem., 236: 3072.
 - Kopin J.J. y Silberstein S.D. (1972). Axons of sympathetic neurons:

- transport of enzymes; in vivo and properties of axonal sprouts in vitro. Pharmacol. Rev., 24: 245.
- Koslow S.H. y Green A.R. (1973). Analysis of pineal and brain indolealkylamines by gas chromatography-mass spectrometry. Adv. Biochem. Psychopharmacol., 7: 33.
 - Koulu M. y Lammintausta R. (1979). Effect of melatonin on L-tryptophan and apomorphine-stimulated growth hormone secretion in man. J. Clin. Endocr. Met., 49: 70.
 - Kramer J. y Ben-David M. (1978). Prolactin suppression by (-) -9-tetrahydrocannabinol (THC): involvement of serotonergic and dopaminergic pathways. Endocrinology, 103: 452.
 - Krebs E. y Bravo J. (1979). Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. Ann. Rev. Biochem., 48: 923.
 - KÜderling I., Trocchi W., Dellantonio M., Spagnesi M. y Fraschini F. (1979). Investigations on seasonal rhythms and the effect of melatonin in the alpine hare (Lepus timidus timidus L.). Prog. Brain Res., 52: 417.
 - Kuehl F.A. Jr. y Humes J.L. (1972). Direct evidence for a prostaglandin receptor and its application to prostaglandin measurements. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69: 480.
 - Kurzrok R. y Lieb C.C. (1930). Biochemical studies of human semen. II - The action of semen on the human uterus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 28: 268.
 - Labrie F., Pelletier G., Borgeat P., Drouin J., Ferland L. y Belan

- ger A. (1975). Mode of action of hypothalamic regulatory hormones in the adenohypophysis. En: Frontiers of Neuroendocrinology. L. Martini, W.F. Ganong (eds). Raven Press, New York, p. 183.
- Lands W.(1979). The biosynthesis and metabolism of prostaglandins. Ann. Rev. Physiol., 41: 633.
 - Lapin V. (1979). Pineal influence on tumor. Prog. Brain Res., 52: 523.
 - Laychock S.G., Franson R.C., Weglicki W.B. y Rubin R.P. (1977). Identification and partial characterization of phospholipases in isolated adrenocortical cells. The effect of synacthen (corticotropin-(1-24)-tetracosapeptide) and calcium ions. Biochem. J., 164: 753.
 - Lemay A., Brouillette A., DenizEAU F. y LavOie M. (1979). Melatonin-stimulated and serotonin-stimulated release of vasopresin from rat neurohypophysis in vitro. Mol. Cell. Endocr., 14: 157.
 - Leonardelli J., Tramu G. y Hermand E. (1978). Melatonine et cellules a gonadoliberine (LHRH) de l'hypothalamus du rat. Compt. Rendus Soc. Biol., 172: 481.
 - Lerner A.B., Case J.D. y Heinzelman R.V. (1959). Structure of melatonin. J. Am. Chem. Soc., 81: 6084.
 - Levine L. y Riceberg L.J. (1975). Radioimmunoassay for melatonin. Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol., 10: 693.
 - Levitt M., Spector S., Sjoerdsman A. y Udenfriend S. (1955). Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea pig heart. J. Pharmacol. Exp. Ther., 148: 1.

- Logan A. y Weatherhead B. (1980). Post-tyrosinase inhibition of melanogenesis by melatonin in hair follicles in vitro. J. Invest. Dermat., 74: 47.
- Longnecker D.E. y Gallo D.G. (1971). The inhibition of PMSG-induced ovulation in immature rats by melatonin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 137: 623.
- 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.
- Lu K.H. y Mietes J. (1973). Effects of serotonin precursors and melatonin on serum prolactin release in rats. Endocrinology, 93: 152.
- Lynch G.R. y Epstein A.L. (1976). Melatonin induced changes in gonads, pelage and thermogenic characters in the white-footed mouse, Peromucous leucopus. Comp. Biochem. Physiol., 53 C: 67.
- Maclouf J., Andriew J. y Oway F. (1975). Validity of PGE radioimmunoassay by using PGE antisera with differential binding parameters. FEBS Lett., 56: 273.
- Malawista S.E. (1973). The effects of colchicine and of cytochalasin B on the hormone-induced movement of melanin granules in frog dermal melanocytes. En: Endocrinology. R. Sow, F. Ebling, I. Henderson (eds.), Amsterdam, p. 288.
- Marcus R., Aversen G. y Ovner F. (1979). Fluctuation of adenosine-3',5'-monophosphate-binding site occupancy as an index of hormone-dependent adenosine-3',5'-monophosphate formation in bone cells. Endocrinology, 104: 744.

- Martin J.E., Engel J.N. y Klein D.C. (1977). Inhibition of the in vitro pituitary response to luteinizing hormone-releasing hormone by melatonin, serotonin and 5-hydroxytryptamine. Endocrinology, 100: 675.
- Mas M., Massa R., Montagna A., Negri-Cesi P. y Martini L. (1979). Role of the pineal gland in the control of gonadotropins and androgen-reducing enzymes in the rat. Prog. Brain Res., 52: 367.
- Matsushima S. y Reiter R.J. (1977). Fine structural features of adrenergic nerve fibers and endings in the pineal gland of the rats, ground squirrel and chinchilla. Am. J. Anat., 148: 463.
- Matsushima S. y Reiter R.J. (1978). Electron microscopic observation on neuron like cells in the ground squirrel pineal gland. J. Neural Transm., 42: 223.
- Mayer S. (1980). Drugs acting at synaptic and neuroeffector functional sites. En: The Pharmacological Basis of Therapeutics. Goodman Gilman, Goodman y Gilman (eds.), p. 62.
- Mc Cann S.M., Djeda S.R., Harms P.G., Wheaton J.E., Sundberg D.K. y Fawcett C.P. (1976). Control of adenohipophyseal hormone secretion by prostaglandins. En: Subcellular Mechanisms in Reproductive Neuroendocrinology. F. Naftolin, K.S. Ryan, J. Davies (eds.). Elsevier, Amsterdam, p. 407.
- Mess B., Trentini G.P., Ruzsas C. y de Gaetani C.F. (1979). Some endocrine effects of the pineal gland and melatonin with special reference to reproduction. Prog. Brain Res., 52: 329.

- Minneman K.P., Hegstrand L. y Molinoff P.B. (1979). Simultaneous determination of beta-1 and beta-2 adrenergic receptors in tissues containing both receptor subtypes. Mol. Pharmacol., 15: 286.
- Minneman K.P. y Wurtman R.J. (1976). The Pharmacology of the pineal gland. Ann. Rev. Pharm. Toxicol., 16: 33.
- Moguilevsky J., Faigon 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.
- Moguilevsky J., Scacchi P. y Deiss R.P. y Siseles V.O. (1976). Effect of melatonin on the luteinizing hormone release induced by clomiphene and luteinizing hormone-releasing hormone. Proc. Soc. Biol. Med., 151: 663.
- Moncada S., Needleman P., Bunting S. y Vane J. (1976). Prostaglandin endoperoxide and thromboxane generating systems and their selective inhibition. Prostaglandins, 12: 323.
- Moncada S. y Vane J. (1978). Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂ and prostacyclin. Pharm. Rev., 30: 293.
- Moncada S. y Vane J. (1979). Mode of action of aspirin-like drugs. En: Advances in Internal Medicine. H. Stollerman (ed). Year Book Medical Publishers, Inc., p. 1.
- Moore R.V. (1973). Retinohypothalamic projection in mammals: A comparative study. Brain Res., 49: 403.

- Moore R.T. (1978). Neural control of pineal function in mammals and birds. J. Neural Transm., supl. 13: 47.
- Moore R.V., Heller A., Bhatnager R.K., Wurtman R.J. y Axelrod J. (1968). Central control of the pineal gland: visual pathway. Arch. Neurology, 18: 208.
- Moore M. y Wolff J. (1973). Binding of prostaglandin E₁ to beef thyroid membranes. J. Biol. Chem., 248: 5705.
- Motta M., Schiaffini O., Piva F. y Martini L. (1971). Pineal principles and the control of adrenocorticotrophin secretion. En: The Pineal Gland. J. Knight (ed). Wolstenholme G.E.W., Churchill, Londres, p. 279.
- 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, 2: 117.
- Murphy G.G. y Modesto R. (1975). Effects of melatonin on ¹⁴C-glucose metabolism in rabbit adipose tissue. Experientia, 31: 383.
- Namboodiri M.A.A., Namboodiri M.A., Weller J.L. y Klein D.C. (1979). A comparative study of pineal acetyl-CoA hidroxylase and N-acetyltransferase activities. J. Neurochem., 32: 31.
- Neff N.H. y Yang H. (1974). Another look at the monoamino oxidases and the monoamine oxidase inhibitor drugs. Life Sci., 14: 2061.
- Nir I. y Hirschmann N. (1979). A possible role of the pineal gland in pregnancy and fertility. Prog. Brain Res., 52: 421.
- Nir I., Hirschmann N., Puder M. y Petrank J.S. (1978). Changes in

- rodent thyroid hormones and cyclic AMP following treatment with pineal indolic compounds. Arch. Int. Physiol. Biochem., 86: 353.
- Nordlund J.J. y Lerner A.B. (1977). The effects of oral melatonin on skin color and on the release of pituitary hormones. J. Clin. Endocr. Metab., 45: 768.
 - Ochs S. y Worth R.M. (1978). Axoplasmic transport in normal and pathological systems. En: Physiology and Pathobiology of Axons. Waxman, S.G. (ed). Raven Press, New York, p. 251.
 - Øgreid D. y Døkeland S. (1980). Protein kinase II has two distinct binding sites for cyclic AMP only one of which is detectable by the conventional membrane-filtration method. FEBS Lett., 121: 340.
 - Ogle T.F. y Kitay J.J. (1978), In vitro effects of melatonin and serotonin on adrenal steroidogenesis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 157: 103.
 - Ojeda S.R. y Mc Cann S.M. (1978). The possible role of prostaglandins in the control of pituitary hormone secretion. En: Curr. Stud. Hypothal. Funct. (K. Lederis, W.L. Veale, eds.). Karger, Basel, vol. I: 106.
 - Ojeda S.R., Neor Z. y Negro-Vilar A. (1979 a). The role of prostaglandins in the control of gonadotropin and prolactin secretion. Prostaglandins and Medicine, 5: 249.
 - Ojeda S.R., Negro-Vilar A. y Mc Cann S. (1979 b). Release of prostaglandin E₂ (PGE) by hypothalamic tissue: evidence for their in-

- volvement in catecholamine-induced LHRH release. Endocrinology, 104: 617.
- Oleshansky M.A. y Neff N.H. (1978). Studies on the control of pineal indole synthesis: cyclic nucleotides, adenylate cyclase and phosphodiesterase. J. Neural Transm., supl. 13: 97.
 - Ozaki Y. y Lynch H.J. (1976). Presence of melatonin in plasma and urine of pinealectomized rats. Endocrinology, 99: 641.
 - Padmanabhan V., Convey E.M. y Tucker H.A. (1979). Pineal compounds alter prolactin release from bovine pituitary cells. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 160: 340.
 - Palmer D. y Riedesel M. (1976). Responses of whole animal and isolated hearts of ground squirrels, Citellus lateralis to melatonin. Comp. Biochem. Physiol., 53 C: 69.
 - Pang S.F. y Yew D.T. (1979). Pigment aggregation by melatonin in the retinal pigment epithelium and choroid of guinea pigs, Cavia porcellus. Experientia, 35: 231.
 - Pardridge W.M. y Mietus L.J. (1980). Transport of albumin-bound melatonin through the blood-brain barrier. J. Neurochem., 34: 1761.
 - Partington C., Edwards M. y Caly J. (1980). Regulation of cyclic AMP formation in brain tissue by α -adrenergic receptors: Requisite intermediacy of prostaglandins of the E series. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 77: 3024.
 - Pavel S. y Goldstein R. (1979). Further evidence that melatonin

represents the releasing hormone for pineal vasotocin. J. Endocr. 82: 1.

- Pedroza García E., Cardinali D.P., Laborda N.P., Bienere W.G., Nagle C.A. y Rosner J.M. (1974). Binding of estradiol to macromolecules in the rat neurohypophysis. Effects of time of the day, pinealectomy or melatonin administration. Neuroendocrinology, 14: 174.
- Pelayo F., Dubocovich M. y Langer S. (1977). Regulation of noradrenaline release in the rat pineal through a negative feedback mechanism mediated by presynaptic α -adrenoceptors. Eur. J. Pharmacol., 45: 317.
- Pérez-Polo J.R., Hall K., Vaughan M.K. y Reiter R.J. (1978). Effect of pinealectomy, blinding, castration and melatonin on nerve growth factor levels in the submaxillary glands of mice. Neurosci. Lett., 10: 83.
- Pevet P. (1979). Secretory processes in the mammalian pinealocyte. The pineal gland of vertebrates including man. Prog. Brain Res., 52: 149.
- Pickles V.R., Hall W.J., Best F.A. y Smith G.N. (1965). Prostaglandins in endometrium and menstrual fluid from normal and dysmenorrhoeic subjects. J. Obstet. Gynaecol. Brit. Commonw., 72: 185.
- Poffenbarger M. y Fuller G.M. (1976). Is melatonin a microtubule inhibitor? Exp. Cell. Res., 103: 135.
- Powell W., Hammarström S., Samuelsson B. y Sjöberg B. (1974 b). Prostaglandin $F_2\alpha$ receptor in human corpora lutea. Lancet: 1120

- Prevedello M.R., Ritta M.N. y Cardinali D.P. (1979). Fast axonal transport in rat sciatic nerve. Inhibition by pineal indoles. Neurosci. Lett., 13: 29.
- Quaste M.R. y Rahamimoff R. (1965). Effect of melatonin on spontaneous contractions and response to 5-hydroxytryptamine of rat isolated duodenum. Br. J. Pharmacol., 24: 455.
- Quay W.B. (1974). Pineal Chemistry (Thomas, Springfield).
- Ralph C.L., Firth B.T. y Scott Turner J. (1979). The role of the pineal body in ectotherm regulation. Am. Zool., 19: 273.
- Ramwell P.W., Leovey E.M. y Sintetos A. (1977). Regulation of the arachidonic acid cascade. Biol. Reprod., 16: 70.
- Ramwell P.W. y Shaw J.E. (1966). Spontaneous and evoked release of prostaglandins from cerebral cortex of anesthetized cats. Ann. J. Physiol., 211: 125.
- Ramwell P.W., Shaw J.E. y Kucharski J. (1965). Prostaglandin: release from the rat phrenic nerve-diaphragm preparation. Science, 149: 1390.
- Rao Ch.V. (1973). Receptors for prostaglandins and gonadotrophins in the cell membranes of bovine corpus luteum. Prostaglandins, 4: 567.
- Reiter R.J. (1972). Surgical procedures involving the pineal gland which prevent gonadal degeneration in adult male hamsters. Annales d'Endocrinologie, 33: 571.
- Reiter R.J. (1977). En: The Pineal - 1977. Eden Press, Montreal.

- Reiter R.J. (1978). En: The Pineal - 1978. Eden Press, Montreal.
- Reiter R.J. (1979). En: The Pineal - 1979. Eden Press, Montreal.
- Reiter R.J. (1980). The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. Endocrine Rev., 1: 109.
- Reiter R.J. y Johnson L.Y. (1974). Depressant action of the pineal gland on pituitary luteinizing hormone and prolactin in male hamsters. Horm. Res., 5: 311.
- Reiter R.J. y Klein D.C. (1971). Observations on the pineal gland, the Harderian glands, the retina, and the reproductive organs of adult female rats exposed to continuous light. J. Endocr., 51: 117.
- Reiter R.J., Petterborg L.J., Trakulrungrasi C. y Trakulrungrasi W. (1980). Surgical removal of the olfactory bulbs increases sensitivity of the reproductive system of female rats to the inhibitory effects of late afternoon melatonin injections. J. Exp. Zool., 212: 47.
- Reiter R.J., Vaughan M.K., Vaughan G.M., Sorrentino S. y Donofrio R.J. (1975). The pineal gland as an organ of internal secretion. En: Frontiers of Pineal Physiology. M.D. Altschule (ed). The MIT Press, Cambridge, Mass., p. 54.
- Reikkinen R. (1978). Use of melatonin and synthetic TRH to determine site of pineal inhibition of TSH secretion. Neuroendocrinology, 25: 310.
- Reppert S.M., Perlow M.J., Tamarkin L. y Klein D.C. (1979). A diurnal melatonin rhythm in primate cerebrospinal fluid. Endocrinology, 104: 295.

- Rissman E.F. (1980). Prepubertal sensitivity to melatonin in male hamsters. Biol. Reprod., 22: 277.
- Roche J.F., Foster D.L., Karsh F.J. (1970). Effect of castration and infusion of melatonin on levels of luteinizing hormone in sera and pituitaries of ewes. Endocrinology, 87: 1205.
- Rogawski M.A., Roth R.H. y Aghajanian G.K. (1979). Melatonin: deacetylation to 5-methoxytryptamine by liver but not brain aryl acylamidase. J. Neurochem., 32: 1219.
- Rollag M.D., Morgan R.J. y Niswender G.D. (1978). Route of melatonin secretion in sheep. Endocrinology, 102: 1.
- Romero J.A., Zatz M., Kebejian J.W. y Axelrod J. (1975). Circadian cycles in binding of ³H-alprenolol to β -adrenergic receptor sites in rat pineal. Nature, 258: 435.
- Rosenberg R.C. y Lovenberg W. (1980). Dopamine β -hidroxylase. En: Essays in Neurochemistry and Pharmacology. M.B. Youdim, W. Lovenberg, D. Sharman y J. Laguada (eds), p. 163.
- Rubin C.S. y Rosen O.M. (1975). Protein phosphorylation. Ann. Rev. Biochem., 44: 831.
- Rust C.C. y Meyer R.K. (1969). Hair color, molt and testis size in male short-tailed wessels treated with melatonin. Science, 165: 921.
- Sackman J.W. y Reiter R.J. (1977). Hyperactivity in the blind-anosmic female rat: role of the pineal gland. Physiol Behav., 18: 321.
- Sakai K.K. y Marks B.H. (1972). Adrenergic effects on pineal cell membrane potential. Life Sci., 11: 285.

- Salzman E.W. (1977). Interrelation of prostaglandin endoperoxide (PGG₂) and cyclic AMP in human blood platelets. Biochim. Biophys. Acta, 499: 48.
- Salzman E.W., Lindon N.J. y Rodvien R. (1976). Cyclic AMP in human blood platelets: Relation to platelet prostaglandin synthesis induced by centrifugation or surface contact. J. Cyclic Nucleotide Res., 2: 25.
- Sampson P.H. (1975). Behaviour and pineal functioning. En: Frontiers of Pineal Physiology. M.D. Altschule (ed). The MIT Press, Cambridge, Mass., p. 204.
- Sanborn B., Bhatta R. y Korenman S. (1973). The endometrial adenosine cyclic 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase. Distribution and properties of islet-cell protein phosphokinase. Biochem. J., 129: 551.
- Saper C.B., Loewy A.D., Swanson L.W. y Cowan W.M. (1976). Direct hypothalamo-autonomic connections. Brain Res., 117: 305.
- Scatchard G. (1949). The attraction of proteins for small molecules and ions. Ann. N.Y. Acad. Sci., 51: 660.
- Scheffé H. (1979). The analysis of variance. Willey, N.Y.
- Semm P. y Vollrath L. (1979). Electrophysiology of the guinea-pig pineal organ: sympathetically influenced cells responding differently to light and darkness. Neurosci. Lett., 12: 93.
- Shaw J.E. y Ramwell P.W. (1968). Release of prostaglandin from rat epididymal fat pad on nervous and hormonal stimulation. J. Biol. Chem., 243: 1498.

- Silman R.E., Leone R.M., Hooper R.J.L. y Preece M.A. (1979). Melatonin, the pineal gland and human puberty. Nature, 282: 301.
- Silver M.J., Smith J.B., Ingerman C. y Kocsis J.J. (1973). Arachidonic acid-induced human platelet aggregation and prostaglandin formation. Prostaglandins, 4: 863.
- Sitaram B.R. y Lees G.J. (1978). Diurnal rhythms and turnover of tryptophan hydroxylase in the pineal gland of the rat. J. Neurochem., 31: 1021.
- Smigel M. y Fleicher J. (1974). Characterization and localization of PGE₁ receptors in the plasma membrane of rat liver. Biochim. Biophys. Acta, 332: 358.
- Smith J.B., Ingerman C.M. y Silver M.J. (1977). Effects of arachidonic acid and some of its metabolites on platelets. En: Prostaglandins in Hematology. M.J. Silver, J.B. Smith y J.J. Kocsis (eds). p. 277.
- Smulders A.P. y Wright E.M. (1980). Role of choroid plexus in transport of melatonin between blood and brain. Brain Res., 191: 555.
- Smythe G.A. y Lazarus L. (1973). Growth hormone regulation by melatonin and serotonin. Nature, 244: 230.
- Smythe G.A. y Lazarus L. (1974). Suppression of human growth hormone secretion by melatonin and cyroheptadine. J. Clin. Invest., 54: 116.
- Snedecor G.W. y Cochran W.G. (1967). Statistical Methods. Iowa State University Press.

- Snyder S.H., Fischer S. y Axelrod J. (1965). Evidence for the presence of monoamine oxidase in sympathetic nerve endings. Biochem. Pharmacol., 14: 363.
- Sprecher H. (1977). Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids and its regulation. En: Polyunsaturated Fatty Acids. W. Kuman y R. Holman (eds). Chigago, Ill., p. 1.
- Sudgen D. (1978). Circadian changes in rat pineal tryptophan content: lack of correlation with serum tryptophan. J. Neurochem., 33: 811.
- Swanson R. y Friedhoff A. (1976). Work in Progress. Decrease of serotonin-N-acetyltransferase activity in rat pineal organs after treatment with prostaglandin synthesis inhibitor indomethacin. Prostaglandins, 11: 503.
- Szentagothai J., Flerko B., Mess B. y Halasz B. (1976). Hypothalamic Control of the Anterior Pituitary. Akademiai Kiado, Budapest.
- Talmadge K., Bechtel E., Salonkangas A., Huber P., Jungmann R. y Eppenberger U. (1975). Characterization of calf-ovary adenosine-3',5'-monophosphate-dependent protein kinases and adenosine-3',5'-monophosphate binding proteins. Eur. J. Biochem., 60: 621.
- Tamarkin L., Hutchinson J.S. y Goldman B.D. (1976 a). Regulation of serum gonadotropins by photoperiod and testicular hormone in the Syrian hamster. Endocrinology, 99: 1528.
- Tamarkin L., Westrom W.K., Hamill A.J. y Goldman B.D. (1976 b). Effects of melatonin on the reproductive systems of male and fema-

- le hamsters: a diurnal rhythm in sensitivity to melatonin. Endocrinology, 99: 1534.
- Thorpe P.A. y Herbert J. (1976). Studies on the duration of the breeding season and photorefractoriness in female ferrets pinealectomized or treated with melatonin. J. Endocr., 70: 255.
 - Trendelenburg U. (1979). The extraneural uptake of catecholamines: is it an experimental oddity or a physiological mechanism? Trends in Pharmacol. Sci., 1: 4.
 - Trentini G.P., Mess B., de Gaetani C.F. y Ruzsas C. (1979). Pineal-brain relationship. Prog. Brain Res., 52: 341.
 - Tsafiri A., Lindner H., Zor U. y Lamprecht S. (1972). Physiological role of prostaglandins in the induction of ovulation. Prostaglandins, 2: 1.
 - Turek F.W. (1979). Role of the pineal gland in photoperiodic-induced changes in hypothalamic-pituitary sensitivity to testosterone feedback in castrated male hamsters. Endocrinology, 104: 636.
 - Turek F.W., Desjardins C., Menaker M. (1976). Differential effects of melatonin on the testes of photoperiodic and nonphotoperiodic rodents. Biol. Reprod., 15: 94.
 - Tukey J.W. (1949). Comparing individual means in the analysis of variance. Biometrics, 5: 89.
 - Urry R.L. y Ellis L.C. (1975). Monoamine-oxidase activity of the hypothalamus and pituitary: alterations after pinealectomy, changes in photoperiod or additions of melatonin in vitro. Experientia, 31: 891.

- Vacas M.I. (1980). La Unidad Glándula Pineal-Ganglio Cervical Superior como un Modelo de Integración Neuroendócrina. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.
- Vacas M.I. y Cardinali D.P. (1979 a). Effects of castration and reproductive hormones on pineal serotonin metabolism in rats. Neuroendocrinology, 28: 187.
- Vacas M.I. y Cardinali D.P. (1979 b). Diurnal changes in melatonin binding sites of hamster and rat brain. Correlation with neuroendocrine responsiveness to melatonin. Neurosci. Lett., 15: 259.
- Vacas M.I. y Cardinali D.P. (1980). Binding sites for melatonin in bovine pineal gland. Hormone Res., 13: 121.
- Vane J.R. (1964). The use of isolated organ for detecting active substances in circulating blood. Br. J. Pharmacol. Chemoter., 23: 360.
- Vane J.R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action of aspirin-like drugs. Nature, 231: 232.
- Vane J. (1976). The mode of action of aspirin and similar compounds. J. Allergy Clin. Immunol., 58: 691.
- Vane J.W. y Williams K.I. (1973). The contribution of prostaglandin production to contractions of the isolated rat uterus. Brit. J. Pharmacol., 48: 629.
- Vaughan M.K., Little J.C., Johnson L.Y., Blask D.E., Vaughan G.M. y Reiter R.J. (1978 b). Effects of melatonin and natural and synthetic analogues of arginine vasotocin on plasma prolactin levels in adult male rats. Hormone Res., 9: 236.

- Vaughan G.M., Mc Donald A., Jordon R.M., Allen J.P., Bohmfalk G.L., Abou-Samra M. y Story J.L. (1978 a). Melatonin concentration in human blood and cerebrospinal fluid: relationship to stress. J. Clin. Endocr. Metab., 47: 220.
- Vaughan M.K., Vaughan G.M., Blask D.E. y Reiter R.J. (1976). Influence of melatonin, constant light or blinding on reproductive system of gerbils (*Meriones unguatus*). Experientia, 32: 1341.
- Vesin M.F. y Harbou S. (1974). The effects of epinephrine, prostaglandins and their antagonists on adenosine cyclic-3',5'-monophosphate concentrations and motility of the rat uterus. Mol. Pharmacol., 10: 457.
- Vriend J., Reiter R.J. y Anderson G.R. (1979). Effects of the pineal and melatonin on thyroid activity of male golden hamsters. Gen. Comp. Endocr., 38: 189.
- Wakeling A., Kirton K.T. y Wyngarden L. (1973). Prostaglandin receptors in the hamster uterus during the estrous cycle. Prostaglandins, 4: 1.
- Wakeling A. y Spilman C. (1973). Prostaglandin specific binding in the rabbit oviduct. Prostaglandins, 4: 405.
- Walsh D.A., Perkins J.P. y Krebs E.G. (1968). An adenosine-3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle. J. Biol. Chem., 243: 3763.
- Wartenberg H. (1968). The mammalian pineal organ: Electron microscopic studies on the fine structure of the pinealocytes, glial cells and on the perivascular compartment. Zeitschrift fur Zellforschung

und Mikroskopie Anatomie, 86: 74.

- Weinberg U., Weitzman E.D., Fukushima D.K., Cancel G.F. y Rosenfeld R.S. (1980). Melatonin does not suppress the pituitary luteinizing hormone response to luteinizing hormone-releasing hormone in men. J. Clin. Endocr. Met., 51: 161.
- Weiss B. y Crayton J. (1970). Gonadal hormones as regulators of pineal adenylyl-cyclase activity. Endocrinology, 87: 527.
- Westfall T.C. y Brated M. (1974). Specificity of blockade of the nicotine-induced release of ³H-norepinephrine from adrenergic neurons of the guinea-pig heart by various pharmacological agents. J. Pharmacol. Exp. Ther., 189: 659.
- Wilkinson M., Arendt J., Bradkte J. y Ziegler D. (1977). Determination of a dark-induced increase of pineal N-acetyltransferase activity and simultaneous radioimmunoassay of melatonin in pineal, serum and pituitary tissue of the male rat. J. Endocr., 72: 243.
- Williams K.I., Sneddon J.M. y Harvey P.J. (1974). Prostaglandin production by the pregnant rat uterus in vitro and its relevance to parturition. J. Pharmacol., 26: 207.
- Wilson B.W. (1978). The application of mass spectrometry to the study of the pineal gland. J. Neural Transm. suppl. 13: 279.
- Withyachumnarnkul B. y Knigge K.M. (1980). Melatonin concentration in cerebrospinal fluid, peripheral plasma and plasma of the confluens sinuum of the rat. Neuroendocrinology. 30: 382.
- Wolfe L. y Coceani F. (1979). The role of prostaglandins in the central nervous system. Ann. Rev. Physiol., 41: 669.

- Wurtman R.J. (1973). Biogenic amines and endocrine function. Introduction: neuroendocrine transducer and monoamines. Fed. Proc., 32: 1769.
- Wurtman R.J. y Axelrod J. (1965). The Pineal Gland. Scientific American, 213: 50.
- Wurtman R.J., Axelrod J. y Chu E.W. (1963). Melatonin, a pineal substance: effect on the rat ovary. Science, 141: 277.
- 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.
- Wurtman R.J. y Cardinali D.P. (1974). The Pineal Organ. En: Textbook of Endocrinology. R. Williams (ed). W.B. Saunders, Filadelfia, p. 832.
- Wurtman R.J. y Moskowitz M.A. (1977). The Pineal Organ. New England J. Med., 296: 1329 & 1383.
- Wurtman R.J., Shein H.M., Axelrod J. y Larin F. (1969). Incorporation of ¹⁴C-tryptophan into ¹⁴C-protein by cultured rat pineals: stimulation by L-norepinephrine. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 62: 749.
- Yamamoto S., Ogino N., Ohki S. y Yoshimoto T. (1977). En: Enzymological studies on prostaglandin biosynthesis. Biochemical aspects of PG and thromboxanes. Norman Kharasch y Joseph Fried (eds). Academic Press Inc., p. 1.
- Yamashita K., Mieno M., Shimizu T. y Yamashita E. (1978). Inhibition by melatonin of the pituitary response to luteinizing hormone relea-

- sing hormone in vivo. J. Endocr., 76: 487.
- Yates C.A. y Herbert J. (1979). The effects of different photoperiods on circadian 5-HT rhythms in regional brain areas and their modulation by pinealectomy, melatonin and oestradiol. Brain Res., 176: 311.
 - Yehuda S. y Frommer R. (1977). Circadian rhythms in melatonin effects on D-amphetamine-induced hyperthermia among rats kept at 4 C. Preliminary results. J. Neural Transm., supl. 13: 407.
 - Ying S.Y. y Greep R.O. (1973). Inhibition of ovulation by melatonin in the cyclic rat. Endocrinology, 92: 333.
 - Young, Lai E.V. (1979). In vitro effects of melatonin on hCG stimulation of steroid accumulation by rabbit ovarian follicles. J. Steroid Biochem., 10: 714.
 - Zatz M. (1977). Effects of cholera toxin on supersensitive and subsensitive rat pineal glands: regulation of sensitivity in multiple sites. Life Sci., 21: 1267.
 - Zatz M. (1978). Sensitivity and cyclic nucleotides in the rat pineal gland. En: The Pineal Gland. I. Nir, R.J. Reiter, R.J. Wurtman (eds). Springer Verlag, Viena, p. 97.
 - Zatz M. (1980). The pineal gland: shedding light on the internal clock. Trends Pharm. Sci., 1: 230.
 - Zinder O. y Pollard H. (1980). The chromaffin granule: recent studies leading to a functional model for exocytosis. En: Neurochemistry and Neuropharmacology, 4: 125.