Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Melatonina y función gabaergica en glándula pineal y sistema nervioso central

Rosenstein, Ruth Estela

1989

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:
Rosenstein, Ruth Estela. (1989). Melatonina y función gabaergica en glándula pineal y sistema nervioso central. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2259_Rosenstein.pdf

Cita tipo Chicago:
Rosenstein, Ruth Estela. "Melatonina y función gabaergica en glándula pineal y sistema nervioso central". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1989. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2259_Rosenstein.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TEMA DE TESIS

MELATONINA Y FUNCION GABAERGICA EN GLANDULA PINEAL Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

AUTOR:

RUTH E. ROSENSTEIN

DIRECTOR:

DANIEL P. CARDINALI

LUGAR DE TRABAJO:

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA, FACULTAD DE MEDICINA, UBA

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

1989

- 2.259 -
Ej: 2.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento y especial reconocimiento al Dr. Daniel P. Cardinali por su inagotable capacidad de generar ideas, por su valiosa actitud crítica y por el estímulo permanente brindado en estos años de intenso aprendizaje a su lado.

A Pedro que siempre tuvo una respuesta paciente y tranquilizadora a mis preguntas impertinentes y mis dudas existenciales.

A mis compañeros de laboratorio: Elba, Kalpa, Horacio, César, Mercedes, María Inés, Alvaro, Irene, Rosalía, Jorge, Adriana, Claudia y Mónica, que soportaron estoicamente mis depresiones y mis euforias y me brindaron el apoyo imprescindible para que este trabajo pudiera realizarse.

Al Dr. Eugenio Caputti que me facilitó los tejidos humanos utilizados en este trabajo.

A la Dra. Cristina Díaz que realizó los estudios inmunohistoquímicos.

Al Dr. Peter Somogyi que me brindó gentilmente el anticuerpo específico antiGABA.

Al Centro de Estudios Farmacológicos y Principios Naturales y al Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina por permitir la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por haberme otorgado las becas que me permitieron llevar a cabo este trabajo.

A mis familiares y amigos que me acompañaron en las buenas y en las no tanto.

A mis padres

Al plantel de amigos imprescindibles

"¿ Pero acaso podemos negarnos al pueblo y al mismo tiempo seguir siendo hombres de ciencia ? Los movimientos de los cuerpos celestes son ahora más fáciles de calcular, pero los pueblos todavía no pueden calcular los movimientos de sus señores. La lucha por medir el cielo ha sido ganada, pero las madres del mundo siguen siendo derrotadas día a día por conseguir el pan de sus hijos. Y la ciencia debe ocuparse de esas dos luchas por igual. Una Humanidad que se debate entre la superstición y la mentira no será capaz de dominar las fuerzas de la naturaleza que Uds los científicos descubren y les revelan. ¿ Con qué objetivo trabajan Uds ?
Mi opinión es que el único fin de la ciencia consiste en aliviar la miseria de la existencia humana."

Bertold Brecht
"Galileo Galilei"

INDICE

ABREVIATURAS 7

I *INTRODUCCION* 9

I.1 LA GLANDULA PINEAL 9

I.1.a Conceptos Generales 9
I.1.b Biosíntesis y Metabolismo de la Melatonina 15
I.1.c Control de la actividad pineal 20
I.1.d Fotoperiodicidad 26
I.1.e Efecto de la glándula pineal 35
I.1.f Mecanismo de acción de la melatonina 41

I.2 SISTEMA GABAERGICO 45

I.2.a Conceptos generales 45
I.2.b Biosíntesis y Metabolismo de GABA 55
I.2.c Mecanismo de acción de GABA 61
I.2.d Benzodiazepinas 69

I.3 OBJETIVOS 75

II. *MATERIALES Y METODOS* 77

II.1 ANIMALES Y TEJIDOS 77

II.2 CIRUGIA 78

II.2.a Gangliectomía cervical superior bilateral 78
II.2.b Pinealectomía 78

II.3 ESTUDIO DE LOS SITIOS DE UNION 79

II.3.a BZP 79
II.3.b $GABA_A$ 80
II.3.c $GABA_B$ 81

II.4 RITMOS 83

II.5 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE GABA 83

II.6 DETERMINACION DEL TURNOVER DE GABA 85

II.7 DETERMINNACION DE LA ACTIVIDAD GLUTAMICO-DESCARBOXILASA 85

II.8 DETERMINACION DE LA CAPTACION DE $^{45}Ca^{2+}$ 86

II.9 DETERMINACION DEL INFLUJO DE $^{36}Cl^{-}$ 87

II.10 DETERMINACION DE LA CAPTACION DE ^{3}H-GABA 88

II.11 DETERMINACION DE LA LIBERACION DE ^{3}H-GABA 89

II.12 DETERMINACION DE MELATONINA 90

II.13 DETERMINACION DE INDOLAMINAS 91

II.14 ESTUDIOS INMUNOHISTOQUIMICOS 92

II.15 ANALISIS ESTADISTICO 93

III *RESULTADOS* 94

III.1 VINCULO ENTRE LA FUNCION PINEAL Y SISTEMA GABAERGICO CENTRAL 94

III.1.a Efecto de la pinealectomía y la melatonina sobre receptores centrales de BZP 94

III.1.b Variaciones circadianas en la unión de BZP en corteza cerebral de rata: Alteración por la pinealectomía y efecto de la melatonina 101

III.1.c Variaciones circadianas en el "binding" de GABA de alta afinidad: Modificación por la pinealectomía o administración de melatonina 110

III.1.d Efecto de la melatonina sobre la acumulación de GABA "in vivo" en corteza cerebral, cerebelo, hipotálamo y glándula pineal de rata 124

III.1.e Cronodependencia del efecto de la melatonina sobre la actividad glutámico descarboxilasa en SNC de rata 128

III.1.f Cronodependencia del efecto de la melatonina "in vitro" sobre el influjo de $^{36}Cl^{-}$ en sinaptoneurosomas hipotalámicos 131

III.1.g Reversión por picrotoxina del efecto de la melatonina sobre el influjo de $^{45}Ca^{2+}$ en sinaptosomas de hipotálamo 136

III.2 ESTUDIO DEL SISTEMA GABAERGICO INTRAPINEAL 139

III.2.a Glándula pineal bovina 139

III.2.b Glándula pineal de rata 152

III.2.c Glándula pineal humana 166

IV *DISCUSION* 181

V *CONCLUSIONES GENERALES* 221

VI *BIBLIOGRAFIA* 224

ABREVIATURAS

ACTH	Adenocoticotrofina
AMP_c	Adenosina monofosfato cíclico
AOAAA	Acido aminooxiacético
ARN	Acido ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
Bmáx.	Número máximo de sitios de unión
BZP	Benzodiazepina
°C	Grados centígrados
Ci	Curie
^{14}C	Carbono 14
DAB	Diamino bencidina
DABA	Acido 2, 4-diamino butírico
Dopamina	3,4-dihidroxifeniletilamina
DSIP	Péptido inductor del sueño delta
DZP	Diazepam
EDTA	Acido etilendiamino tetraacético
ENS	Enolasa neurona-específica
EGTA	Acido etilénglicol tetracético
ES	Error standard
fmol	Femtomol
FNZP	Flunitrazepam
FSH	Hormona folículo estimulante
GABA	Acido gama-aminobutírico
GABA-T	GABA-transaminasa
GAD	Glutámico-descarboxilasa
GAG	Gama acetilén-GABA
GCS	Ganglio cervical superior
GCSx, Gx	Ganglie ctomía cervical superior
GMP_c	Guanosina monofosfato cíclico
h	Hora
^3H	Tritio
HIAA	Acido hidroxindol acético
HIOMT	Hidroxindol-O-metiltransferasa
HMB	Hipotálamo medio basal
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
5-HT	5-hidroxitriptamina
i.p.	Intraperitoneal
Kd	Constante de disociación
Ki	Constante de inhibición
kg	Kilogramo
Km	Constante de Michaelis-Menten
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LH	Hormona luteinizante
LHRH	Hormona liberadora de LH
M	Molar
MAO	Monoaminooxidasa
mCi	Milicurie

Melatonina	N-acetil-5-metoxitriptamina
min	Minuto
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mM	Milimolar
3MPA	Acido 3-mercaptopropiónico
MSH	Hormona melanocito estimulante
N	Normal
nM	Nanomolar
Norepinefrina (NE)	3,4-dihidroxifeniletanolamina
NPY	Neuropéptido Y
pg	Picogramo
PG	Prostaglandina
PRL	Prolactina
prot.	Proteína
Px	Pinealectomía
RIA	Radioinmunoanálisis
rpm	Revoluciones por minuto
SNAT	Serotonina-N-acetiltransferasa
SNC	Sistema nervioso central
sham	Operacidn simulada
SSADH	Succínico semialdehído-deshidrogenasa
TCA	Acido tricloroacético
TSH	Tirotrofina
uCi	Microcurie
ul	Microlitro
uM	Micromolar
Vmáx.	Velocidad máxima
Vol.	Volumen

I. INTRODUCCION

I.1. LA GLANDULA PINEAL.

I.1.a CONCEPTOS GENERALES

Desde el punto de vista evolutivo los mamíferos que habitan las zonas templadas de altas latitudes (alejadas del Ecuador) han experimentado una fuerte presión selectiva para circunscribir su época de máxima actividad y consumo de energía a la estación del año más favorable. Si bien el ejemplo más conspicuo lo da la reproducción (sincronizada para producir el nacimiento de las crías en la época del año en que el clima es más propicio y el aporte de nutrientes es suficiente para asegurar la sobrevida tanto del recién nacido como de la madre), otras funciones endócrinas y no endócrinas (como la conducta), presentan un claro ritmo circanual, incluso en el hombre (1,2).

Para la mayoría de las especies la principal señal ambiental en la adecuación fisiológica al hábitat natural es el fotoperíodo, lo cual no resulta ilógico ya que para un día determinado éste no varía de año a año, a diferencia de otras variables ambientales como la temperatura o la humedad. El mecanismo de transducción neuroendócrina de la información luminosa ambiental en respuesta fisiológica, involucra en la mayoría de los vertebrados examinados, a la glándula pineal y a su hormona específica, la melatonina (3).

La existencia de la pineal en el hombre, parece ser reconocida ya desde el siglo III A.C. y su descubrimiento es

adjudicado a Herófilo de Alejandría, quien consideró a la glándula como una válvula reguladora del flujo del pensamiento en los ventrículos cerebrales. Desde entonces hasta la actualidad han sido muchas las hipótesis sobre la función pineal, las que incluyen opiniones tan variadas como la de Descartes (1596-1650), quien propuso que "el alma tiene su principal asiento en la pequeña glándula que existe en el medio del cerebro, desde donde irradia hacia el resto del cuerpo, por medio de los espíritus animales, nervios y también la sangre y participando en la impresión de los espíritus, puede conducirlos a través de las arterias hacia todos los otros miembros" (Fig 1) (4), hasta las más "mitológicas" que la consideraron el vestigio del tercer ojo. Su nombre, sin embargo, tiene un origen genital, dado por el anatomista inglés Thomas Gibson, quien la denominó glándula pineal, de "penis", por su localización sobre, y entre, los tubérculos cuadrigéminos inferiores o "testes".

Durante el siglo XIX y la primera mitad del siglo XX, las observaciones microscópicas de la glándula pineal en vertebrados, fueron acompañadas de exámenes clínicos y estudios experimentales. En 1959, Lerner y colaboradores describieron una molécula liberada por la pineal, la que fue denominada melatonina (5-metoxi N-acetiltriptamina), por su capacidad de aclarar la piel de los anfibios (5). A partir de entonces, y con la incorporación de nuevas tecnologías y la creación de numerosos grupos de estudio, se inició una etapa fecunda en resultados y conceptos, que llevaron a la glándula pineal a

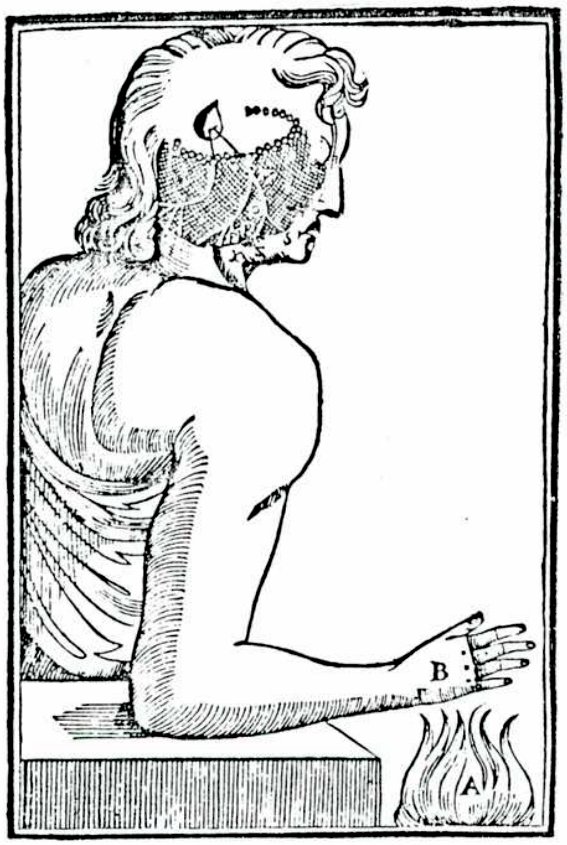

Fig. 1 Ilustración del libro de R. Descartes "Homine Figuris", quien atribuía al alma la causa de las funciones vitales y ubicaba su sitio de acción principalmente en la pineal. Según Descartes, los nervios eran tubos por los que circulaba el espíritu que a través de la pineal, pasaba de la sangre al III ventrículo. El flujo del espíritu dependía de la percepción visual que llegaba a la glándula por la vía óptica.

adquirir en forma definitiva, el status de órgano funcional, y no vestigial en los mamíferos como inicialmente se pensara.

La glándula pineal es una estructura circunventricular que se origina a partir de una evaginación neuroepitelial del techo del diencéfalo, que en el hombre se hace evidente a partir del 2do mes de vida intrauterina. Es una estructura pequeña; en la rata pesa 1-2 mg y en el hombre adulto entre 100 y 200 mg. Está ubicada en el borde posterior e inferior del cuerpo calloso, entre ambos tubérculos cuadrigéminos superiores (Fig 2), y se halla encapsulada por la piamadre desde la cual le llegan vasos sanguíneos, fibras nerviosas amielínicas y estroma de tejido conjuntivo.

La glándula pineal presenta una gran variabilidad a través de la escala zoológica (6). En peces, anfibios y reptiles lacértidos, contiene células fotorreceptoras semejantes a las retinianas (7), dotadas de un polo receptor y de un polo secretor de transmisores, destinado a neuronas de segundo orden que proyectan al cerebro. En muchos reptiles y aves, conserva la sensibilidad a la luz aunque con estructuras modificadas (fotorreceptores vestigiales) (7), en los que el polo receptor está reducido y el polo emisor termina en la proximidad de capilares sanguíneos pineales. Las neuronas de segundo orden desaparecen poco a poco, de manera tal que las conexiones nerviosas con el cerebro paulatinamente regresionan. La última etapa evolutiva de los fotorreceptores corresponde a los pinealocitos de mamíferos y serpientes. Los pinealocitos se

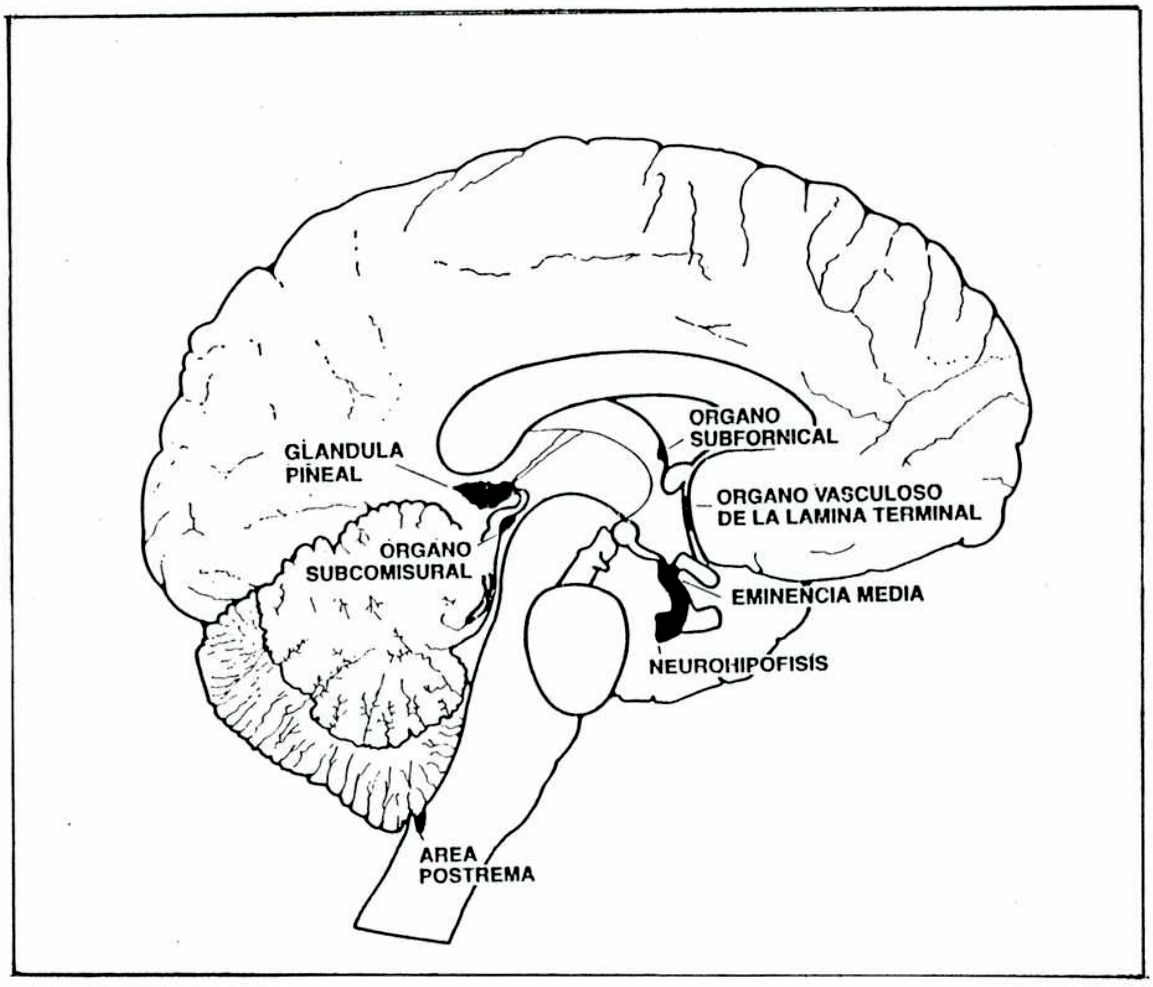

Fig. 2 Localizacidn anatdmica de la glándula pineal en el cerebro humano.

reducen a una célula con prolongaciones orientadas hacia los capilares o espacios intercelulares, en los cuales la fotosensibilidad y la conexión con neuronas hacia el cerebro han desaparecido, para formar una estructura típicamente neuroendócrina. En el curso de la evolución, las células pineales (fotorreceptores, fotorreceptores modificados o, finalmente, pinealocitos) han sufrido importantes modificaciones aunque conservan ciertas características comunes, como por ejemplo todas ellas producen moléculas semejantes. El pinealocito o célula parenquimatosa pineal es el principal componente de la glándula de los mamíferos (85%). Esto ha llevado a suponer que la pineal es una estructura altamente homogénea, aunque no es posible por ahora descartar que existan pinealocitos morfológica y fisiológicamente diferentes (8).

El resto de la glándula está formado por células gliales (que se distribuyen como elementos de sostén), elementos vasculares y terminaciones nerviosas (6). La glándula pineal recibe un flujo sanguíneo muy elevado (el segundo después del riñón), y presenta tendencia a calcificarse en el hombre, sin que esto afecte su función endócrina (9).

La inervación de la glándula pineal sigue dos disposiciones anatómicas fundamentales. En la mayoría de las especies predominan las fibras simpáticas postganglionares originadas en el ganglio cervical superior (GCS), que llegan a la glándula a través de los vasos sanguíneos o los nervios conarios y terminan en el espacio perivascular, en la cercanía de los pinealocitos.

Estos terminales tienen distribución tanto parenquimatosa como perivascular y constituyen la forma más común de inervación pineal en los mamíferos. Asimismo, existe una inervación de origen central que penetra la glándula desde la habénula, a partir de regiones lejanas como el núcleo supraóptico o paraventricular, o desde el área hipotalámica periventricular. Existe también una escasa inervación parasimpática, constituida por fibras preganglionares que nacen en el núcleo salivatorio superior y siguen el curso de los nervios petrosos superiores y facial. Algunas de estas fibras hacen sinapsis en pequeños ganglios ubicados en el trayecto de los nervios, mientras que otras terminan en neuronas ubicadas dentro de la glándula pineal (10).

Se han aislado dos familias de compuestos con actividad endócrina y potencialidad para revertir las secuelas de la pinealectomía: (a) Metoxindoles; (b) Pétidos y proteínas. La información disponible sobre los metoxindoles, con la melatonina como principal representante, es preponderante, ya que constituyeron la primera familia de hormonas de la glándula pineal aisladas en forma pura.

I.1.b Biosíntesis y Metabolismo de la Melatonina

La melatonina es producida por la glándula pineal de todas las especies de vertebrados conocidos. Su biosíntesis se inicia con la captación de triptofano por los pinealocitos, que es uti-

lizado en parte para la síntesis de proteínas y en una fracción mayor es convertido a indolaminas (12,13). Los niveles de este aminoácido en la glándula pineal de rata, exhiben cambios en el ciclo de 24 horas siendo mayores cerca del final del período de luz y disminuyendo durante el período de oscuridad. El aumento diurno del triptofano pineal precede al aumento del aminoácido libre o sérico total, lo que sugiere que la glándula lo capta activamente (14). El triptofano es sustrato de la enzima triptofano hidroxilasa (15) y, posteriormente, es transformado en serotonina (5-HT) por una descarboxilasa de relativa especificidad, también involucrada en la biosíntesis de catecolaminas.

La 5-HT es el indol presente en mayor concentración en el tejido pineal; su contenido y velocidad de recambio ("turnover") es mayor en la glándula que en otras áreas del Sistema Nervioso Central (SNC). Ello se debe a la gran actividad de la triptofano hidroxilasa, que a pesar de suposiciones iniciales (14), no parece estar saturada por sustrato "in vivo" (17).

Aproximadamente el 30% de la 5-HT pineal en la rata, está localizada en los terminales sinápticos, aunque la síntesis sólo ocurre en los pinealocitos (18). La 5-HT pineal es el precursor de compuestos biológicamente activos como la melatonina y el 5-metoxitriptofol; asimismo, la serotonina liberada al espacio vascular puede tener efectos hormonales propios (16). La 5-HT pineal presenta en la rata un ritmo circadiano definido, con valores máximos durante el día (90-120 ng/glándula) y mínimos durante la noche (25-30 ng/glándula) (19). La disminución del

contenido de 5-HT en la fase de oscuridad es consecuencia de 4 vías metabólicas diferentes: (a) desaminación oxidativa; (b) N-acetilación; (c) 3-oxidación por la 2,3 dioxigenasa; (d) liberación al espacio extravascular. La vía principal es la metabolización por la monoaminooxidasa (MAO) (20). La disponibilidad de la 5-HT para cualquiera de estas rutas depende del equilibrio "5-HT granular <==> 5-HT libre"; sólo la segunda forma está sujeta a metabolización.

La conversión de 5-HT a melatonina comprende 2 pasos enzimáticos. En primer término es acetilada a N-acetilserotonina por acción de la enzima relativamente inespecífica serotonina N-acetiltransferasa (SNAT), considerada la etapa limitante (21). El grupo acetilo proviene del cofactor acetilcoenzima A, cuya concentración está bajo control de una activa acetil-Co A hidroxilasa (22). A continuación, un grupo metilo es transferido a partir de la S-adenosil-metionina (SAM) al grupo 5-hidroxi de la N-acetilserotonina para dar melatonina, reacción catalizada por la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) (23). Los niveles elevados del cofactor SAM se deben a altas concentraciones de la enzima L-metionina-S-adenosiltransferasa pineal, que cataliza su síntesis a partir de ATP y L-metionina (24) (Fig 3).

La síntesis de melatonina no es exclusiva de la glándula pineal; existe también producción en la retina, glándula harderiana (25), intestino (26) y glándulas lacrimales (27). Sin embargo, la pinealectomía en mamíferos resulta en niveles plasmáticos indetectables de melatonina (28), lo que ha llevado a con-

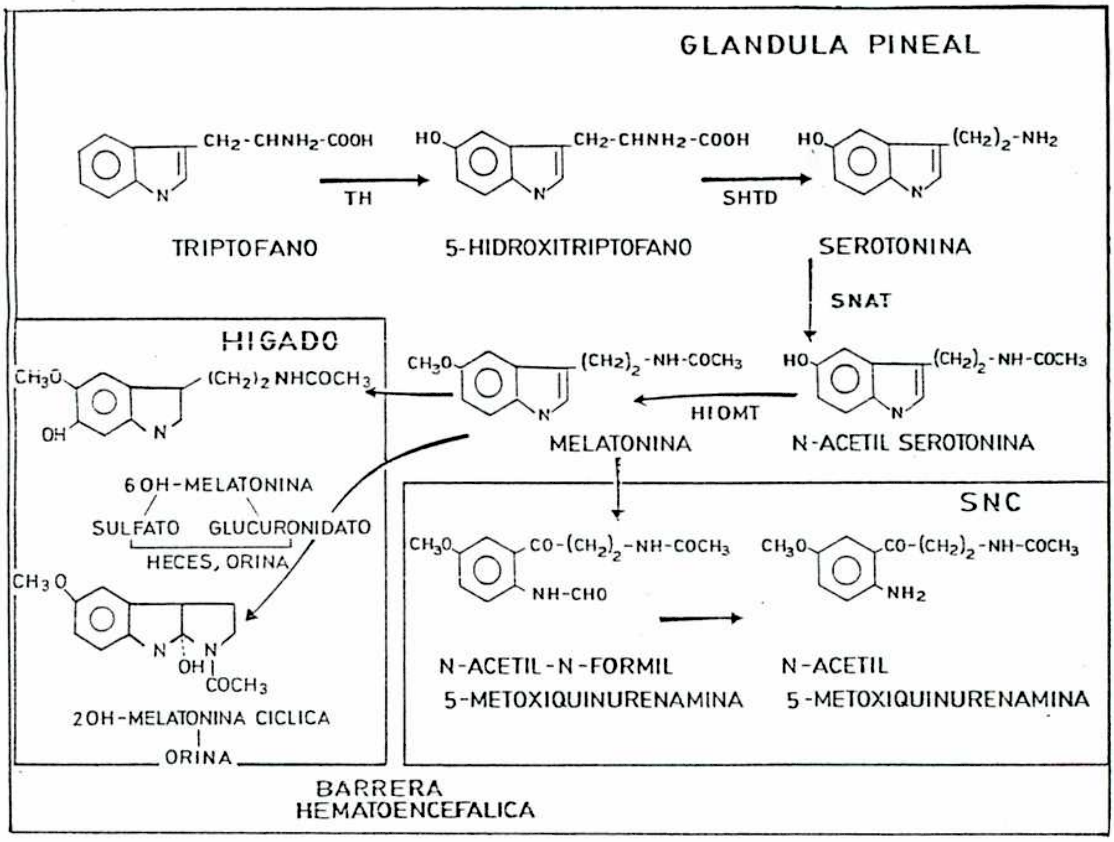

Fig. 3 Biosíntesis y Metabolismo de la melatonina.

cluir que la producción extrapineal de la hormona es probablemente local.

La melatonina pineal es secretada primariamente a la circulación más que al líquido cefalorraquídeo (LCR) (29) por un mecanismo aparentemente de difusión simple. La existencia de un posible mecanismo de liberación para la melatonina es controvertido dada su alta lipofilicidad, de manera tal que el consenso general es que la melatonina plasmática es un reflejo rápido (en min) de la producción pineal (30). Alrededor del 60-70% de la melatonina plasmática está asociada a albúmina (31), lo que inicialmente llevó a suponer que sólo el 40% restante es capaz de llegar al LCR. Más tarde se sugirió que la melatonina asociada a albúmina puede ser también transportada al cerebro, a través del LCR luego de la acumulación en el plexo coroideo (32).

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

El hígado es el principal sitio de inactivación. El metoxindol se hidroxila a un compuesto sin actividad biológica, la 6-hidroximelatonina, que luego de la conjugación con ácido glucurónico (5-30%) o sulfúrico (55-80%) es eliminada por orina o heces (33). La melatonina remanente (< 1%) permanece inalterada o como metabolito no indólico (15%), identificado como N-acetil-5-metoxiquinurenamina (34). El ácido 5-metoxindol-

acético es producido periféricamente en el hígado por desacetilación de la melatonina (35). Recientemente (36) se ha postulado la existencia de un nuevo metabolito excretado en orina de humanos y de rata, que es un isómero cíclico de la 2-hidroximelatonina (Fig.3).

En cuanto a los estudios cinéticos del metabolismo cerebral, se observó que después de una inyección intracisternal, la melatonina desaparece rápidamente, siendo detectable sólo un 5% de la dosis administrada, dentro de los 5 min. de la inyección, lo que sugiere un rápido intercambio de la hormona entre el LCR y el compartimento vascular. La concentración de melatonina en el hipotálamo es 4 o 5 veces mayor que en el resto del cerebro, ya sea luego de la inyección intraventricular o intracisternal (37).

El metabolismo de la melatonina en el SNC es relevante: 1 hora después de la inyección intracisternal, sólo un 30-40% permanece en esta estructura (38). Estudios tanto "in vivo" como "in vitro" indican que la melatonina cerebral es oxidada a N-acetil-5-metoxiquinurenamina, formándose como metabolito intermediario N-formil-5-metoxiquinurenamina.

I.1.c Control de la actividad pineal

La glándula pineal es, en todas las especies, una estructura fotosensible, en forma directa para los no mamíferos o indirecta para los mamíferos.

El control indirecto de la actividad pineal de los mamíferos está dado por las vías neurales que llegan a la glándula, y reciben la información fótica desde los ojos. La conexión óptica pineal consiste en una red neural que incluye fotorreceptores, celulas bipolares y células ganglionares retinianas, cuyos axones proyectan y hacen sinapsis en forma ipsi y contralateral en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo anterior; esta vía se proyecta caudalmente a las áreas periventricular y tuberal hipotalámica (39). Los axones del área ventrotuberal proyectan al hipotálamo lateral y finalmente estas neuronas proyectan a través del tallo cerebral hacia las células de la columna intermediolateral de la médula, en el segmento torácico superior. Estas constituyen las neuronas preganglionares del sistema simpático cervical, cuyos axones salen de la médula por la raíz ventral y ascienden en dirección cefálica por el tronco simpático para hacer sinapsis en el ganglio cervical superior (GCS). De esta manera el GCS representa la vía final de la cadena de neuronas entre la retina y la glándula pineal (Fig 4). Estos axones postganglionares llegan a la glándula por la pared de sus arterias irrigantes y forman los nervios conarios del polo caudal (40). A través de estos terminales neurales, la luz inhibe la producción de melatonina y la oscuridad estimula su síntesis por medio de potenciales de acción que llegan a la glándula por la vía simpática descripta o desde el SNC. De esta manera, durante el día la producción de melatonina permanece muy

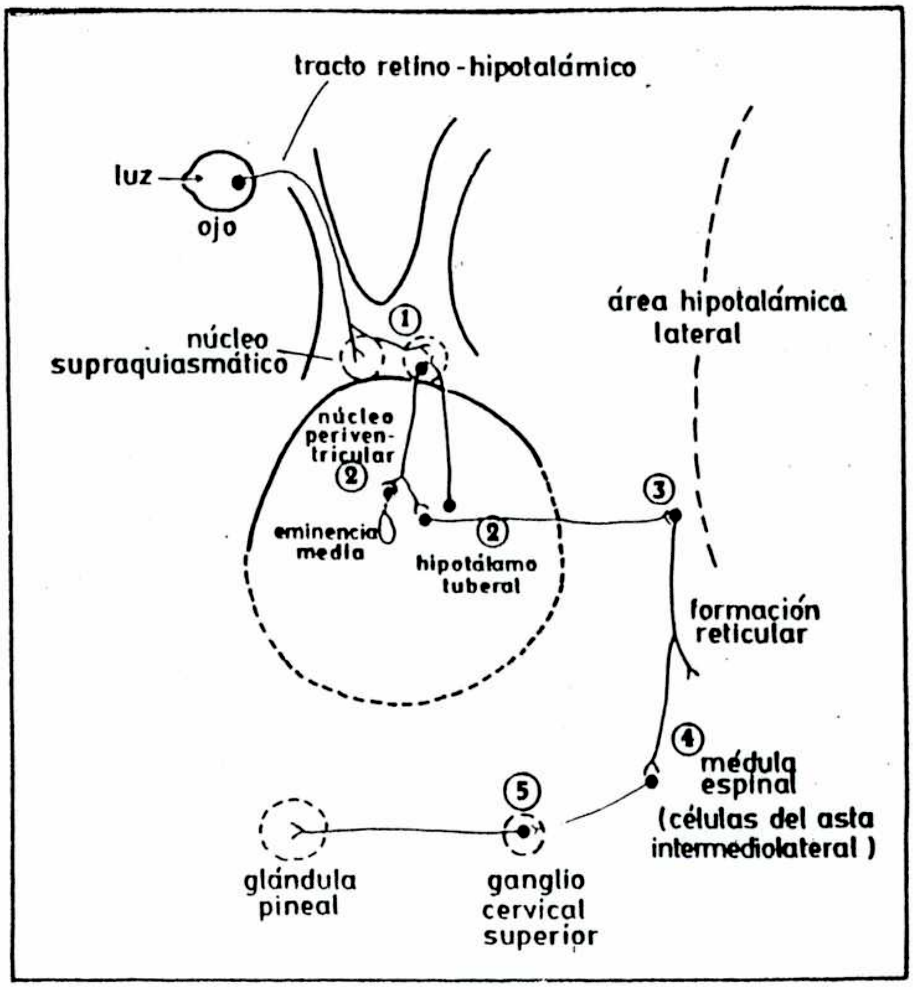

Fig. 4 Vía neural simpática del control de la funcidn pineal. Se designan las distintas etapas de la vía neural descriptas en el texto.

baja, y los valores más elevados se observan durante la noche (41).

La gangliectomía cervical superior bilateral, la descentralización ganglionar (sección de las fibras preganglionares) o la sección del nervio carotídeo interno, inhibe el aumento nocturno de la hormona pineal. Por el contrario, la estimulación eléctrica del tronco simpático o la liberación supraliminal de norepinefrina (NE) durante la degeneración anterógrada aumentan la producción de la hormona (41).

El ritmo en la síntesis de melatonina pineal es generado por el SNC y sincronizado por la información luz-oscuridad ambiental. Existe un ritmo endógeno en la producción de melatonina que persiste en ausencia del ciclo de luz-oscuridad aunque difiere ligeramente del ciclo de 24 horas (42). De esta manera, en condiciones de oscuridad prolongada, de daño retinal o ceguera, los impulsos eléctricos que llegan a la glándula se interrumpen intermitentemente y como consecuencia, la actividad rítmica pineal persiste, aunque el lapso entre dos picos sucesivos es algo mayor que 24 horas (43).

La estimulación de las fibras simpáticas postganglionares produce la liberación de NE, que por activación de receptores β_1 desencadena una cascada metabólica que involucra varias etapas (44-45): cambio en el potencial de membrana (46), aumento de la actividad de adenilciclasa (47) y niveles de AMP_c (48), fosforilación de histonas, aumento en la síntesis de ARN (49) y proteínas (50), y activación de las enzimas involucradas en la

síntesis de melatonina (SNAT (51) y HIOMT (52)). La inducción de la SNAT que ocurre tempranamente durante la fase de oscuridad se puede reproducir en cultivo por el agregado de dibutiril-AMP_c o agonistas β -adrenérgicos (53). La NE y los receptores β están acoplados rítmicamente en la producción de melatonina. El número de receptores β aumenta durante la segunda mitad de la fase de luz, la estimulación noradrenérgica se inicia en la fase de oscuridad y es seguida por una disminución ("down regulation") de receptores β en el transcurso de la noche (54).

Este esquema clásico (GCS -> NE ->Recept β ->efectos) ha sufrido importantes modificaciones por la incorporación de un creciente número de factores que controlan la síntesis de melatonina (55). En primer lugar, por observaciones neuroanatómicas y electrofisiológicas se ha demostrado la existencia de una inervación central pineal que contribuye al control de la actividad de la glándula (56,57). Esto correlaciona con la observación de varias poblaciones de terminales nerviosas, además de las clásicas con vesículas pequeñas de centro denso (catecolaminérgicas); se trata de terminales que contienen vesículas grandes de centro denso (peptidérgicas) y otras con vesículas pequeñas, claras que podrían tratarse de terminales colinérgicos y/o aminoacidérgicos. Sólo las típicamente catecolaminérgicas desaparecen luego de la gangliectomía cervical superior. Además, el receptor β-adrenérgico no es el único involucrado en la producción de melatonina. Se ha demostrado una actividad α_1-adrenérgica postsináptica (58, 59) facilitatoria que involu-

cra una serie de eventos demostrados glándula pineal (60): unión a receptores específicos (61), activación de fosfolipasa C (62) y sistema de señales vinculados al fosfatidilinositol, movilización de Ca^{2+}, activación de la proteína quinasa C y fosfolipasa A_2 (63), producción y liberación de prostaglandinas (64), tromboxanos y leucotrienos (65). Adicionalmente, se han descripto receptores dopaminérgicos de tipo D_2 en la glándula pineal bovina aunque su función no ha sido todavía aclarada (66).

Por otro lado, algunos de los neuropéptidos identificados en vesículas grandes de centro denso han sido asociados a un rol modulador de la actividad pineal; entre ellos, el VIP exhibe una potente actividad estimulante en la producción de AMP_c y de melatonina en la rata (67). Otro péptido, el neuropéptido Y (NPY), ha sido detectado en la glándula pineal por técnicas inmunohistoquímicas (68). En estudios recientes se ha demostrado que el NPY afecta la producción de melatonina pineal y, a bajas concentraciones, potencia el efecto de la NE (69). Otros péptidos involucrados en la fisiología pineal son la sustancia P, péptido inductor del sueño delta (DSIP) (71), la hormona α-melanocito estimulante, (MSH) y péptidos opioides (73). En este trabajo de tesis se presentan los resultados experimentales que llevan a suponer la participación de señales gabaérgicas intrapineales en el control de la función de la glándula.

En suma, estos resultados indican que muy posiblemente neurotransmisores distintos de la NE, algunos de ellos liberados por las fibras pinealopetales centrales, juegan un rol importante en

el control de la producción de melatonina en mamíferos (Fig 5).

Si bien la señal primaria que controla la amplitud y la longitud del pico de melatonina es la luz, varias observaciones indican que el ambiente endócrino participa de una manera aún no completamente elucidada, en la expresión final de la respuesta glandular. Algunos datos que ejemplifican esta afirmación son los siguientes: la amplitud del ritmo diurno plasmático de melatonina cambia significativamente dependiendo del estado del ciclo sexual en humanos (74) y en ratas (75); la ablación endócrina induce cambios en la biosíntesis de melatonina, dependiendo de la especie y glándula extirpada; en ratas, la hipofisectomía reduce la amplitud del pico nocturno de melatonina (76). La administración de varias hormonas produce cambios en distintos aspectos de la función pineal, incluyendo la liberación de melatonina (77). Estos cambios son producidos ya sea por una acción directa de la hormona sobre la célula pineal o bien por la modificación del tráfico de información que llega a la glándula a través de la vía neural (55).

I.1.d Fotoperiodicidad

Los ciclos estacionales en muchas especies que habitan en regiones no ecuatoriales, están controlados por los cambios anuales recurrentes en la longitud del día. Este fenómeno se denomina fotoperiodicidad. El ejemplo más obvio se encuentra en el ciclo reproductivo ajustado para garantizar la sobrevida de

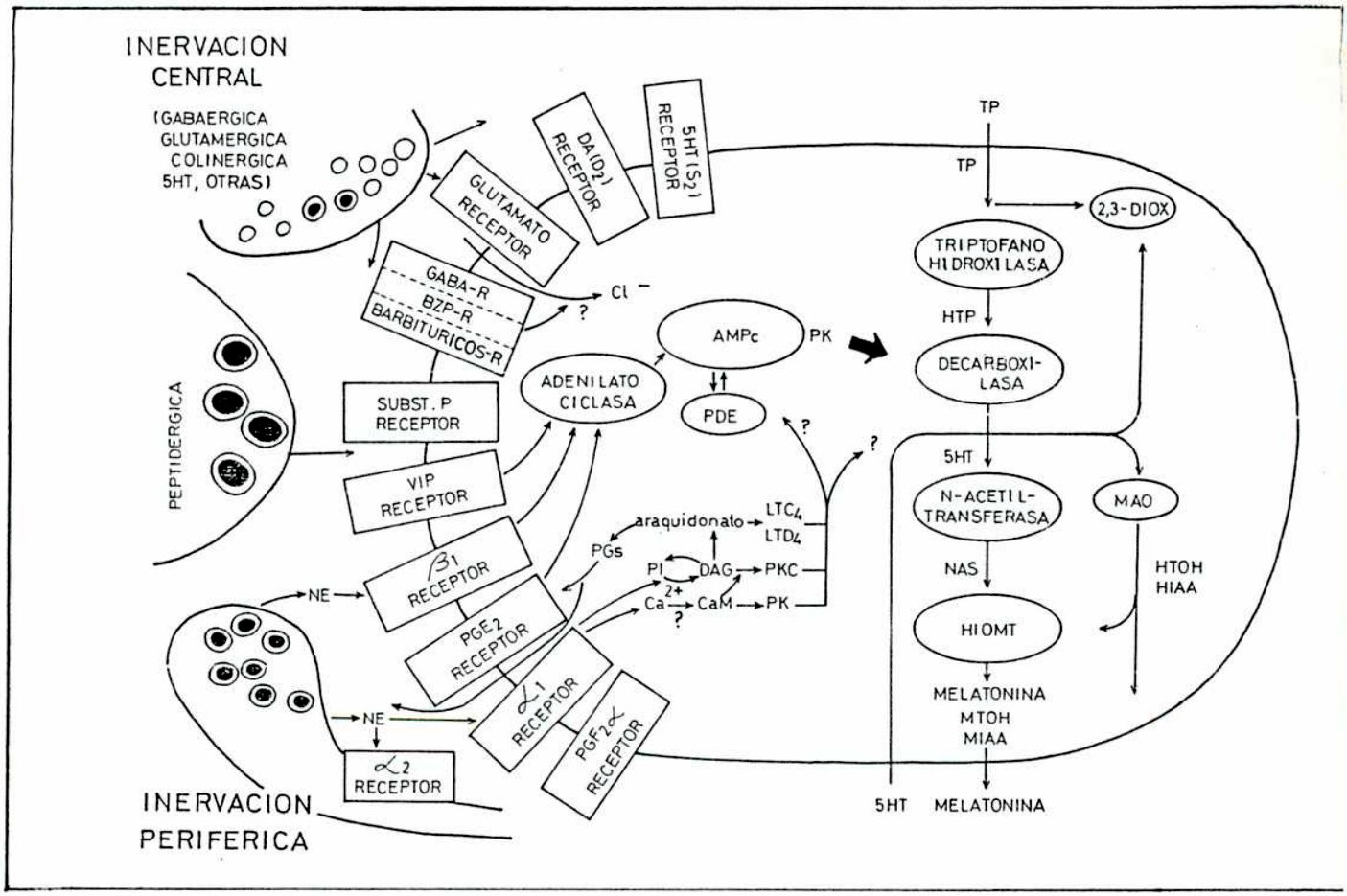

Fig. 5 Representación esquemática de la multiplicidad de señales que controlan la actividad de la glándula pineal.

la cría y del animal adulto. Otros fenómenos tales como el cambio en el color y crecimiento de pelaje, o distintos aspectos de la conducta, muestran variaciones estacionales dependientes de la señal luminosa (1,2). Los cambios en la longitud del día actúan de manera que controlan el desarrollo de estos eventos (78).

Se acepta actualmente que en la mayoría de las especies, la glándula pineal juega un rol esencial en la transmisión de la información fotoperiódica (79). Las variaciones de temperatura ejercen control sobre algunos ciclos estacionales y en esto también la glándula pineal juega un rol integrativo (80).

Los primeros experimentos, ya clásicos, fueron realizados en hámsteres. Estos animales privados de luz, ya sea por extirpación ocular o por exposición a fotoperíodos de menos de 12,5 horas de luz por día (fotoperíodo corto, no estimulatorio) presentan regresión gonadal en 8-10 semanas (81). En hámsteres pinealectomizados la regresión gonadal asociada al fotoperíodo no se observa, indicando que los efectos de la oscuridad sobre el sistema neuroendócrino están mediados por la pineal (82). La pinealectomía en otras especies como la oveja o el visón, destruye la capacidad de percibir cambios en el fotoperíodo. Los efectos de la pinealectomía son revertidos por la administración de melatonina en condiciones adecuadas.

Ratas pinealectomizadas sometidas a 12-14 horas de luz por día no presentan, salvo excepción, cambios endócrinos permanentes. Estas observaciones sugieren que en la rata, la ausencia

de la pineal es compensada por el desarrollo de un nuevo estado de equilibrio entre señales que modulan la función hipotalámica. Se ha propuesto que la rata, por tratarse de un animal de hábitos nocturnos en su ambiente natural, está en las condiciones de luz del laboratorio sujeta a fotoperíodos que determinan una depresión artificial de la actividad pineal (82, 83). En ciertas condiciones experimentales (desnutrición, anosmia o tratamiento neonatal con esteroides), el hipotalámo de la rata es más sensible a la melatonina endógena o a su administración exógena (82, 83, 84).

Especies de vida larga parecen tener un ritmo anual endógeno que persiste en ausencia de pineal, pero desfasado del ciclo anual preciso (85). Por lo tanto el estudio del efecto de la pinealectomía ha requerido experimentos de larga duración, cuidadosamente diseñados para ser puestos de manifiesto.

Se ha considerado que los humanos no son una especie fotosensible. Ejercemos, particularmente en la vida urbana (y en ausencia de crisis energética), un control considerable sobre el medio ambiente, en lo que se refiere a la luz y a la temperatura. En regiones árticas, donde las variaciones de la longitud del día son mayores, se han encontrado variaciones estacionales en los nacimientos. Un estudio detallado demuestra que la concepción ocurre durante todo el año, pero con dos máximos, uno en diciembre (noche ártica) y el otro en abril (retorno del sol) (86). En el norte europeo se han observado también 2 picos, uno mayor en mayo-junio y otro menor en diciembre. Sin embargo, aun

cuando podría suponerse una influencia fotoperiódica, hay que tener en cuenta la participación de factores económicos y culturales en el control de nuestros ciclos. Los motivos esencialmente biológicos de esta periodicidad en poblaciones humanas están avalados, empero, por la clara circanualidad de la frecuencia de nacimientos múltiples, un índice de la sobreestimulación periódica ovárica.

El cambio en la longitud del fotoperíodo es percibido mediante la secreción de melatonina, cuya producción en casi todas las especies, correlaciona con la longitud de la noche (79). En realidad queda todavía por resolver cómo el mensaje melatonina es "leído" por los órganos blanco; existen actualmente dos hipótesis llamadas (a) de duración (87), (b) de coincidencia (88).

Según la primera, el mensaje importante que recibe el organismo desde la pineal, es la duración nocturna de la producción elevada de melatonina. Considerando que, según se ha demostrado en muchas especies, ella es proporcional a la longitud de la noche, la duración de la producción elevada de melatonina puede proveer importante información respecto a la estación del año. Esta hipótesis permite explicar por ejemplo, la regresión gonadal inducida por la inyección diaria al final de la tarde en hámsteres mantenidos en fotoperíodo largo (más de 12,5 horas de luz diaria), en los cuales la hormona administrada se suma al pico endógeno y produce como resultado la prolongación de la señal elevada de melatonina.

La hipótesis alternativa ha surgido para explicar cómo la glándula pineal da señales al organismo sobre la estación del año. Se postula la existencia de 2 ritmos endógenos: un ritmo de melatonina de 24 horas y un ritmo de sensibilidad a la hormona (ventana de sensibilidad). De acuerdo a este esquema, la respuesta del organismo a un determinado mensaje de melatonina puede ser comprendido sólo cuando la señal coincide con la ventana de sensibilidad del órgano efector (coincidencia interna). En este caso, la melatonina administrada a la tarde produce un corrimiento del período de sensibilidad a la hormona, en fase con los niveles endógenos. Si a lo largo del año, la duración de los niveles elevados de melatonina y la duración de la ventana de sensibilidad varían, las posibilidades de que estos fenómenos se superpongan, también fluctúa sobre bases estacionales. De esta manera, una determinada onda de secreción de melatonina puede se "leída" o "ignorada", dependiendo de la capacidad de respuesta del órgano blanco.

La hipótesis de la coincidencia interna ha permitido explicar algunos fenómenos que permanecen inexplicables de acuerdo a la hipótesis de duración. Por ejemplo, existen situaciones durante las cuales una señal prolongada de melatonina elevada, es ignorada por el organismo (período refractario) (82); según esta hipótesis, la refractariedad puede interpretarse como falta de coincidencia entre el mensaje y la sensibilidad a la hormona (Fig 6).

No está completamente aclarado cuál de las hipótesis expues-

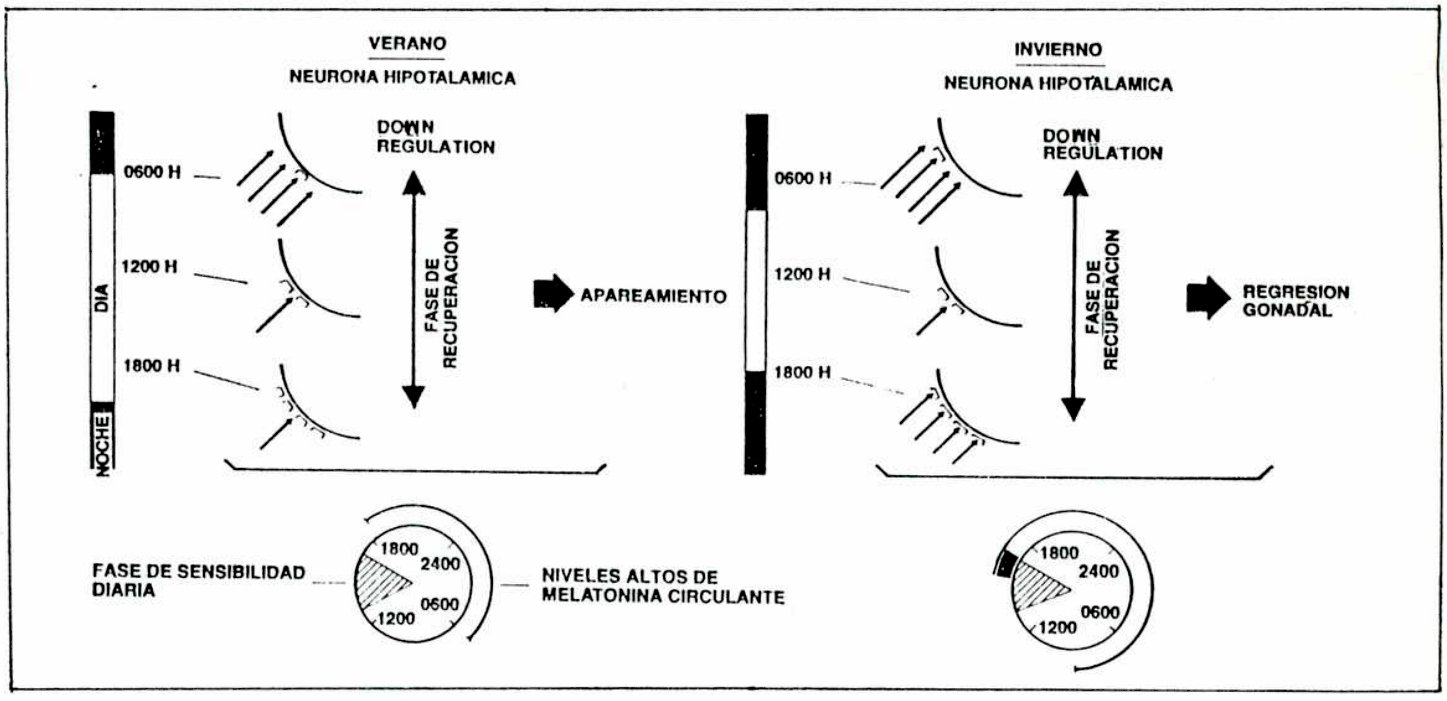

Fig. 6 Hipótesis sobre el control de la estación de apareamiento por la glándula pineal en apareadores estivales. Flechas: niveles circulantes de melatonina, ganchos: receptores celulares para la melatonina. Durante el verano no hay coincidencia entre los niveles elevados de melatonina circulante y la fase de sensibilidad a la hormona. Durante el invierno, y con el comienzo más temprano de la noche, ambos acontecimientos coinciden produciéndose regresión gonadal.

tas explica la regulación de cambios estacionales en la fisiología de los organismos. Pero no caben dudas de que la pinealectomía, o sea la ausencia de melatonina, provoca en muchas especies una fisiología no estacional o con ritmos anuales inapropiados (82).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, la administración exógena de melatonina busca reproducir la secreción de larga duración de la noche de invierno o de corta duración de la noche de verano (Fig. 4). Por ejemplo, la administración diaria en el forraje a ovejas intactas (un apareador estacional de días cortos), durante las últimas horas de la tarde, desde mediados de junio (hemisferio norte) produce, como un fotoperíodo invernal artificial, la aparición de ciclos estrales tempranos. El avance del estro inducido de esta manera es de 6-8 semanas, provocando un adelanto en el nacimiento de la cría (89); se ha observado asimismo un aumento en el número de crías por oveja, probablemente por el avance del pico estacional en la frecuencia ovulatoria (90).

Las variaciones dependientes del fotoperíodo en el crecimiento del pelaje en algunas especies (por ej. el visón) puede ser inducida por la manipulación de los niveles de melatonina (91). La hormona pineal es capaz de replicar el efecto del fotoperíodo sobre la secreción de prolactina, que podría mediar a su vez, el efecto del fotoperíodo sobre el pelaje (92).

Así como la luz sincroniza los ritmos estacionales (circanuales), y la melatonina juega un rol esencial en esta función,

es posible suponer también su participación en la sincronización de ritmos diarios de luz-oscuridad (circadianos). En algunas aves y vertebrados inferiores, la pineal tiene una función preponderante en la organización de ritmos diarios, comportándose en algunos casos como un generador de ritmos (93) y en otros como un agente de acoplamiento (94). El cultivo de pinealocitos de pineal de pollo es capaz de mantener la producción rítmica de melatonina "in vitro" (95); esto no se observa en pineales de mamíferos.

La pinealectomía en ratas induce una resincronización rápida de algunos ritmos circadianos luego de un cambio de fase. La administración diaria de bajas dosis de melatonina a ratas que, en estado de oscuridad permanente expresan el ritmo endógeno de la actividad rítimica diaria de 25 h ("free running"), produce sincronización a un ritmo de 24 horas (96). Esta capacidad de resincronizar es característica de los llamados "zeitgebers" ("dadores de tiempo"), propiedad de la melatonina que es compartida por una familia de drogas sobre las que se discutirá más adelante, las benzodiazepinas (BZP) (97).

En este contexto, se ha propuesto a la administración farmacológica de melatonina como tratamiento de la desincronización provocada por vuelos transmeridianos ("jet lag"), con resultados promisorios que consisten en la mejoría de la latencia y calidad del sueño y, del estado anímico general (98).

I.1.e Efectos de la glándula pineal

Existen indudables influencias fotoperiódicas en el desarrollo de la pubertad, por ejemplo, en ovejas (99), que pueden ser atribuidas a la pineal en su rol de transductor neuroendócrino. La pineal también ha sido involucrada en el desarrollo puberal en humanos y ratas, especies de escasa fotoperiodicidad (100). En rata se ha demostrado que la administración de melatonina en dosis cercanas a las fisiológicas, y como para reproducir un perfil de larga duración (noche larga) tiene un efecto retardador del desarrollo puberal determinado por distintos parámetros (101). Aún no resulta claro si esto refleja un efecto antigonadal de la hormona pineal o una señal particular fotoperiódica.

Evidentemente, no resulta sencillo el diseño de experimentos de este tipo en humanos; existen datos sobre tumores pineales asociados con pubertad precoz o retardo en el desarrollo puberal, pero el efecto de los tumores pineales (muchos de ellos cariocarcinomas con sitio de síntesis ectópica de gonadotrofina coriónica humana) es complejo y pueden no necesariamente involucrar a la melatonina (102). Algunos datos experimentales indican que los niveles de melatonina circulante declinan en el curso del desarrollo puberal en humanos (103); esto podría indicar un efecto inhibitorio sobre la melatonina aunque no prueba una relación causal.

Trabajos ya clásicos, indican que la melatonina es, en dosis farmacológicas, un inhibidor de la ovulación (104). El hallazgo de niveles preovulatorios bajos de melatonina en humanos (105), ha sido confirmada en ratas (106). La melatonina modifica la función ovárica y testicular a varios niveles del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (107, 108).

Los efectos de la pineal no se restringen, sin embargo, a la esfera reproductiva. Diversos aspectos de los ejes hipotálamo-hipófiso-tiroideo e hipotálamo-hipófiso-suprarrenal son afectados por la manipulación de la pineal (84, 109). Los datos mencionados se resumen en la tabla I. Distintos estudios puntualizan un rol significativo pineal sobre diversos aspectos de la excitabilidad del SNC que le han valido la caracterización como órgano "tranquilizante" (110). Estos incluyen una función depresora general, revelable en trazados electroencefalográficos epileptoides luego de la pinealectomía (111). Asimismo, la destrucción electrolítica de la glándula provoca una actividad eléctrica anormal en el hipocampo (112). La inyección intraventricular de un anticuerpo antimelatonina produce un electroencéfalograma de tipo epileptoide en corteza cerebral de rata (113); se observa por otro lado inducción de sedación y sueño por inyección de melatonina (114). Su acción se exterioriza también, en un efecto potenciador del sueño inducido por barbitúricos en ratones (115), así como en la precipitación de crisis convulsivas a menudo fatales, en ratas paratiroidectomizadas luego de la ablación pineal (116). La distribución de sueño lento y paradojal se afecta por la pinealectomía (117).

Tabla I. Efectos endócrinos de la pinealectomía y administración de melatonina.

PINEALECTOMIA	INYECCION DE MELATONINA
Eje Hipotálamo-Hipofisario-Gonadal	
Bloqueo de la involución gonadal que sigue a fotoperíodos cortos o ceguera en el hámster. Aumento de la secreción de PRL, LH, FSH y testosterona.	Inyectada hacia el final del período de luz u oscuridad produce involución gonadal y disminución o alteración de gonadotrofinas en hámster.
Disminución de la sensibilidad al "feedback" por testosterona. Desaparición de la respuesta gonadal a una única inyección vespertina de melatonina en el hámster.	Implantada en cápsulas subcutáneas previene la regresión gonadal producida por privación de luz o inyecciones de melatonina en hámster.
Desincronización de la estación de apareamiento en el hámster.	Retarda la aparición de la pubertad en hámster y rata.
Apertura vaginal precoz, ovulación temprana luego de la inyección de suero de yegua preñada en rata. Liberación de LH alterada en primavera en la rata.	Apertura vaginal retardada en rata. Disminución de peso ovárico y uterino y de extendidos vaginales en estro en la rata.
Reversión del efecto inhibitorio que la oscuridad asociada a la anosmia o desnutrición tienen sobre el peso gonadal en la rata.	Efectos potenciados sobre el peso gonadal y liberación de PRL en ratas desnutridas y anósmicas; inhibe la androgenización de ratas hembra recién nacidas.
Aumento de la testosterona plasmática.	Disminución del peso testicular y testosterona circulante e inhibición de la esteroideogénesis testicular en rata.

Picos de LH y FSH modificados en ratas adrenolectomizadas. Elimina el efecto de anosmia sobre PRL plasmática en ratas seudopreñadas. Abolición del pico nocturno de PRL en ratas machos. Modifica los niveles de LH y FSH en ratas ciegas y anósmicas. Afecta la liberación de PRL inducida por melatonina en hembras castradas. Aumenta la respuesta de LH y FSH, y disminuye la de PRL ante el stress.	Inhibe la liberación de LH y ovulación en ratas. Aumenta el contenido de LHRH. Disminuye FSH en machos. Efecto dosis-dependiente sobre PRL en la misma especie.
Liberación aumentada de LH, PRL, progesterona y estradiol durante la preñez en rata.	Revierte los efectos de la pinealectomía sobre LH y FSH durante la preñez de la rata.
Sincronización alterada del ciclo reproductivo anual en el hurón. Inducción o regresión gonadal alteradas por fotoperíodos artificiales en esta especie.	Regresión gonadal en el hurón al inyectarse en la 8a. hora del período de luz.
Ritmo anual de la reproducción alterado en ovinos, caprinos, ciervos, equinos, marsupiales, lagomorfos, ratón de campo y otros múridos.	Restablecimiento por inyecciones o perfusiones diarias del ritmo anual de la reproducción en estas mismas especies.
	Disminución de la liberación de LH en el hombre. Inhibición de la secreción de progesterona luteal.

Eje Hipotálamo-Hipofisario-Adrenal

Hiperfunción adrenal en la rata. Aumento de ACTH plasmático en ratas adrenalectomizadas y anósmicas. Aumento de la *secreción de corticoides y* aldosterona. Aumento de la renina plasmática. Hipertensión.	Disminución del peso adrenal y de la corticosterona plasmática. Inhibición de la biosíntesis de corticoides *in vitro* . Reversión de la hipertensión en ratas pinealectomizadas.

Eje Hipotálamo-Hipofisario-Tiroideo

Abolición de los efectos de la oscuridad sobre la secreción de tiroxina en el hámster.	Disminución de tiroxina plasmática en hamster.
Signos morfológicos de hiperfunción tiroidea en la rata. Cambios transitorios en TSH plasmático y PBI. Respuesta aumentada de TSH a stress en la misma especie.	La inyección intracerebroventricular disminuye TSH plasmático en la rata. Disminución del AMPc tiroideo y de la liberación de tiroxina.

Otras Funciones Hipotálamo-Hipofisarias

Aumento del peso y mitosis hipofisarias y de la síntesis de proteínas en la rata.	Disminución de la síntesis de proteínas hipotalámicas en rata. Neurosecreción y transporte axonal modificados.
Bloqueo de la liberación de GH en ratas ciegas. Modificaciones en el ritmo diario de secreción de GH en rata.	Revierte la estimulación de GH plasmático por indolaminas o insulina en varias especies inclusive el hombre.
Aumento de la captación de estradiol por la adenohipófisis.	Disminuye la captación de estradiol. Aumenta la liberación de vasopresina en la rata.

Páncreas

Hiperinsulinemia en la rata. Reducción de la tolerancia a la glucosa. Aumento de antagonistas insulínicos en plasma. Aumento de la captación de tirosina por los islotes pancreáticos en la rata.	Bloqueo de la liberación de insulina *in vitro* en la rata.

La secreción rítmica de melatonina y su control por la luz a través de neuronas simpáticas han adquirido en forma reciente, importante interés en estudios psiquiátricos. Algunos autores sugieren que los niveles de melatonina nocturna están disminuidos en pacientes depresivos, en los cuales la amplitud del ritmo secretorio está atenuada (118). Se ha sugerido una relación inversa entre los ritmos de melatonina y cortisol. Teniendo en cuenta la hipótesis serotoninérgica y noradrenérgica de la depresión, (ambos productos involucrados en la producción de melatonina), la disminución de los niveles de la hormona pineal es esperable. Algunos datos aún no plenamente confirmados, sugieren altos niveles de melatonina en manía (119), y bajos niveles en esquizofrenia (120).

La participación potencial más interesante de la glándula pineal en patologías psiquiátricas es el llamado síndrome de depresión estacional o enfermedad afectiva estacional ("seasonal affective disorder", SAD). Este es un cuadro recurrente de depresión invernal con algunas características atípicas, como ganancia de peso y apetito aumentado por hidratos de carbono. Por analogía con los efectos fotoperiódicos estacionales, algunos autores supusieron un vínculo entre este cuadro y la longitud del día invernal (121, 122). El tratamiento propuesto consiste en exponer a los pacientes a luz brillante (más de 2500 lux), durante 3 horas a la tarde y 3 a la mañana de manera de extender el fotoperíodo natural, obteniéndose una remisión significativa de los síntomas. Hay, sin embargo, debate sobre la

participación pineal; el tratamiento farmacológico que suprime la producción de melatonina no fue siempre efectivo en modificar el SAD (123), y el tratamiento con luz durante 6 horas en el medio del día, (que no modifica los niveles de melatonina) fue igualmente exitoso (124). No cabe duda de que este es un terreno cuya exploración arrojará resultados de importancia sobre la fisiología pineal en la especie humana.

Otro área de interés en el campo psiquiátrico es la enfermedad maníaco-depresiva; estos pacientes son supersensibles a la luz, con supresión de la producción nocturna de melatonina (125).

I.1.f Mecanismo de acción de la melatonina.

Una de las principales cuestiones que concita la atención en el terreno de la investigación pineal es la elucidación del mecanismo de acción de la melatonina. Las evidencias experimentales indican que la melatonina actúa sobre el SNC para producir sus efectos neuroendócrinos y conductuales.

En el hámster dorado, la longitud del fotoperíodo modifica el contenido de LHRH, sin alterar la respuesta hipofisaria al péptido (84). En la oveja, donde cada pulso de LH es precipitado por uno de LHRH, la melatonina produce modificaciones sobre la LH a nivel central y no hipofisario, como lo revela la falla de un bolo de melatonina en alterar la respuesta de LH a la administración de LHRH (126). Esta acción no hipofisaria,

probablemente hipotalámica, está avalada por los significativos efectos de la hormona pineal al ser implantada en la región retroquiasmática de diversos mamíferos (127).

La primera descripción de receptores de melatonina en membranas hipotalámicas se realizó en 1978 (128, 129). Se identificaron receptores altamente específicos en hipotálamo medio basal (HMB) con una concentración de 15-20 fmol/mg de prot y un Kd = 12 nM. Más tarde se identificó "binding" de ^{3}H-melatonina en citosol de cerebro humano, bovino y de rata (130). La posible coexistencia de receptores citosólicos y de membrana fue confirmada en hígado de rata, hipófisis e hipotálamo (131).

Es importante señalar que la caracterización de sitios receptores mediante el uso de ^{3}H-melatonina ha sido dificultosa por la inestabilidad del radioligando disponible. En la actualidad se han logrado mayores avances con el uso de ^{125}I-melatonina, mediante la cual distintos autores describieron la presencia de sitios receptores de membrana en sinaptosomas de cerebro de rata con un Kd = 38 nM (dentro del rango obtenido con el ligando tritiado) pero con una concentración 10 veces mayor que la descripta (132). Aunque la caracterización del receptor de melatonina es un punto todavía en discusión, existen evidencias a favor del rol fisiológico del sitio receptor en membranas de cerebro. Los receptores tienen máxima concentración al final de la tarde en cerebro de rata y de hámster, coincidiendo con el momento de máxima respuesta a la administración de melatonina (133). La supresión del ritmo de melatonina por ablación o

desnervación de la glándula o por exposición continua a la luz, elimina el efecto de una única inyección diaria de melatonina y la diferencia mañana-tarde en la concentración de receptores (134). Asimismo, la ovariectomía en ratas provoca una disminución, reversible por estradiol, del "binding" de ^{125}I-melatonina a membranas hipotalámicas sin evidenciar cambios en otras regiones cerebrales (135). Estas observaciones parecen indicar el rol fisiológico del presunto receptor de melatonina en membranas de estructuras neuroendócrinas.

En cuanto a los eventos post-receptor, la primera indicación sobre la participación de nucleótidos cíclicos como segundos mensajeros de la acción de la melatonina se obtuvo en 1969 (136), observándose una disminución en el contenido de AMP_c inducido por MSH por efecto de melatonina en la piel de anfibios. La pinealectomía aumenta, y la inyección de melatonina deprime, la síntesis de AMP_c en HMB de rata (137). Este efecto fue también examinado en cultivos de astroglía en los que la melatonina produjo una disminución significativa del estímulo β-adrenérgico sobre el contenido de AMP_c (138). En trabajos más recientes se propuso que el efecto de la melatonina está mediado por la interacción con una proteína G_i (139).

Otro nucleótido cíclico afectado por la melatonina es el GMP_c. La inyección de melatonina en la cisterna magna de conejos provoca un incremento en la concentración de GMP_c en el LCR (140). Se demostró luego, que la melatonina "in vitro" a una concentración de 10 nM, aumenta significativamente la síntesis

de GMP_c HMB de rata (141) y aumenta la actividad guanilato ciclasa en adenohipófisis, ovario, testículo, tiroides, intestino e hígado (142).

Por otro lado, ha sido demostrado que la hormona pineal, a partir de una concentración de 10 nM, disminuye la liberación espontánea e inducida por NE de prostaglandina E_2 (PG E_2) (143) en HMB de rata, y deprime la actividad ciclooxigenasa (144). Estos resultados se correlacionan con cambios "in vivo" en la concentración de PG E_2 en LCR de conejos tratados con melatonina (145).

La melatonina inhibe la liberación, inducida por estímulo eléctrico o de K^+ elevado, de dopamina en HMB (146) y en retina, siendo este efecto revertido por el ionóforo de Ca^{2+}, A23187 (147), lo que sugiere que el efecto ocurre a nivel del canal de Ca^{2+}. Efectivamente, se demostró que la hormona pineal inhibe el influjo de $^{45}Ca^{2+}$ en sinaptosomas de cerebro de rata estimulado por una concentración despolarizante de K^+, sin modificaciones en el "uptake" basal (148). Estas evidencias indican que un posible sitio de acción, es la modificación directa o indirecta de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes. En resumen, estos resultados indican en forma conjunta, que la melatonina actúa a través de receptores específicos ubicados sobre neuronas y/o células gliales, estableciendo un "tono" que modula la recepción del mensaje principal de la vía neural afectada. En cuanto al evento primario postrreceptor, la relación directa o indirecta con

canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje es de interés, ya que el Ca^{2+}, a través de la actividad de distintas enzimas (proteínquinasa dependiente de calmodulina, proteínquinasa C) afecta múltiples funciones de las membranas sinápticas. Por ejemplo, una disminución en la entrada de Ca^{2+} puede modificar la actividad adenilato ciclasa, guanilato ciclasa, ciclooxigenasa, lipooxigenasa y/o diversas fosfolipasas (149).

En este trabajo de Tesis se postula al sistema gabaérgico central como un sitio primario de acción de la melatonina, analizaremos por lo tanto, las características de dicho sistema.

I.2 SISTEMA GABAERGICO

I.2.a Conceptos generales

Generalmente se concibe a la actividad del SNC como un conjunto ordenado de excitaciones; los estímulos sensoriales se convierten en impulsos eléctricos que son transportados entre células nerviosas antes de desencadenar una respuesta. Esta es sólo una sobresimplificación esquemática, ya que existe en realidad una clase entera de operaciones en el sistema nervioso que no son excitatorias sino inhibitorias, mediadas por un tipo especial de neuronas (neuronas inhibitorias), que actúan a través de la disminución o abolición de la probabilidad de descarga liberación de moléculas específicas llamadas neurotransmisores

inhibitorios; entre este tipo de moléculas se encuentra el ácido γ-aminobutírico (GABA).

El GABA fue reconocido como neurotransmisor inhibitorio luego de una larga serie de experimentos comenzados en 1950 (150). En los últimos años, el uso de técnicas de biología molecular y de electrofisiología han permitido un gran avance en el conocimiento del sistema gabaérgico, los receptores a los cuales se une el GABA y las características de las respuestas biológicas asociadas a este transmisor. Este avance ha permitido un mayor conocimiento de la función de la red inhibitoria en la que actúa el GABA, no sólo como freno de la actividad neural, sino también como seleccionador de respuestas específicas de la red excitatoria que transmite la información desde el mundo exterior (151).

En la investigación del SNC inicialmente se prestó mucha atención al camino excitatorio. Ya en la década del 40 se reunió bastante información sobre la generación y transmisión de impulsos entre neuronas (152). Una señal excitatoria se transmite a lo largo de una neurona con un cambio eléctrico. En estado de reposo una neurona tiene un potencial eléctrico negativo respecto al exterior celular, y esta diferencia es mantenida a expensas de bombas y canales que distribuyen iones (Na^+, K^+, Cl^-) diferencialmente entre el interior y el exterior de la célula. Cuando un impulso eléctrico o potencial de acción pasa a través de la neurona, hay apertura o cierre de canales que permiten el flujo de iones, lo que resulta un cambio

del potencial eléctrico que se hace positivo respecto al exterior. El potencial de acción viaja desde el cuerpo hacia el axón, hasta alcanzar el botón terminal donde se produce la liberación del neurotransmisor hacia el espacio sináptico. El transmisor difunde a través de la sinapsis y se une a un receptor específico de la neurona postsináptica; todo este proceso ocurre en milésimas de segundos.

Sin embargo, no todas las sinapsis actúan de esta manera, ya que muchas de ellas bloquean la actividad postsináptica. En la década del 50 surgieron las primeras evidencias sobre el rol del GABA como neurotransmisor inhibitorio (150). Se observó inicialmente una alta concentración de GABA en tejido cerebral de mamíferos. Su ausencia en otros tejidos llevó a postular su específica participación en la actividad del SNC, aunque dada la enorme complejidad de esta estructura, fue muy difícil en esta etapa inicial sugerir un posible rol para el γ-aminoácido. Afortunadamente se obtuvo un buen modelo de trabajo en organismos más simples como los crustáceos.

Las fibras musculares de la langosta reciben tres entradas neurales distintas. Los axones excitatorios se extienden desde los ganglios centrales a las fibras musculares, y su activación provoca la contracción muscular. Un segundo tipo de neuronas se extiende desde el músculo hasta los ganglios centrales (denominadas neuronas del receptor de estiramiento), y llevan información sobre la longitud del músculo a los nodos centrales. Un tercer grupo consiste en interneuronas inhibitorias que están

conectadas tanto a las fibras musculares como a los receptores de estiramiento, de modo tal que cuando descargan, inhiben la actividad de ambos tipos celulares. Varias líneas de evidencia demostraron en forma concluyente, que el GABA es el neurotransmisor inhibitorio del tercer componente de este sistema. El GABA agregado a una preparación aislada de fibras musculares y neuronas suprime la respuesta de ambas. Un alcaloide de origen natural, la picrotoxina, que bloquea la acción del GABA, elimina la acción de los axones inhibitorios en forma específica y reversible. A su vez, se demostró la presencia de GABA y su enzima de síntesis glutamico descarboxilasa (GAD) en las neuronas inhibitorias, y no en las excitatorias. Finalmente se obtuvo una preparación neuromuscular de crustáceo separado del resto del tejido, en la cual se demostró que sólo la estimulación de axones inhibitorios provoca la liberación de GABA. Todas estas evidencias en conjunto, demostraron el rol inhibitorio del GABA en un sistema neuronal bien caracterizado (153, 154).

A partir de los años 60 y luego de los avances mencionados se encaró el estudio del sistema gabaérgico en el SNC de los mamíferos. Una de las áreas que recibió mayor atención es la capa externa de la corteza cerebelar. La corteza cerebelar participa en la coordinación de la actividad muscular, a través de la conexión con estructuras cerebrales superiores. De las neuronas que forman la corteza cerebelar, sólo las células de Purkinje son neuronas de proyección que terminan en estructuras llamadas

núcleos cerebelares profundos, de manera tal que la corteza del cerebelo sólo puede influir a otras estructuras centrales a través de las células de Purkinje y exclusivamente en forma indirecta, ya que éstas proyectan a los núcleos cerebelares. En 1960, Ito y colaboradores demostraron que la estimulación de las células de Purkinje provoca una disminución en la frecuencia de descarga en las células de los núcleos profundos. De esta manera, dado el rol de las células nucleares como neuronas de proyección cerebelosa, se postuló que la influencia de la corteza cerebelosa sobre estructuras cerebrales es de tipo inhibitorio (155). El paso siguiente fue la identificación del neurotransmisor involucrado como el GABA, para lo cual, y siguiendo el modelo descripto en el trabajo de crustáceos, se demostró que el agregado exógeno de GABA en los núcleos cerebelares producía una inhibición en la frecuencia de descarga y que este efecto era bloqueado por picrotoxina. Se demostró también la presencia de GABA y GAD en células de Purkinje, y finalmente se verificó que la estimulación de este tipo celular provoca la liberación de GABA (156, 157).

La neuronas gabaérgicas se distribuyen profusamente en todo el SNC, principalmente como interneuronas inhibitorias a nivel supraespinal y algunas vías de proyección (vía estriato-nigral, neuronas de Purkinje y vía hipotálamo-cortical), representando en alguna porción hasta un 20-40% de las sinapsis. Existe una hipótesis atractiva para explicar el predominio de las sinapsis inhibitorias en el sistema nervioso (158) y los efectos globales

y dispersos que se obtienen por su bloqueo (159). El modelo postula sinapsis inhibitorias tónicas que controlan al circuito responsable de una determinada actividad. Una segunda neurona inhibitoria fásica y regulable, permitiría a través de la inhibición de la primera neurona la activación del circuito completo. Esta teoría de la desinhibición supone la existencia de circuitos neuronales que codifican respuestas específicas (160). La puesta en marcha de la segunda neurona inhibitoria es la que posibilita la aparición de la conducta codificada por el circuito. Por otro lado, este modelo permite también explicar los profundos efectos de liberación (p. ej., convulsiones) que se observan cuando se administran antagonistas gabaérgicos. De esta manera, la respuesta conductual no es homologable a los efectos electrofisiológicos: una acción electrofisiológica inhibitoria podrá tener como correlato respuestas conductuales excitatorias, presentando una salida final que cubrirá un rango variable desde la respuesta conductual activa hasta una respuesta de inactividad. En síntesis, y de acuerdo a este esquema, el resultado final de la administración de una droga que potencia la actividad de las sinapsis inhibitorias dependerá del estado de funcionamiento de las distintas sinapsis inhibitorias, pasibles de ser moduladas y de los distintos circuitos neuronales regulados por el mecanismo de desinhibición (160).

Existen elevadas concentraciones de GABA en el hipotálamo. Este hecho despertó interés desde el el punto de vista neuroendocrinológico, en particular durante la presente década. Unos 10

años atrás, era claro que drogas con actividad sobre el sistema gabaérgico central podían afectar la secreción de diversas trofinas hipofisarias, aunque el significado fisiológico de estas observaciones fue incierto. El ímpetu mayor para los estudios fisiológicos provino de la presunción acerca de la existencia de neuronas gabaérgicas entre los terminales neurosecretorios de la eminencia media (161, 162). Sin embargo la demostración formal de este hecho fue demorada por la carencia de métodos inmunocitoquímicos adecuados. Se conocía desde tiempo atrás, que cantidades significativas de GABA podían medirse en diversas regiones hipotalámicas, y que el GABA radiactivo era captado en sitios de alta afinidad localizados en terminales de la eminencia media (163, 164). El desarrollo de anticuerpos específicos para la GAD permitió caracterizar una inervación significativa gabaérgica en la totalidad de los núcleos hipotalámicos. Si bien el sitio de origen de estos terminales no es conocido en su totalidad, la mayoría de ellos pertenece a neuronas de tamaño pequeño o intermedio ubicados en el hipotálamo basal y posterior. Existe una abundante población de fibras gabaérgicas proyectando a la capa externa de la eminencia media y contactando con los terminales del sistema parvicelular hipotalámico; asimismo, algunas de estas fibras terminan sobre capilares del plexo primario del sistema porta hipofisario (161, 162). Por ejemplo, hay una abundante y significativa asociación de terminales dopaminérgicos y gabaérgicos en la zona externa de la eminencia media. Recientemente se

ha descripto neuronas gabaérgicas del hipotálamo basal que concentran estradiol con gran afinidad, sugiriendo que podrían estar involucradas en el control de la secreción de gonadotrofinas y prolactina (162). Se ha demostrado también que los catecolestrógenos, metabolitos estrogénicos de significado neuroendócrino, tienen un efecto específico sobre neuronas gabaérgicas hipotalámicas en el cobayo (165).

Sobre la base de experimentos de lesión y mapeo bioquímico ha sido caracterizado un contingente de fibras gabaérgicas de la eminencia media que se originan en el núcleo arcuato. Estas fibras hacen sinapsis axo-dendríticas y axo-somáticas con neuronas neurosecretorias, y también terminan en la proximidad de los vasos sanguíneos. La posibilidad de la secreción de GABA hacia los vasos porta hipofisarios fue inicialmente sugerida por las altas concentraciones del aminoácido detectables en la adenohipófisis (166). Asimismo, el GABA es detectable en la sangre portal y sus niveles se elevan por encima de los de la sangre periférica luego de la inhibición de la enzima de degradación GABA-transaminasa (GABA-T) o de la estimulación eléctrica de la eminencia media. Estos hallazgos, junto con las altas concentraciones hipofisarias de GABA en ausencia de GAD glandular, son indicio de una importante función directa del GABA en la hipófisis. Es probable que la mayoría de las trofinas hipofisarias, con excepción de la prolactina, sean afectadas por neuronas gabaérgicas hipotalámicas a través de un mecanismo neural a nivel de la eminencia media (167).

La inyección intraventricular de GABA produce un incremento dosis-dependiente de LH plasmática tanto en ratas ovariectomizadas como tratadas con estrógenos (167). Estas modificaciones de LH se acompañan de cambios en los niveles hipotalámicos de LHRH, dopamina y NE, sugiriendo la participación de los tres sistemas neuronales en la inducción del fenómeno. Existen también datos que indican que la administración de muscimol, un agonista gabaérgico, disminuye la secreción de LH en ciertas condiciones. Avalando una forma compleja, bimodal, de la acción del GABA sobre la secreción de LH, la administración sistémica del antagonista gabaérgico bicuculina en ratas ovariectomizadas produce una caída inicial de LH seguida por una elevación significativa minutos más tarde. Estos datos sugieren distintos sitios de acción para el GABA en relación a la liberación de LH (167).

En cuanto a la secreción de prolactina, se han identificado dos fenómenos vinculados con la actividad del GABA. A través de un efecto directo sobre el lactotropo el GABA inhibe la secreción de prolactina, mientras que por medio de un mecanismo neural que involucra a terminales dopaminérgicas de la eminencia media, la secreción de la hormona es estimulada (166).

Se han descripto también efectos estimulatorios o inhibitorios de drogas gabaérgicas sobre la liberación de FSH, TSH, GH y ACTH (167, 168). En conclusión, los datos mencionados avalan un papel significativo del sistema gabaérgico hipotalámico en la regulación de las trofinas hipofisarias.

Recientemente se ha propuesto un rol interesante para el circuito de neuronas inhibitorias a nivel hipotalámico, y en forma general, a nivel central. Experimentos diseñados con el fin de determinar si las conexiones del HMB son esenciales para el aprendizaje (habituación, adquisición, retención y extinción) demostraron que esta función no se modifica luego del aislamiento neural de la información que llega al sector proveniente del resto del cerebro. Sin embargo, y sorprendentemente, se observó que los animales con aislamiento neural del HMB evidencian una significativa disminución en el coeficiente de variación (desviación estándar/media) respecto a los animales con operación simulada (169).

En el hipotálamo, el "pattern" de estímulos integrados está en permanente interrelación con el sistema neuroendócrino bajo el comando de la región hipofisotropa del HMB. La salida neural y endócrina del hipotálamo en general, y del HMB en particular, juegan un rol crítico en la regulación de reacciones que hacen accesibles los distintos bloques neurales de programas conductuales. La información proveniente de esta región es también importante en la selección del programa disponible en la jerarquía de opciones accesibles, que se ejecuta en un determinado momento. El aislamiento neural del HMB probablemente reduce la capacidad de análisis de estímulo ambiental, y por lo tanto disminuye la versatilidad de los repertorios conductuales que pueden ser organizados como respuesta a este estímulo. Esto se acompaña de una reducción en la varianza interindividual, como se revela en forma experimental (165).

Se ha propuesto que las proyecciones y circuitos locales inhibitorios (mayoritariamente gabaérgicos) participan en el procesamiento de la información del cerebro. De esta manera el sistema inhibitorio genera la variabilidad en la conducta que provee al organismo de la capacidad de ajustarse a la intensidad y velocidad de cambios con los cuales debe enfrentarse para su subsistencia. En resumen, las neuronas gabaérgicas tendrían un papel clave para mantener óptimamente la comunicación dentro y entre unidades, necesaria para la generación de variabilidad en relación a la demanda. De esta manera, la interposición de interneuronas en los circuitos neuronales permitiría al sistema nervioso, a todos los niveles, ser el propio generador de variabilidad, con una expansiva capacidad de procesamiento de la información en relación a la demanda. El organismo paga un alto precio para esta función: casi la mitad de la glucosa y del oxígeno utilizado por el cerebro sostienen la actividad de los elementos interneuronales gabaérgicos (169).

I.2.b Biosíntesis y Metabolismo de GABA

El GABA es sintetizado principalmente a partir de glucosa, aunque el piruvato y otros aminoácidos pueden ser también precursores. El metabolismo del GABA está íntimamente relacionado a los ciclos de glutamato y glutamina. El GABA se origina en el llamado "shunt" tricarboxílico del GABA, en el cual un intermediario del ciclo de Krebs, el α-cetoglutarato, es

transaminado a glutamato y este es descarboxilado por la enzima GAD, que requiere fosfato de piridoxal como cofactor (169 b). El GABA es transaminado por la enzima GABA-T que cataliza su transformación a semialdehído succínico, el que a su vez es rápidamente oxidado a ácido succínico por la enzima succínico deshidrogenasa (SSADH), y así reingresa al ciclo de Krebs. En la transaminación de GABA a semialdehído succínico, el α -cetoglutarato es el aceptor del grupo amino dando glutamato; de esta manera se cierra el "shunt" de GABA manteniendo los niveles del precursor (Fig 7) (170). Entre 1962 y 1965 se realizó el estudio sistemático de las enzimas clave de este ciclo (171, 172). Se demostró que la GAD es una enzima soluble, concentrada en una fracción especial de sinaptosomas. En cambio la GABA-T y la SSADH son estrictamente mitocondriales, con localización en la matriz de estas organelas.

Los estudios de fraccionamiento subcelular permitieron concluir que la GAD se localiza dentro del axoplasma del sinaptosoma y que se encuentra parcialmente unida a membranas, particularmente a vesículas sinápticas. En esta etapa se especuló con que, "in vivo", la GAD se fija a la superficie externa de la vesícula sináptica por uniones Ca^{2+}-dependientes, facilitando la concentración del GABA en estas organelas. Estos resultados fueron confirmados más tarde (173).

Por otra parte, se demostró que la GABA-T y la SSADH, aunque estrictamente mitocondriales, evidencian un cierto grado de heterogeneidad en su distribución. La fracción mitocondrial li-

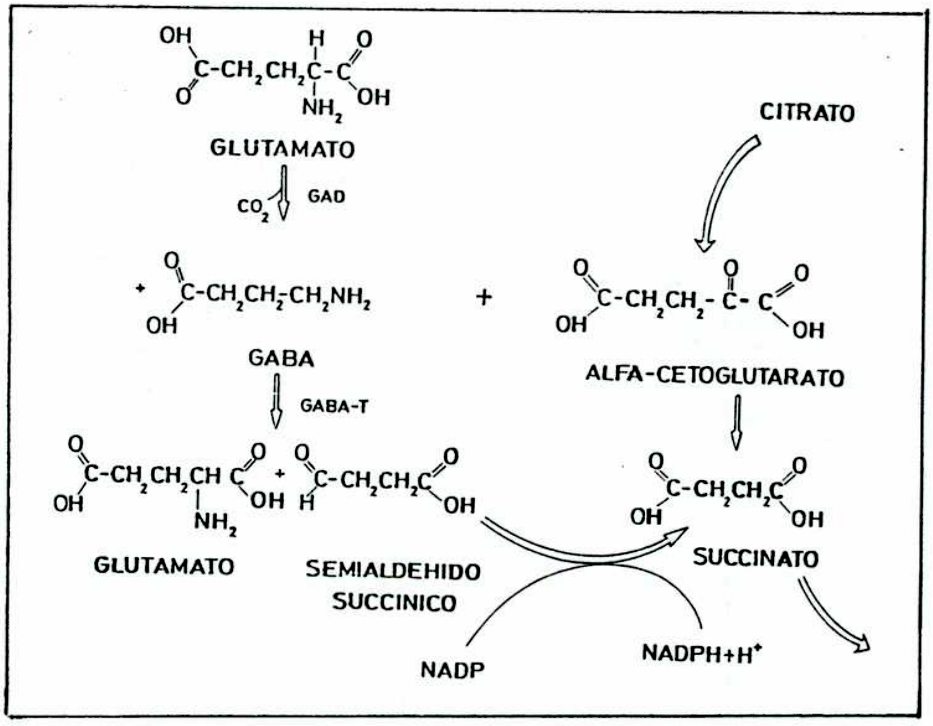

Fig. 7 Biosíntesis y Metabolismo del GABA.

bre, proveniente del pericario y la glía, tienen mayores concentraciones de estas enzimas que las mitocondrias localizadas en los sinaptosomas, (lo cual apoya la hipótesis del metabolismo transneuronal de GABA). Los estudios cinéticos de marcación de glutamato, glutamina y GABA a partir de diferentes precursores llevaron a postular un modelo simplificado que se representa en la Fig 8 (174). La glucosa y sus metabolitos relacionados son precursores de un pool de glutamato, localizado en neuronas, donde tiene lugar la síntesis de distintos transmisores: glutamato, aspartato y GABA. Luego de la liberación de éstos del terminal neural, existe recaptación parcial por el terminal en forma Na^+-dependiente o por células gliales, donde son transformados a glutamina por la enzima glutamina sintetasa, de localización preferencial en los astrocitos (175).

La glutamina difunde libremente entre las células y probablemente transporta el esqueleto carbonado de la célula glial a la neurona (176, 177), de modo tal que podría ser precursor de glutamato y GABA. Se ha demostrado que existe una buena correlación entre el nivel de GABA y la actividad de GAD (178). Esto ha permitido dar un paso importante en la localización de neuronas gabaérgicas en el SNC con la descripción de técnicas inmunohistoquímicas para la GAD purificada (179). Mediante este método se localizó la enzima de síntesis de GABA en sistemas interneuronales de la médula espinal (180), bulbo olfatorio (181), retina (182) y cerebelo (183). Más recientemente, métodos

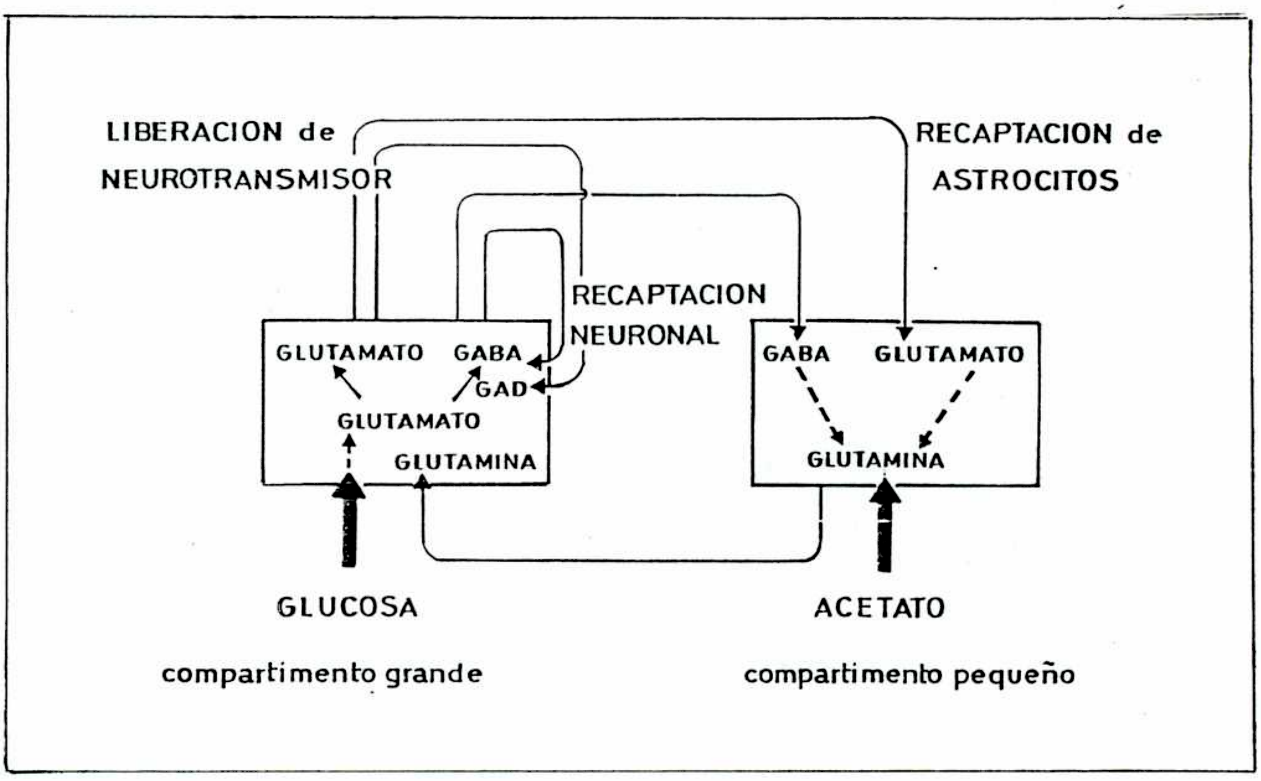

Fig. 8 Modelo del Metabolismo del GABA. Se representa un modelo de dos compartimentos para el metabolismo del GABA en el SNC. Los dos compartimentos se conectan por el flujo de glutamina desde el más pequeño al más grande y por el transporte de GABA y glutamato en el sentido contrario.

inmunohistoquímicos para la detección de GABA han confirmado ampliamente las observaciones anatómicas iniciales sobre la GAD (184).

Además de la localización de GABA en el SNC, se ha demostrado la presencia de GABA, GAD y GABA-T en tejidos periféricos de varios mamíferos. En general, las actividades enzimáticas y los niveles de GABA son mucho más bajos en la periferia que a nivel central, aunque existen excepciones. Por ejemplo, la concentración de GABA en el oviducto de rata duplica la del cerebro (185), y la actividad de GABA-T en el hígado de ciertos mamíferos es tan alta como la cerebral (186).

La síntesis de GABA en tejidos periféricos está catalizada por una GAD que reúne características bioquímicas e inmunológicas diferentes a las de la GAD central. Se ha demostrado por ejemplo, que la GAD de riñón está fuertemente estimulada por aniones, con una máxima activación con Cl^- 0.2M, en tanto que la GAD central es inhibida en las mismas condiciones. Asimismo la GAD no neuronal es activada por el ácido aminooxiacético (AOAA) y no es afectada por fosfato de piridoxal; por su parte la GAD central es inhibida por AOAA y requiere de la presencia del cofactor. El fraccionamiento subcelular de la GAD de riñón indicó que 60-80% de la enzima se localiza en la fracción mitocondrial (187). La síntesis de GABA a partir de otros precursores (por ejemplo, putrescina u ornitina) y la degradación por rutas distintas de la transaminación podrían contribuir al mantenimiento de niveles relevantes de GABA en la periferia

(188). En el SNC la contribución de vías alternativas a la GAD en la síntesis de GABA es pequeña (189).

La extendida localización de GABA en tejidos periféricos ha abierto la polémica, aún sin resolver, sobre su localización en ausencia de inervación gabaérgica demostrable (190); esta es una hipótesis a considerar para el sistema gabaérgico intrapineal que se discute en la segunda parte de este trabajo de Tesis.

I.2.c Mecanismo de acción de GABA

De acuerdo a los datos discutidos en la sección anterior, el GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio a nivel supra-espinal. El mecanismo de acción del GABA involucra un receptor específico (9), que puede ser estudiado mediante el uso de distintos radioligandos tales como ^{3}H-GABA, ^{3}H -muscimol, ^{3}H- bicuculina y otros (170). En membranas frescas el "binding" de ^{3}H-GABA se debe a la presencia de dos poblaciones cinéticamente diferentes de receptores, de alta y baja afinidad con Kd de 30 y 800 nM, respectivamente (170).

A nivel electrofisiológico el GABA media la inhibición pre y postsináptica a través de la modificación de canales de Cl^-. El mecanismo de inhibición difiere en la pre y postsinapsis, con despolarización parcial de la primera e hiperpolarización de la segunda, dependiendo de la concentración del ión Cl^- a ambos lados de la membrana y de su potencial de equilibrio (191). Existen muchas evidencias electrofisiológicas acerca de que el

GABA, luego de la interacción con un receptor específico (tipo A), produce la apertura del canal de Cl^-, el que es una proteína integral de membrana. La dirección y la magnitud del flujo de Cl^- depende del número y la conductancia de canales específicos, del potencial de equilibrio (E_{Cl^-}) (que es determinado por la concentración del anión a ambos lados de la membrana) y del potencial de reposo (E_M). La fuerza inductora del flujo de Cl^- cuando se produce la apertura del canal, está dada por $E_{Cl^-}-E_M$ (gradiente de potencial electroquímico). Este último parámetro es diferente en distintas neuronas en condiciones fisiológicas, posiblemente por la actividad variable de una bomba de Cl^-. De esta manera, algunos tipos de neuronas serán hiperpolarizadas por efecto del GABA (influjo de cargas negativas) y otras pueden ser despolarizadas (eflujo neto de iones Cl^-). Inclusive, el GABA puede producir cambios de potencial opuestos en el soma y las dendritas de una misma neurona (192). Estos resultados han sido recientemente confirmados por estudios de "patch-clamp" en cultivos neuronales (193, 194).

El receptor tipo A del GABA pertenece a la familia de receptores para neurotransmisores/hormonas de respuestas ionotrópicas (otros ejemplos son el receptor nicotínico, receptor glicinérgico, receptor NMDA del glutamato, etc). Este grupo produce un rápido cambio en la conductancia iónica sin involucrar segundos mensajeros. El receptor gabaérgico tipo A es el sitio de acción de varias drogas de gran importancia farmacológica. Estudios

farmacológicos y de "binding" han demostrado la complejidad de la estructura receptorial que involucra al menos 5 tipos de sitios de unión:

(a) el sitio de unión de agonistas y antagonistas gabaérgicos

(b) el sitio de unión de BZP (que se discutirá en detalle más adelante)

(c) el sitio de picrotoxina y t-butilbiciclofosforotionato (TBPS), que bloquean la activación por GABA del canal

(d) sitio de reconocimiento de barbitúricos y otros depresores del SNC

(e) sitio de unión de aniones (195).

Cada uno de estos tipos de ligandos pueden interactuar alostéricamente con uno o más de los restantes (196). Varios esteroides modulan la acción del GABA sobre el ionóforo de Cl^- (195). A partir de esta compleja red de interacciones puede deducirse que varios de los sitios pueden ser ocupados por sus respectivos ligandos simultáneamente y que cada uno de ellos puede estar físicamente separado en la estructura del receptor (197). La estructura proteica unitaria postulada ha sido identificada, y se esquematiza en la Fig 9.

La purificación del receptor en un detergente adecuado se obtuvo con una columna de afinidad con BZP covalentemente unida (198); la glicoproteína eluida con flurazepam tiene capacidad para unir los 5 tipos de ligandos antes mencionados (199). La proteína purificada conserva la modulación alostérica entre los ligandos aunque está disminuida con respecto a la estructura en la membrana (200).

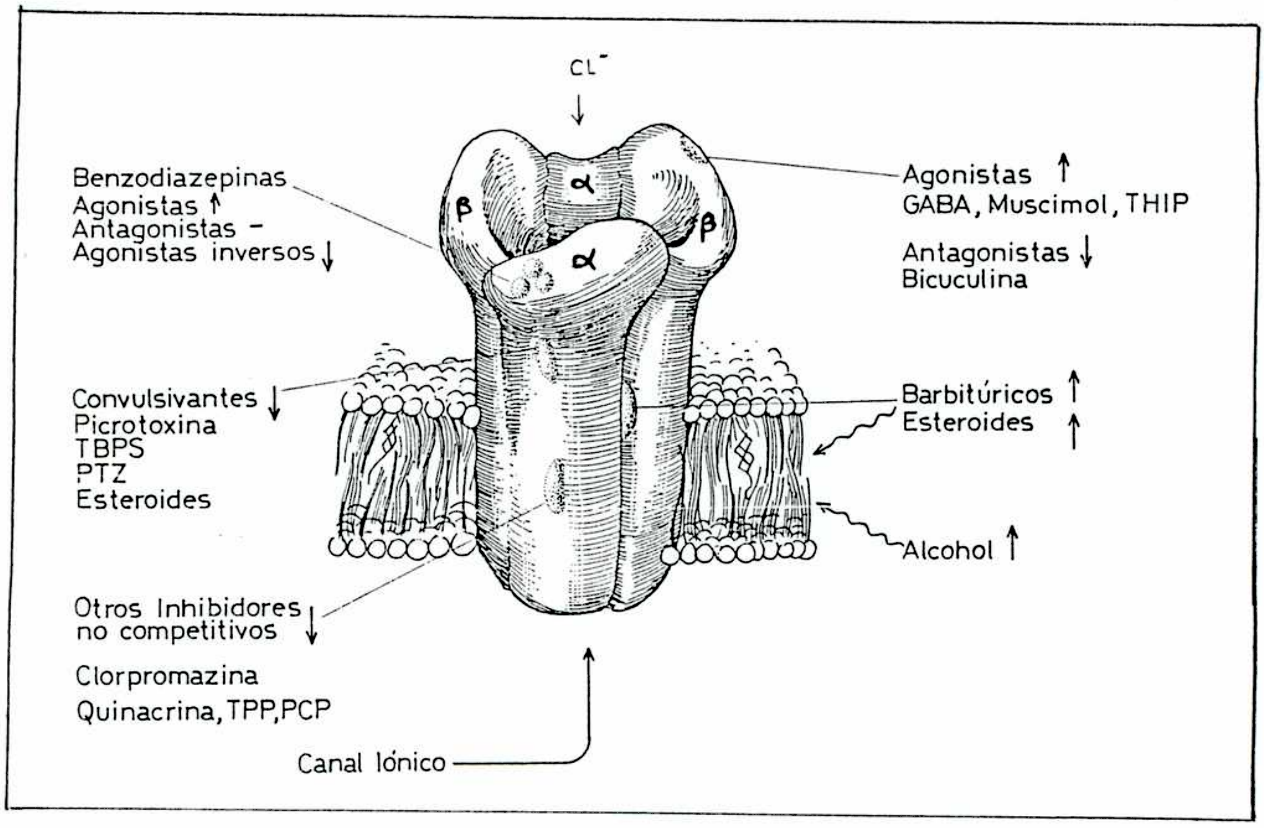

Fig. 9 Representación esquemática del receptor gabaérgico de tipo A. Este complejo supramolecular involucra al menos 5 sitios de unión: (a) Sitio de unión de agonistas y antagonistas gabaérgicos (b) Sitio de unión de BZP (c) Sitio de picrotoxina y TBPS (d) Sitio de reconocimiento de barbitúricos (e) Sitio de unión de aniones.

El receptor gabaérgico tipo A purificado de cerebro bovino (201) o de pollo (202) presenta dos subunidades α y β de peso molecular 53 000 y 57 000 d, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores que por métodos similares aislaron esta proteína de cerebro de rata y cerdo (203, 204).

La estequiometría es de tipo $\alpha_2\beta_2$ (202). La subunidad alfa puede ser marcada por fotoafinidad con la BZP flunitrazepam y la subunidad beta con muscimol, lo que demuestra la localización del receptor para BZP en la subunidad alfa y del receptor para GABA en la subunidad beta (205, 206). Se ha demostrado electrofisiológicamente que deben ocuparse las dos subunidades β con GABA para inducir la apertura del canal de Cl^- (207). Recientemente se han logrado importantes avances en la caracterización de este complejo supramolecular, que ha sido clonado y el RNA_m de cada subunidad inyectado en oocitos de Xenopus, donde se logró un nivel de expresión efectiva de la proteína que reproduce la corriente inducida por GABA (208, 209). El receptor expresado en estas condiciones es sensible a picrotoxina y bicuculina, y potenciable por BZP y pentobarbital.

En 1981 se describió la existencia de un receptor de GABA distinto al que acabamos de analizar (210). Las diferencias entre este receptor, denominado de tipo B, y el receptor clásico, que pasó a denominarse receptor de tipo A, se apoyan en diferentes aspectos farmacológicos y bioquímicos (Tabla II). El receptor de tipo B exhibe dependencia absoluta de cationes

Tabla II. Características diferenciales de los receptores gabaérgicos de tipo A y B.

	Receptor $GABA_A$	*Receptor* $GABA_B$
isoguvocina	agonista	inactivo
(-) Baclofen	inactivo	agonista
Bicuculina	antagonista	inactivo
GTP	inactivo	disminuye la afinidad de la unión
Muscimol	agonista potente	agonista muy débil
respuesta biológica	asociación al canal de Cl^-	modulación de corrientes de Ca^{2+} o K^+
Tratamiento con Tritón X 100	aumenta la capacidad de unión	disminuye la capacidad de unión
cationes	independiente de Ca^{2+}/ Mg^{2+}	dependiente de Ca^{2+}/ Mg^{2+}

divalentes y presenta un perfil farmacológico totalmente diferente. Por ejemplo, la isoguvacina, que desplaza activamente al GABA del receptor de tipo A, es inefectiva sobre los receptores de tipo B, lo mismo que se observa con la bicuculina (211). El receptor B ha sido descripto dentro y fuera del SNC de mamíferos, como por ejemplo, en músculo intestinal (212), ganglios autonómicos (213), músculo vascular (214) y cerebro (215).

La respuesta biológica asociada al receptor B no involucra al ionóforo de Cl^- (216), sino más bien parece estar vinculada a la modulación de la entrada de Ca^+ (en la periferia) (217) y de la salida de K^+ (a nivel central) (218). Existen por lo menos dos mecanismos alternativos por los cuales el receptor B puede regular canales de Ca^{2+}. Podría haber un acoplamiento de los receptores al canal de Ca^{2+} dentro de la membrana a través de una proteína G, o bien podría estar involucrado un sistema de segundos mensajeros como por ejemplo la activación de PKC. Hasta ahora la contribución relativa de estos mecanismos no ha sido rigurosamente elucidada (219, 220). En células piramidales del hipocampo, el receptor de $GABA_B$ aumenta la conductancia al K^+ sin afectar la conductancia al Ca^{2+} (221). La apertura de canales de K^+ requiere de una proteína sensible a la toxina pertussis y activada al máximo por GTP-γS (222). Los ésteres de forbol, activadores de la PKC, reducen el incremento de la conductancia al K^+, mediado por GABA (222).

En resumen, el receptor tipo A del GABA estabiliza el potencial de reposo de la membrana celular por aumento de la

conductancia al Cl^-. Esta función inhibitoria no se restringe a los terminales sinápticos neurales. Los receptores $GABA_A$ están profusamente distribuidos en todo el organismo, sugiriendo la posibilidad de receptores extrasinápticos involucrados en el control fino de la excitabilidad celular.

Las células cromafines de la médula adrenal, en ausencia de inervación gabaérgica, son capaces de sintetizar, almacenar y liberar GABA (223), pudiendo estar involucrado a través de un receptor de tipo A en la regulación de la liberación de catecolaminas inducida por acetilcolina (224). La respuesta celular que sigue a la activación del receptor tipo A puede depender de la distribución espacial y temporal del GABA. Esto está vinculado a factores tales como la desensibilización del receptor y la efectividad del sistema de recaptación. Además, este receptor está sometido a la modulación alostérica de gran variedad de ligandos farmacológicos y/o fisiológicos.

En contraste al receptor de tipo A, el receptor B no es una estructura integral de membrana y el acoplamiento a iondforos de K^+ o Ca^{2+} está mediado por una proteína G sensible a la toxina pertussis. La activación del receptor B en el SNC induce una corriente de salida de K^+ que, al igual que la entrada de Cl^- del receptor A es hiperpolarizante. En neuronas periféricas el receptor de tipo B parece estar involucrado exclusivamente con canales de Ca^{2+}, efecto mediado por una proteína G a través de un mecanismo que es similar al observado en la regulación de la corriente de K^+ a nivel central. El receptor

gabaérgico de tipo B parece estar involucrado en el control de la función sináptica por inhibición de la liberación del neurotransmisor a nivel del terminal neural (216).

I.2.d Benzodiazepinas

En 1950, en los laboratorios Hoffman La Roche, se inició un trabajo de síntesis con una serie de compuestos, las benzheptoxdiazinas (225). Tratando 3-óxido de quinazolina con metilamina se obtuvo el primer compuesto de esta serie, que sometido a test farmacológicos mostró resultados sorprendentes, sobre todo en comparación con los sedantes preexistentes y por su baja toxicidad (226). Los trabajos posteriores se abocaron al hallazgo de una estructura química óptima, y ya en 1960 aparece en el mercado el primer miembro de esta familia (llamadas genéricamente BZP) con el nombre comercial de Librium (clordiazepóxido) (227), el que fue seguido 2 años más tarde por otro miembro de este grupo, el Valium (diazepam). Estas dos drogas y sus congéneres, que fueron apareciendo sucesivamente, se convirtieron con gran rapidez en las drogas más prescriptas de acción central.

Las BZP son de elección en la farmacoterapia de la ansiedad y estados emocionales relacionados, en alteraciones del sueño, estado epiléptico y otros estados convulsivos, relajación muscular y como agentes inductores en anestesiología (228). La gran ventaja ofrecida por este grupo de fármacos consistió en la

posibilidad de separar los efectos ansiolíticos de los efectos sedantes (229). A pesar de que al comienzo del tratamiento presentan un efecto sedante, se desarrolla tolerancia rápidamente, en tanto que el efecto ansiolítico se incrementa (230).

Los modelos experimentales en animales indican que las BZP son drogas liberadoras, no de la conducta en su totalidad, sino de aquellos componentes que previamente habían sido inhibidos (231). En relación a la actividad hipnótica, las BZP inducen una disminución del sueño REM con decremento de la fase de latencia y aumento del tiempo total de sueño (232). Aún en la actualidad se desconoce el mecanismo por el cual las BZP inducen este amplio espectro de efectos.

Los primeros logros en la elucidación del mecanismo de acción de las BZP se obtuvieron recién a mediados de los años 70. En 1974 se observó que estas drogas eran capaces de unirse al receptor de glicina (233) y se postuló que los efectos farmacológicos se debían a esta interacción. De esta manera se podía justificar el efecto como relajantes musculares, dado que la glicina es uno de los neurotransmisores de las células de Renshaw. Sin embargo esta hipótesis debió descartarse por las elevadas concentraciones de BZP necesarias para competir con el "binding" de glicina y por la ausencia de efectos de BZP en las convulsiones inducidas por estricnina (antagonista glicinérgico) (234).

En 1974 se publicaron los primeros experimentos que condujeron a la hipótesis, actualmente aceptada, sobre el mecanismo

de acción de las BZP. Se demostró que la inhibición de la síntesis de GABA disminuye la efectividad de las BZP y que su administración podía revertir parcialmente los efectos producidos por la carencia de GABA (235, 236). Se determinó también que estas drogas no eran agentes "gabamiméticos", es decir no interactuaban directamente con el receptor para GABA (237, 238, 239). Pronto se reunieron evidencias conductuales, electrofisiológicas y bioquímicas que demostraron en forma concluyente que las BZP potencian la neurotransmisión gabaérgica (240). Para demostrar el mecanismo íntimo de esta potenciación se examinó el efecto de las BZP sobre la síntesis, degradación, liberación y recaptación de GABA, ninguno de los cuales resultó alterado por estas drogas (241).

La única evidencia experimental disponible indica que la potenciación de la transmisión gabaérgica por BZP se debe al aumento en la afinidad del GABA por receptores independientes de Na^+, localizados en membranas sinápticas crudas de la corteza cerebral (242). El interés en demostrar la localización de receptores de BZP en sinapsis gabaérgicas por técnicas autorradiográficas y el número creciente de tejidos examinados condujo a la identificación de receptores específicos, saturables, de baja capacidad y alta afinidad para ^{3}H-diazepam en corteza cerebral (243, 244, 245), bulbo olfatorio, hipocampo, amígdala, hipotálamo y tálamo (246, 247, 248).

En 1978 se demostró que el GABA aumenta la afinidad del "binding" de BZP y se propuso que las BZP a su vez, aumentan la

unión del GABA a su receptor (249). Poco después se demostró que la unión específica de BZP era también modulable por otros agentes capaces de interactuar con el canal de Cl^- modulado por GABA (250). Un punto de activa discusión actual es la existencia de ligandos endógenos para el receptor de BZP. En 1980 se comunicó la existencia de un compuesto de bajo peso molecular presente en la orina humana con alta afinidad para el receptor de BZP (251), denominado etil ester del ácido β carbolina 3-carboxílico. Estas drogas continuan teniendo gran interés en la investigación farmacológica dada su alta afinidad por el receptor de BZP la existencia de importantes efectos neurofarmacológicos (252) sensibles al bloqueo con antagonistas de este receptor, y su interacción con el GABA (253, 255). Más recientemente se ha aislado de cerebro de rata un polipéptido de 41 aminoácidos que posee actividad proconvulsivante luego de una inyección intrahipocámpica y antagoniza el efecto anticonflictivo de las BZP. Este péptido denominado DBI "Diazepam-binding inhibitor" posee una afinidad del orden micromolar por el sitio de unión de BZP del SNC y fue detectado mediante un anticuerpo específico en cerebelo e hipocampo (256).

En 1981 se describió un derivado imidazobenzodiazepinona denominado Ro 15-1788 (257) que permitió demostrar que variaciones químicas de la molécula de BZP permiten obtener sustancias cuya propiedad es unirse al receptor de BZP con alta afinidad y bloquear los efectos farmacológicos de estas drogas. Poco tiempo después se describieron los efectos antagonistas de

las β-carbolinas, drogas ansiogénicas y proconvulsivantes (258). Estos últimos hallazgos ampliaron la gama de herramientas para la óptima caracterización del receptor de BZP e iniciaron la búsqueda de otros representantes de estos grupos que se denominaron: antagonistas (Ro 15-1788) y agonistas inversos (β-carbolina) (259, 260). Es un punto de activa discusión actual la existencia de efectos de BZP no mediados por facilitación gabaérgica (para un descripción detallada ver referencia 266). A nivel molecular se ha demostrado que los antagonistas no tienen efecto en la potenciación gabaérgica pero revierten la acción de agonistas. Los agonistas inversos, en cambio, tienen "per se" un efecto inhibitorio sobre la apertura del canal de Cl^- mediada por GABA (261).

El sitio molecular de acción de las BZP es el complejo supramolecular del receptor gabaérgico tipo A descripto en secciones precedentes, sustrato de la modulación alostérica producida por BZP en la respuesta al GABA.

A nivel electrofisiológico se ha demostrado que las BZP desplazan a la izquierda la curva dosis-respuesta de aumento de conductancia inducido por GABA sin modificar la respuesta máxima (aumento en la potencia) (262, 263). El desplazamiento es pequeño, aun a concentraciones máximas de BZP (2-3 veces), no modificándose el efecto máximo del GABA. Estos resultados deben considerarse conjuntamente con el análisis de fluctuación que indican que las BZP no alteran la conductancia individual del canal, la especificidad, el tiempo medio de apertura, ni el

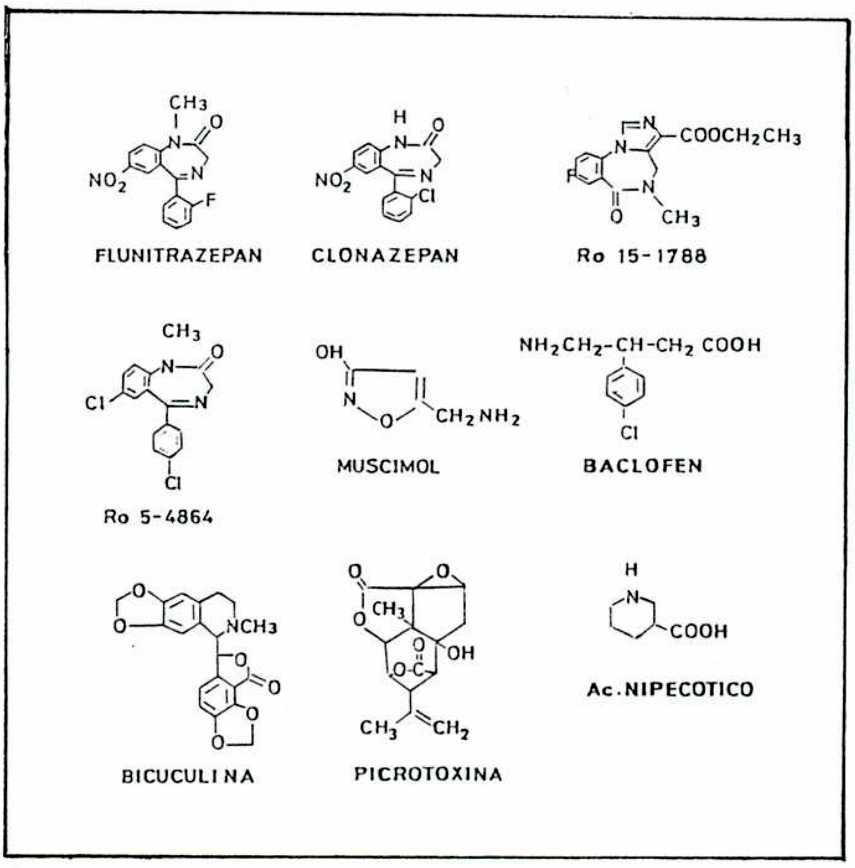

Fig. 10 Fórmulas de ligandos utilizados en este trabajo de Tesis (a) para la caracterización del receptor de BZP (flunitrazepam, clonazepam, Ro 15-1788, Ro 5-4864). (b) para la caracterización del receptor gabaérgico (muscimol, baclofen, bicuculina, picrotoxina, ácido nipecótico).

número de canales (264). Las BZP aumentan la frecuencia de apertura del canal o en otras palabras, la probabilidad de apertura de un canal individual en respuesta al GABA. Este efecto puede tener dos mecanismos posibles: un aumento en la afinidad del GABA por el receptor o bien una optimización del acoplamiento entre la activación del receptor de GABA y la del ionóforo de Cl^-.

Como entidad independiente del receptor central de BZP, que forma la compleja estructura mencionada en párrafos anteriores existe un receptor de BZP inicialmente localizado en tejidos periféricos: riñón, hígado y pulmón, y por ello denominado "receptor periférico" (267). La diferencia entre ambos tipos de receptores de BZP se basó inicialmente en criterios farmacológicos derivados de la capacidad del Ro 5-4864 para unirse exclusivamente al receptor periférico de BZP y del clonazepam al receptor central (268). El receptor periférico no está acoplado el receptor de GABA ni potencia los efectos de barbitúricos (269). El rol fisiológico de los receptores periféricos aún no ha sido aclarado.

I.3 OBJETIVOS

Este trabajo de Tesis persigue analizar diversos aspectos de la neuroquímica y fisiología del GABA en vinculación con la función de la glándula pineal.

Los objetivos principales de los experimentos que se presentarán a continuación son:

1. Estudiar el vínculo entre la glándula pineal en general y la melatonina en particular, con el sistema gabaérgico central.
2. Analizar las características del sistema gabaérgico intrapineal en diversas especies y sus implicancias fisiológicas.

II MATERIALES Y METODOS

II.1 ANIMALES Y TEJIDOS

Se utilizaron ratas Wistar adultas (180-250 g), mantenidas en un régimen de luz diaria de 14 h (07.00-21.00) en ambiente climatizado (22 ± 2°C), y alimentadas con alimento balanceado Purina y agua "ad libitum".

Las glándulas pineales bovinas se obtuvieron en un frigorífico de la zona dentro de los 20-30 min. después del sacrificio del animal y se transportaron hasta el laboratorio en solución buffer a 4°C.

Las glándulas pineales y cerebros humanos se obtuvieron de autopsias realizadas en el servicio de Neuropatología del Hospital de Clínicas y Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires y fueron gentilmente cedidas por el Dr. E. Caputti. Los tejidos humanos provinieron de pacientes sin patología neurológica evidente y fueron conservados a -20°C; el tiempo transcurrido postmortem fue de aproximadamente 6 h. El 60% de las muestras correspondían a pacientes de sexo masculino y la edad promedio fue de 58,6 años.

II.2 CIRUGIA

II.2.a Gangliectomía cervical superior bilateral.

La gangliectomía cervical superior bilateral se realizó bajo anestesia etérea de la rata a distintos intervalos (5, 10 y 15 días) antes del sacrificio. Se expusieron las glándulas salivales mediante una incisión ventral en el cuello y se las retrajo con el objeto de exteriorizar los músculos suprahioideos. 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.

II.2.b Pinealectomía

La pinealectomía se realizó bajo anestesia etérea de la rata a diferentes intervalos (3, 7 y 14 días) antes del sacrificio. Luego de la exposición del cráneo con un torno de uso odontológico, se realizó el corte de la calota, de manera de exponer la desembocadura del seno venoso longitudinal superior en los senos laterales. Luego de ligar al seno longitudinal superior, se disecaron las meninges de manera de exponer la glándula pineal. Esta se extirpó tomándola con una pinza de relojero (Bruselas nº 7). Los animales con operación simulada ("sham") fueron intervenidos de la misma manera, disecándose el seno longitudinal superior hasta exponer la glándula pineal, sin extirparla.

II.3 ESTUDIO DE LOS SITIOS DE UNION

II.3.a BZP

Para los estudios de sitios de unión de BZP en glándula pineal humana, corteza cerebral humana y de rata, se utilizó una fracción cruda de membranas preparadas de la siguiente manera: se homogeneizaron los tejidos en una solución de sacarosa 0.32 M mediante un homogeneizador de vidrio-teflón. Los homogenatos se centrifugaron a 900 g durante 10 min. El sobrenadante se centrifugó a 30000 g durante 20 min. Toda la preparación se realizó entre 0°-4°C. El precipitado final fue resuspendido en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 (243, 244, 245).

Se incubaron 0.8-1 mg de proteína por tubo a una temperatura de 0°C, en un volumen total de 1 ml y en presencia de ^{3}H-flunitrazepam (^{3}H-FNZP) (Actividad específica 83.6 Ci/mol, New England Nuclear). La unión específica del radioligando se determinó por la diferencia entre la unión total y la unión inespecífica (en presencia de 12 uM de FNZP frío). La incubación se realizó durante 90 min a 0°C. La reacción fue terminada por el agregado de 4 ml de buffer frío y rápida filtración de las muestras bajo presión reducida a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/B para separar el ligando libre del unido a membranas. Los filtros se lavaron tres veces con 4 ml de buffer frío y fueron transferidos a viales de conteo. La radiactividad de los filtros se determinó en un contador de centelleo líquido

mediante el agregado de una solución de centelleo conteniendo 30% de Tritón. Las muestras fueron medidas con un error de 3% y una eficiencia entre 50-60%. En todos los casos la unión específica fue mayor de 70%.

Los datos de unión en estado de equilibrio obtenidos por los métodos de saturación o competencia se analizaron por el método de Scatchard (270), y los parámetros cinéticos se calcularon por regresión lineal. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (271).

II.3.b <u>$GABA_A$</u>

Para el estudio de sitios de unión tipo A de GABA en corteza cerebral de rata y pineales humanas, se utilizó una fracción de membranas preparadas de la siguiente manera: los tejidos fueron homogeneizados con una solución fría de sacarosa 0.32 M y el homogenato resultante se centrifugó a 900 g durante 10 min, con el objeto de descartar la fracción nuclear. El sobrenadante fue centrifugado a 20000 g por 20 min. El pellet fue resuspendido en agua destilada y centrifugado a 8000 g durante 20 min. El sobrenadante de esta centrifugación, conjuntamente con una capa superficial al precipitado, se centrifugó a 48000 g y durante 20 min. Luego de repetir 2 veces este último lavado, el "pellet" resultante fue congelado a -70°C hasta el momento del experimento de unión (en general 18 h más tarde).

Para la realización del experimento de unión, el precipitado fue resuspendido en 50 vol de buffer Tris HCl 50 mM, pH 7.2 a

4°C y Tritón X-100 al 0.01% (v/v). La mezcla fue incubada a 37°C durante 30 min con agitación permanente. Luego de una centrifugación a 40000 g durante 10 min, el "pellet" resultante fue lavado 3 veces con buffer sin detergente y finalmente resuspendido en buffer Tris HCl fresco. Alícuotas de las membranas (0.8-1 mg de prot.) fueron incubadas por triplicado en un volumen total de 1 ml. La reacción se inició por el agregado de ^{3}H-GABA (Actividad específica 80.8 Ci/ mmol, New England Nuclear) en una concentración de 10 nM, en presencia de concentraciones variables de GABA frío (6-200 nM). La unión específica se determinó como la diferencia entre la unión total y la unión en presencia de 200 uM de GABA. Luego de 10 min. de incubación a temperatura ambiente, la reacción fue terminada por centrifugación a 40000 g durante 10 min. El sobrenadante fue descartado y el precipitado se lavó 3 veces superficialmente con buffer frío. La radiactividad fue extraída, luego de resuspender el "pellet" en 0.1 ml de hidróxido de hiamina durante toda la noche a temperatura ambiente (272, 273). Luego del trasvasamiento a viales de conteo y el agregado de una mezcla centellante, la radiactividad se cuantificó en la forma usual. El análisis de los resultados se realizó por el método de Scatchard y los parámetros cinéticos se calcularon por regresión lineal.

II.3.c <u>$GABA_B$</u>

Para los estudios de sitios de unión de GABA al receptor de

tipo B en glándula pineal humana y bovina, se utilizó una fracción de membranas preparada de la siguiente manera: se homogeneizaron las pineales en sacarosa 0.32 M con un homogeneizador de vidrio-teflón. El homogenato fue centrifugado a 1000 g durante 10 min. El "pellet" fue descartado y el sobrenadante se centrifugó a 20000 g por 20 min. El precipitado resultante fue lisado por resuspensión en agua destilada y centrifugado durante 20 min a 8000 g. El sobrenadante de esta centrifugación, conjuntamente con una capa superficial al pellet, se centrifugó a 48000 g por 20 min. Luego de repetir 2 veces más esta última etapa, el precipitado resultante fue congelado a -20°C hasta el momento del experimento (generalmente luego de 18 horas).

Para la realización del experimento de "binding", se resuspendió el pellet en buffer Tris HCl, pH 7.4 y se incubó a temperatura ambiente durante 45 min. La suspensión fue centrifugada a 7500 g por 10 min, el pellet resultante se resuspendió en buffer fresco y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente en buffer Tris HCl 50 mM, Ca^{2+} 2.5 mM, pH 7.4. Para el ensayo de unión, alícuotas de las membranas (0.5-1 mg de proteína) fueron incubadas en presencia de ^{3}H-GABA (concentración final 10 nM, Actividad específica: 80.8 Ci/mmol New England Nuclear) o de ^{3}H-baclofen (concentración final 10 nM, Actividad específica: 8.8 Ci/mmol, New England Nuclear). Se examinó la capacidad de competencia de GABA y baclofen fríos con cada uno de estos radioligandos. Luego de 10 min de incubación a temperatura ambiente, se terminó la reacción por centrifugación

a 40000 g durante 10 min. El sobrenadante fue descartado y el precipitado fue lavado superficialmente 3 veces con buffer frío. La radiactividad fue extraída, resuspendiendo el pellet en 0.1 ml de hidróxido de hiamina durante toda la noche a temperatura ambiente (210, 211). La radiactividad se cuantificó en la forma usual.

II.4. RITMOS

Para el estudio de la variación circadiana en receptores para GABA y BZP, grupos de 4-6 ratas (pinealectomizadas o con operación simulada 15 días antes) fueron sacrificadas por decapitación a 6 intervalos diferentes del ciclo de 24 h; sus cerebros fueron rápidamente removidos y una alícuota de corteza cerebral parietal fue extraída y congelada a -20°C. Los tejidos fueron tratados en forma individual para la determinación de sitios de unión de ^{3}H-GABA y ^{3}H-FNZP.

II.5 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE GABA

La determinación del contenido de GABA se realizó por una técnica de radiorreceptor (274, 275). Los animales fueron sacrificados por decapitación, y sus cerebros removidos y disecados en hielo. El hipotálamo, cerebelo, corteza cerebral y glándula pineal fueron congeladas hasta su posterior procesamiento. Los tejidos, luego de pesarse, fueron homogeneizados en agua destilada.

Para el ensayo de radiorreceptor alícuotas (100 ul) de una preparación cruda de membranas sinápticas de cerebelo de rata (aproximadamente 300 ug de proteína) en buffer Tris-citrato, pH 7.2, se incubaron con 100 ul de muestras de tejido o varias concentraciones de GABA, disueltos en agua destilada. Se agregaron 100 ul de ^{3}H-muscimol (Actividad específica 27.8 Ci/mmol, New England Nuclear) en una concentración final de 5 nM. La unión inespecífica se determinó en presencia de 200 uM de GABA y cada determinación se realizó por triplicado. Se incubaron las muestras durante 10 min a temperatura ambiente y luego se centrifugaron a 12000 g por 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado fue lavado superficialmente 2 veces con 3 ml de buffer Tris-citrato frío. La radiactividad del precipitado fue extraída con hidróxido de hiamina durante toda la noche y se cuantificó en la forma usual.

El rango de detección para GABA fue de 1-20 ng. Los coeficientes de variación inter e intraensayo fueron de 5 y 20 % respectivamente. A fin de verificar que el desplazamiento del ^{3}H-muscimol de su sitio de unión se deba a GABA presente en el tejido, una serie paralela de muestras de tejido se incubaron en presencia de un sistema enzimático de degradación del GABA altamente específico, (GABAsa, Sigma) antes del ensayo. Tanto el GABA auténtico como el contenido en la preparación del tejido fue completamente degradado por la GABAsa (más del 85 %) (276).

II.6 DETERMINACION DEL "TURNOVER" DE GABA

La determinación del "turnover" de GABA se realizó por la cuantificación de la acumulación del aminoácido luego de la inhibición de la GABA-T por administración de γ-acetilenGABA (200 mg/kg), 62,5 min. (i.p.) antes del sacrificio. Para prevenir el aumento post-mortem del contenido de GABA se administró un inhibidor de la GAD, el ácido 3-mercaptopropiónico (3MPA) 2,5 min. (i.p.) antes del sacrificio, en una dosis de 50 mg/kg (277, 278).

II.7 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD GLUTAMICO-DESCARBOXILASA

La actividad de GAD fue determinada por la producción de $^{14}CO_2$ en presencia de concentraciones saturantes de fosfato de piridoxal (279, 280). Los hipotálamos, cortezas cerebrales, cerebelos de rata y glándulas pineales bovinas se homogeneizaron en buffer fosfato 0.05 M, pH 6,8. Las alícuotas del homogenato fueron incubadas en tubos Eppendorf durante 60 min a 37°C. La mezcla de incubación (300 ul) contenía 1-^{14}C- glutamato (Actividad específica 49.6 Ci/mol, New England Nuclear) (0.2 uCi/ml), fosfato de piridoxal 200 uM β-mercaptoetanol 10 mM y concentraciones variables de glutamato (0.5-2 mM).

Las incubaciones se realizaron por triplicado empleando 5 concentraciones diferentes de glutamato. Se detuvo la reacción por agregado de ácido tricloroacético (TCA) al 10% y el

$^{14}CO_2$ liberado en un período adicional de 120 min. fue capturado en papeles de filtro embebidos en hidróxido de hiamina. La radiactividad se determinó en la forma usual. Los blancos contenían todos los reactivos excepto el TCA que fue agregado antes que el homogenato de tejido. El análisis de los resultados se realizó por el método de Lineweaver-Burk y los parámetros cinéticos se calcularon por regresión lineal. Las diferencias entre triplicados fue en todos los casos menor al 10%.

II.8 DETERMINACION DE LA CAPTACION DE $^{45}Ca^{2+}$

Los animales fueron sacrificados por decapitación, y sus hipotálamos fueron rápidamente extraídos y homogeneizados en sacarosa 0.32 M, y luego centrifugados a 900 g durante 10 min. El sobrenadante resultante se centrifugó a 30000 g por 20 min. El "pellet" fue resuspendido en buffer Hepes-Tris conteniendo: NaCl 140 mM, KCl 5 mM, Cl_2Mg 1 mM, Cl_2 Ca 2.5 mM, Hepes 10 mM y glucosa 10 mM, pH 7.4. Las alícuotas del tejido (2-5 mg proteína /ml) fueron incubadas a 37°C; la melatonina, la picrotoxina o la suma de ambas se preincubaron durante 10 min. Luego de este período, se inició la captación por el agregado de $^{45}Ca^{2+}$ (Actividad específica: 5-20 mCi/mg de Ca^{2+}, Amersham) disuelto en buffer normal o despolarizante (concentración final de K^+: 50 mM). Se detuvo la captación luego de 1 min mediante el agregado de 4 ml de buffer frío y filtrado rápido a presión reducida a través de filtros Whatman GF/B

embebidos en polietilenimina al 0.05%, a fin de reducir la pegada inespecífica del catión radiactivo. Los filtros fueron lavados 2 veces con 4 ml de buffer y luego transferidos a viales de conteo. La radiactividad se cuantificó en la forma usual en un contador de centelleo líquido (281).

II.9 DETERMINACION DEL INFLUJO DE $^{36}Cl^-$

La captación de ^{36}Cl fue medida por una modificación del método de Harris y Allan (282). Las pineales bovinas e hipotálamos de rata fueron homogeneizados en buffer Hepes 10 mM (ClNa 145 mM, ClK 5 mM, Cl_2Ca 2.5 mM, Cl_2Mg 1 mM, glucosa 10 mM) ajustado a pH 7.5 con Tris, en un homogeneizador vidrio- teflón.

El homogenato fue centrifugado a 900 g por 15 min a 4°C, el sobrenadante fue descartado, y el "pellet" fue resuspendido en buffer y centrifugado a 900 g durante 15 min. El "pellet" final fue resuspendido en buffer hasta obtener una concentración de 2-5 mg de prot./ml. Alícuotas de 200 ul de la suspensión fueron incubadas a 30°C durante 10 min. Luego de la incubación, el influjo de Cl fue iniciado por el agregado de 200 ul de una solución conteniendo ^{36}Cl (Actividad específica 14.3 m Ci/g, New England Nuclear, concentración final 0.5 uCi/ml). Luego de 5 segundos del agregado de $^{36}Cl^-$ con o sin GABA, el "uptake" fue frenado por el agregado de 4 ml de buffer frío y rápidamente filtrado a presión reducida a través de filtros Whatman GF/C embebidos en polietilenimina al 0.05 %, a fin de

reducir la pegada inespecífica de ^{36}Cl (283). Los filtros fueron lavados 2 veces con 4 ml de buffer y fueron posteriormente transferidos a viales de conteo. La radiactividad se determinó en la forma usual por espectrometría de centelleo líquido. La cantidad de ^{36}Cl unido a los filtros en ausencia de tejido fue sustraída de todos los valores. El GABA en las diferentes concentraciones examinadas (10-100 uM) se agregó conjuntamente con el ^{36}Cl, mientras que la picrotoxina (100 uM) y la melatonina (10^{-9}- 10^{-6} M) fueron agregados 10 min antes.

II. 10 DETERMINACION DE LA CAPTACION DE ^{3}H-GABA

Se obtuvieron fragmentos de 1.5-2.5 mg provenientes de la región medial de glándulas pineales bovinas. Grupos de 6 fragmentos se incubaron en 0.5 ml de buffer Hepes (ClNa 145 mM, ClK 5 mM, Cl_2Ca 2.5 mM, Cl_2Mg 1 mM, glucosa 10 mM) llevado a pH 7.4 con Tris, en presencia de ^{3}H-GABA (0.2-0.4 uCi/ml, Actividad específica 70 Ci/mmol New England Nuclear), GABA frío en diferentes concentraciones (10-400 uM) y ácido aminooxiacético para prevenir la degradación de GABA, en una concentración de 0.1 mM. La temperatura se mantuvo a 37°C y la solución fue burbujeada con O_2. Los blancos se realizaron a 0°C, en ausencia de Na^+ (reemplazado por colina), y en presencia de GABA frío 10 mM (277, 284). La β-alanina o el ácido nipecótico fueron utilizados en ausencia de GABA frío. Luego de 10 min de in-

cubación, los fragmentos fueron separados del medio y lavados 3 veces con buffer fresco. El tejido fue pesado y digerido durante toda la noche con hidróxido de hiamina. La radiactividad fue determinada en la forma usual. El análisis de los datos se realizó por el método de Lineweaver- Burk y los parámetros cinéticos fueron calculados por regresión lineal.

II. 11 DETERMINACION DE LIBERACION DE ^{3}H-GABA

Para examinar la liberación de GABA en fragmentos de pineal bovina o pineales de rata, se incubó el tejido en las condiciones descriptas en el ensayo de "uptake" durante 20 min a 37°C, en presencia o ausencia de antagonistas de la captación. Luego de la incubación se lavó el tejido 3 veces con buffer frío y se transfirió a 4 cámaras paralelas conectadas a una bomba peristáltica. El medio de perfusión fue buffer HEPES-Tris a 37°C, burbujeado con O_2, con un flujo de 0.4 ml/min; se colectaron fracciones cada 5 minutos. Luego de 35 min de perfusión el medio fue sustituído por el medio experimental a ser testado, excepto por el medio sin Ca^{2+} que se perfundió desde el principio del experimento. Luego de 10 min, el medio con alto K^+ (20-80 mM), NE (10^{-6}- 10^{-4} M) o los agonistas adrenérgicos (10^{-7}-10^{-5} M) fueron perfundidos durante 5 min. Los antagonistas adrenérgicos se preincubaron durante 10 min, antes del estímulo de NE. La radiactividad liberada en cada fracción y la extraída del tejido luego de la digestión con hidróxido de hiamina fueron

cuantificadas en un contador de centelleo líquido. Los resultados se expresan como liberación fraccional calculada como la fracción liberada respecto a la radiactividad total del tejido (275, 285). Se identificó la radiactividad como ^{3}H-GABA por cromatografía en placa delgada.

II.12 DETERMINACION DE MELATONINA

La cuantificación de melatonina en tejido y medio de incubación se realizó por radioinmunoanálisis (RIA) (286). Se incubaron las glándulas pineales a 37°C en medio TC 199 durante 6 h. Las pineales se homogeneizaron en forma individual en 1 ml de HCl 0.1 N y se centrifugaron a 1500 g durante 20 min. Se tomaron alícuotas para la determinación de proteínas antes de la centrifugación. El sobrenadante se extrajo con 6 ml de diclorometano y se descartó la fase acuosa. La fase orgánica se lavó con 2 ml de $NaHCO_3$ al 2% y 2 ml de agua tridestilada sucesivamente y fue llevada a sequedad bajo vacío.

En el caso de los medios de incubación, las alícuotas se extrajeron con 7 ml de diclometano y se procedió en forma análoga a la descripta para el tejido. La recuperación con este método, determinado con un trazador de ^{3}H-melatonina fue de 85%. Para el RIA se utilizó ^{3}H- melatonina (Actividad específica 81.7 Ci/mol, Amersham) y anticuerpo policlonal antimelatonina de conejo (CIDTech, Research Inc.). Paralelamente se realizó una curva de calibración con melatonina fría en un rango entre 1-1000 pg.

Finalizado el período de incubación, se mantuvieron los tubos a 0°C durante 10 min y se agregó el mismo volumen de $(NH_4)_2SO_4$ (ss), con agitación. Luego de 30-60 min de incubación en hielo, se centrifugaron las muestras a 40000 g durante 5 min. Se aspiró el sobrenadante a presión reducida y se resuspendió el precipitado con 0.1 ml de agua destilada a 37 °C. La radiactividad se determinó en la forma usual. La sensibilidad del ensayo fue de 30 pg/muestra; los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 3 y 5 % respectivamente.

II.13 DETERMINACION DE INDOLAMINAS

La determinación del contenido de 5-HT y ácido hidroxiindolacético (HIAA) en glándula pineal de rata se realizó por cromatografía de alta presión con detección electroquímica (287) de acuerdo al siguiente protocolo: se incubaron las glándulas a 37°C en medio Tc 199 durante 3 o 6 horas. Finalizado el período de incubación, se separó el tejido del medio de incubación y se congeló a -20°C. Una alícuota del medio de incubación se utilizó para la determinación del contenido de 5-HT y HIAA en un cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC). Las pineales se homogeneizaron en 0.2 M de ácido perclórico y el homogenato se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min a 4°C; una alícuota del sobrenadante se utilizó para la determinación de indolaminas por inyección en el HPLC.

El sistema utilizado consistió en una columna analítica de fase reversa de 5 um ODS Biophase, 25 cm, 4.6 mm i.d. (BAS), el solvente de corrida utilizado contiene: ácido acético 0.1 M, acetato de amonio 0.1 mM, EDTA 50 mg/L y 25 % de metanol.

El sistema utiliza un detector electroquímico de tipo LC-3 con control amperométrico y electrodo TL-8A "glassy carbon" (BAS). El potencial aplicado en la detección de indolaminas es de 0.7 V. Los cromatogramas se obtuvieron con un registrador gráfico y la altura de los picos se refirió a la altura de los estándares. Los estándares se prepararon en ácido perclórico y se inyectaron antes y después de la corrida de las muestras.

II. 14 ESTUDIOS INMUNOHISTOQUIMICOS

El antisuero antiGABA fue gentilmente cedido por el Dr. Somogyi de la unidad de Anatomía Neurofarmacológica de la Universidad de Oxford, Inglaterra.

Las glándulas pineales bovinas fueron fijadas en alcohol 90%-Fijador de Bouin- Formol y glutaraldehído al 2%. Se realizaron técnicas de Inmuno-marcación post-inclusión en parafina para la demostración de GABA y Enolasa Neuroespecífica (ENS). Para la determinación de GABA los cortes de pineales fueron incubados de acuerdo al siguiente protocolo: 1h a temperatura ambiente con suero normal de oveja, lavado con Buffer Tris-fosfato 10 mM (TBPS), 24h a 4°C en antisuero antiGABA diluído 1: 3000, 3 lavados de 40 min. en TBPS, 4h en una fraccion antiinmunoglo

bulina de conejo obtenida en oveja diluído 1: 30, 3 lavados de 40 min. en TBPS, 15h a 4°C en el complejo peroxidasa- anti-peroxidasa con el sistema amplificado de avidina-biotina diluido 1: 100, 2 lavados de 40 min. en TBPS. Todos los sueros fueron diluídos en TBPS conteniendo 1% de suero de oveja inactivado por calor. El color fue revelado con Diamino-benzidina (DAB) 0.3 mg/ml pH 7.4 y 3 amino, 9 etil-carbazol (AEC). Los cortes se observaron por microscopia óptica con aumento entre 10 y 40 X (288).

Para la marcación de ENS se utilizó un antisuero diluído 1: 1000 y el cromógeno DAB para visualizar el complejo (289).

II. 15 ANALISIS ESTADISTICO

Para el análisis estadístico se utilizaron los tests de Student para comparación de 2 muestras y de Dunnet, Scheffe o Tukey para comparaciones múltiples. Para el análisis de los gráficos de Scatchard se utilizó el análisis de covarianza global y la significación de las rectas de correlación se calcularon según las fórmulas de Snedecor y Cochran.

III. RESULTADOS

III.1 VINCULO ENTRE LA FUNCION PINEAL Y SISTEMA GABAERGICO CENTRAL

III.1.a Efecto de la pinealectomía y la melatonina sobre receptores cerebrales de BZP.

Hemos analizado en la Introducción la base experimental de la aseveración de que la melatonina es el principal producto de secreción pineal. La síntesis de la hormona presenta un ritmo diario con máximo en horas de la noche, controlado por la información luminosa que llega a la glándula a través de una vía multisináptica que se origina en la retina, cuya última neurona es la neurona postsináptica del sistema simpático cervical, y por proyecciones neurales de origen central. A través de la secreción rítmica de la hormona, la glándula controla una serie de funciones del SNC, desde la clásicamente reconocida: el control estacional del sistema neuroendócrino, hasta la excitabilidad general del SNC, teniendo efectos anticonvulsionantes, sedantes e hipnóticos (290, 291, 292). En vista de que la melatonina es capaz de competir, en altas concentraciones, con la unión específica de ^{3}H-FNZP en cerebro de rata (293), y considerando que la pinealectomía produce en diversas especies una disminución del umbral para distintos tratamientos convulsi-

vantes (294), se examinó la posible regulación de los receptores para BZP en el SNC de la rata por la glándula pineal y su hormona específica.

La Fig. 11 muestra la evolución de dichos sitios receptores a distintos tiempos post-pinealectomía. Se observó una disminución en el número máximo de sitios de unión (Bmáx) sin modificaciones significativas en la afinidad por el radioligando. La craneotomía "per se", practicada en los animales con operación simulada, produjo un efecto depresor sobre los sitios cerebrales de unión para ^{3}H-FNZP, como puede observarse en la Fig 12. El trauma quirúrgico desaparece en su efecto depresor sobre los sitios de unión de BZP luego de 14 días de la operación, en tanto que en los animales pinealectomizados los valores de Bmáx. se mantienen significativamente deprimidos.

La desnervación pineal por ganglectomía cervical superior no modificó significativamente la concentración de sitios receptores para BZP (Fig 13).

El tratamiento con melatonina (800 ug/kg, 3 horas antes del sacrificio) revirtió el efecto depresor de la pinealectomía sobre los receptores de BZP como lo revelan los estudios de "binding" que se observan en la Fig 14.

La administración de melatonina en animales intactos, a dosis de 800 o 1600 ug/kg inyectada en horas de la mañana o de la tarde, 3 horas antes del sacrificio, no modificó la unión del radioligando (Fig 15). Sólo luego de un tratamiento prolongado de melatonina durante (800 ug/kg durante 5 días), se observaron

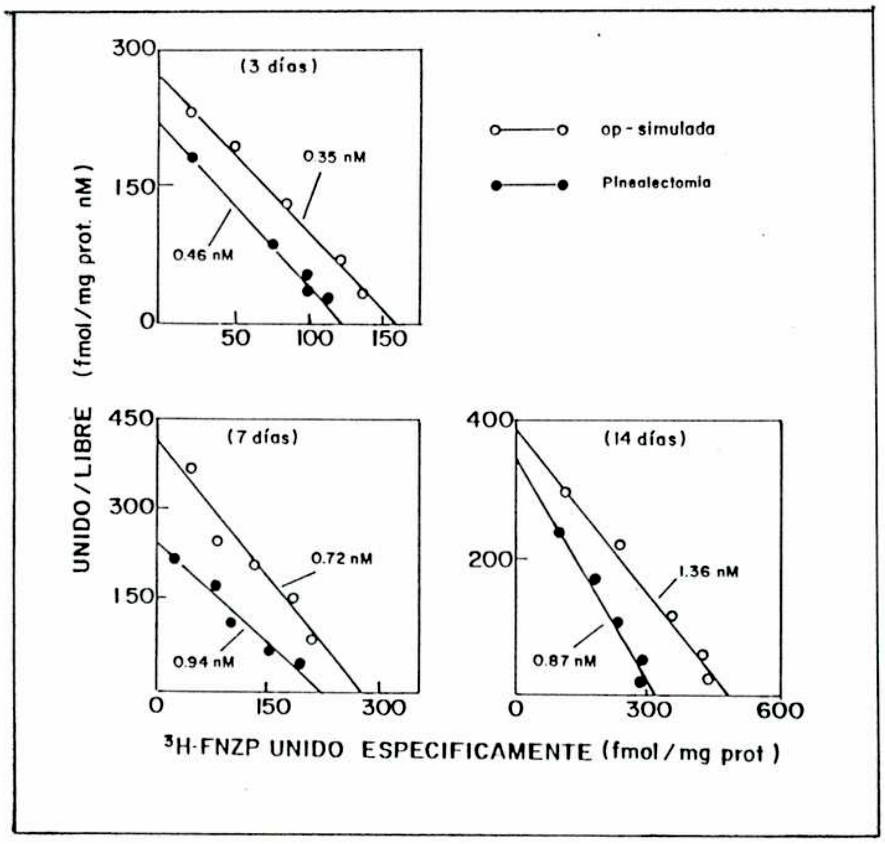

Fig. 11 Efecto de la pinealectomía (•—•) u operación simulada (o—o) sobre los sitios de unión para ³H-FNZP en membranas de corteza cerebral de rata. La cirugía se realizó 3, 7 y 14 días antes de sacrificio. En cada caso la concentración de sitios de unión (Bmax) fue significativamente diferente entre los grupos ($p < 0.05$ análisis de varianza). Se consigna en cada caso el valor del Kd.

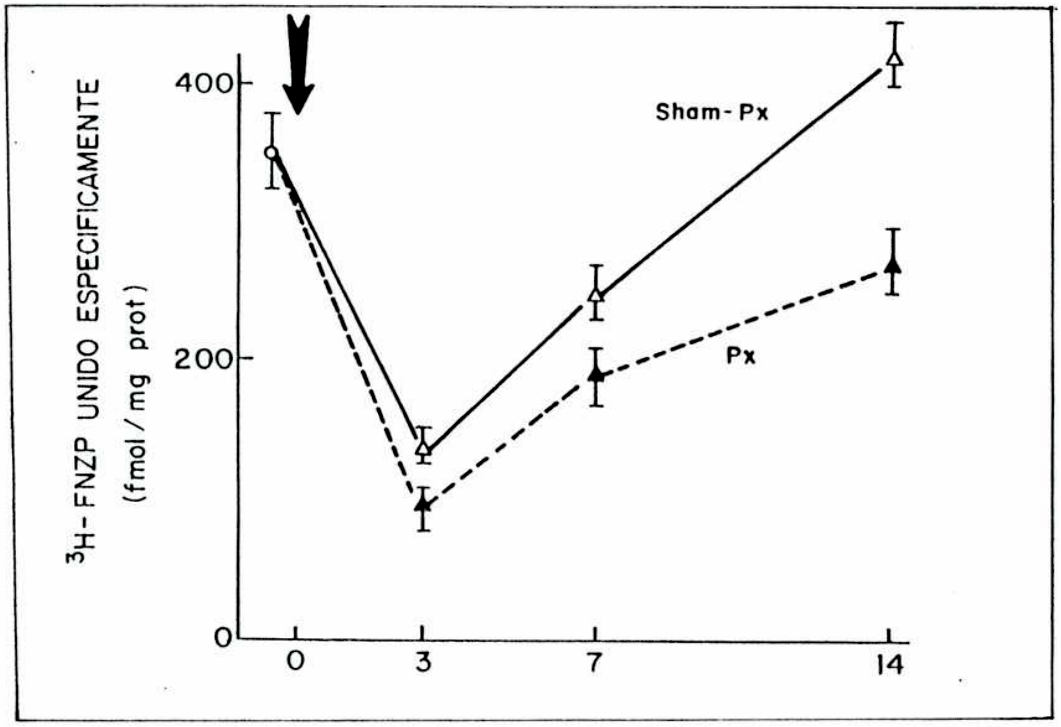

Fig. 12 Efecto de la pinealectomía (Px) (▲—▲) u operación simulada (Sham-Px) (△——△) sobre la unión específica de ^{3}H-FNZP a membranas de corteza cerebral de rata Media ± ES, n=4-6/grupo. Los valores entre grupos difieren entre sí en todos los intervalos post-cirugía ($p<0.05$, test de Student). En el grupo Px todos los valores difieren del tiempo 0, en tanto que en el grupo Sham-Px sólo difieren los valores de 3 y 7 días ($p< 0.01$, análisis de varianza).

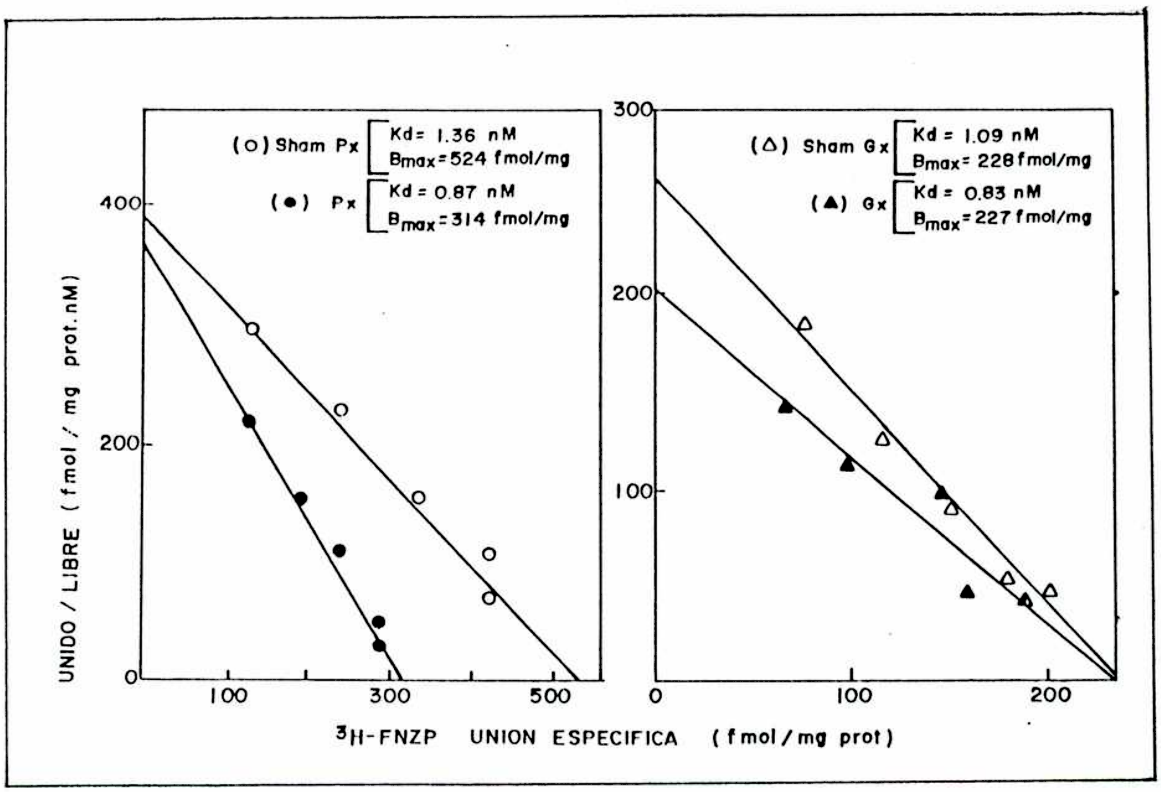

Fig. 13 Gráficos de Scatchard representativos de la unión de ^{3}H-FNZP a membranas cerebrales de rata sometidas a pinealectomía (Px) o ganglectomía cervical superior (Sham Gx) o sus respectivas operaciones simuladas (sham Px, sham Gx) 15 días antes. La concentración total de sitios receptores (Bmax) difiere significativamente en el grupo Px respecto al grupo sham ($p < 0.01$ test de Student).

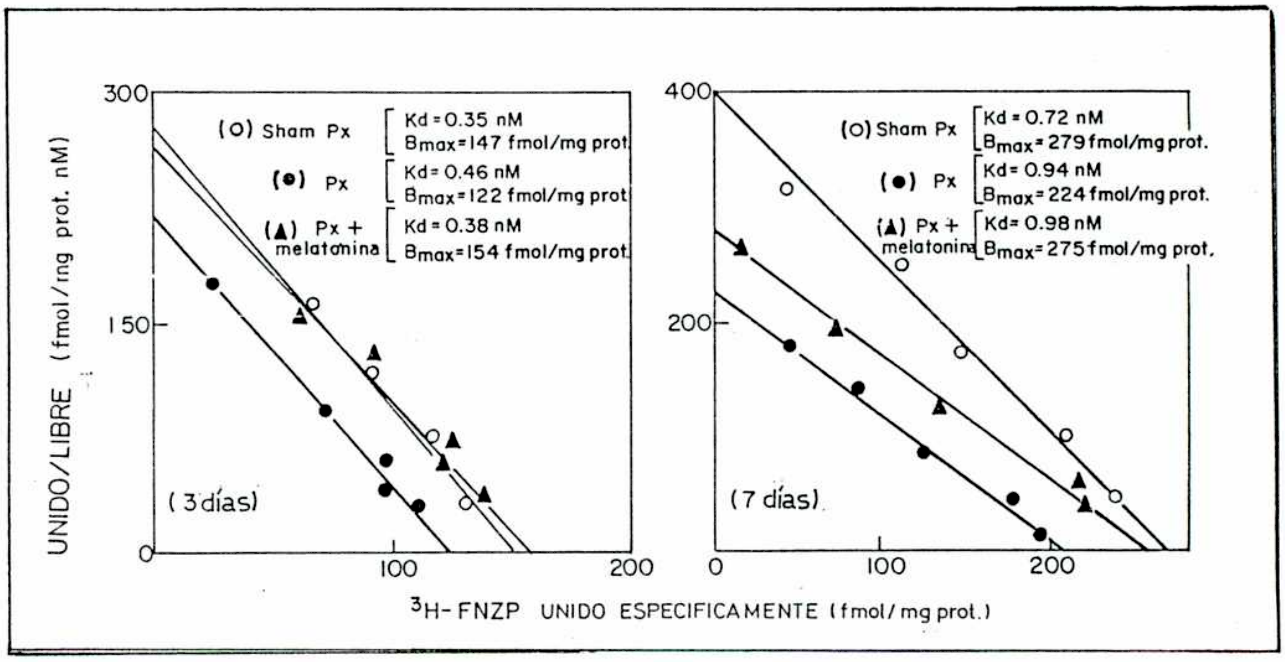

Fig. 14 Efecto de la inyección de melatonina (800 ug/kg, 3 h antes) (▲—▲) sobre la concentración de sitios de unión de ^{3}H-FNZP a membranas de corteza cerebral de ratas sometidas a pinealectomía (Px) (●—●), 3 o 7 días antes, operación simulada (Sham Px) (○—○). En todos los casos el tratamiento revirtió la depresión de sitios de unión ($p<0.05$ análisis de covarianza).

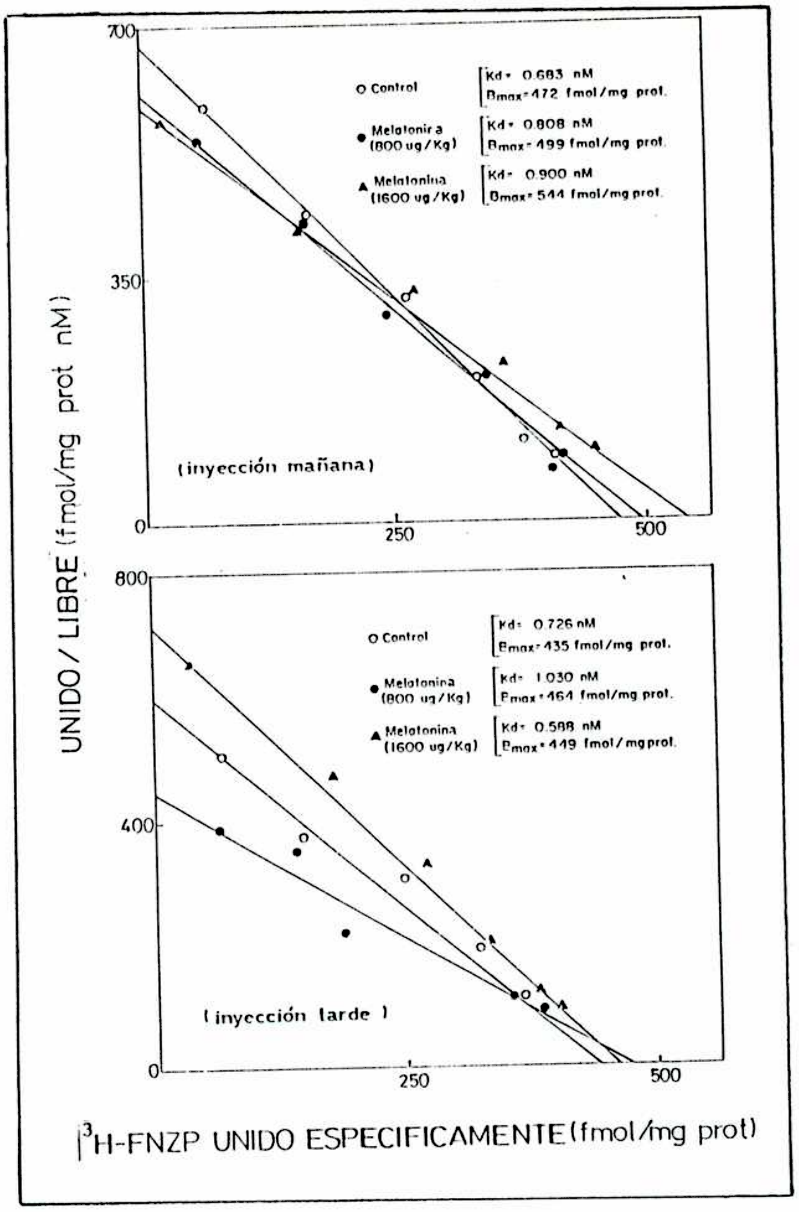

Fig. 15 Ausencia de efectos del tratamiento agudo con melatonina: 800 ug/kg (●—●), 1600 ug/kg (▲—▲) sobre el receptor de BZP en corteza cerebral de ratas intactas. Horas de inyeccidn 09.00 h (gráfico superior), 17.00 (gráfico inferior).

cambios en los sitios receptores para BZP en corteza cerebral de animales intactos. El tratamiento matutino produjo una modificación en la concentración de sitios receptores pero no en la afinidad; el tratamiento vespertino afectó a esta última (Fig 16).

Los cambios observados luego de la supresión o incremento de la melatonina circulante no parecen estar vinculados a una acción directa sobre los sitios de unión, ya que se requieren concentraciones varios órdenes de magnitud mayores que las logradas "in vivo" con las dosis administradas para obtener una inhibición de la unión de ^{3}H-FNZP a membranas cerebrales (Fig 17).

III.1.b <u>Variaciones circadianas en la unión de BZP en corteza cerebral de rata: Alteración por la pinealectomía y efecto de la melatonina</u>

Los resultados presentados en la sección anterior indican que la pinealectomía disminuye significativamente el "binding" de BZP en ratas sacrificadas en horas de la mañana luego de 14 días de la operación. Este efecto se revierte por la administración de melatonina, 800 ug/kg, inyectada 3 h antes del sacrificio.

Teniendo en cuenta que algunos autores habían sugerido variaciones diarias en la unión específica de BZP (295), y en vista de que la glándula pineal y la melatonina participan en la generación o sincronización de ciertos ritmos circadianos (296),

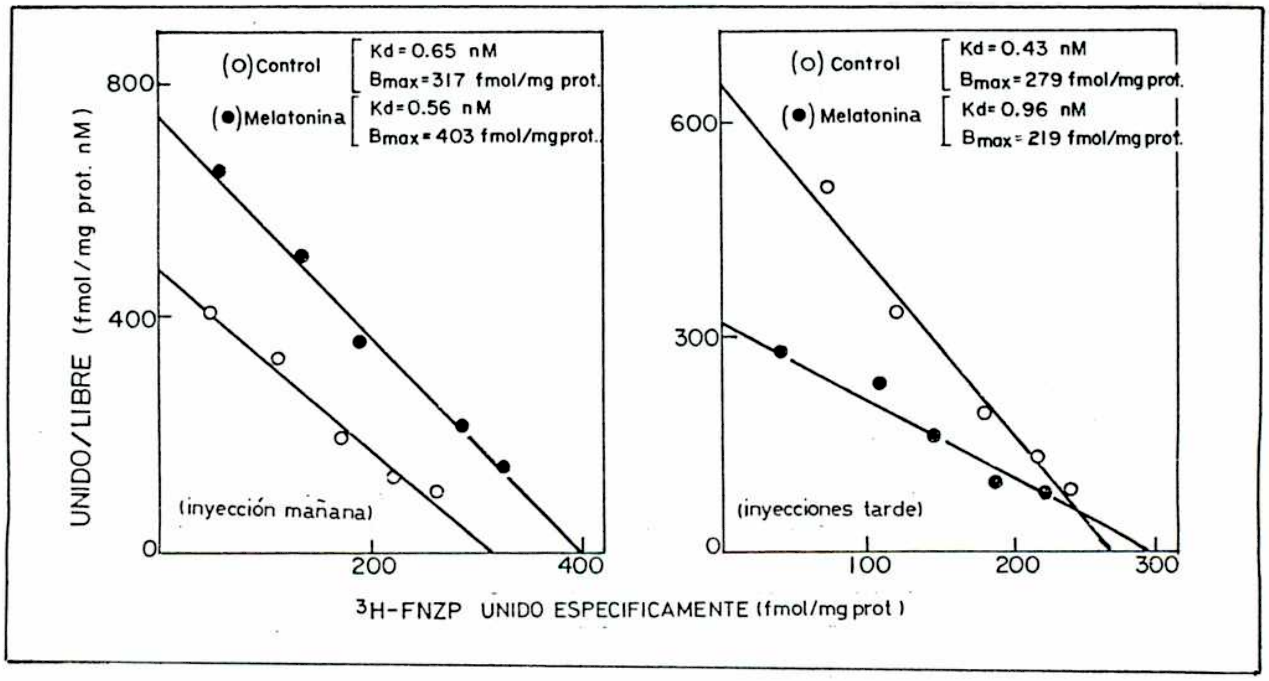

Fig. 16 Efecto de la administración de 800 ug/kg de melatonina durante 5 días a las 09.00 h (panel izquierdo) o a las 17.00 h (panel derecho) sobre la unión de ^{3}H-FNZP a membranas cerebrales de rata. Los cambios en la concentración de sitios (inyección mañana) o Kd (inyección tarde) son significativos ($p<0.05$ análisis de covarianza).

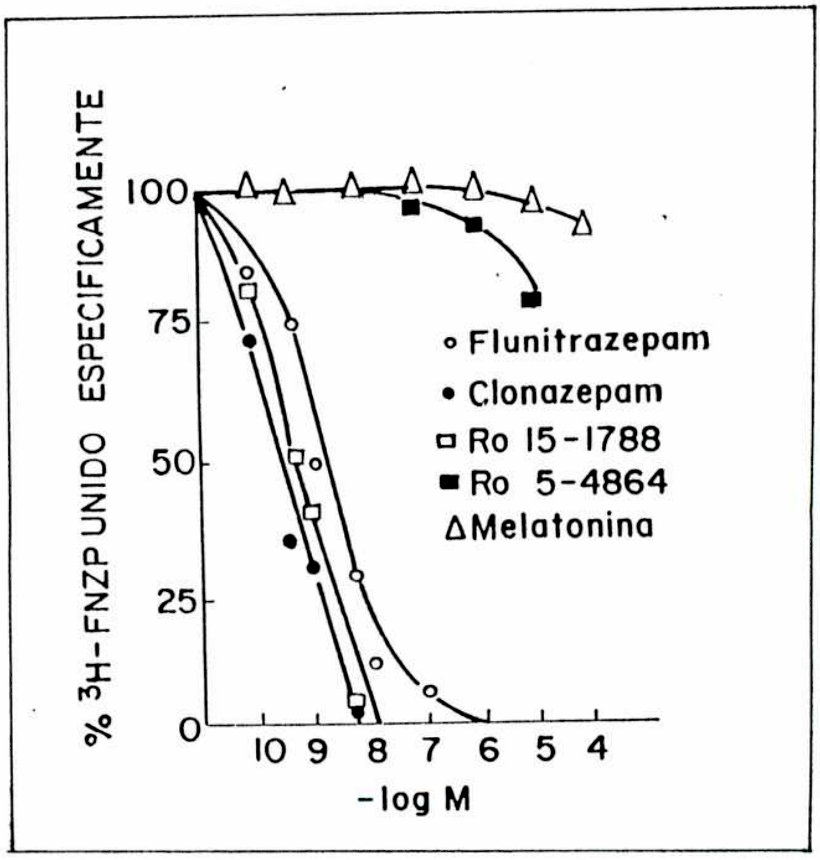

Fig. 17 Competencia de varias BZP y melatonina por la unión específica de ³H-FNZP a membranas de corteza cerebral de rata. Cada punto es la media de 3 determinaciones que difieren entre sí en menos de 10%.

resultó de interés examinar la posible relación entre el ritmo de receptores para BZP y la actividad pineal.

En la Fig 18 se representan los cambios en la concentración total de sitios de unión (Bmax) y en la constante de disociación (Kd) de la unión de ^{3}H-FNZP a membranas de corteza cerebral de ratas sacrificadas a 6 intervalos diferentes durante el ciclo de 24 h. La afinidad del receptor por el radioligando no cambia en función de la hora del sacrificio del animal, mientras que la concentración de sitios de unión alcanza valores máximos hacia la medianoche. En la Fig 19 se representan los gráficos de Scatchard correspondientes.

Luego de la caracterización de las variaciones circadianas de la unión de BZP a membranas corticales de rata, se examinó el efecto de la pinealectomía. La ablación pineal abolió el pico nocturno en la concentración de receptores observado en ratas con operación simulada. Se registró, además, una significativa disminución en la Bmax. de animales pinealectomizados sacrificados al mediodía. No se observaron cambios en la afinidad del receptor por el radioligando, ni en función de la hora del día ni de la manipulación quirúrgica (Fig 20). En la Fig 21 se representan los gráficos de Scatchard correspondientes a los 6 intervalos examinados en animales pinealectomizados o con operación simulada.

La etapa siguiente fue determinar la dosis mínima de melatonina necesaria para revertir el efecto de la pinealectomía sobre el "binding" de BZP. Se representan en la Fig 22 los valores de

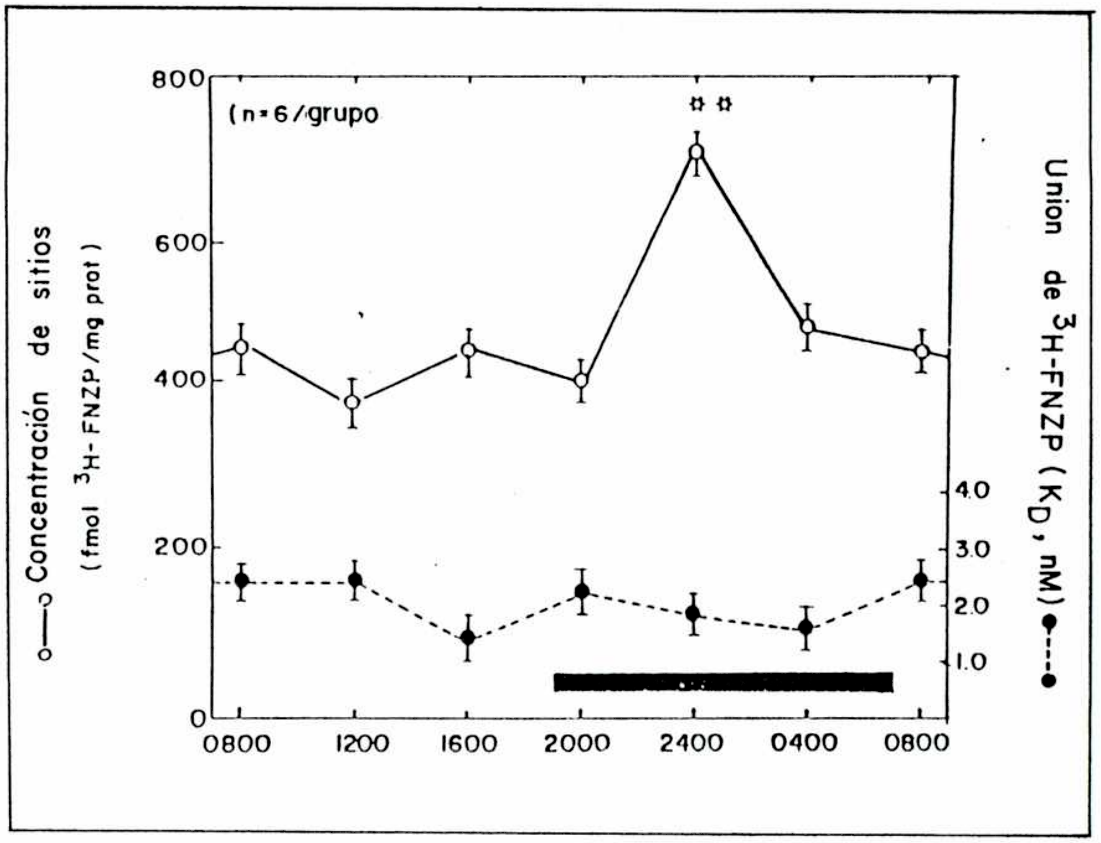

Fig. 18 Variaciones diarias en Bmax y Kd de la unión de ^{3}H-FNZP a membranas de corteza cerebral de rata sacrificadas a 6 intervalos diferentes del ciclo de 24 h. Los valores de Bmax y Kd se obtuvieron a partir del análisis de Scatchard. Se representan las medias ± ES. El análisis estadístico se realizó por análisis de varianza a 2 vías para determinar la existencia de un ritmo y se utilizó el test de Tukey para establecer diferencias significativas entre distintos tiempos. ☼☼ $p<0.01$ comparado con cada uno de los demás intervalos.

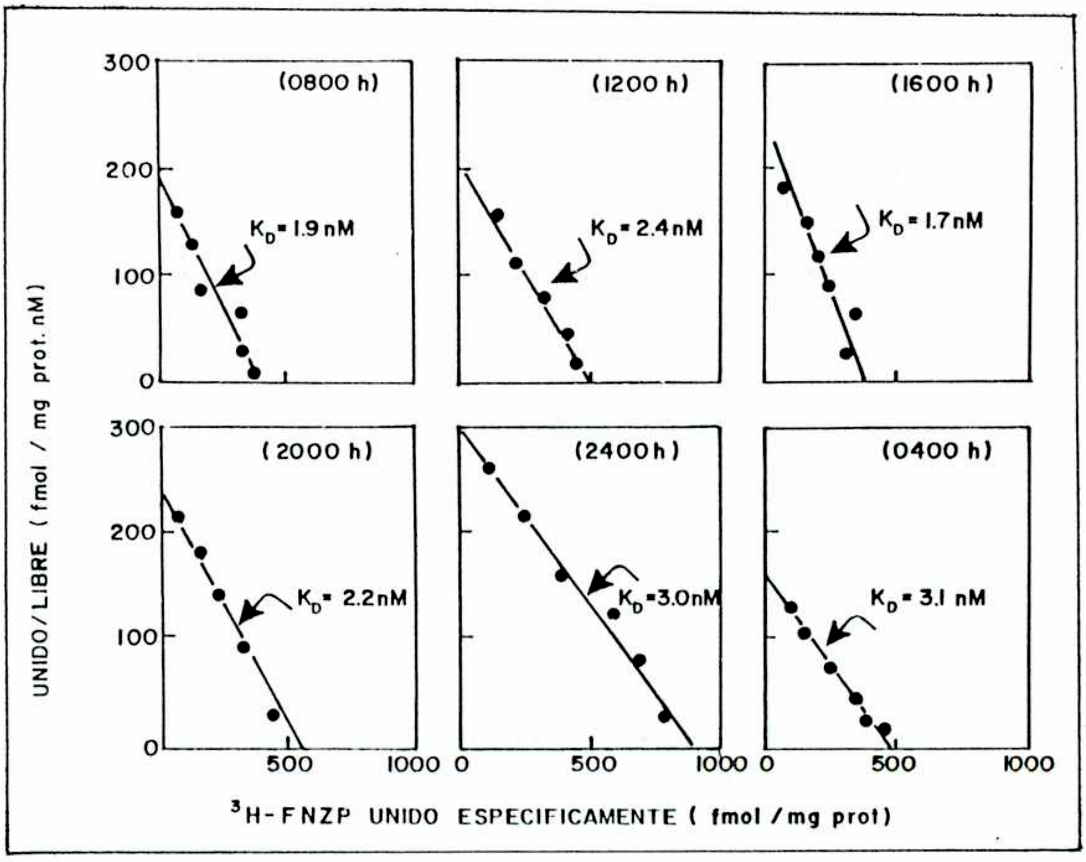

Fig. 19 Gráficos de Scatchard de la unión de ^{3}H-FNZP a membranas de corteza cerebral de ratas sacrificadas a 6 intervalos diferentes durante el ciclo de 24 h (luz de 07.00 hasta 19.00).

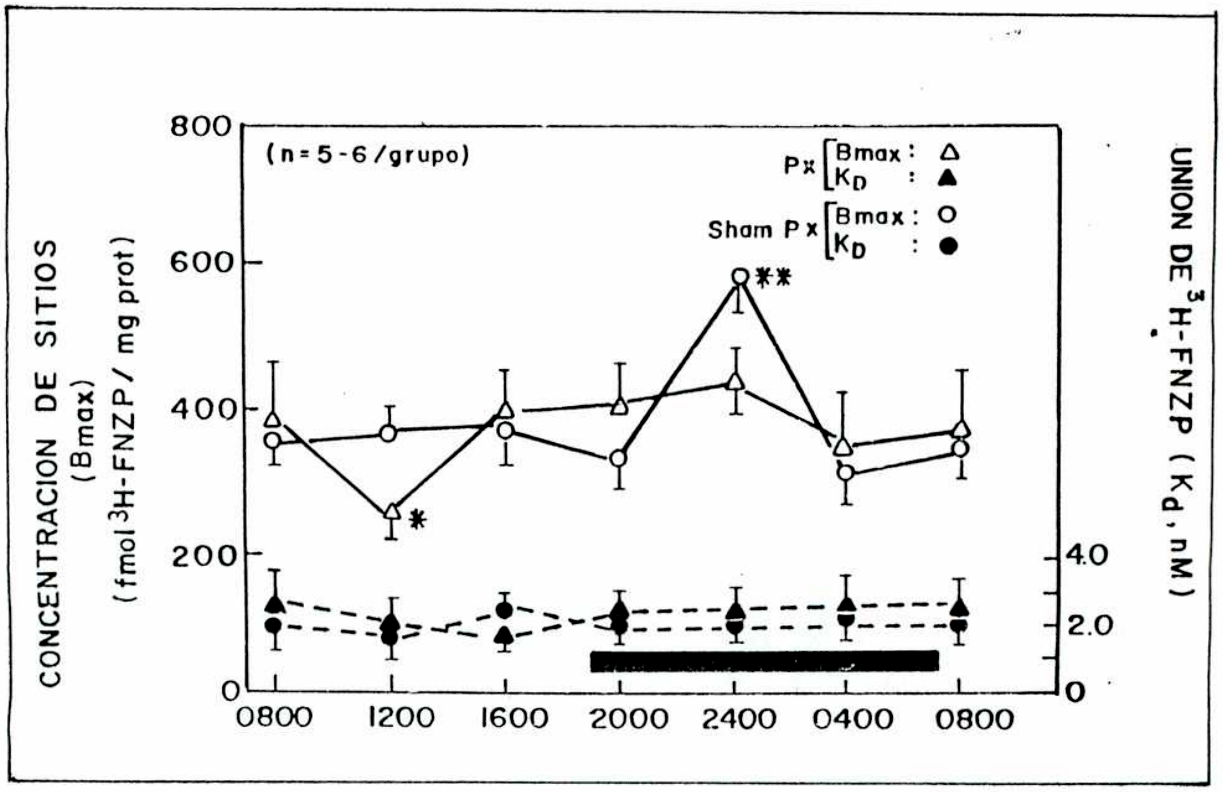

Fig. 20 Efecto de la pinealectomía (Px) u operación simulada (sham Px) sobre las variaciones circadianas de Bmax y Kd del binding de ^{3}H-FNZP a membranas de corteza cerebral de rata. Grupos de 5 ó 6 ratas sujetas a cirugía 14 días antes y mantenidas con luz desde 07.00 hasta 19.00 fueron sacrificadas a 6 intervalos diferentes durante el ciclo de 24 h. Los valores de Bmax y Kd se obtuvieron por análisis de Scatchard. Se representa la media ± ES. El análisis estadístico de varianza indica que la Bmax de ratas Px sacrificadas a las 24.00 h difiere significativamente de cada uno de los intervalos ($p<0.05$ test de Tukey) **, $p<0.05$ comparado con su respectivo control sham Px, test de Student.

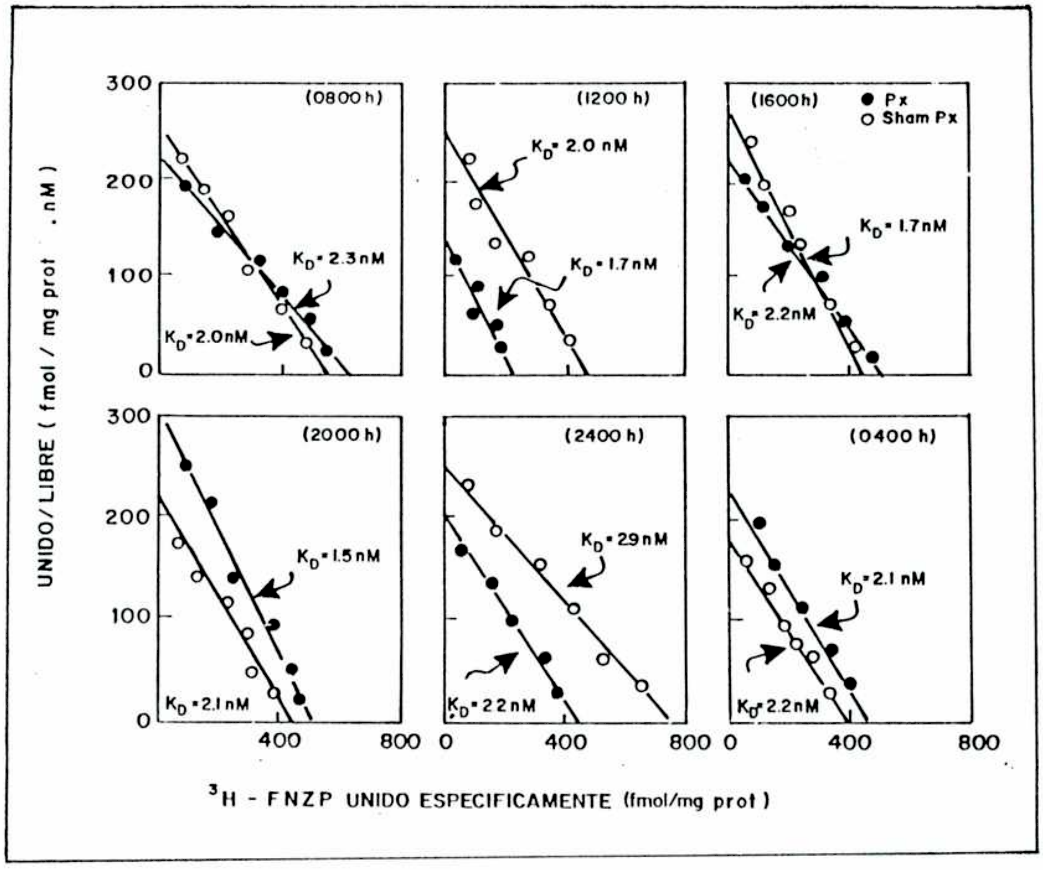

Fig. 21 Gráficos de Scatchard de la unión de ^{3}H-FNZP a membranas de corteza cerebral de ratas sujetas a pinealectomía (Px) o su operación simulada (sham Px) 14 días antes, sacrificadas a 6 intervalos durante el ciclo de 24 h (luz diaria desde 07.00 hasta 19.00).

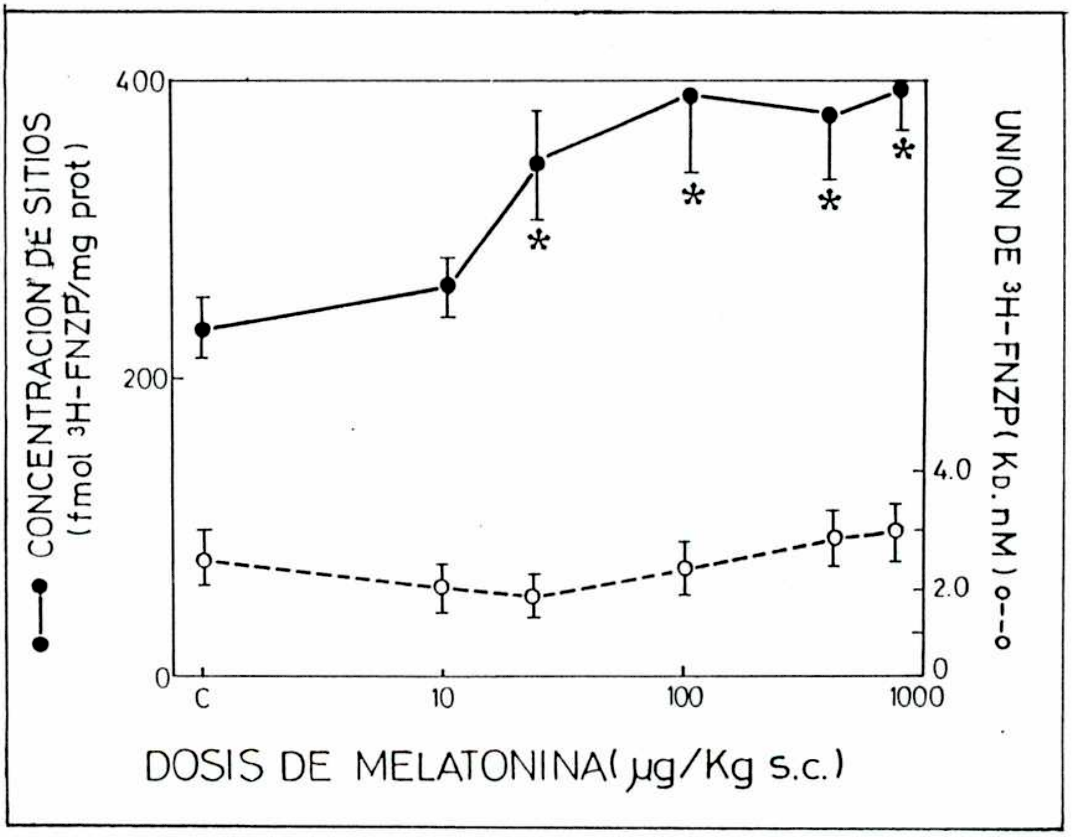

Fig. 22 Efecto de la administracidn de distintas dosis de melatonina (10-1000 ug/kg de peso) 3 horas antes, sobre Bmax y Kd de la unidn de ^{3}H-FNZP a membranas de corteza cerebral de ratas pinealectomizadas 14 días antes y sacrificadas al mediodía. Cada punto es la media ± ES de 5 ratas, obtenidos por análisis de Scatchard (* $p<0.05$ en relacidn al control inyectado con vehículo, ANOVA, test de Dunnet).

Bmax. y Kd de la unión de ^{3}H-FNZP a membranas de corteza cerebral de ratas pinealectomizadas inyectadas con melatonina (10-800 ug/kg) 3 horas antes del sacrificio, en horas de la mañana. La dosis mínima de melatonina necesaria para revertir el efecto de la pinealectomía fue de 25 ug/kg. No se observaron cambios en la afinidad del receptor por el radioligando como resultado de la administración de melatonina. En la Fig 23 se representan los gráficos Scatchard correspondientes a la curva dosis-respuesta de melatonina.

III.1.c <u>Variaciones circadianas en el "binding" de GABA de alta afinidad: Modificación por la pinealectomía o administración de melatonina</u>

Dado que la función pineal en general, y particularmente la melatonina, afectan los sitios receptores para BZF, la continuación lógica de nuestros experimentos fue analizar el vínculo entre la secreción pineal y la concentración de GABA y sus sitios receptores en el SNC.

En una primera etapa se examinaron la fluctuaciones diarias en el receptor para GABA de alta afinidad en membranas corticales de ratas sacrificadas a 6 intervalos diferentes durante el ciclo de 24 h. En las condiciones de trabajo utilizadas, con concentraciones de GABA entre 16-210 nM, se encontró sólo un sitio de unión con Kd entre 20-50 nM y Bmáx. entre 200-500 fmoles/mg de proteína (Fig 24). En la Fig 25 se representan las varia-

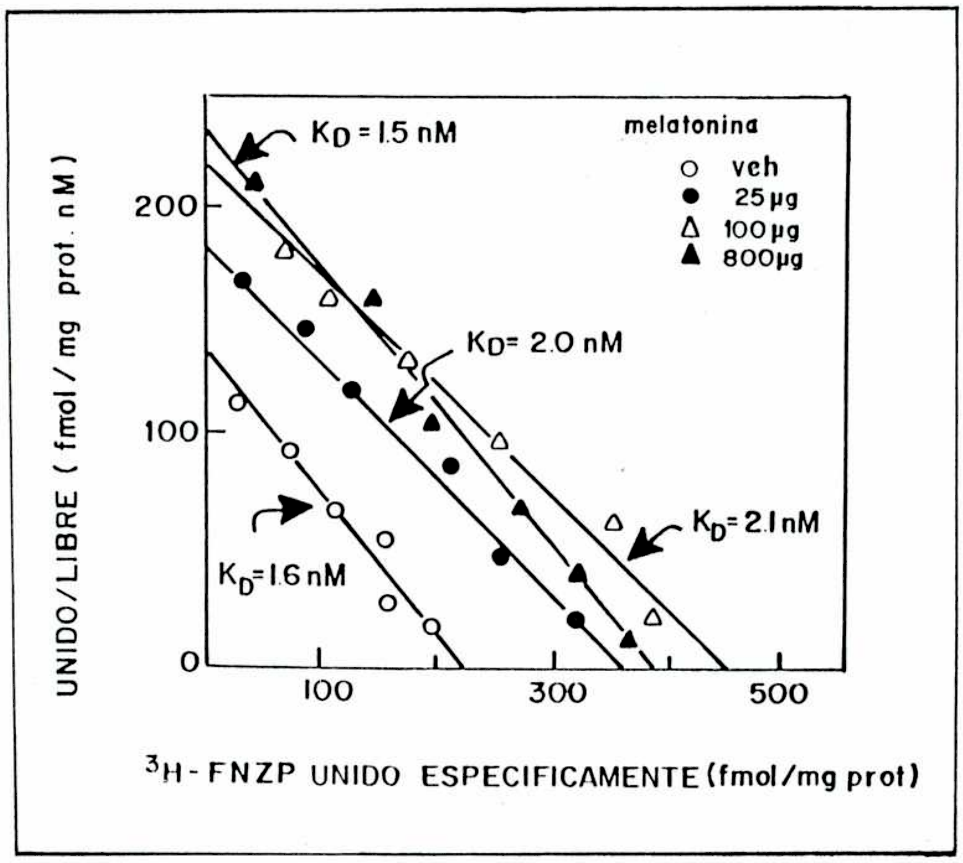

Fig. 23 Gráficos de Scatchard de la unión de ^{3}H-FNZP a membranas de corteza cerebral de ratas pinealectomizadas 14 días antes e inyectadas con melatonina (25-800 ug/kg de peso) a las 09.00 h y sacrificadas a las 12.00 h.

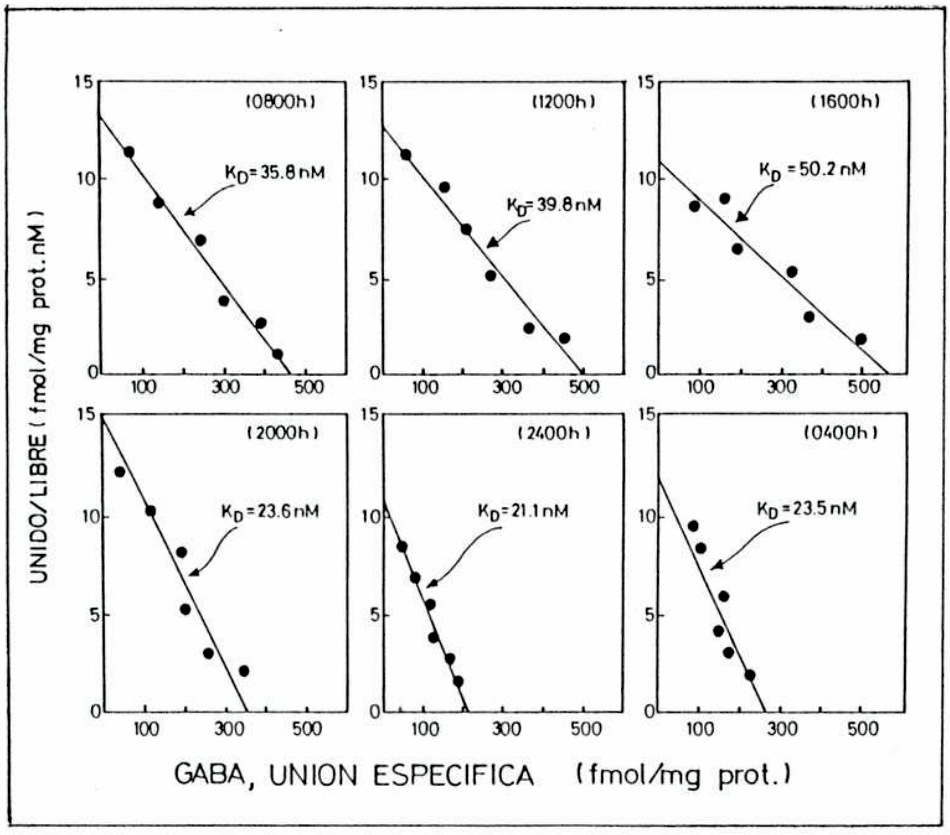

Fig. 24 Gráficos de Scatchard de la unión de ^{3}H-GABA a sitios de alta afinidad en membranas de corteza cerebral de ratas sacrificadas a 6 intervalos diferentes en el ciclo de 24 h. Se emplearon membranas congeladas y tratadas con detergente según se detalla en Materiales y Métodos.

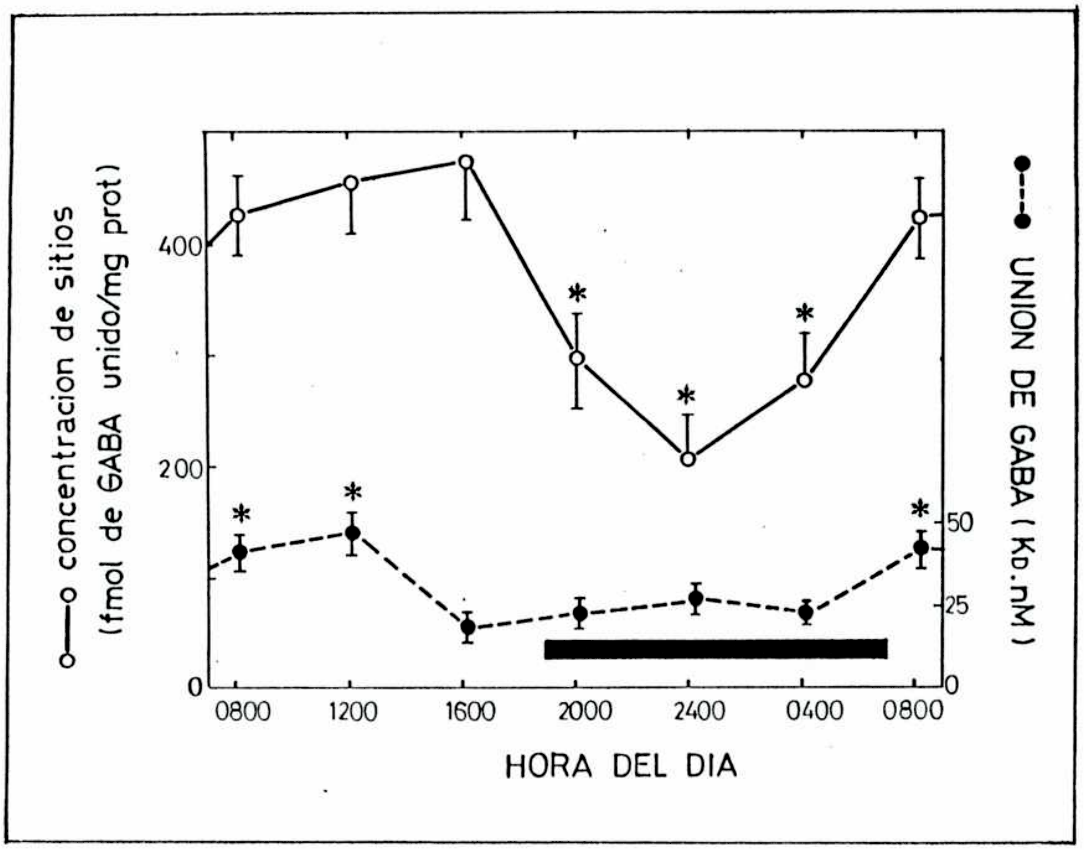

Fig. 25 Variaciones circadianas en Bmax y Kd del binding de GABA de alta afinidad en membranas de corteza cerebral. Grupos de 6 ratas mantenidas diariamente con luz desde 07.00 hasta 19.00 se sacrificaron en distintos intervalos y sus cerebros fueron procesados individualmente según se describe en Materiales y Métodos. Los valores de Bmax y Kd se obtuvieron por análisis de Scatchard. Se representa la media ± ES n = 4-6/grupo Se realizó el examen estadístico por análisis de varianza a 2 vías para establecer la existencia de un ritmo y el test de Tukey se utilizó para distinguir diferencias significativas entre intervalos. * $p<0.05$ comparado con los valores de las 16.00 a las 04.00 (Kd) o a los valores diurnos (Bmax).

ciones de los parámetros correspondientes al receptor para GABA de alta afinidad en función de la hora de sacrificio del animal. El número total de sitios de unión alcanza valores mínimos durante la noche y aumenta durante el día. Se observó una significativa disminución de la afinidad por el ligando en horas de la mañana.

La siguiente etapa fue estudiar el efecto de la pinealectomía sobre las variaciones circadianas del receptor para GABA detectado en corteza cerebral de rata. En la Fig 26 se representan los gráficos de Scatchard de la unión de ^{3}H-GABA a membranas corticales de ratas pinealectomizadas o con operación simulada sacrificadas 14 días post-cirugía, a 6 intervalos diferentes durante el ciclo de 24 h. Los valores de Kd y Bmax. en función de la hora del sacrificio se representan en la Fig 27. La pinealectomía produjo, en forma general, un aumento en la concentración de sitios receptores de alta afinidad y la modificación de su ritmicidad diaria, observándose un pico de Bmax en horas de la noche, en tanto que los animales con operación simulada presentaron valores máximos del mismo parámetro en horas de la mañana. Ambos grupos (pinealectomía y operación simulada) difieren de los animales intactos, en los que se observó una disminución de la afinidad en horas de la mañana, mientras que en los animales operados se observó una disminución en la escotofase tardía.

Los cambios en Bmax. y en afinidad de membranas de corteza cerebral de ratas pinealectomizadas, con ganglectomía cervical

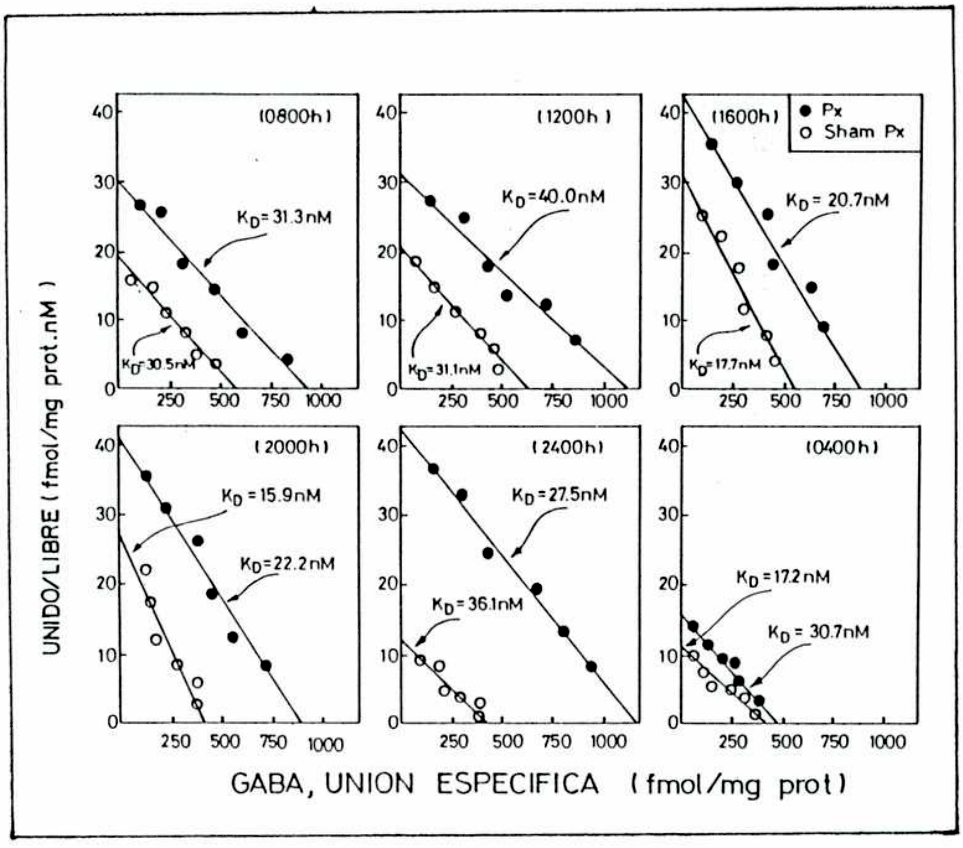

Fig. 26 Gráficos de Scatchard de la unión de GABA a membranas de corteza cerebral de ratas pinealectomizadas (Px) o con su respectiva operación simulada (sham Px) 15 días antes y sacrificadas a 6 intervalos diferentes durante el ciclo de 24 h.

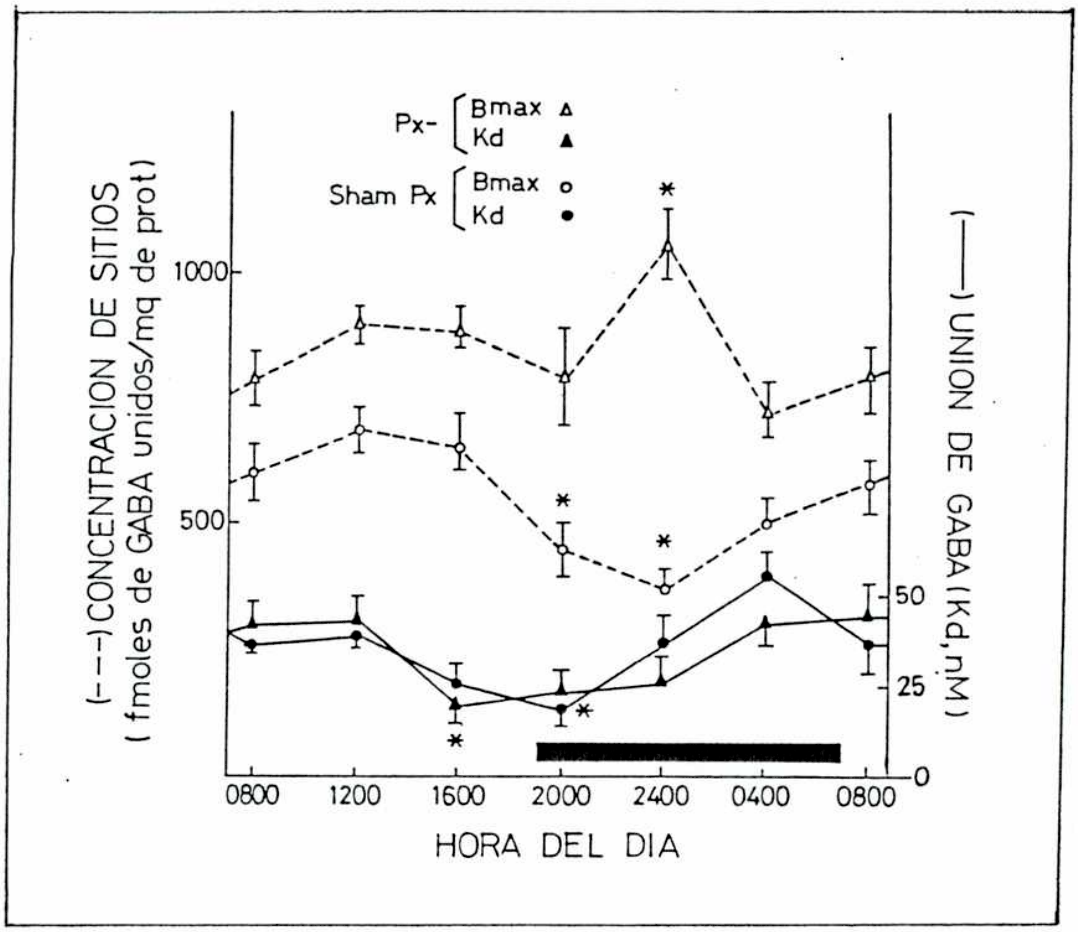

Fig. 27 Efecto de la pinealectomía (Px) o su operación simulada (sham Px) sobre las variaciones circadianas de Bmax y Kd de la unión de alta afinidad de GABA a membranas de corteza cerebral. Grupos de ratas operadas 15 días antes fueron mantenidas diariamente con luz desde las 07.00 hasta 19.00 h y se sacrificaron a diferentes intervalos, sus cerebros fueron procesados en forma individual, según se detalla en Materiales y Métodos. Los valores de Bmax y Kd se obtuvieron por análisis de Scatchard. Se representan las medias ± ES. El análisis estadístico es el mismo que se utilizó en la Fig. 25 (* $p<0.05$, test de Tukey).

superior o las respectivas operaciones simuladas se examinaron entre los días 5-15 post-cirugía. La concentración total de sitios receptores de alta afinidad (en horas de la mañana) alcanza valores máximos en los días 5 y 10 luego de la pinealectomía, disminuyendo 5 días más tarde (Fig 28). Los animales con operación simulada mostraron un aumento transitorio en la Bmax. hasta el día 10 de la operación, retornando a valores normales en el día 15. No se observaron cambios en la Kd en función del tratamiento quirúrgico o del tiempo transcurrido luego de la operación en ratas pinealectomizados o con operación simulada. Por el contrario, la ganglectomía cervical superior no afectó la concentración total de sitios receptores hasta 15 días luego de la cirugía, pero provocó un aumento en la afinidad en todos los intervalos examinados (Fig 29, tabla III).

La etapa siguiente fue examinar el efecto de la melatonina sobre la unión de GABA de alta afinidad en membranas corticales de ratas pinealectomizadas. A tal efecto, se realizó una curva dosis-respuesta de melatonina sobre la unión de GABA (Fig 30). La dosis mínima de melatonina necesaria para revertir el efecto de la pinealectomía en el aumento de la concentración total de sitios unión de alta afinidad, fue de 25 ug/kg. No se observaron cambios en la afinidad luego de la administración de melatonina. Los correspondientes gráficos de Scatchard de animales inyectados con distintas dosis de melatonina se presentan en la Fig 31.

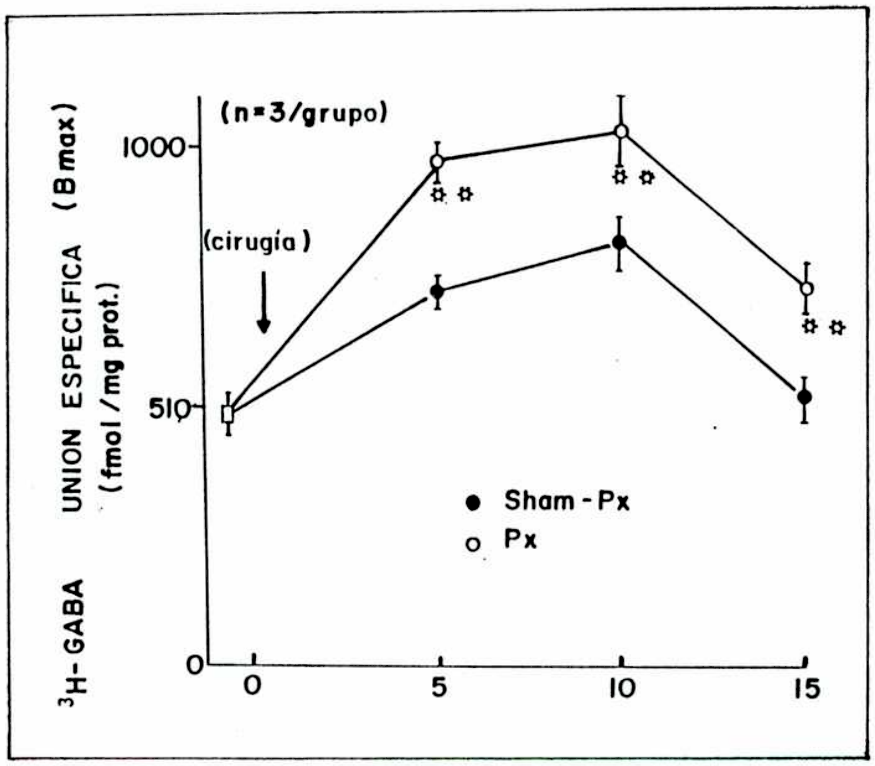

Fig. 28 Efecto de la pinealectomía (Px) (●—●) o su operación simulada (○—○) sobre la unión de ^{3}H-GABA a sitios de alta afinidad en membranas de corteza cerebral de ratas sacrificadas a los 5, 10 y 15 días post-cirugía. Los valores entre grupos difieren entre sí en todos los intervalos post-cirugía ($p<0.05$ test de Student). En el grupo Px todos los valores difieren del tiempo 0, en tanto que en el grupo sham-Px sólo difieren los valores de 5 y 10 días ($p<0.01$, análisis de varianza).

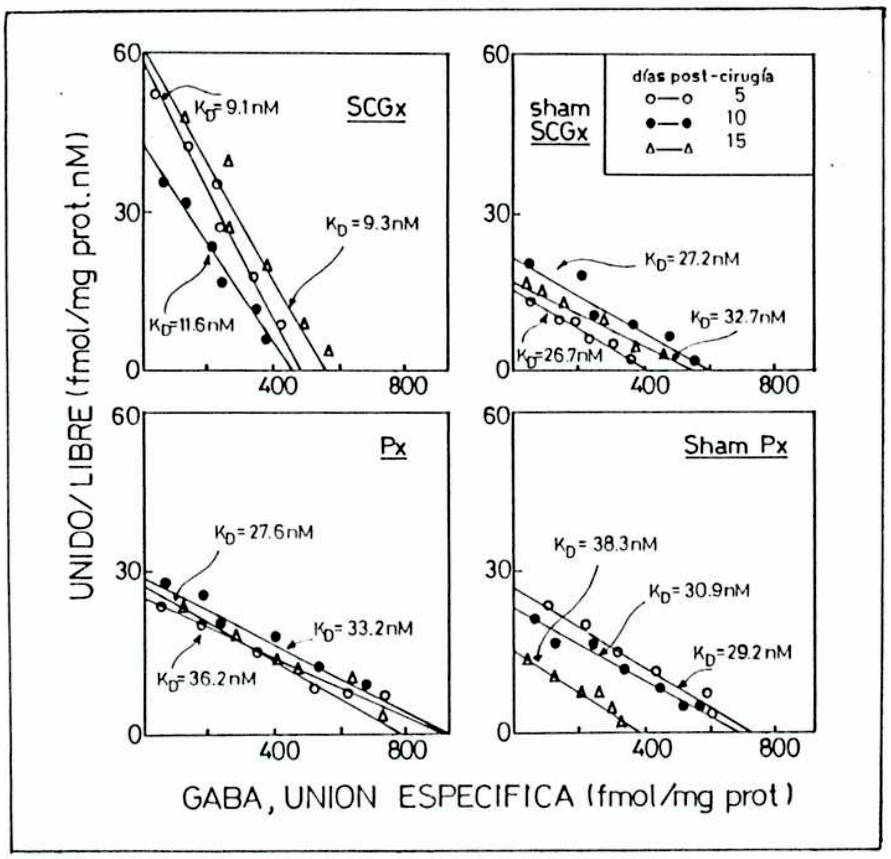

Fig. 29 Gráficos de Scatchard de la unión de ^{3}H-GABA a sitios receptores de alta afinidad en membranas de corteza cerebral de ratas sujetas a ganglectomía cervical superior (SCGx), pinealectomía (Px) o sus respectivas operaciones simuladas 5, 10 ó 15 días antes del sacrificio.

Tabla III. Efecto de la pinealectomía y gangliectomía cervical superior sobre el "binding" de GABA en corteza cerebral.

	Días post-cirugía	
	5	
grupos experimentales	Bmax	Kd
I. Pinealectomía	997 ± 51 II*, III**, IV**a	38.6 ± 4.8 III*
II. Sham pinealectomía	729 ± 60 I*, IV*	37.0 ± 4.9 III*
III. Gangliectomía cervical superior	522 ± 40 I**	17.0 ± 1.2 I*, II*, IV*
IV. Sham gangliectomía	437 ± 65 I**, II*	40.7 ± 5.2 III*

	10	
grupos experimentales	Bmax	Kd
I. Pinealectomía	1043 ± 67 II*, III**, IV*	43.6 ± 4.7 III**
II. Sham pinealectomía	818 ± 61 I*, III*, IV*	33.6 ± 4.6 III**
III. Gangliectomía cervical superior	428 ± 28 I**, II*	6.0 ± 0.5 I**, II**, IV**
IV. Sham gangliectomía	496 ± 37 I**, II*	45.9 ± 4.0 I*

15

grupos experimentales	Bmax	Kd
I. Pinealectomía	739 ± 55 II*, III*, IV*	42.6 ± 4.2 III**
II. Sham pinealectomía	562 ± 36 I*	34.6 ± 2.0 III**
III. Ganglectomía cervical superior	555 ± 40 I*	10.5 ± 4.0 I**, II**, IV**
IV. Sham ganglectomía	512 ± 28 I*	39.4 ± 4.1 III**

Los animales se sacrificaron al mediodía y sus cortezas cerebrales fueron procesadas individualemente según se describe en Materiales y Métodos. Los valores de Bmax (fmol/ mg de prot.) y Kd (nM) se obtuvieron por análisis de Scatchard. Se representa la media ± ES de 5-6 ratas.
a. Análisis de varianza (test de Scheffe). Los números romanos indican el grupo dentro de la misma columna que difiere significativamente de la media considerada y los asteriscos designan valores de p, por ejemplo, 997 (I) es diferente de 729 (II), 522 (III) y 437 (IV), *$p<0.05$, ** $p<0.01$.

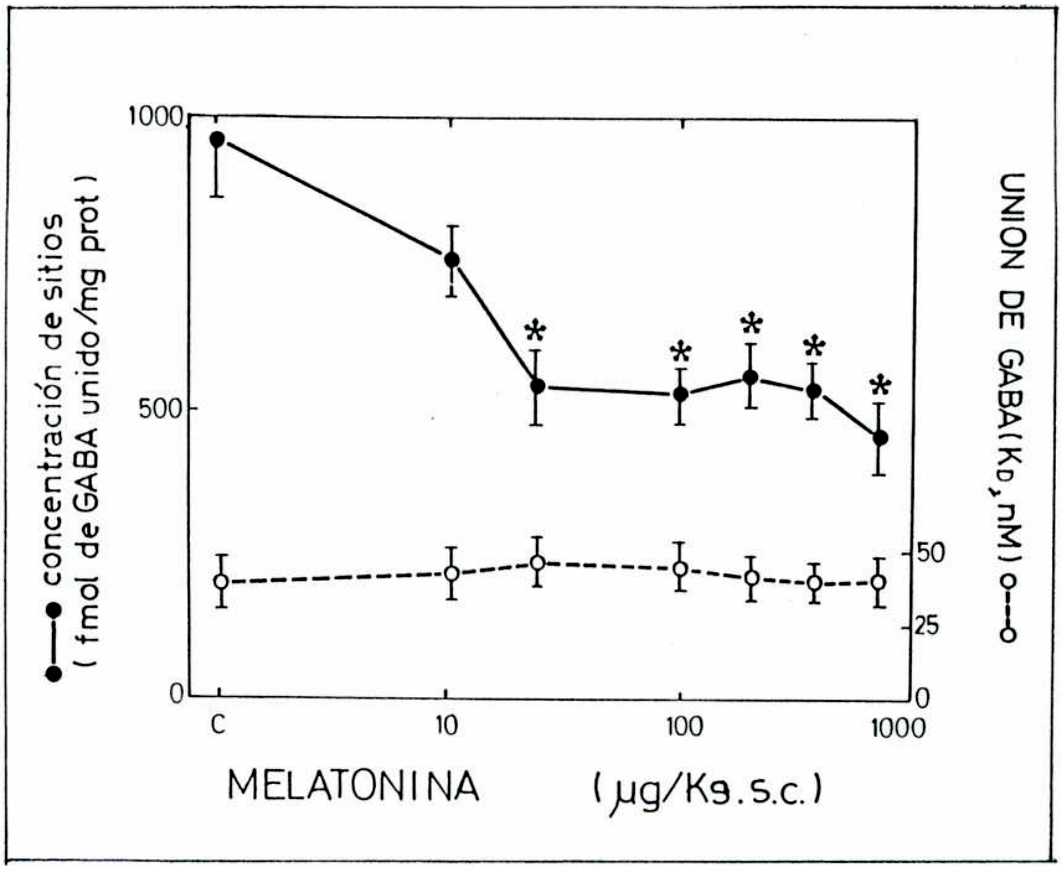

Fig. 30 Efecto de la administracidn de melatonina (10-100 ug/kg de peso), 3 horas antes, sobre valores de Bmax y Kd de la unidn de ^{3}H-GABA a sitios de alta afinidad en membranas de corteza cerebral de ratas pinealectomizadas 14 días antes, sacrificadas al mediodía. Cada punto es la media ± ES de 5 ratas, obtenido por análisis de Scatchard (* $p<0.05$ en relacidn al control inyectado con vehículo, ANOVA, test de Dunnet).

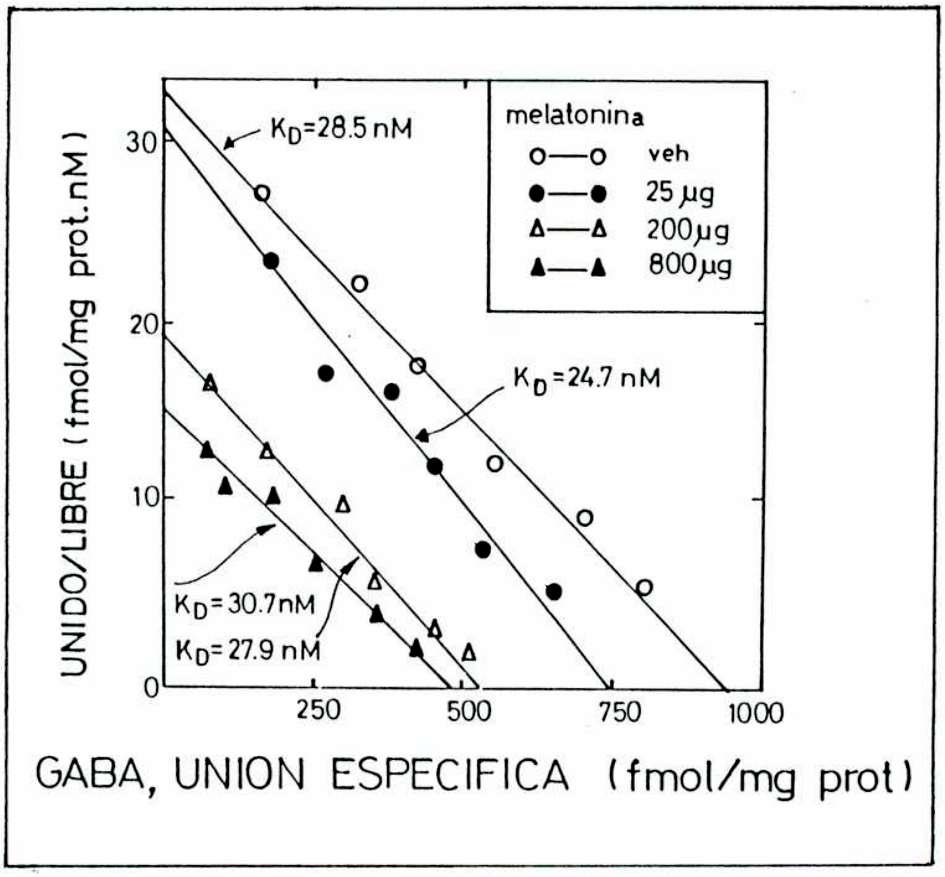

Fig. 31 Gráficos de Scatchard de la unión de ^{3}H-GABA de alta afinidad a membranas de corteza cerebral de ratas pineal-ectomizadas 14 días antes e inyectadas con melatonina (25-800 ug/kg de peso) a las 09.00 h y sacrificadas a las 12.00 h.

Los efectos de la melatonina sobre el receptor gabaérgico no se deben a un efecto directo de la hormona sobre el sitio de unión, según se demuestra en la curva de competencia realizada "in vitro" (Fig 32).

III.1.d Efecto de la melatonina sobre la acumulación de GABA "in vivo" en corteza cerebral, cerebelo, hipotálamo y glándula pineal de rata

Datos de la bibliografía demuestran que la concentración de sitios receptores para GABA de alta afinidad en sustancia nigra desaferentada (situación en la cual la concentración del neurotransmisor decrece entre el 60-80%) aumenta significativamente (297). Una posible hipótesis de trabajo para explicar la disminución en la concentración de receptores luego de la administración de melatonina, es que la hormona pineal produzca un aumento de la liberación de GABA, lo cual desencadena un fenómeno de subsensibilidad ("down regulation") del receptor cortical. Otra alternativa es que la melatonina desencadene un proceso esencialmente postsináptico sobre el receptor de GABA o sobre algún otro de los componentes del complejo supramolecular, como por ejemplo el receptor de BZP. A fin de estudiar la viabilidad de estas hipótesis fue necesario la puesta a punto de un método que permitiera evaluar el contenido de GABA en distintas áreas del SNC. El método elegido fue la técnica del radiorreceptor (275), por tratarse de un método específico y altamente sensible (esta técnica se detalla en Materiales y Métodos).

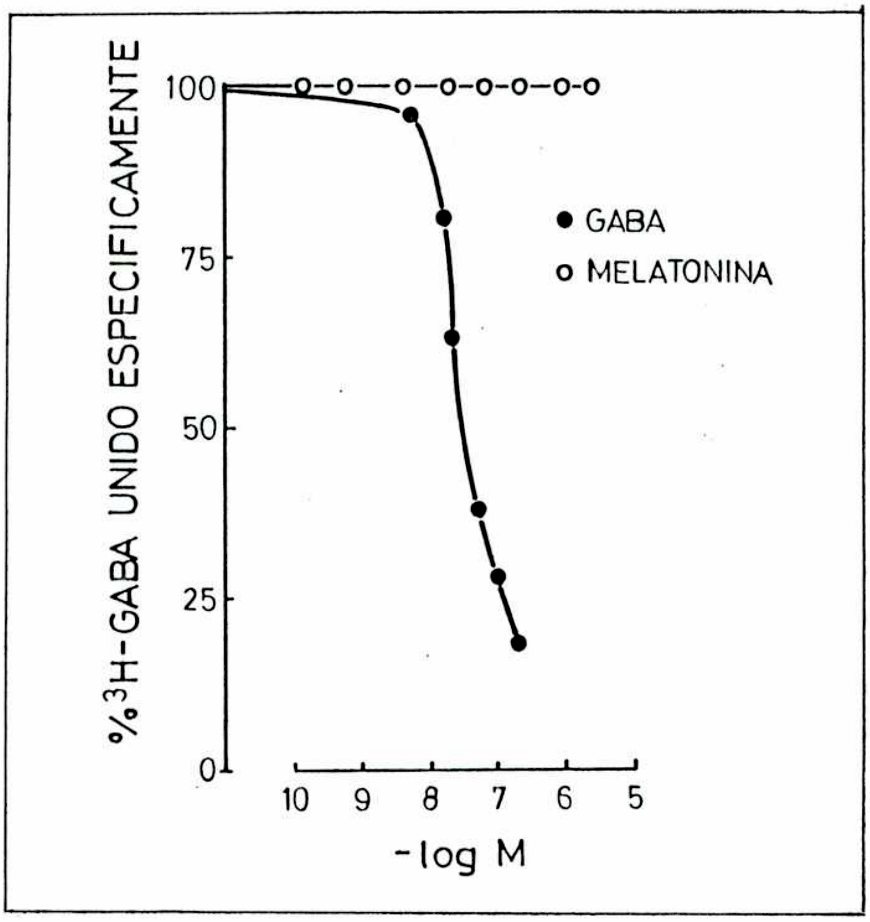

Fig. 32 Efecto "in vitro" de melatonina o GABA sobre la unión de ^{3}H-GABA a membranas de corteza cerebral de rata. Cada punto es la media de 5 determinaciones que difirieron entre sí en menos de un 10%.

Debe notarse que sin embargo, la determinación del contenido de un transmisor es a menudo un pobre indicador de la actividad neural del mismo transmisor. Este hecho, que es generalizable a la mayoría de los neurotransmisores tiene particular validez para el caso del GABA, en el cual, los datos del contenido quedan invalidados debido a que pocos minutos después de la muerte del animal se produce un aumento como resultado de la inhibición diferencial de las enzimas que catalizan la síntesis y la degradación del GABA. La enzima de degradación, GABA-transaminasa, es irreversiblemente inhibida por el efecto de la anoxia, no así la enzima de síntesis (GAD), de manera tal que se produce un aumento del GABA post-mortem. Por este motivo fue necesaria la administración de ácido 3-mercaptopropiónico (3MPA) que inhibe el aumento post-mortem descripto por inhibición de la GAD (278). Una caracterización más apropiada de la actividad neural antes que la medición del contenido, consiste en la determinación del "turnover" del neurotransmisor, evaluado por medio de la cuantificación de la acumulación de GABA, luego de la inhibición de la enzima de degradación (274, 275). Con este esquema se determinó el efecto de la melatonina sobre la acumulación de GABA "in vivo" en varias regiones del SNC (corteza cerebral, cerebelo e hipotálamo), y en la glándula pineal, por la determinación del incremento de los niveles de GABA luego de la inhibición de la enzima de degradación, GABA-T producida por la administración de γ-acetilenGABA (GAG), en dosis de 200 mg/kg, 62.5 min antes del sacrificio. El 3MPA fue administrado 2,5 min antes del sacrificio en dosis de 50 mg/kg.

La inyección de melatonina 3 h antes, (25-300 ug/kg) aumentó significativamente, entre 17-20% la acumulación de GABA en el hipotálamo (Fig 33) y produjo un aumento dosis-dependiente de este parámetro en la glándula pineal (Fig 34). Se observaron aumentos significativos en cerebelo y corteza cerebral luego de la administración de 100-300 ug/kg y 300 ug/kg de melatonina respectivamente (Fig 33).

El tratamiento con melatonina, sin la administración de GAG, no modificó los niveles de GABA en ninguna de las áreas examinadas.

III.1.e Cronodependencia del efecto de melatonina sobre la actividad glutámico descarboxilasa en SNC de rata

De acuerdo a los resultados presentados en la sección anterior, puede concluirse que la melatonina induce un aumento en el "turnover" de GABA en la glándula pineal y en el SNC de la rata, principalmente en el hipotálamo. Estos resultados se correlacionan con la distribución regional de receptores para la hormona determinada por ensayos de radioligando (131).

La estimación del "turnover" se realizó por la cuantificación de los niveles de GABA acumulados luego de la inhibición de la enzima de degradación por administración de GAG 1 hora antes del sacrificio. Los fundamentos de este método se apoyan en evidencias que demuestran que la GAD es la enzima marcadora de la actividad de la neurona gabaérgica (178); la enzima de degrada-

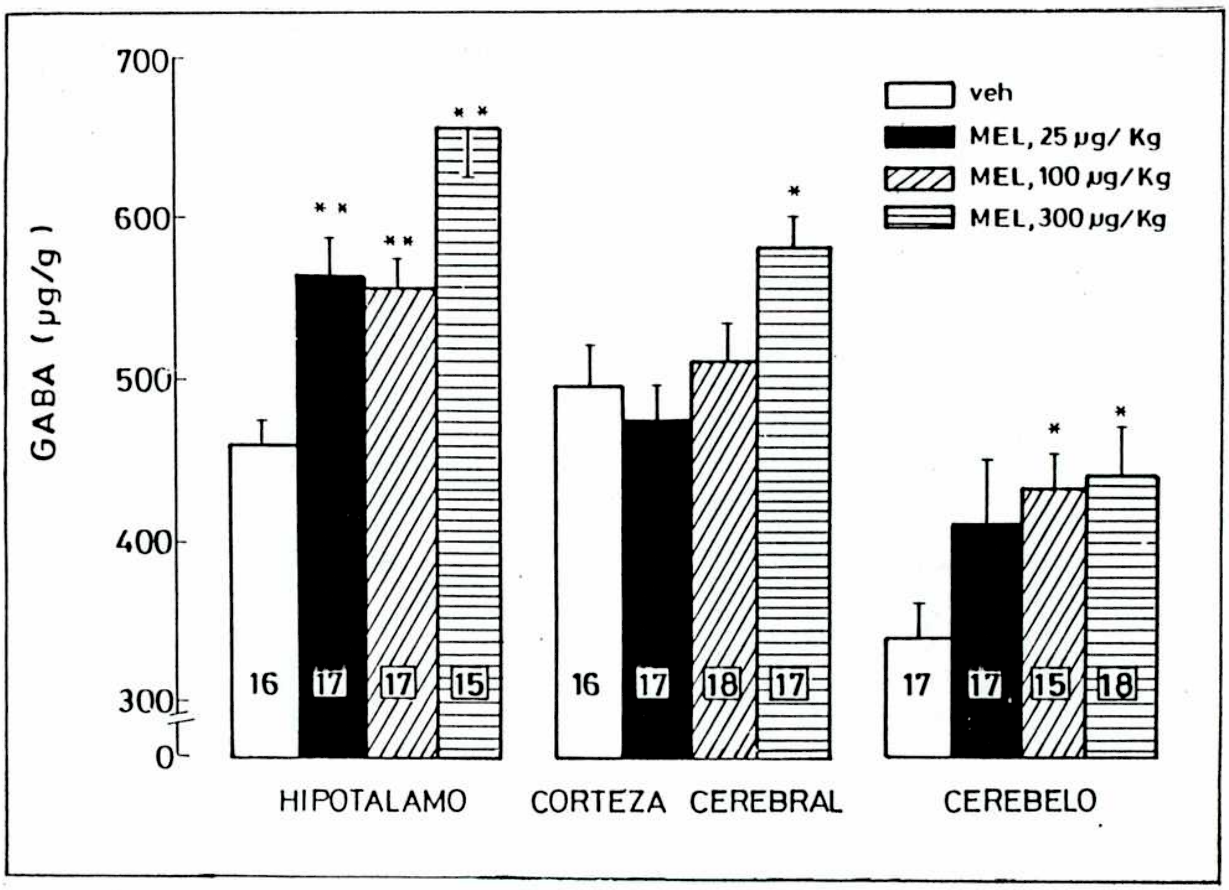

Fig. 33 Efecto del tratamiento con melatonina (25, 100 y 300 ug/kg de peso, 3 horas antes del sacrificio), sobre la acumulación de GABA en áreas cerebrales luego de la administración de γ -acetilenGABA (inhibidor de la GABA-T). Se grafica la media ± ES. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ en relación al vehículo, ANOVA, test de Dunnet.

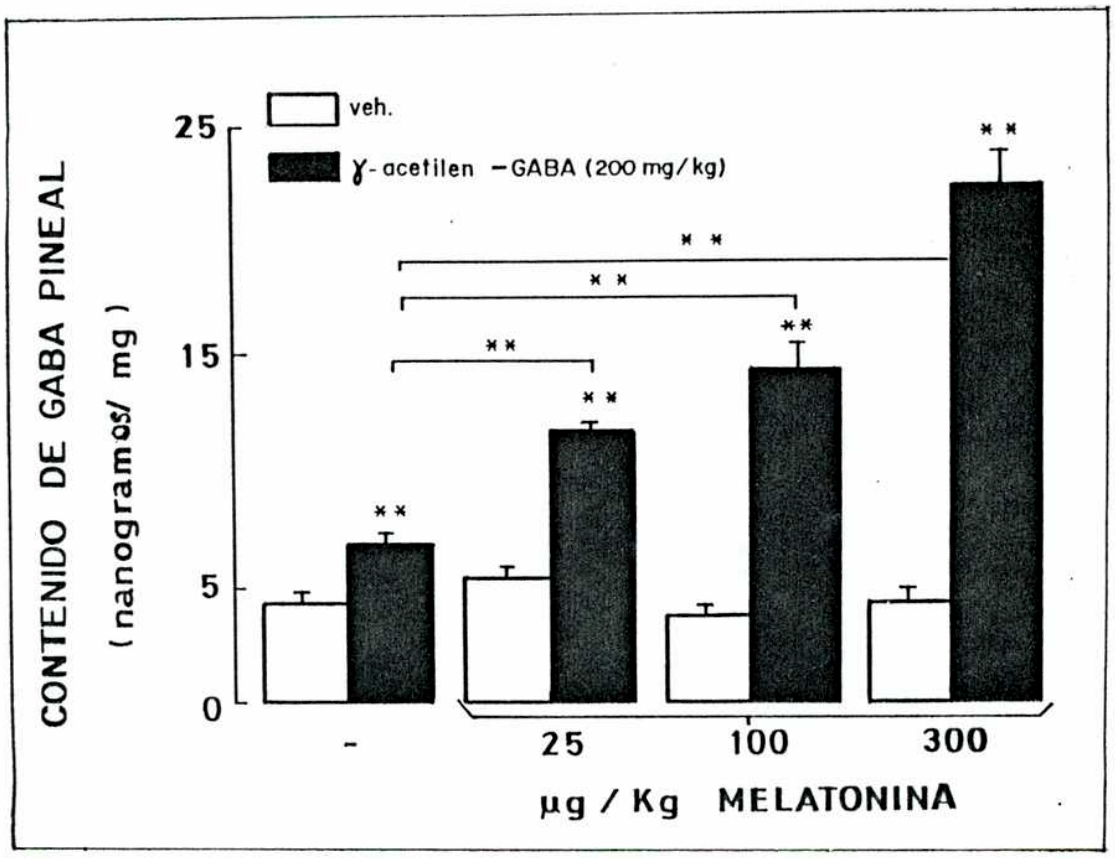

Fig. 34 Efecto del tratamiento con melatonina (25, 100 y 300 ug/kg de peso, 3 horas antes del sacrificio), sobre la acumulacidn de GABA en la glándula pineal luego de la inhibicidn de la GABA-T. Se grafican la media ± ES (n = 10-15/grupo) ** p<0.01 con respecto al grupo control (test de Student, test de Dunnet).

ción en cambio es ubicua, se inhibe por anoxia y no se correlaciona con la actividad neural (174).

El aumento de la acumulación de GABA inducido por melatonina podría indicar un efecto activador de la hormona sobre la GAD, un efecto inhibitorio sobre la liberación de trasmisor, o bien, un efecto estimulatorio sobre la recaptación de GABA. A fin de dilucidar el mecanismo que subyace al efecto de la melatonina se examinó la actividad de la GAD en el SNC de animales inyectados con la hormona.

De acuerdo a las evidencias discutidas en la Introducción, no sólo la secreción de la melatonina sino también la sensibilidad del SNC a la hormona presenta cambios fotoperiódicos con máximos de ambos parámetros en horas de la noche (87, 88). Los cambios circadianos de estos fenómenos no coinciden, apareciendo el máximo de sensibilidad más tempranamente que el pico nocturno de los niveles hormonales (298).

De acuerdo a estos antecedentes resulta esperable encontrar diferencias de la respuesta a la melatonina en función de la hora de su administración. Por lo tanto se examinó el efecto de melatonina sobre la actividad de la GAD cerebral en dos momentos diferentes del ciclo de 24 h, en horas de la mañana (inyección a las 09.00 h) y en horas de la tarde (inyección a las 17.00 h).

La melatonina administrada en horas de la tarde produce un incremento en el Km y Vmax de la GAD hipotalámica en todas las dosis examinadas (25, 100 y 300 ug/kg) y luego de 3 h de la inyección. Cuando la administración de melatonina se realizó por

la mañana se produce un cambio significativo en ambos parámetros sólo con la dosis mayor (300 ug/kg) (Fig. 35, tabla IV).

En la corteza cerebral y cerebelo, los cambios en la actividad de la GAD fueron observables sólo en horas de la tarde y con la máxima dosis de melatonina. En ambos tejidos se observa un aumento significativo en el Km de la enzima, en tanto que la Vmax. fue incrementada significativamente sólo en la corteza cerebral (Fig. 36, tabla V).

II.1.f Cronodependencia del efecto de la melatonina "in vitro" sobre el influjo de ^{36}Cl en sinaptoneurosomas hipotalámicos

En los resultados descriptos previamente se examinaron los efectos "in vivo" de la función pineal en general, y de la melatonina en particular, sobre el sistema gabaérgico central. En trabajos recientes de otros autores se demostró un efecto "in vitro" de la hormona pineal sobre receptores gabaérgicos de alta y baja afinidad, produciendo un aumento en la concentración total de sitios en ambos casos y una significativa disminución en el Kd para el sitio de baja afinidad (299). Si bien, como se demuestra en los resultados de la Fig. 32 la melatonina no compite en forma directa con el ^{3}H-GABA por sus sitios de unión, existe la posibilidad que se produzcan interacciones alostéricas entre los distintos sitios, exteriorizables "in vitro".

En base a estos antecedentes, y de acuerdo a consideraciones ya discutidas, se examinó el efecto de la melatonina sobre la

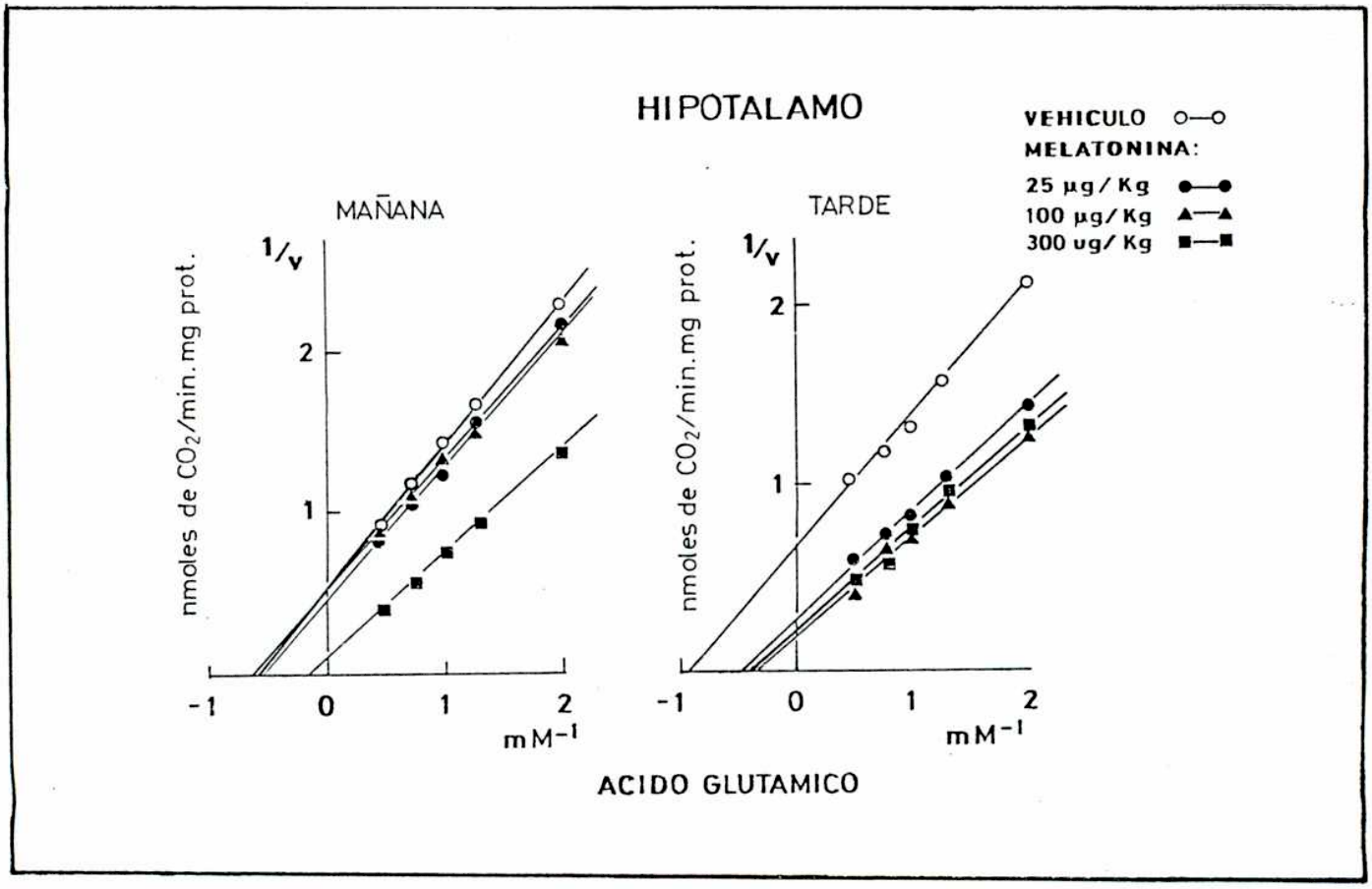

Fig. 35 Efecto del tratamiento con melatonina (25, 100 y 300 ug/kg de peso, 3 horas antes del sacrificio) sobre la actividad de GAD en hipotálamo de ratas sacrificadas a las 12.00 h (panel izquierdo) o a las 20.00 h (panel derecho). Las pendientes y ordenadas al origen se calcularon por el método de cuadrados mínimos. Los valores de Km aparente y Vmax se obtuvieron por análisis de Lineweaver-Burk.

Tabla IV. Efecto de la melatonina sobre la GAD hipotalámica.

	MAÑANA		*TARDE*	
dosis de Melatonina	Km ap.	Vmax	Km ap.	Vmax
-	2.32 ± 0.24	2.47 ± 0.19	1.17 ± 0.07	1.88+0.20
25 ug/kg	3.08 ± 0.14	2.60 ± 0.14	1.90 ± 0.23*	3.53+0.60*
100 ug/kg	1.69 ± 0.14	1.88 ± 0.26	1.98 ± 0.22*	3.05+0.40*
300 ug/kg	4.71 ± 0.83**	6.08 ± 1.17**	1.89 ± 0.18*	3.57+0.34*

La actividad de GAD se determinó por la captura de CO_2 usando 1-^{14}C-glutamato como sustrato, según se detalla en Materiales y Métodos. Los valores de Km aparente (mM) y Vmax (nmol/min/ mg de prot.) se obtuvieron por análisis de Lineweaver -Burk. Se representa la media ± ES (n=5 en cada grupo) de animales sacrificados a las 12.00 h (izquierda) o 20.00 h (derecha), inyectados con melatonina 3 h antes. Los resultados se analizaron por ANOVA a 2 vías, seguido por el test de Dunnet. ** $p<0.01$ comparado con el control, *$p<0.05$ comparado con el control.

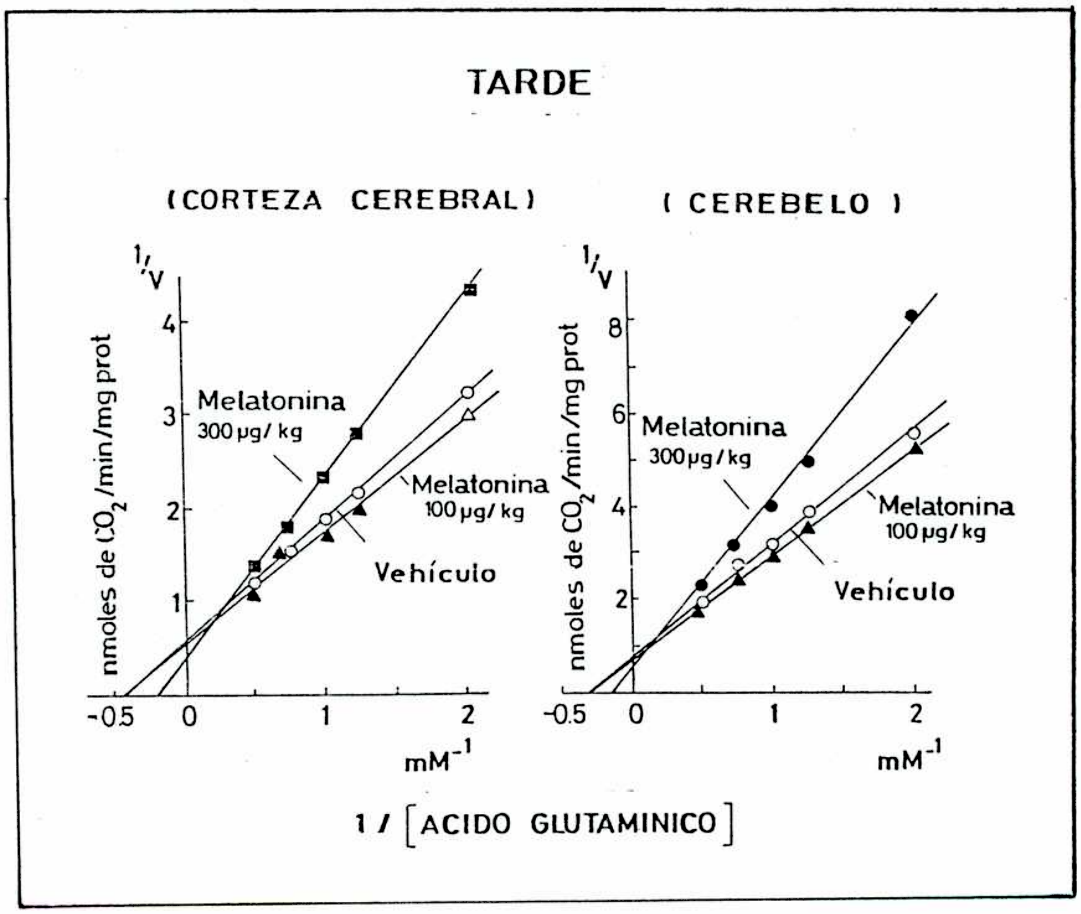

Fig. 36 Efecto del tratamiento con melatonina (100 y 300 ug/kg) sobre la actividad de GAD en corteza cerebral (panel izquierdo) y cerebelo (panel derecho). Los animales fueron inyectados con melatonina a las 17.00 h y sacrificados 3 horas más tarde. Las pendientes y ordenadas al origen se calcularon por el método de cuadrados mínimos.

Tabla V. Efecto de la melatonina sobre la GAD en corteza cerebral y cerebelo.

	Corteza cerebral		*Cerebelo*	
dosis de Melatonina	Km	Vmax	Km	Vmax
-	2.93 ± 0.50	1.67 ± 0.25	3.74 ± 0.56	1.14 ± 0.08
100 ug/kg	3.01 ± 0.22	1.50 ± 0.15	3.92 ± 0.28	1.03 ± 0.09
300 ug/kg	6.55 ± 1.26**	2.83 ± 0.33*	7.67 ± 1.21**	1.67 ± 0.31

La actividad de GAD se determinó por la captura de CO_2 usando 1-^{14}C-glutamato como sustrato, según se detalla en Materiales y Métodos. Los valores de Km aparente (mM) y Vmax (nmol/ min/ mg de prot.) se obtuvieron por análisis de Lineweaver-Burk. Se representa la media ± ES (n=5 en cada grupo). Los resultados se analizaron por ANOVA seguida por el test de Dunnet. ** $p<0.01$ comparado con el control (ANOVA, 2 vías) * $p<0.05$ comparado con el control (ANOVA, 1 vía).

captación de $^{36}Cl^-$ inducida por GABA en momentos de mínima y máxima sensibilidad a la hormona pineal.

En la Fig. 37 se representa el efecto de la melatonina sobre el influjo de $^{36}Cl^-$ en un pellet de 900 g de hipotálamo de ratas sacrificadas en dos intervalos distintos del ciclo de 24 h. El tejido se preincubó con melatonina durante 10 min y se expuso luego a un estímulo de GABA en distintas concentraciones (10-100 uM) conjuntamente con $^{36}Cl^-$ durante 5 seg.

La melatonina en horas de la mañana, en una concentración de 10^{-6} M, indujo un incremento en la captación de Cl^- para todas las concentraciones de GABA examinadas. En horas de la tarde, se evidenció una mayor sensibilidad del sistema a la hormona pineal dado que el estímulo sobre el influjo de $^{36}Cl^-$ inducido por GABA pudo evidenciarse a una concentración de 10^{-7}M.

En la Tabla VI se resume una curva dosis-respuesta de melatonina sobre el influjo de $^{36}Cl^-$ en ausencia de GABA. La melatonina "per se" induce un incremento en este parámetro con una sensibilidad diferencial de acuerdo a la hora del sacrificio. La concentración mínima de la hormona necesaria para el estímulo del "uptake" del anión es de 10^{-7} M, en horas de la mañana y de 10^{-8} M en horas de la tarde.

III.1.g <u>Reversión por picrotoxina del efecto de la melatonina sobre el influjo de $^{45}Ca^{2+}$ en sinaptosomas de hipotálamo.</u>

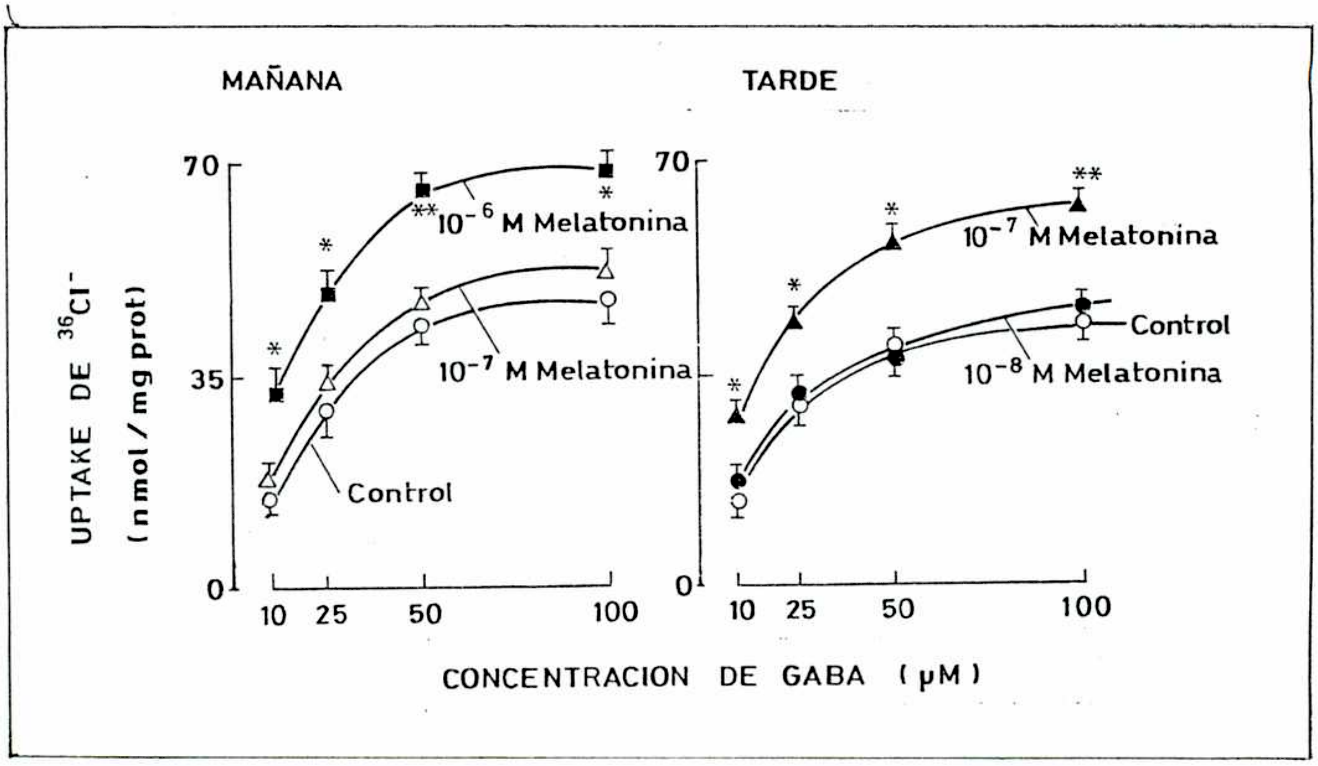

Fig. 37 Efecto de la melatonina "in vitro" sobre el influjo de $^{36}Cl^-$ inducido por GABA, en un pellet de 900 g de hipotálamos de ratas sacrificadas a las 12.00 (panel izquierdo) o 20.00 (panel derecho). Se preincubaron alícuotas del tejido con melatonina o vehículo durante 10 minutos y luego se agregó GABA (10-100 uM) conjuntamente con $^{36}Cl^-$ durante 5 segundos. Se terminó la reacción por filtración rápida a través de filtros Whatman GF/C. Se representa la media ± ES (n=7 en cada grupo) del influjo de $^{36}Cl^-$ específico (calculado como influjo total-influjo en presencia de 100 uM de picrotoxina) * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ANOVA, test de Dunnet.

Tabla VI. Efecto de melatonina sobre el influjo de $^{36}Cl^-$

Melatonina	*influjo de $^{36}Cl^-$ (nmol/mg prot.)*	
nM	*MAÑANA*	*TARDE*
-	15 ± 1	19 ± 1
1	13 ± 1	21 ± 2
10	14 ± 2	30 ± 2**
100	28 ± 2**	44 ± 3**
1000	24 ± 2**	48 ± 4**

Alícuotas de pellet de 900 g de hipotálamo de ratas sacrificadas a las 12.00 h (izquierda) o 20.00 h (derecha) fueron preincubadas con melatonina (1-1000 nM) durante 10 min y luego fueron expuestas a $^{36}Cl^-$ durante 5 seg. La reacción se detuvo por filtración rápida. Se representa la media ± ES (n=7) del influjo específico de $^{36}Cl^-$ (influjo total- influjo en presencia de 100 uM de picrotoxina). El influjo de $^{36}Cl^-$ en presencia de 100 uM de picrotoxina fue de 23 ± 3 nmol/ mg de prot. Los resultados se analizaron estadísticamente por ANOVA a 2 vías seguido por el test de Dunnet. ** $p<0.01$ respecto al control.

Los resultados presentados en la sección anterior demuestran que la melatonina incrementa la entrada de Cl^- en hipotálamo de rata. Este efecto es bloqueable por la preincubación con picrotoxina.

De acuerdo a datos ya discutidos en la Introducción se ha demostrado que la hormona pineal produce una disminución en la entrada de $^{45}Ca^{2+}$ inducida por la despolarización (148). Sobre la base de estos antecedentes se examinó la participación del Cl^- en la disminución en la entrada de $^{45}Ca^{2+}$ inducida por K^+.

Los resultados obtenidos se representan en la Fig. 38. La melatonina en una concentración 10^{-6}M, disminuye el influjo de $^{45}Ca^{2+}$ inducido por K^+. La preincubación con picrotoxina revierte el efecto de la hormona pineal.

III.2 ESTUDIO DEL SISTEMA GABAERGICO INTRAPINEAL

III.2.a Glándula pineal bovina

La principal inervación de la glándula pineal de los mamíferos proviene del ganglio cervical superior a través de fibras que siguen al nervio carotídeo interno y entran a la glándula por los nervios conarios (300). Estas fibras simpática contienen NE y posiblemente neuropéptidos. La otra inervación involucra fibras provenientes de regiones hipotalámicas y epitalámicas que pasan a través de la habénula y entran por el tallo pineal

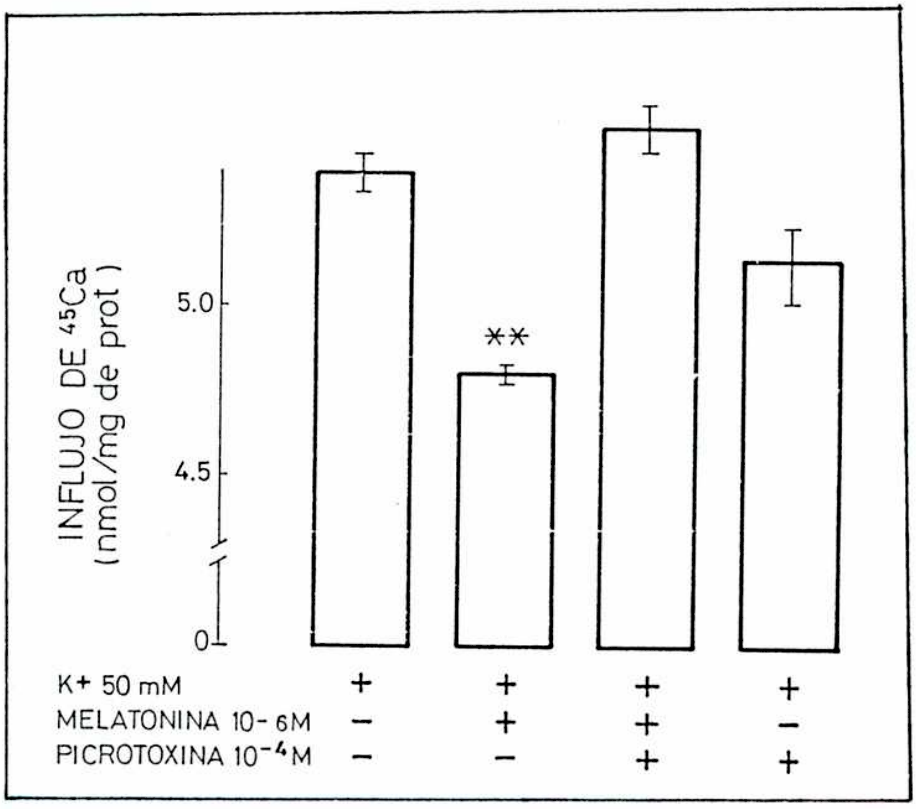

Fig. 38 Reversión por picrotoxina del efecto inhibitorio de la melatonina sobre el influjo de $^{45}Ca^{2+}$ inducido por K^+. Sinaptosomas hipotalámicos fueron preincubados durante 10 min. con melatonina 10^{-6} M, en presencia o ausencia de picrotoxina 10^{-4} M. Se inició la reacción por el agregado de $^{45}Ca^{2+}$ en un medio despolarizante. La reacción se terminó 60 seg más tarde por filtración rápida bajo vacío. Se representa la media ± ES (n = 10) del influjo de $^{45}Ca^{2+}$ inducido por despolarización (influjo en presencia de K^+ 50 mM - influjo en presencia de K^+ 5 mM). * $p<0.01$ comparado con el grupo K^+ 50 mM o el grupo melatonina + picrotoxina. ANOVA, test de Student.

(301). Las fibras centrales podrían contener una variedad de neurotrasmisores o neuromoduladores, incluyendo neuropéptidos, aminas biógenas, y probablemente, aminoácidos como el glutamato o GABA. Además, los mismos pinealocitos pueden ser una fuente importante de señales modulatorias que afecten las células vecinas o el entorno exterior a la glándula (302). Dentro de este contexto se ha propuesto el rol del GABA como posible neurotrasmisor o neuromodulador en la glándula pineal (303).

Estudios previos en membranas de pineal bovina revelan la presencia de receptores para GABA de alta y baja afinidad (304). El sitio de alta afinidad es caracterizable como receptor gabaérgico de tipo A, esto es compatible con la descripción de receptores centrales para BZP en este sistema (305). El sitio de baja afinidad fue dependiente de Na^+, sugiriendo la existencia de un mecanismo de captación de GABA en este sistema (304). Se estudiaron en este trabajo de Tesis diversos aspectos funcionales del GABA en la glándula pineal bovina.

Se representa en la Fig. 39 la cinética de captación de ^{3}H-GABA en fragmentos de pineal bovina, analizado de acuerdo al método de Lineweaver-Burk. Se detectaron dos sitios para la captación de GABA. El sistema de alta afinidad tiene valores de Km de 37 $\pm$ 5 uM y Vmáx de 2.4 $\pm$ 0.2 nmol/min. g de tejido, en tanto que para el sitio de baja afinidad se obtuvieron los siguientes parámetros: Km: 435 $\pm$ 50 uM y Vmáx.: 13 $\pm$ 3 nmol/min/g de tejido.

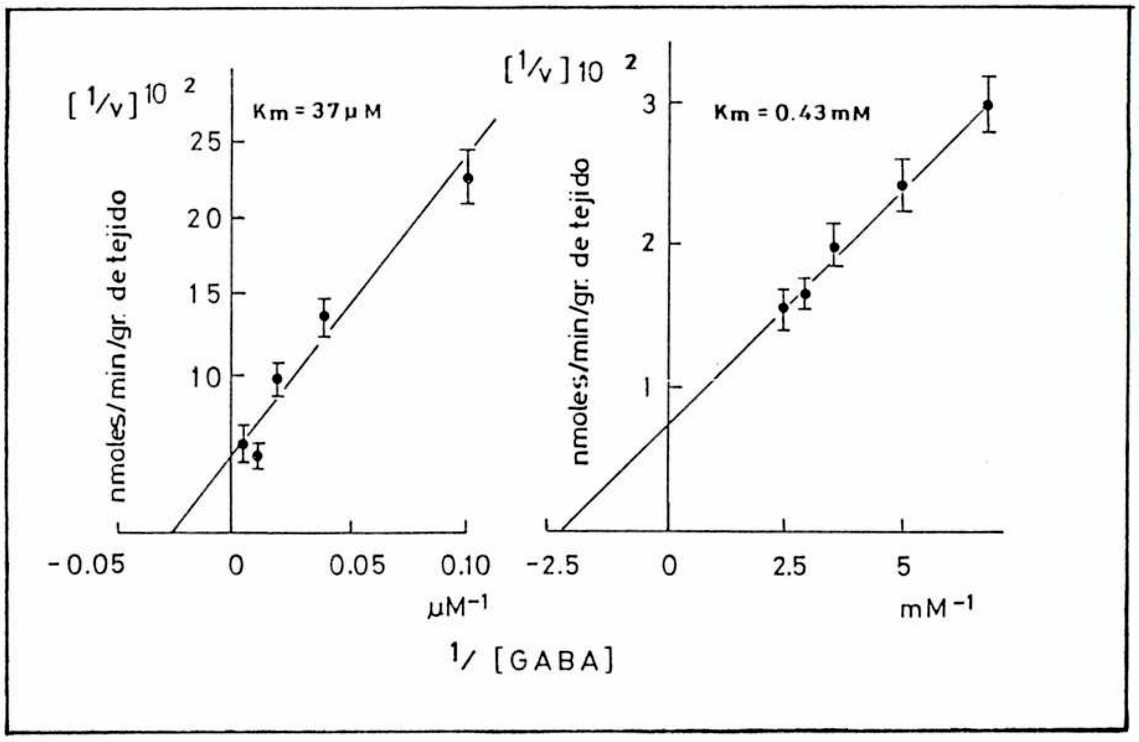

Fig. 39 Análisis gráfico de las recíprocas de la concentración de GABA y la acumulación de ^{3}H-GABA en fragmentos de pineal bovina incubados por 10 minutos a 37 °C con ^{3}H-GABA y GABA frío (10-400 uM). La acumulación de GABA se expresa como nmol/ min/ gr de tejido). Las pendientes y ordenadas al origen fueron calculadas por el método de cuadrados mínimos. Cada punto representa la media ± ES de determinaciones por sextuplicado. Otros dos experimentos dieron constantes cinéticas esencialmente similares.

Tanto neuronas (306) como células gliales (307) y algunas células endócrinas (308) muestran la capacidad de captar GABA de manera Na^+-dependiente. Estos procesos sin embargo presentan una sensibilidad farmacológica diferencial; así por ejemplo el ácido nipecótico es sustrato para la captación glial y neuronal, en tanto que la β-alanina compite por la captación de tipo glial (309). Como puede apreciarse en la Tabla VII cantidades equimoleculares de GABA frío y ácido nipecótico fueron significativamente más efectivos que la β-alanina en la disminución de la captación de ^{3}H-GABA por fragmentos bovinos. Estos resultados indican la existencia de un mecanismo de captación de GABA de tipo neuronal, además de la captación glial presente en este sistema.

Se examinó asimismo, la existencia de una mecanismo de liberación para el GABA en la glándula pineal bovina. Para ello, según se detalla en Materiales y Métodos, los fragmentos de pineal bovina fueron sometidos luego de la captación del aminoácido radiactivo a un sistema de perfusión continua y se aplicó un estímulo despolarizante de K^+ durante 5 min. En la Fig. 40 se representa la curva dosis-respuesta para el K^+ en la inducción de la liberación de ^{3}H-GABA. El K^+, a partir de una concentración de 20 mM, indujo la liberación de GABA, observándose una respuesta creciente a concentraciones mayores (40, 60 y 80 mM).

El experimento realizado a continuación fue el análisis de la Ca^{2+}-dependencia del mecanismode liberación descripto. En la Fig. 41 se observan los resultados obtenidos por la perfusión de

Tabla VII. Efecto de inhibidores sobre el "uptake" de ^{3}H-GABA en fragmentos de glándula pineal bovina.

Grupos experimentales	*uptake de ^{3}H-GABA (pmol/mg de tejido)*
Control	0.485 ± 0.085
0.5 mM GABA	0.097 ± 0.006
10 mM GABA	0.075 ± 0.007
0.5 mM -alanina	0.150 ± 0.024*
10 mM -alanina	0.161 ± 0.013*
0.5 mM ácido nipecótico	0.096 ± 0.011
10 mM ácido nipecótico	0.077 ± 0.007

Se incubaron fragmentos de pineal bovina con ^{3}H-GABA en presencia de inhibidores del uptake (GABA frío, ácido nipecótico, o -alanina), durante 10 min a 37°C. Se representa la media ± ES, * $p<0.05$ comparado con el control, GABA o ácido nipecótico. ANOVA, Test de Tukey.

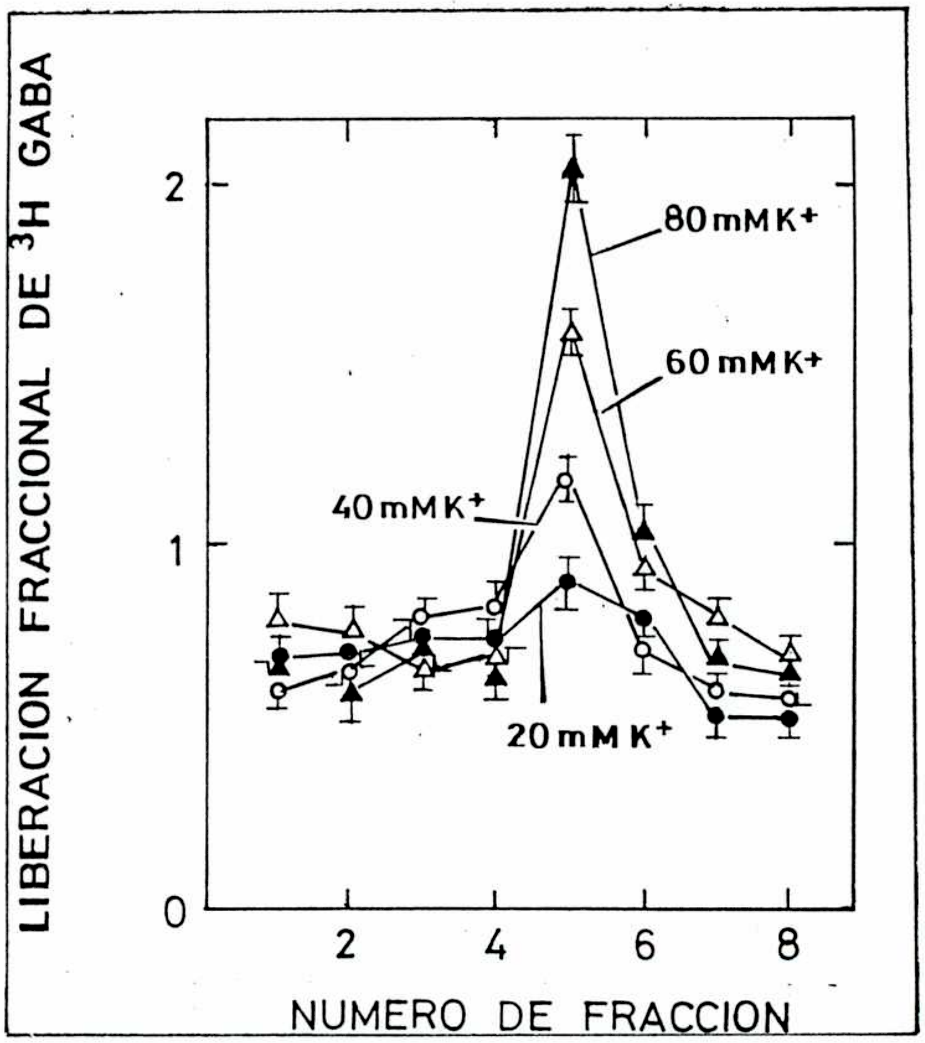

Fig. 40 Liberación de ³H-GABA por fragmentos de pineal bovina, inducida por K^+ (20, 40, 60 u 80 mM). Los fragmentos fueron cargados con ³H-GABA y perfundidos según se detalla en Materiales y Métodos. Se inició la recolección de fracciones cuando el eflujo de radiactividad se niveló (35 minutos luego de iniciar la perfusión). En todos los casos el estímulo despolarizante fue aplicado en la fracción 4. Se representa la media ± ES (n=6 en cada grupo). Las diferencias entre los grupos experimentales fueron significativas (ANOVA, test de Tukey).

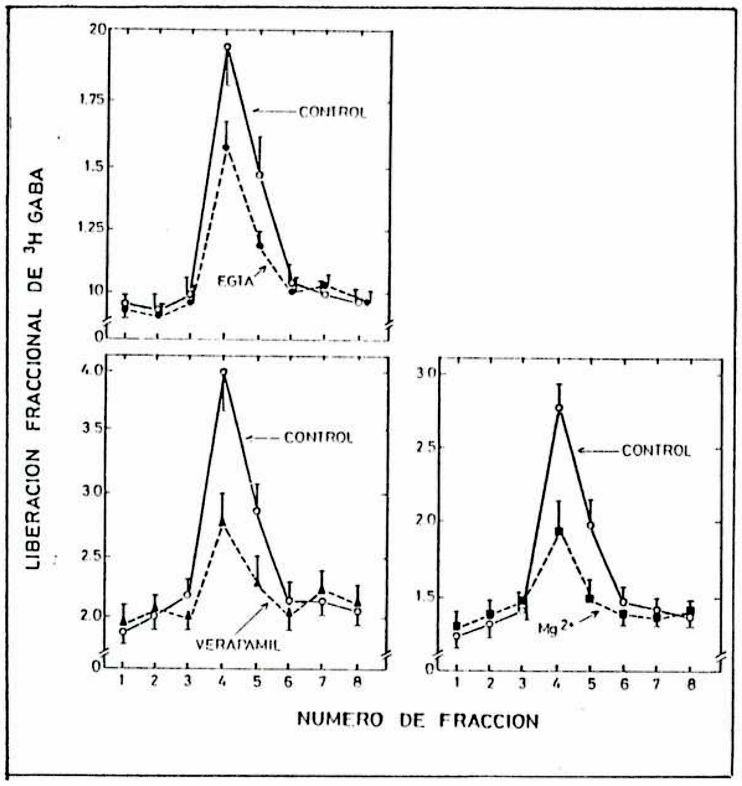

Fig. 41 Ca^{2+}-dependencia de la liberación de ^{3}H-GABA inducida por K^+ en fragmentos de pineal bovina. Los fragmentos fueron cargados con ^{3}H-GABA y perfundidos según se detalla en Materiales y Métodos. En el panel superior se representa los resultados obtenidos por perfusión con un medio libre de Ca^{2+} en presencia de 10 mM de EGTA. En el panel inferior (izquierda) el verapamil fue perfundido durante todo el experimento. En el caso del Mg^{2+} se perfundió desde el inicio con un buffer libre de Ca^{2+}, con Mg^{2+} (3.5 mM). En todos los casos se aplicó un estímulo despolarizante de K^+ (55 mM) en la fracción 3. Se representa la media ± ES (n=6 en cada grupo) de la liberación fraccional. Las diferencias entre el control y los grupos experimentales en el pico de liberación fueron significativas ($p<0.05$ experimento con EGTA" $p<0.01$, experimento con Verapamil o Mg^{2+}, test de Student).

los fragmentos en 3 condiciones de ausencia de Ca^{2+}: en presencia de EGTA (10 mM), con reemplazo de Ca^{2+} por Mg^{2+} (3.5 mM) o en presencia de Verapamil (bloqueante de canales de Ca^{2+}). En dichas condiciones la respuesta inducida por un estímulo de K^+ de 55 mM disminuyó significativamente aunque subsistió un componente de GABA liberable. Estos resultados indican que la liberación de GABA por fragmentos de pineal bovina implica en parte un proceso independiente del Ca^{2+} extracelular.

Con el objeto de establecer el tipo celular involucrado en este mecanismo de liberación, los fragmentos bovinos fueron incubados con ^{3}H-GABA en presencia de β-alanina, GABA frío o ácido nipecótico, y luego sometidos a un estímulo despolarizante. Los resultados obtenidos se representan en la Fig. 42. La incubación, tanto en presencia de GABA como de ácido nipecótico, eliminó la liberación de ^{3}H-GABA; dicha liberación subsiste, en cambio en presencia de β-alanina. Los resultados obtenidos indican la existencia de un componente de tipo neuronal para la liberación de ^{3}H-GABA, y no descartan la posible existencia adicional de un componente de tipo glial.

El efecto postsináptico del GABA asociado al receptor de tipo A consiste en un rápido incremento de la conductancia al Cl^-. En la Tabla VIII se representa el efecto del GABA en una concentración de 100 uM sobre el "uptake" de $^{36}Cl^-$ en el pellet de 900 g de homogenato de pineal bovina. La exposición al GABA durante 5 seg indujo un aumento significativo en este parámetro

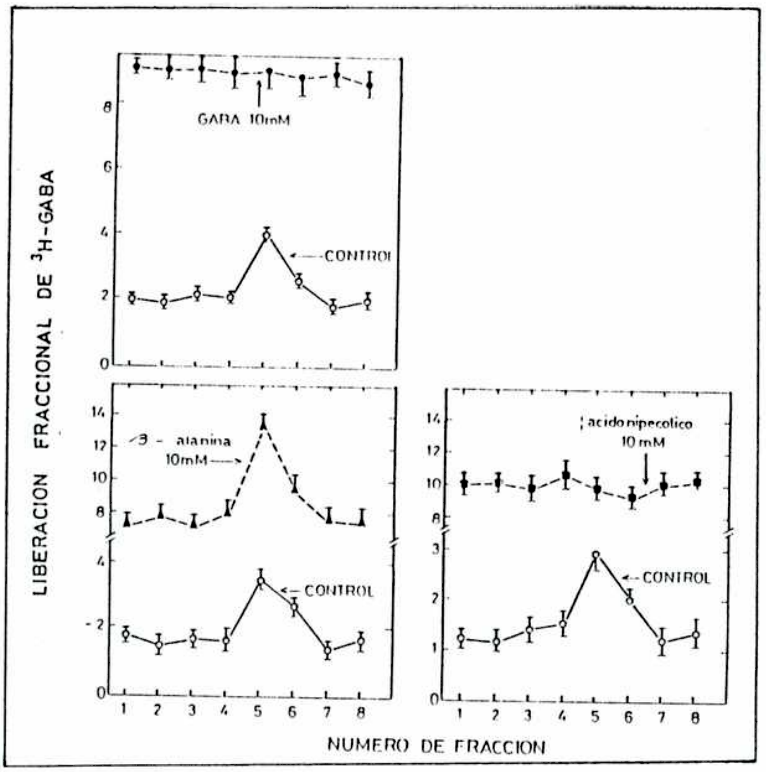

Fig. 42 Efecto de la incubación en presencia de GABA, β -alanina o ácido nipecótico sobre la subsecuente liberación de ³H-GABA inducida por un estímulo despolarizante de K^+, en fragmentos de pineal bovina. Los fragmentos fueron incubados con ³H-GABA en presencia o ausencia de 10 mM de GABA (panel superior), 10 mM de β -alanina (panel inferior izquierda) o 10 mM de ácido nipecótico (panel inferior, derecha) y luego transferidos a un sistema de perfusión según se detalla en Materiales y Métodos. En todos los casos el estímulo despolarizante de K^+ (55 mM) se aplicó en la fracción 4. Se represnta la media ± ES (n=6 en cada grupo) de liberación fraccional. No se observaron estadísticamente picos de liberación de ³H-GABA luego de la preincubación con GABA o ácido nipecótico.

Tabla VIII. Efecto de GABA sobre el influjo de $^{36}Cl^-$ en glándula pineal bovina.

	entrada de $^{36}Cl^-$ en 5 seg		
	nmol/mg prot.	captación específica	n
basal	4.6 ± 0.2	1.2 ± 0.2	7
100 uM picrotoxina	3.4 ± 0.3	---	6
100 uM GABA	5.6 ± 0.3	2.2 ± 0.2	5
100 uM GABA + 100 uM picrotoxina	3.8 ± 0.3	0.4 ± 0.1	6

El "pellet" de 900 g de glándulas pineales bovinas, se preincubó con o sin picrotoxina (100 uM) durante 5 min a 30°C, luego se agregó $^{36}Cl^-$ con o sin GABA (100 uM). La reacción se terminó 5 seg más tarde por filtración rápida a través de filtros Whatman GF/C. Se representa la media ± ES del influjo de $^{36}Cl^-$ total o específico (total-100 uM de picrotoxina). * $p<0.01$ comparado con el basal o el grupo GABA + picrotoxina. ANOVA, test de Dunnet.

que fue bloqueable por la preincubación durante 5 min con picrotoxina.

De acuerdo a lo discutido en la Introducción, se ha descripto la existencia de dos tipos de GAD, con diferencias inmunológicas y bioquímicas (187). A fin de caracterizar la actividad GAD en este sistema se estudió el efecto del ácido aminooxiacético (AOAA) sobre la cinética de la enzima. En la Fig. 43 se representa el análisis de Lineweaver-Burk de los resultados obtenidos. El AOAA en una concentración de 1 mM indujo una disminución significativa en la Vmáx. sin modificaciones en el Km aparente. De acuerdo a este análisis la Vmáx. del grupo control fue de 50.4 ± 6.9 y para el grupo incubado con AOAA, el valor fue de 13.8 ± 1.5 pmol/min/mg de prot, respectivamente.

Una cuestión a resolver a partir de estos resultados es si los procesos de captación, liberación, actividad de la enzima de síntesis y efecto postsináptico asociado, reflejan la existencia de terminales gabaérgicas pineales, o bien se trata de una propiedad de las células del parénquima pineal. Para discernir entre estas posibilidades, se examinó el efecto de liberación de ^{3}H-GABA en fragmentos provenientes de la región proximal, medial y apical de la glándula, observándose una respuesta semejante entre los distintos sectores (resultados no mostrados). Esto es un indicio de que la propiedad de liberación de GABA corresponde a los pinealocitos pues las posibles fibras pinealopetales de origen central deberían concentrarse en la región proximal de la glándula, como lo indican distintos estudios histológicos (310).

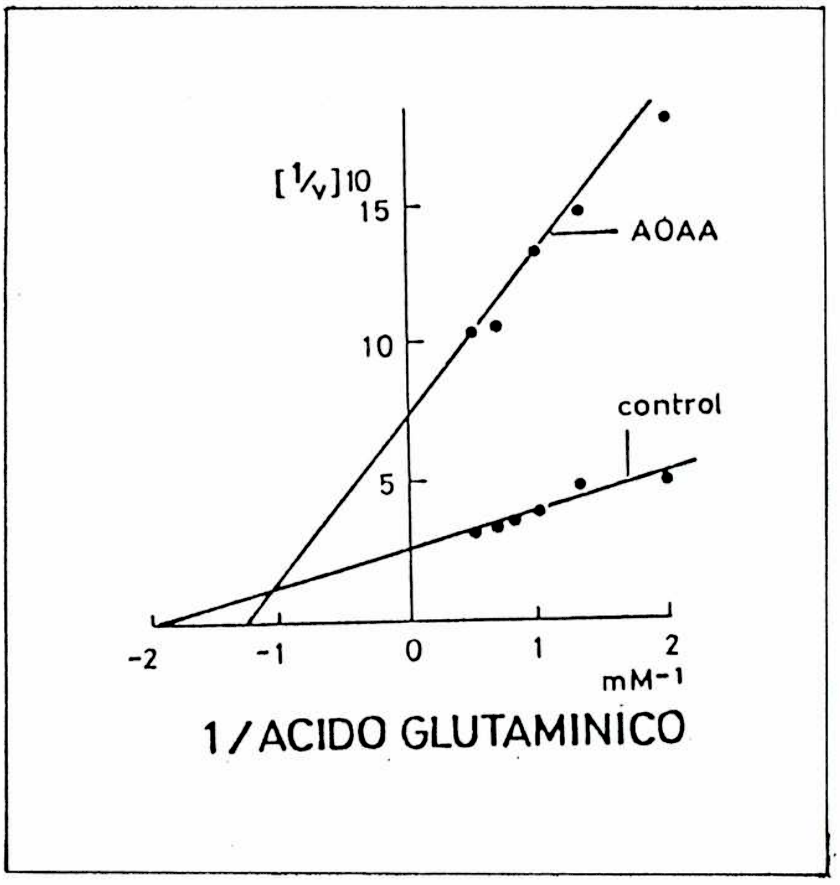

Fig. 43 Actividad de GAD en glándula pineal bovina: determinación gráfica del Km aparente y Vmax por el método de Lineweaver-Burk, en presencia o ausencia de 1 mM de AOAA. La pendiente y ordenada al origen fue calculada por el método de cuadrados mínimos. Cada punto representa la media de determinaciones por cuadruplicado que difieren en menos del 10%.

Una forma más directa de evaluar la existencia de almacenamiento neural o parenquimatoso del GABA, fue realizada por estudios inmunohistoquímicos. Se presentan los resultados obtenidos en la Fig. 44, 45, 46 y 47.

La Fig. 44 muestra un corte de glándula pineal bovina tratado con anticuerpo antienolasa neuronoespecífica. La inmunomarcación fue realizada por el método de inmuno-peroxidasa, a través del sistema amplificado de avidina-biotina. Se observa un conjunto de pinealocitos homogéneamente teñidos.

En las Fig. 45, 46 y 47 se muestran cortes de pineales bovinas tratadas con anticuerpo específico antiGABA (provisto generosamente por el Dr. Somogyi). Aproximadamente 15% de las células pineales mostraron tinción positiva. El material revelado tiende a concentrarse en el polo secretorio perivascular (Fig. 45, 46). En la Fig. 47 se observa con mayor aumento un pinealocito gabaérgico con prolongaciones características.

III.2.b <u>Glándula Pineal de Rata</u>

En la glándula pineal de rata, la concentración de GABA es de 2-3 órdenes de magnitud mayor que la concentración circulante (311). Se ha detectado actividad de GAD en este sistema (312), así como síntesis de GABA radiactivo a partir de glucosa o acetato marcados (313). En tanto que la actividad de GAD, el contenido de GABA y el "uptake" de ^{3}H-GABA, no se modifican en ratas sujetas a gangliectomía cervical superior, se ha sugerido

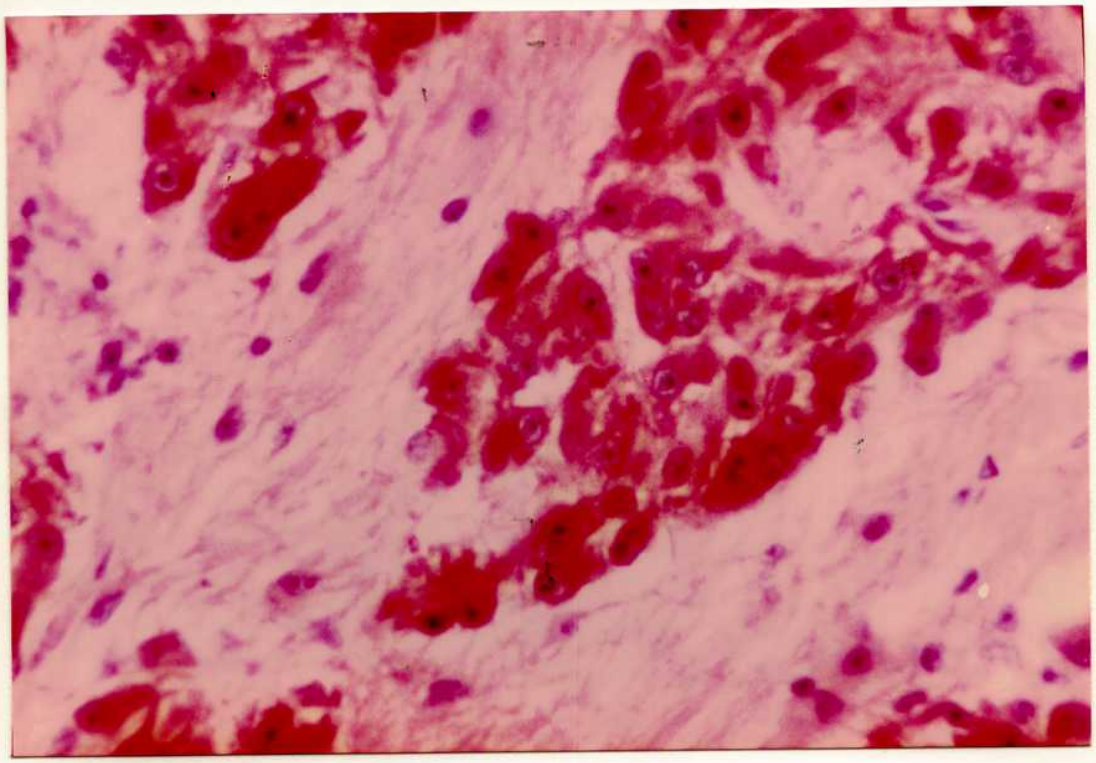

Fig. 44 Corte de glándula pineal bovina. Marcación de NSE en todos los pinealocitos. Revelado con AEC y observación al microscopio óptico con aumento de 10 X.

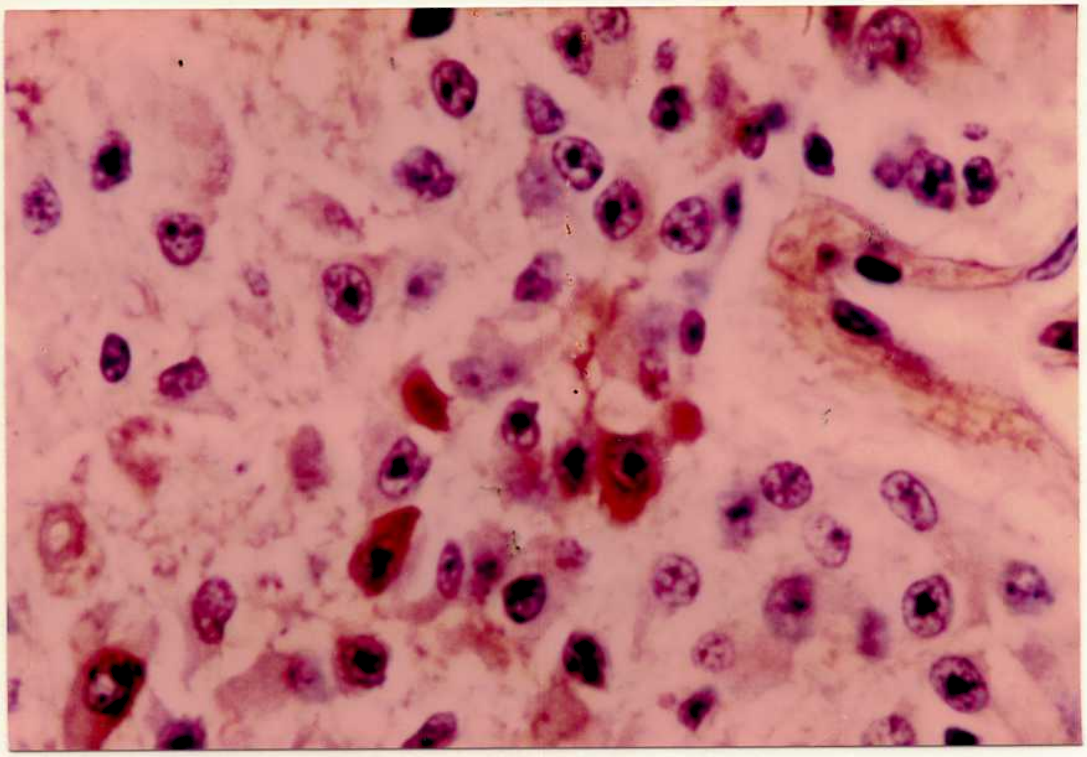

Fig. 45 Corte de glándula pineal bovina. Marcación de GABA con un anticuerpo específico antiGABA. La positividad (color marrón) se observa para algunos pinealocitos y para la región perivascular. Revelado con DAB y observación al microscopio óptico con aumento de 20 X.

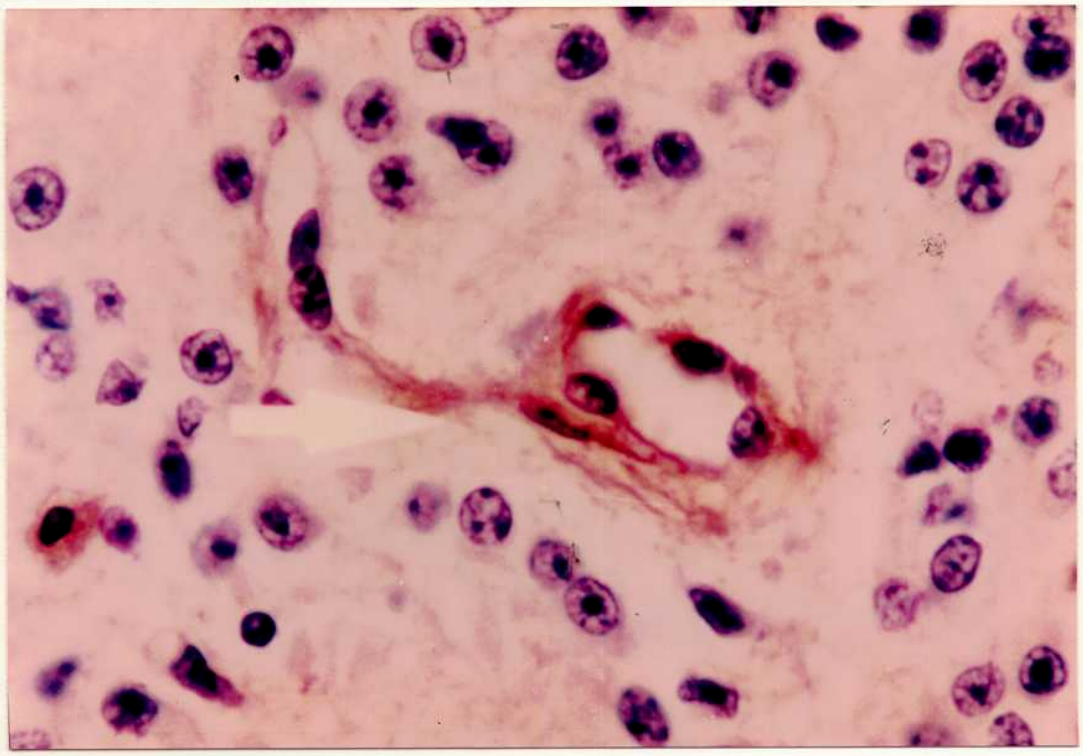

Fig. 46 Corte de glándula pineal bovina. Marcación de GABA con un anticuerpo específico antiGABA. Se observaron pinealocitos negativos y prolongaciones perivasculares positivas (color marrón). Revelado con DAB y observación al microscopio óptico con aumento de 20 X.

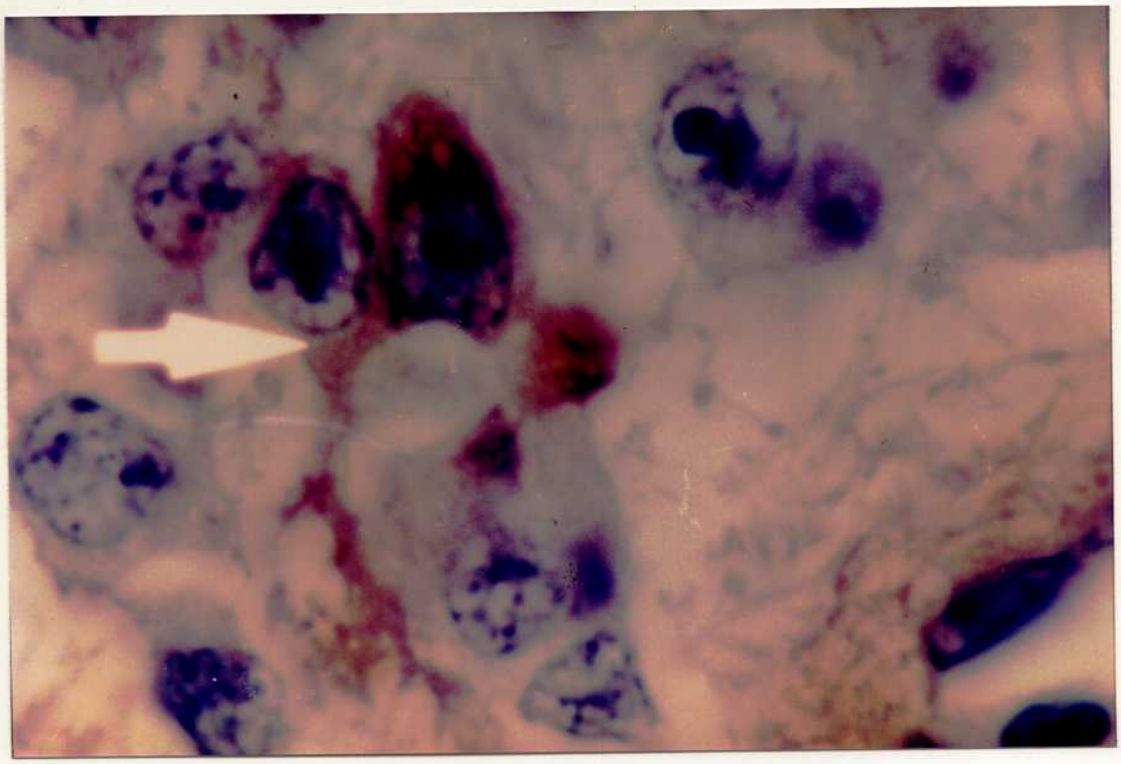

Fig. 47 Corte de glándula pineal bovina. Marcación de GABA con un anticuerpo específico antiGABA. Se señala con la flecha un pinealocito con prolongaciones que da señal positiva (color marrón). Observación al microscopio electrónico con aumento de 40 X.

que el GABA pineal se localiza en un compartimento extraneuronal (311).

Estudios publicados por otros grupos de investigación han examinado la actividad del GABA sobre la producción de melatonina inducida por NE, con resultados contradictorios. Mata y colaboradores no encontraron influencia del GABA sobre la regulación noradrenérgica de la SNAT, una de las enzimas que participan en la síntesis de melatonina (311). Por el contrario, otros autores observaron aumento o disminución en la síntesis de metabolitos radiactivos O-metilados por efecto de GABA dependiendo de la hora del sacrificio o de la disponibilidad de dadores de metilos (314). En el presente trabajo de Tesis se examinaron algunos aspectos adicionales del rol del GABA en la glándula pineal de rata.

Se representa en la Fig. 48 el efecto de un estímulo de K^+ de concentración variable (20, 40, 60 y 80 mM) en un sistema de perfusión continua de pineales de rata cargadas con ^{3}H-GABA. La liberación se indujo a partir de una concentración de 20 mM de K^+, y la respuesta fue creciente para los estímulos mayores.

En la Fig. 49 se representa el efecto de la remoción de Ca^{2+} extracelular sobre la liberación de ^{3}H-GABA. Los resultados obtenidos indican que, a bajas concentraciones de K^+ (30 mM) hay una disminución significativa de este parámetros, que no se observa a concentraciones de K^+ mayores (50 mM). Estos resultados sugieren que a altas concentraciones de K^+ se

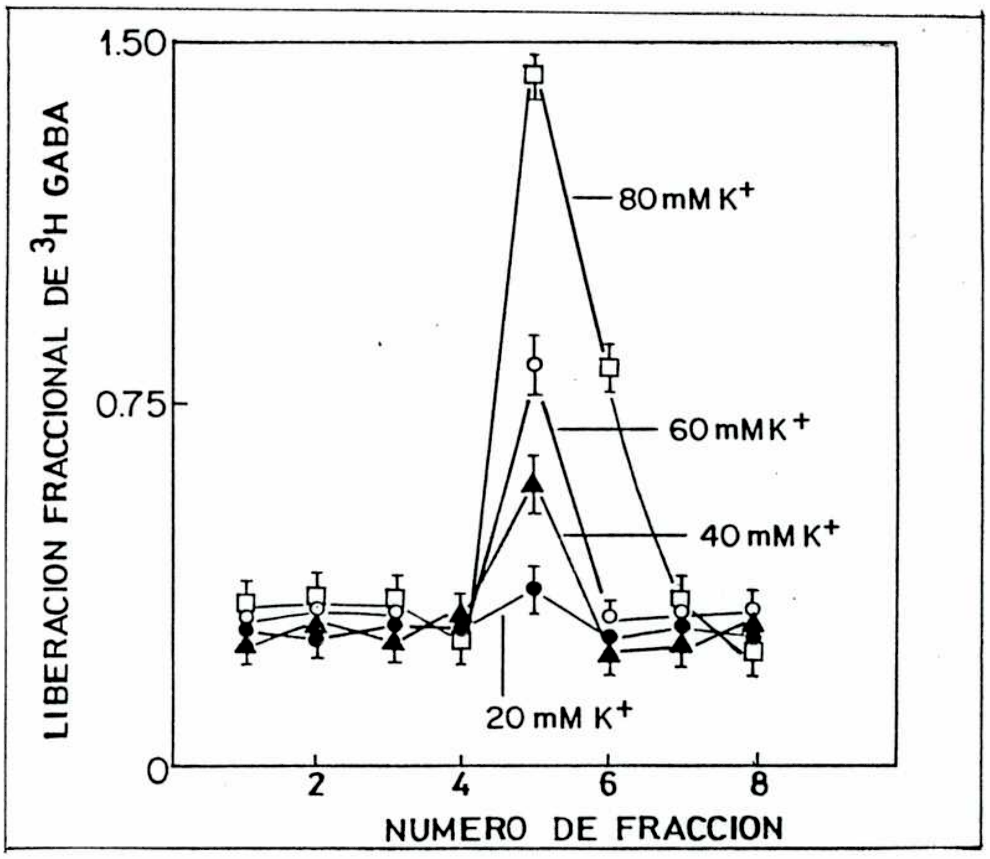

Fig. 48 Liberación de ^{3}H-GABA inducida por K^+ (20, 40, 60 u 80 mM) en glándula pineal de rata. Los explantos fueron cargados con ^{3}H-GABA y perfundidos según se detalla en Materiales y Métodos.

Se inició la recolección de fracciones cuando se nivelé el influjo de radiactividad (35 minutos luego de iniciar la perfusión). En todos los casos el estímulo despolarizante fue aplicado en la fracción 4. Se representa la media ± ES (n=6 en cada grupo). Las diferencias entre los grupos experimentales fueron significativas (ANOVA, test de Tukey).

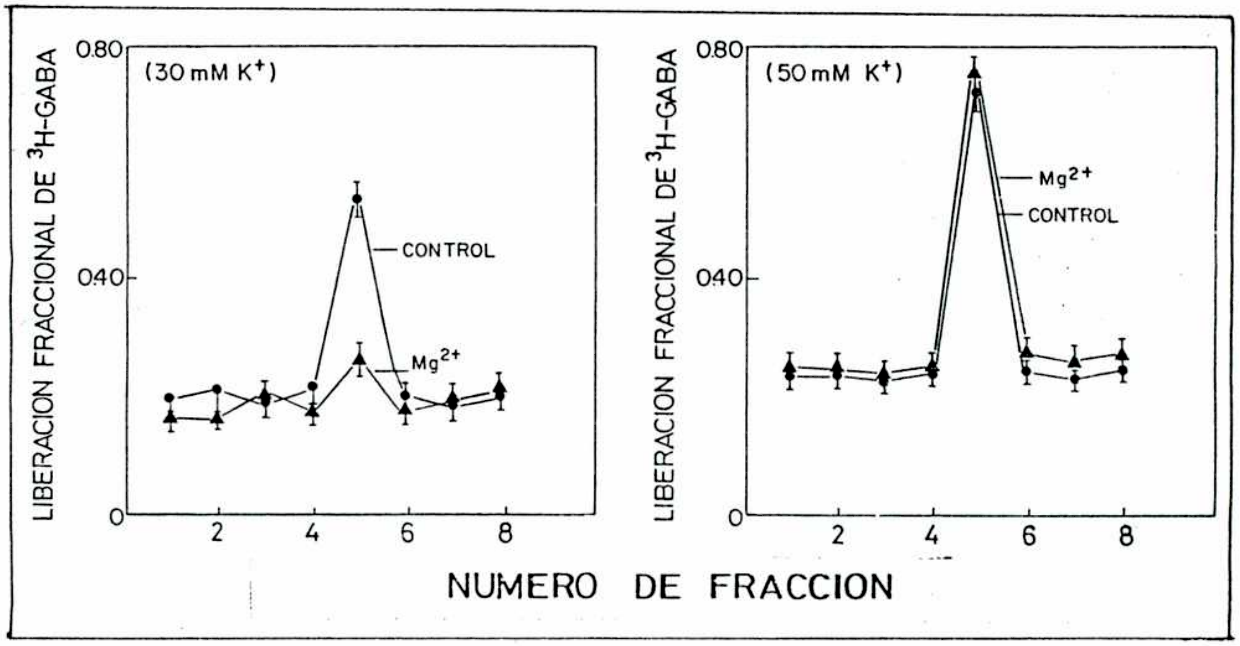

Fig. 49 Ca^{2+}-dependencia de la liberación de ^{3}H-GABA inducida por K^+ en glándula pineal de rata. Los fragmentos fueron cargados con ^{3}H-GABA y perfundidos según se describe en Materiales y Métodos. En los casos de Mg^{2+}, se utilizó un medio libre de Ca^{2+} en presencia de 3.5 mM de Mg^{2+}. El estímulo de K^+ (30 mM panel izquierdo o 50 mM panel derecho) fue aplicado en la fracción 4. Se representa la media $\pm$ ES (n=6 en cada grupo) de liberación fraccional. Las diferencias entre los controles y los grupos experimentales en el pico de liberación fueron significativas para el estudio dosis-respuesta de K^+ y para el grupo 30 mM de K^+, libre de Ca^{2+} y con Mg^{2+} 3.5 mM ($p<0.01$, test de Student).

moviliza un "pool" de GABA de origen citosólico. En cambio, a concentraciones más bajas, podría estar involucrado un "pool" vesicular y/o un "pool" citosólico particular, dependiente de Ca^{2+} extracelular (315, 316). Con el objeto de establecer el tipo celular que participa en este mecanismo de liberación, se preincubaron los explantos con ^{3}H-GABA en presencia de β -alanina (inhibidor de la captación glial) o de 2-4 diaminobutírico (DABA), que inhibe la captación de tipo neuronal. Los resultados se representan en la Fig 50. Un estímulo de K^{+} de 55 mM fue efectivo en inducir la liberación de ^{3}H-GABA sólo en el caso de la preincubación con β -alanina. No se evidenció este efecto en los explantos pineales preincubados con DABA.

Como ya hemos señalado, la principal señal que recibe la glándula pineal de rata es la NE que proviene de las fibras postganglionares del ganglio cervical superior. Se examinó si esta señal es capaz de inducir la liberación de GABA en nuestro sistema. Como se muestra en la Fig 51, la NE, a partir de una concentración de 10^{-6}M, tuvo un efecto estimulatorio sobre la liberación de GABA observándose una respuesta dosis-dependiente. Con el objeto de aclarar la identidad del receptor noradrenérgico involucrado en el efecto se hicieron pruebas con una serie de agonistas y antagonistas noradrenérgicos. Los resultados se resumen en la Tabla IX.

El efecto de la NE fue bloqueado por fentolamina (antagonista α) pero no por propranolol (antagonista β), sugiriendo que

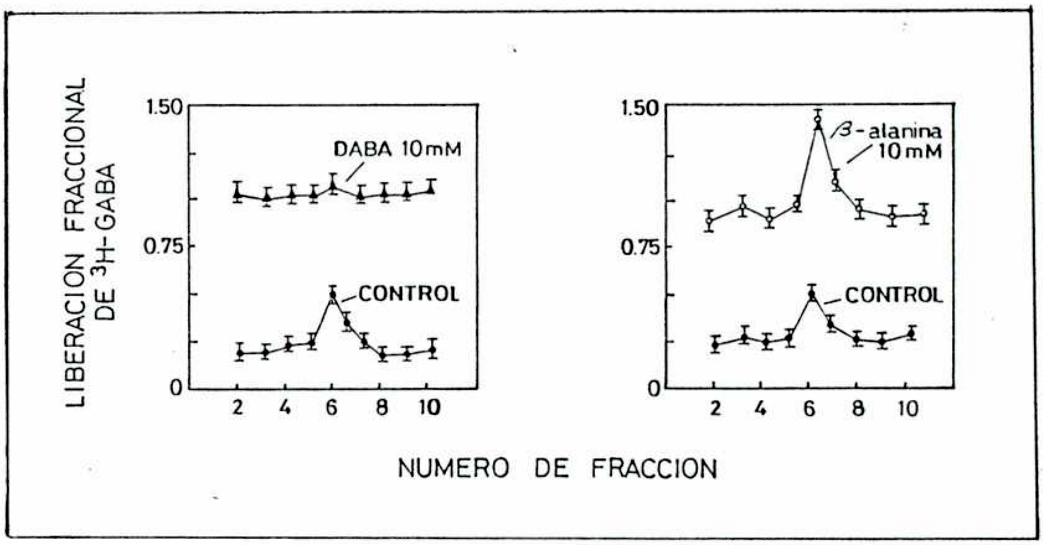

Fig. 50 Efecto de la incubación con β -alanina o DABA sobre la subsecuente liberación de ^{3}H-GABA inducida por un estímulo despolarizante de K^+ en explantos pineales de rata. Las pineales fueron incubadas con ^{3}H-GABA en presencia o ausencia de 10 mM de DABA (panel izquierdo) o 10 mM de β -alanina (panel derecho) y luego transferidos a un sistema de perfusión según se detalla en Materiales y Métodos. En todos los casos el estímulo despolarizante de K^+ (55 mM) se aplicó en la fracción 5. Se representa la media ± ES (n = 5 en cada grupo) de liberación fraccional. No se observaron estadísticamente picos de liberación de ^{3}H-GABA luego de la preincubación con DABA.

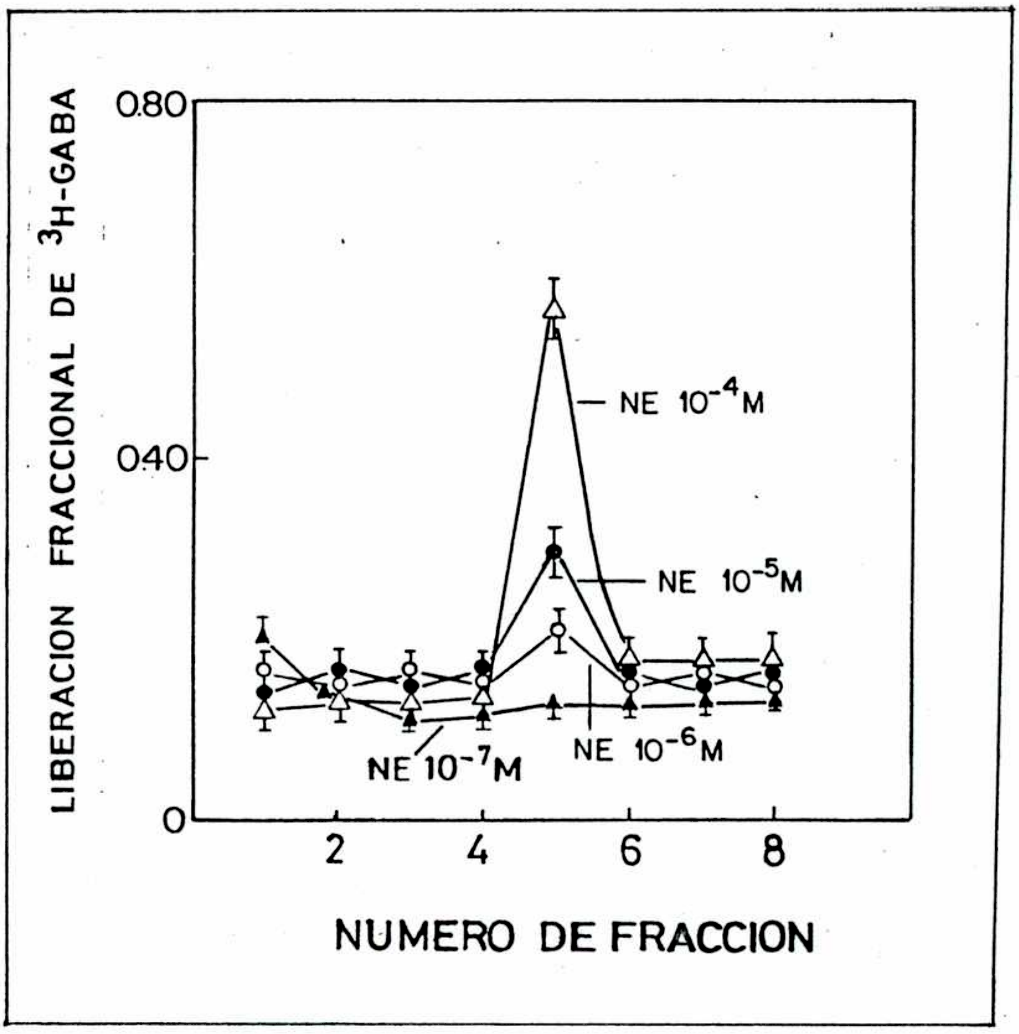

Fig. 51 Liberación de ^{3}H-GABA en glándula pineal de rata inducida por NE (10^{-6}- 10^{-4}M). Los explantos pineales fueron cargados con ^{3}H-GABA y perfundidos según se detalla en Materiales y Métodos. Se inició la recolección de fracciones cuando se niveló el eflujo de radiactividad (35 minutos luego de iniciar la perfusión). En todos los casos el estímulo de NE fue aplicado en la fracción 4. Se representa la media ± ES (n=6 en cada grupo) de liberación fraccional. Las diferencias entre las concentraciones de NE en el pico de liberación fueron significativas (ANOVA, test de Tukey).

Tabla IX. Efecto de agonistas y antagonistas adrenérgicos sobre la liberación de ^{3}H-GABA en glándula pineal de rata.

1	*liberación fraccional*
basal	0.13 ± 0.01
10 uM NE	0.30 ± 0.02**
10 uM NE + 10 uM fentolamina	0.15 ± 0.01
10 uM NE + 10 uM propanolol	0.29 ± 0.01**
10 uM NE + 10 uM prazosina	0.16 ± 0.02
2	
basal	0.14 ± 0.01
0.1 uM fenilefrina	0.22 ± 0.01*
10 uM fenilefrina	0.33 ± 0.02**
0.1 uM clonidina	0.13 ± 0.01
10 uM clonidina	0.17 ± 0.02
0.1 uM isoproterenol	0.14 ± 0.01
10 uM isoproterenol	0.23 ± 0.02*

Los explantos pineales fueron cargados con ^{3}H-GABA y perfundidos según se describe en Materiales y Métodos. En todos los casos el agonista adrenérgico fue aplicado en la fracción 4. Los antagonistas fueron perfundidos 10 min antes y durante el estímulo de NE. Los resultados se expresan como media ± ES (n=5 en cada grupo) de la liberación fraccional en la fracción 5. *p<0.05 comparado con el control. ** <p0.01 comparado con el control. ANOVA, test de Dunnet.

el receptor involucrado es de tipo α . Esto se confirmó por el uso de agonistas: la fenilefrina (agonista α_1) reproduce el efecto de NE en concentraciones de 10^{-7} y 10^{-5}M. El isoproterenol carece de efecto a 10^{-7}M (dosis en que actúa como agonista β), aunque induce la liberación de GABA a 10^{-5} M (dosis a las que se manifiesta la naturaleza α del isoproterenol) (317). Se descartó la participación de un receptor de tipo α_2 con el uso de clonidina que careció de efecto en las dosis examindas.

En vista de los resultados controversiales de la bibliografía sobre una posible regulación por GABA en la producción de melatonina, se examinó su efecto y el de agentes que aumentan el contenido endógeno de GABA (γ -acetilenGABA y AOAA) sobre la producción de melatonina evaluada por RIA en glándulas cultivadas durante 6 h. Los resultados se representan en la Fig 52. Se observa un efecto inhibitorio de los 3 compuestos en el contenido pineal de melatonina, en la liberación de la hormona al medio o en ambos. El receptor gabaérgico involucrado en este efecto se identificó como un receptor de tipo A, dada la capacidad de la bicuculina (antagonista específico de tipo A) para revertir el efecto del GABA, y la inefectividad del baclofen (agonista de tipo B) en reproducir la inhibición de la producción de melatonina (Fig 52).

En el intervalo examinado (6 h) los terminales nerviosos comienzan a degenerar y a liberar NE endógena (318), de manera tal que los resultados obtenidos con GABA o con sus agonistas

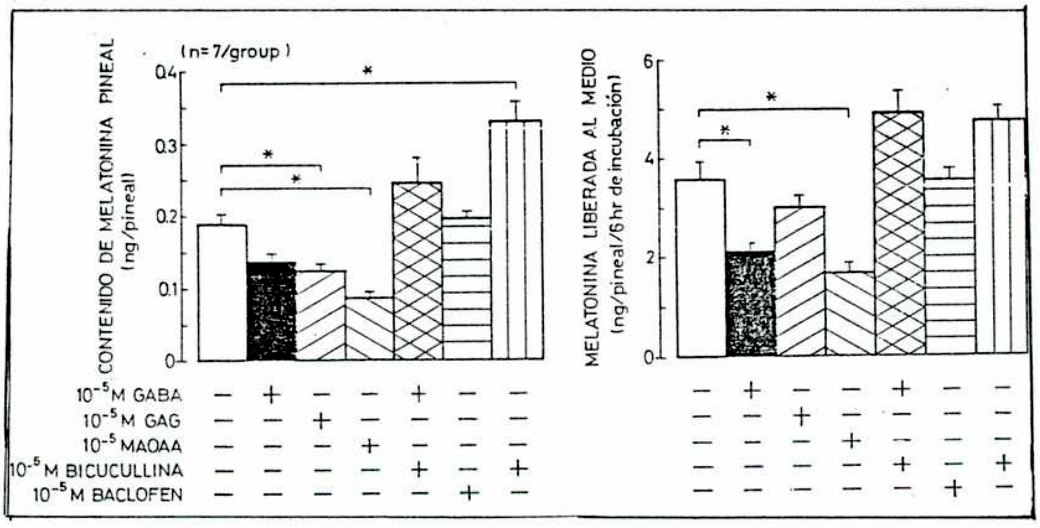

Fig. 52 Efecto del GABA, γ-acetilenGABA (GAG), AOAA, bicuculina o baclofen sobre los niveles de melatonina en explantos de pineal de rata y sus medios de cultivo. Las glándulas fueron cultivadas durante 6 horas en medio TC 199 según se describe en Materiales y Métodos. Se representa la media ± ES (n=7 en cada grupo). * $p<0.05$ comparado con el grupo control, ANOVA, test de Dunnet.

indirectos podrían deberse a la interacción con NE liberada por degeneración. A fin de aclarar una posible interacción de GABA con NE, se incubaron las pineales con el trasmisor adrenérgico en presencia de distintas concentraciones de GABA. Los resultados se representan en la Fig 53. El GABA a partir de una concentración de 10^{-5}M revirtió parcialmente el estímulo noradrenérgico en la producción de melatonina. Con objeto de aclarar la naturaleza del receptor gabaérgico involucrado, se realizaron las respectivas incubaciones en presencia de bicuculina y picrotoxina (Fig 54).

Se representan en la Tabla X los niveles de 5-HT y HIAA en explantos de pineales de rata expuestos a NE y/o GABA durante 3 y 6 h. La NE disminuyó el contenido de 5-HT en un 36% a las 3 horas y en un 59% a las 6 h de incubación. El GABA no modifica el efecto de NE pero aumenta significativamente el contenido de la indolamina pineal a las 3 h. Este efecto no se observa a las 6 h. Se evidenció un perfil similar en los niveles de 5-HIAA, aunque en este caso las diferencias no fueron siempre significativas.

III.2.c <u>Glándula Pineal Humana</u>

En trabajos previos de otros autores se caracterizó la presencia de receptores para BZP en glándula pineal bovina (305) y de rata (319). En la pineal de rata, se detectó una población de receptores de tipo periférico en tanto que en la glándula pineal

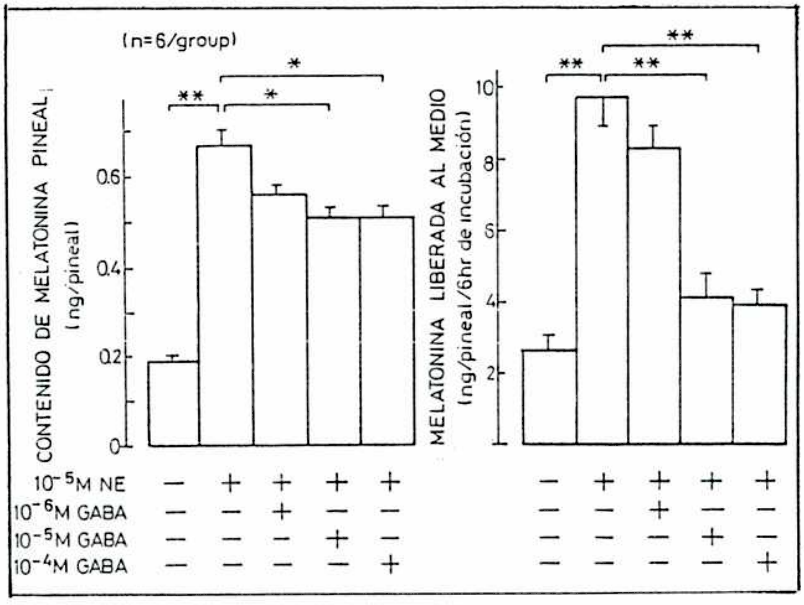

Fig. 53 Efecto del GABA (10^{-6}- 10^{-4} M) sobre el aumento de melatonina inducida por NE en explantos de pineal de rata y sus medios de cultivo. Las glándulas fueron cultivadas durante 6 horas en medio TC 199 según se detalla en Materiales y Métodos. Se representa la media ± ES (n=6 en cada grupo). * $p<0.05$, ** $p<0.01$ comparado con el grupo de NE, ANOVA, test de Dunnet.

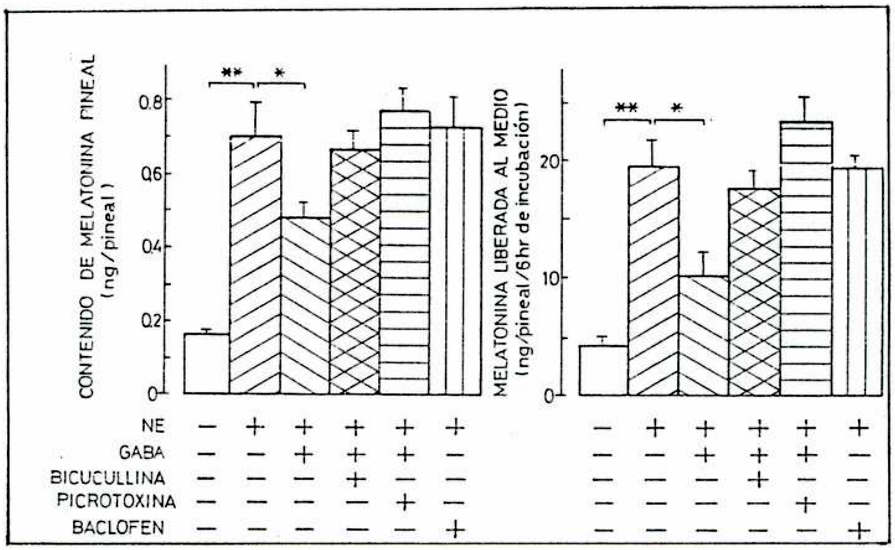

Fig. 54 Identificación del receptor involucrado en el efecto del GABA sobre el aumento de melatonina inducida por NE en los explantos pineales y sus medios de cultivo. Las glándulas fueron cultivadas durante 6 h en medio TC 199 según se detalla en Materiales y Métodos. La concentración de las drogas utilizadas fue de 10^{-5} M. Se representa la media ± ES (n=9 en cada grupo). * $p<0.05$, ** $p<0.01$ comparado con el grupo de NE, ANOVA, test de Student.

Tabla X. Efecto de GABA y/o NE sobre los niveles de 5-HT y 5-HIAA en explantos de pineal de rata.

	TIEMPO DE INCUBACION			
	3 h		6 h	
TRATAMIENTO	*5-HT*	*5-HIAA*	*5-HT*	*5-HIAA*
CONTROL	13.7 ± 0.6	9.7 ± 1.1	16.7 ± 1.0	9.0 ± 0.4
NE	8.7 ± 1.0**	7.3 ± 0.7	6.9 ± 1.0**	4.7 ± 0.1**
NE + GABA	9.0 ± 0.4**	6.7 ± 0.8	9.1 ± 0.8**	6.9 ± 0.7
GABA	19.1 ± 1.9**	10.1 ± 1.0	16.9 ± 2.9	12.2 ± 0.5*

La incubación de las glándulas fue de 3h (panel izquierdo) o 6 h (panel derecho) en medio Tc 199 según se detalla en Materiales y Métodos, en presencia o ausencia de NE (10^{-5}M) y/o GABA (10^{-5}M). Los resultados se expresan en ng de 5-HT o 5-HIAA/glándula. Se representa la media ± ES (n=7 en cada grupo). ** $p<0.01$, *$p<0.05$ comparado con el grupo control, ANOVA, test de Dunnet.

bovina se identificaron receptores de tipo periférico y una población de receptores de tipo central, que forman parte del complejo supramolecular que involucra al sitio de reconocimiento para GABA y para barbitúricos.

En vista de la carencia de información sobre la existencia y tipo de receptor para GABA y BZP en glándula pineal humana, se consideró de interés la caracterización de estos sitios en material de autopsia obtenido de decesos por causas no neurológicas. Se examinó la existencia de receptores para BZP en glándula pineal humana. El "binding" de BZP en este sistema se estudió de dos maneras: (a) con concentraciones crecientes de ^{3}H-FNZP (saturación), (b) con concentraciones crecientes de ligando frío, o sea variando la actividad específica del radioligando (competencia). Los resultados del análisis de Scatchard de ambos procedimientos se presentan en las Fig 55 y 56, respectivamente.

El análisis cinético en ambos casos indica la existencia de una única población de receptores con los siguientes parámetros: (caso a): Kd: 2.53 nM y Bmáx. 108 fmol/mg de prot; (caso b): Kd: 2.36 nM y Bmáx. 59 fmol/mg de prot.

En la Fig. 57 se representa la curva de competencia de distintos análogos de BZP. Los resultados indican el siguiente orden de afinidad: clonazepam > Ro 15-1788 > FNZP. El Ro 5-4864, agonista de tipo periférico, no compite por el receptor. Los valores de la constante de inhibición obtenida fueron los siguientes: (nM) clonazepam: 0.13, Ro 15-1788: 0.60, FNZP: 2.14, Diazepam: 13.5, Ro 5-4864: 10000.

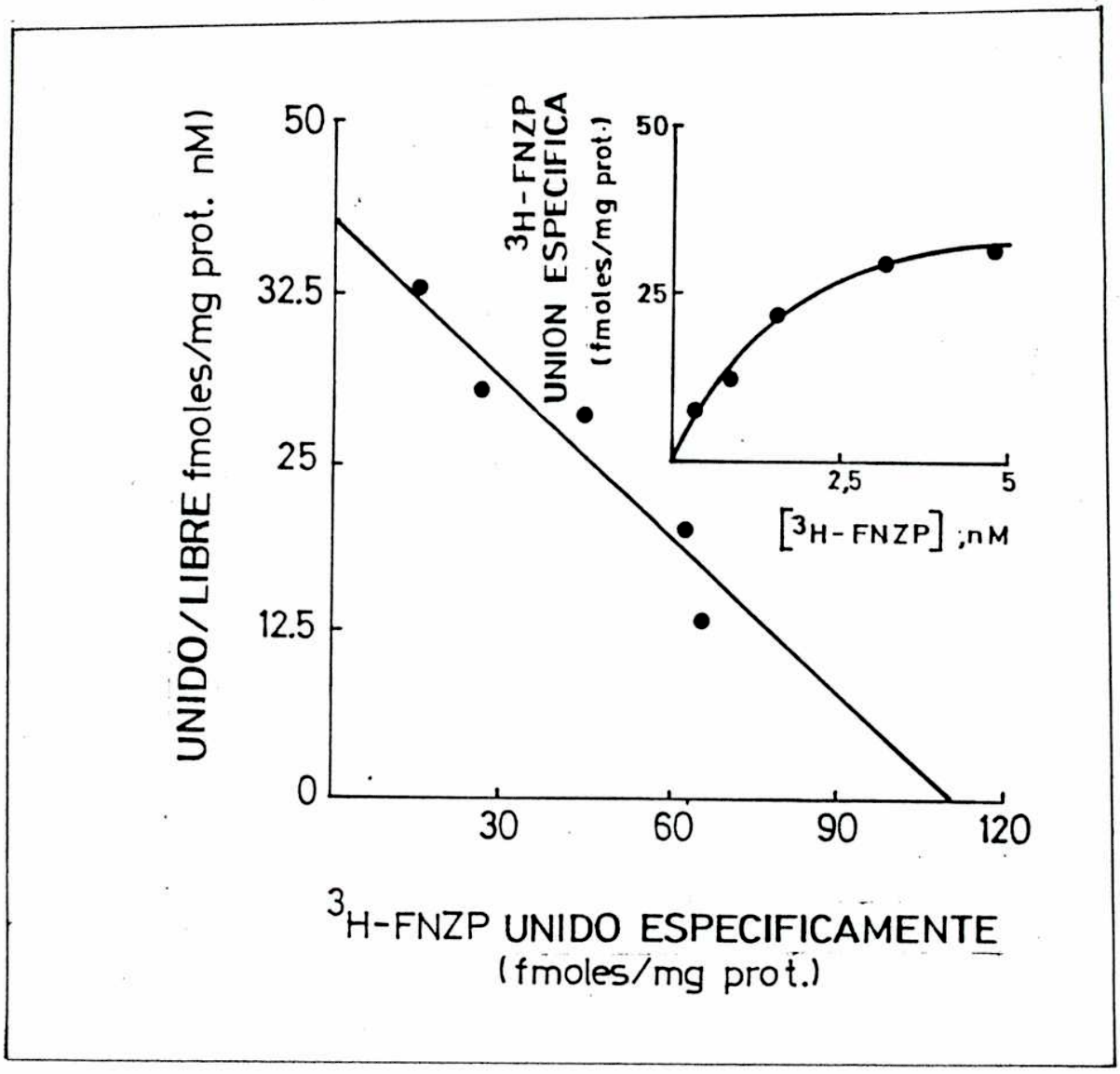

Fig. 55 Asociación específica de ^{3}H-FNZP a membranas pineales humanas. Experimento realizado variando la concentración de ligando radiactivo en el medio de incubación. Los resultados se analizaron por el método de Scatchard. Cada punto representa la media de 3 determinaciones que variaron en menos de un 10%.

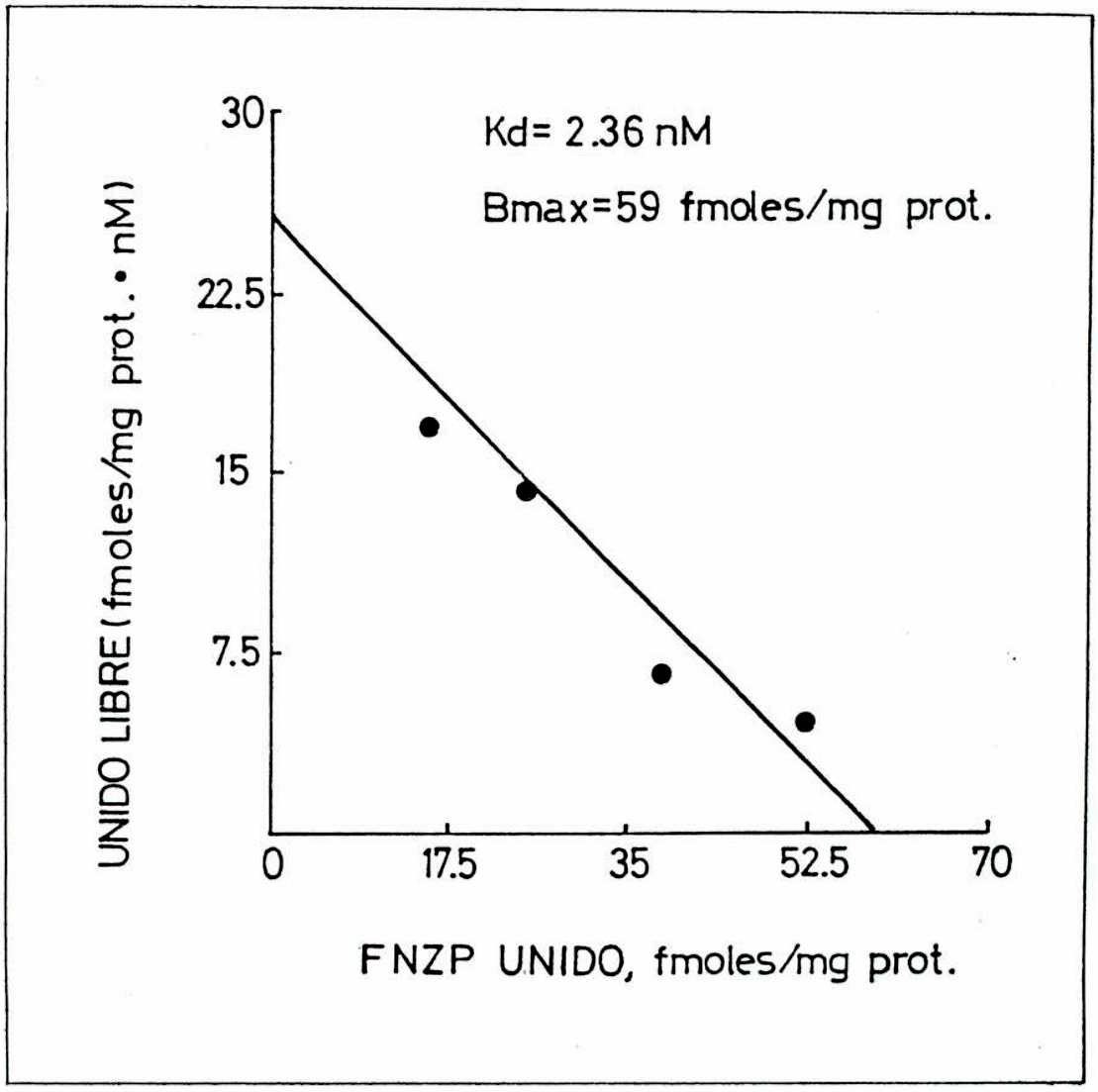

Fig. 56 Asociación específica de ^{3}H-FNZP a membranas pineales humanas. Experimento realizado utilizando una concentración única de ligando radiactivo y cantidades variables de FNZP frío. Los resultados se analizaron por el método de Scatchard. Cada dato es la media de 3 determinaciones que variaron en menos de un 10%.

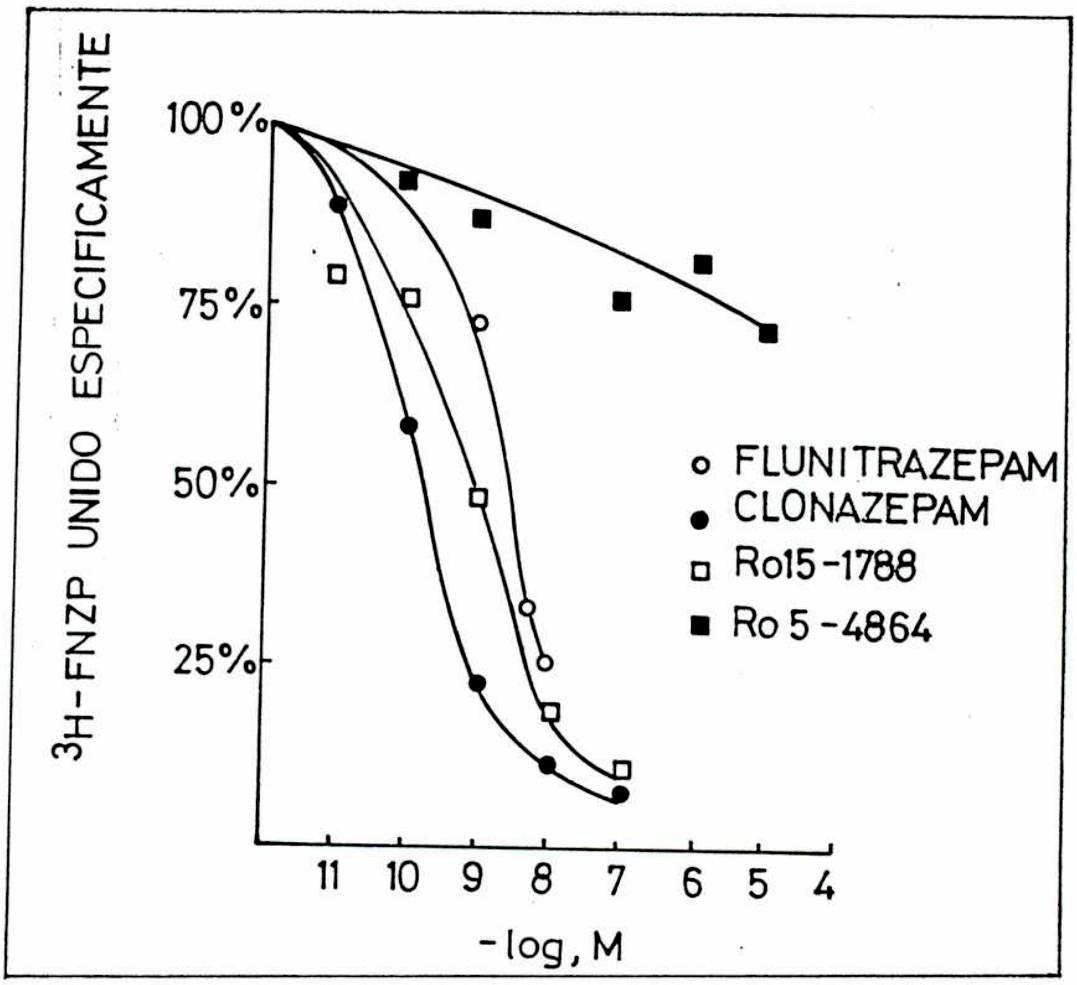

Fig. 57 Competencia de diversas benzodiazepinas por la unión específica de ^{3}H-FNZP a membranas pineales humanas. Cada dato es la media de 3 determinaciones que variaron en menos de un 10%.

El efecto del GABA sobre el binding de FNZP en membranas de corteza cerebral y glándula pineal humana está representado en la Fig. 58 El GABA (10^{-6}- 10^{-4}M) aumenta el "binding" de BZP, con un efecto máximo del 30% a la concentración de 10^{-5}M. En corteza cerebral humana, el efecto del GABA fue dosis-dependiente, alcanzando un 30% de estímulo a 10^{-4}M. El estímulo gabaérgico sobre la unión específica de BZP fue significativamente menor que el observado en ratas o en tejidos bovinos (305). Para aclarar si esta diferencia se debe a una diferencia entre especies o a una condición particular de las membranas humanas, se realizó el siguiente experimento. Se sacrificaron 3 lotes de ratas y se extrajo la corteza cerebral de un grupo en forma inmediata, del segundo grupo se extrajo el tejido a las 3 h, y a las 6 h del tercero. Este último intervalo es aproximadamente similar al tiempo transcurrido entre la muerte del paciente y el momento de la autopsia.

Las cortezas cerebrales de rata fueron congeladas y procesadas en paralelo con las cortezas humanas. Los resultados que se muestran en la Fig. 59 indican que el porcentaje de estimulación gabaérgica en la corteza cerebral de rata disminuye con el tiempo transcurrido desde la muerte del animal, en tanto que la intensidad del bloqueo por el antagonista gabaérgico, la bicuculina, aumenta en función del tiempo transcurrido. El estímulo observado en el cerebro de rata congelado luego de 6 h post-mortem, fue similar al observado en membranas cerebrales humanas (21 y 19%, respectivamente). El estímulo gabaérgico en

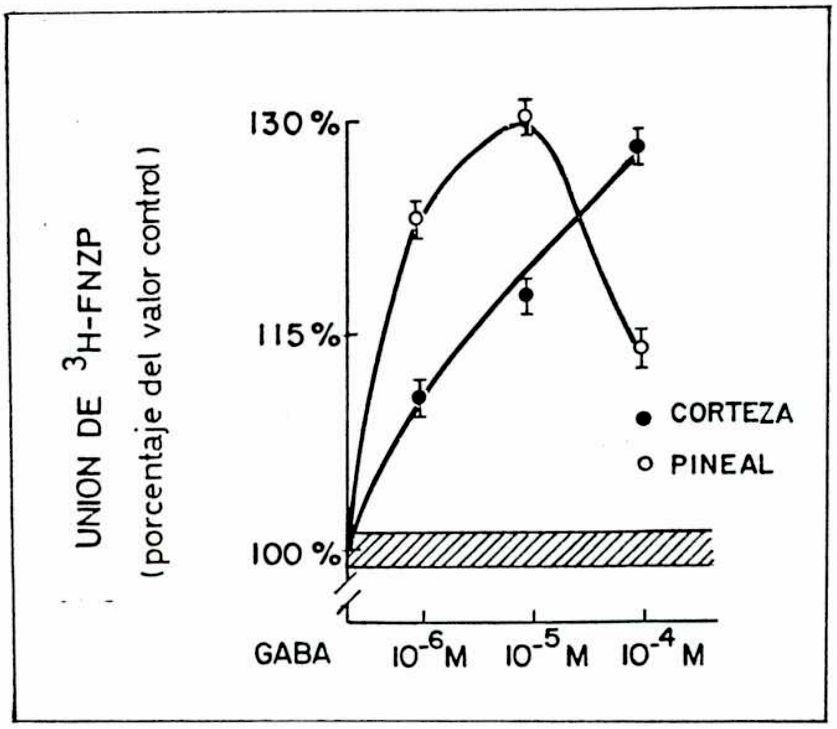

Fig. 58 Efecto de GABA sobre la unión específica de ^{3}H-FNZP a pineales y cortezas cerebrales humanas. Los resultados se expresan como porcentaje de estimulación de la unión basal. Se representa la media ± ES (n=5 en cada grupo). El efecto del GABA fue significativo a todas las concentraciones examinadas ($p<0.05$ análisis de varianza).

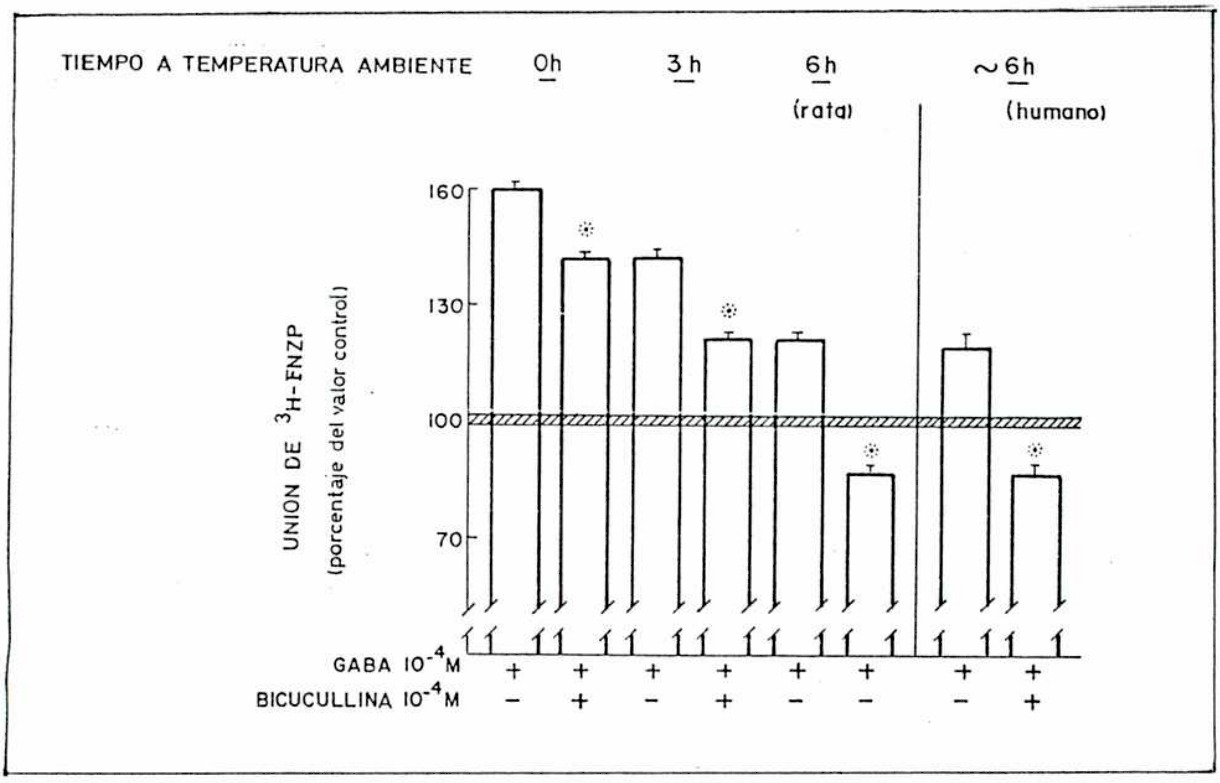

Fig. 59 Efecto de GABA solo o en presencia de bicuculina sobre la unión específica de ³H-FNZP en corteza cerbral humana y de rata. Los animales sacrificados se mantuvieron durante 0, 3 ó 6 h a temperatura ambiente antes de la remoción de los cerebros. Los resultados se expresan como porcentaje de estimulación o inhibición basal. Se representa la media ± ES (n=5 en cada grupo). Todos los grupos difieren de la unión de ³H-FNZP en incubaciones control realizadas con el mismo material pero en ausencia de drogas ($p<0.01$ análisis de varianza). * $p<0.01$ entre grupo con GABA y grupo con GABA + bicuculina, test de Student.

corteza cerebral humana fue también bloqueable por bicuculina. El número de sitios receptores no varía en función del tiempo de exposición a temperatura ambiente en membranas corticales de rata.

En conjunto, estos resultados demuestran la existencia de receptores para BZP de tipo central en la glándula pineal humana. Estos receptores son similares a los del SNC humano, pero con una concentración de alrededor del 10% de éstos. En ambos sistemas (bovino y humano) se observa un estímulo de la unión del GABA mediado por un receptor gabaérgico de tipo A. El estímulo obtenido fue menor que el observado en otras especies pero esto, según se demostró, podría deberse a un deterioro del mecanismo de acoplamiento entre el receptor de GABA y el de BZP o a un deterioro post-mortem de algún componente del sistema excluyendo al receptor para BZP que no evidenció modificaciones durante el tiempo examinado.

El siguiente paso fue establecer la existencia de receptores gabaérgicos en glándula pineal humana. En la Fig. 60 se representa el análisis de Scatchard de la unión de ^{3}H-GABA a membranas pineales humanas. Se observó la presencia de 2 sitios de unión de alta y baja afinidad con valores de Kd de 14.1 y 312 nM y Bmáx. de 355 y 640 Fmol/mg de prot., respectivamente. Las membranas preparadas para este análisis fueron lavadas exhaustivamente con detergente Tritón X 100 y en el ensayo de "binding" se utilizó un buffer carente de Ca^{2+}, habiéndose elegido estas condiciones porque según las consideraciones discutidas en

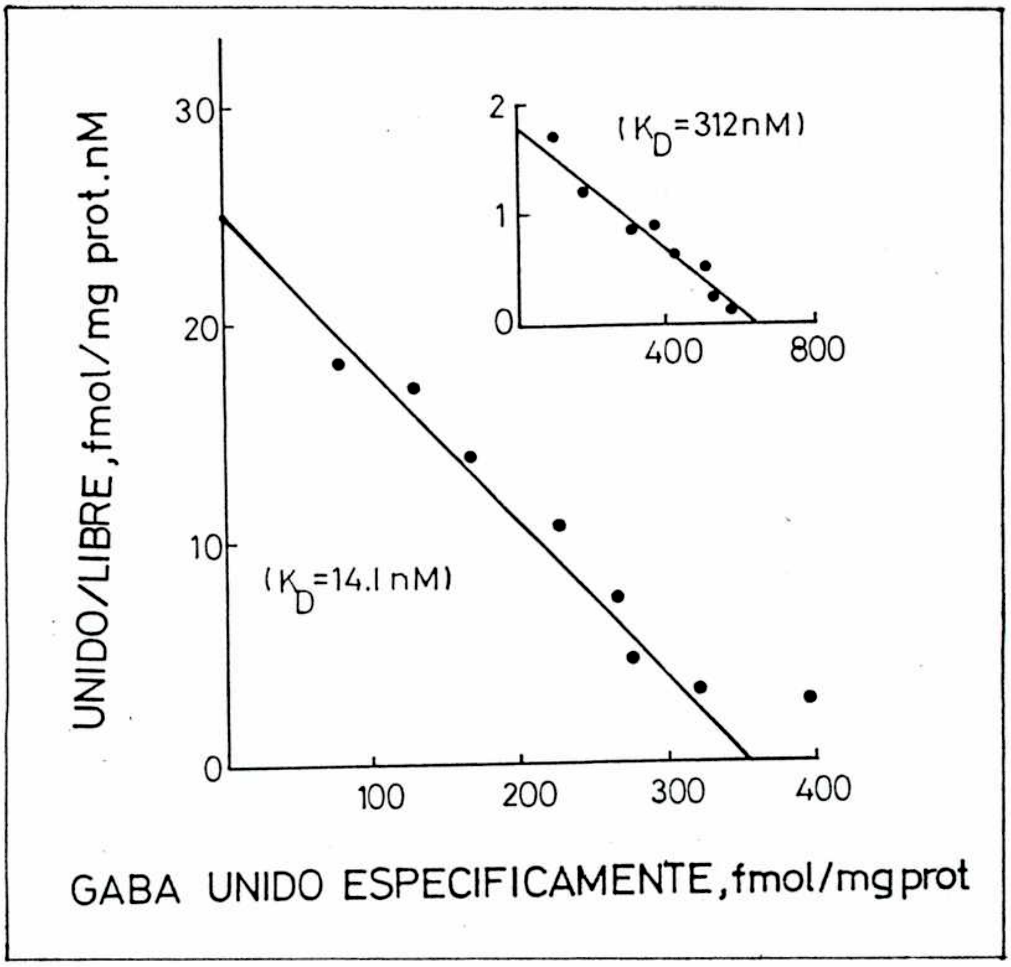

Fig. 60 Asociación específica de baja panel superior derecho) y alta afinidad (panel inferior izquierda) de ^{3}H-GABA a membranas pineales humanas. Las membranas pineales fueron tratadas con tritón x-100 y congeladas según se detalla en Materiales y Métodos. El análisis se realizó por el método de Scatchard.

la Introducción, se optimiza la unión específica de GABA al receptor de tipo A (210).

Las condiciones experimentales necesarias para la caracterización del receptor de tipo $GABA_B$, por el contrario requieren una preparación de membranas que excluye el tratamiento con el detergente y requiere la presencia de Ca^{2+} en una concentración de 2.5 mM (210). En estas condiciones, se estudió la presencia de receptores gabaérgicos de tipo B en la glándula pineal humana mediante un análisis de competencia a puntos únicos, con el uso de dos radioligandos diferentes: ^{3}H-GABA (agonista mixto) y ^{3}H-baclofen (agonista específico de tipo B) (Fig. 61). En el ensayo de unión con ^{3}H-baclofén se evidenció la presencia de receptores de tipo B dada la capacidad tanto de GABA como del baclofen fríos (200 uM) para competir equipotentemente. Cuando se utilizó ^{3}H-GABA como radioligando, se observó que cantidades equimoleculares de GABA y baclofen presentan diferencias significativas en la capacidad de competir por la unión con el radioligando, siendo el primero más efectivo. Esto podría deberse a la participación en la unión del radioligando de receptores de tipo A, aún cuando las condiciones de ensayo no hayan sido las más favorables. La falta de disponibilidad de tejido y la característica peculiar del receptor de tipo B (que presenta una muy elevada unión inespecífica, mayor de 70%) (211) hicieron imposible una caracterización más detallada de estos receptores en glándula pineal humana.

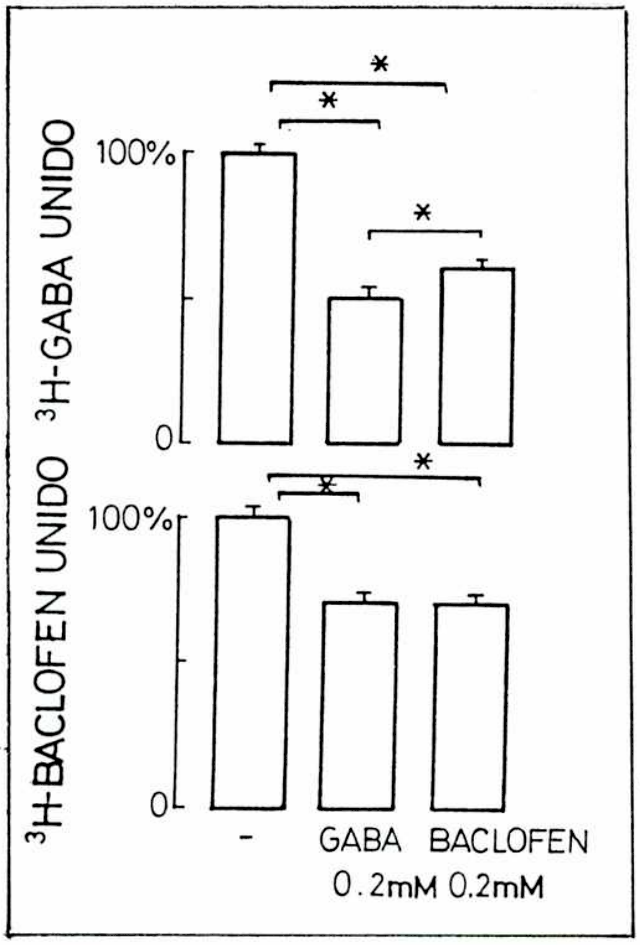

Fig. 61 Caracterización de un receptor de tipo $GABA_B$ en membranas de pineales humanas. En la preparación de estas membranas se omitió el uso de detergente y se utilizó un medio con Ca^{2+} 2.5 mM según se detalla en Materiales y Métodos. Se incubó en presencia de ^{3}H-GABA (panel superior) o ^{3}H-baclofen (panel inferior) con el agregado de GABA o baclofen fríos (200 uM).

El GABA y el baclofen fueron equipotentes en la competencia con ^{3}H Baclofen. En cambio el GABA fue más efectivo para la competencia por la unión con ^{3}H-GABA. * $p<0.05$, test de Dunnet.

IV DISCUSION

Como hemos analizado en la Introducción de este trabajo de Tesis, la ubicuidad y extensión del sistema central de interneuronas gabaérgicas es un indicador de la importancia que tales redes tienen para el procesamiento y elaboración de la información neural. Conjuntos de terminales dendríticas y somáticas gabaérgicas controlan la descarga de neuronas efectoras en las distintas regiones cerebrales. Por ejemplo, la función integradora de la corteza cerebral depende de interneuronas gabaérgicas inhibitorias y de interneuronas peptidérgicas , en general excitatorias, que afectan a las células piramidales de proyección.

El tono inhibitorio gabaérgico predomina y su supresión farmacológica produce estragos en la actividad normal cerebral (convulsiones, estado epiléptico). Tal tono gabaérgico es responsable entre otras, de la inhibición lateral, de enorme trascendencia para el procesado de la información neural (320).

En el hipotálamo, el sistema de interneuronas gabaérgicas desempeña un papel que recién ha comenzado a elucidarse. Sin embargo, ya resulta claro que las trofinas hipofisarias pueden afectarse por la manipulación farmacológica del sistema gabaérgico, avalando una función central de este sistema en la regulación neuroendócrina (166, 167). No sería sorprendente que, por analogía a lo que ocurre en otras áreas cerebrales, exista una

activa interacción entre los sistemas gabaérgico y peptidérgico neurosecretorios hipotalámicos.

La sensibilidad de neuronas gabaérgicas centrales ante modificaciones en la función de la glándula pineal es el tema central de la primera parte del presente trabajo de Tesis. Por su papel modulador mediado por la secreción de melatonina, la glándula pineal ha pasado a constituir una pieza fundamental en el mecanismo adaptativo por el cual las diferentes especies sincronizan su fisiología con la época del año más adecuada para el cumplimiento de metas esenciales que hacen a la preservación de la especie: sobrevivir y reproducirse. En este sentido, la glándula pineal es una estructura indispensable para la sobrevida, no ya del individuo, sino de la especie en su conjunto. Se desarrollarán a continuación las consecuencias conceptuales y prácticas de las observaciones realizadas en el presente trabajo de Tesis.

En la primera serie de experimentos se examinó la existencia de un vínculo entre la función pineal y uno de los componentes del complejo supramolecular regulador del canal de Cl^-: el receptor para BZP de tipo central. El antecedente directo de este trabajo es la descripción previa de una interacción "in vitro" de la melatonina y sus metabolitos con dicho sitio de unión (293). Se acepta actualmente que los sitios aceptores para BZP son los receptores farmacológicos que median los efectos anticonvulsivantes, ansiolíticos, hipnóticos y relajantes musculares de estas drogas (228). Aunque se han propuesto mecanismos

alternativos (266), se asume en forma general que las BZP actúan por potenciación de la neurotransmisión gabaérgica.

Si bien existe discusión sobre la posible existencia de un ligando endógeno para el receptor de BZP (252, 258, 259), no puede descartarse por ahora la hipótesis alternativa de que estos sitios sean una región regulatoria sin función fisiológica, pero capaces de alteración farmacológica (por ejemplo, modificación de la estructura topológica del complejo supramolecular) al ser ocupados por una BZP activa.

Los resultados presentados en la sección (III.1 a) demuestran que la pinealectomía en animales sacrificados al mediodía reduce la concentración de sitios receptores para BZP en corteza cerebral de rata, sin modificar su afinidad. El efecto de la ablación pineal se manifiesta ya a los 3 días de la operación y persiste, por lo menos, por 2 semanas. Si bien se observó que la craneotomía "per se" disminuye el número de sitios receptores para BZP en la corteza cerebral, este efecto fue máximo a los 3 días y desapareció a los 14 días post-cirugía. Por el contrario, en los animales pinealectomizados la concentración de sitios receptores fue significativamente menor, a cada uno de los intervalos estudiados (Fig 12). La ganglectomía cervical superior no afecta la concentración total de sitios para BZP en corteza cerebral de rata, lo cual constituye una evidencia de que la ablación del ganglio cervical superior y la pinealectomía no son procedimentos quirúrgicos homologables, a pesar de que en ambos casos se produce una caída de los niveles séricos de melatonina a valores indetectables.

Aceptando la existencia de un agonista endógeno para el receptor cortical de BZP, el estado convulsivo o el aumento del sueño paradojal en ratas pinealectomizadas (117) podrían ahora interpretarse como una disminución de la neurotransmisión gabaérgica que sigue a la remoción de la glándula. Sin embargo, los cambios en la concentración de GABA producen modificaciones en el Kd, más que en la Bmax de los sitios de unión para BZP.

Según se ha discutido en la Introducción, múltiples observaciones experimentales (114, 115, 116) permiten postular que la glándula pineal tiene una función depresora del SNC (tranquilizante). Esta función está vinculada a la melatonina, principal producto de secreción pineal. Dosis farmacológicas de melatonina protegen de las convulsiones inducidas por pinealectomía en monos (321) o de convulsiones inducidas por ouabaína (inhibidor de la bomba Na^+/K^+ATPasa) en ratas (322). En ratones, la melatonina potencia el sueño inducido por barbitúricos, antagoniza las convulsiones inducidas por pentilentetrazol, 3-mercaptopropiónico o electroshock, y tiene actividad analgésica (323). Asimismo, la melatonina mejora la actividad electroencefalográfica alterada en pacientes con epilesia del lóbulo temporal (324), disminuye las convulsiones en babuinos inducidas por luz (325), y reduce la actividad epiléptica focal de áreas sensoriales primarias en gatos (326).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis indican que una única inyección de melatonina a la mañana, 3 h antes del sacrificio, restablece los niveles de receptores para

BZP en ratas pinealectomizadas (Fig 14). Dosis similares o mayores de melatonina, inyectadas en horas de la mañana o de la tarde, no afectan este parámetro en animales intactos. Sin embargo, un tratamiento prolongado durante 5 días induce modificación en la concentración total de sitios receptores para BZP (inyección matutina) o en la afinidad de estos (inyección vespertina) (Fig 16).

En confirmación con resultados de otros autores, la melatonina compite "in vitro" por el "binding" de ^{3}H-FNZP sólo a concentraciones mayores que 10 uM (293). Esta concentración no es alcanzable en el cerebro con las dosis farmacológicas administradas, lo que sugiere que el efecto observado no se debe a una interacción directa de la hormona con el sitio receptor.

En la etapa siguiente del presente trabajo de Tesis se examinó la existencia de ritmos diarios en los sitios aceptores para BZP, que pudieran sugerir un vínculo con la actividad circadiana de la glándula pineal. Los resultados presentados en la sección (III.1.b) confirman trabajos de otros autores sobre la existencia de variaciones circadianas en el "binding" de BZP en corteza cerebral de rata, en los que, empleando una única concentración de ^{3}H-diazepam como ligando, se encontraron valores máximos de la unión de BZP en horas de la medianoche (295).

Debe notarse que con exámenes de puntos únicos como los empleados en los estudios citados no puede identificarse cuál de los parámetros cinéticos varía cicadianamente. Los resultados aquí presentados, obtenidos por análisis de Scatchard en corte-

zas cerebrales individuales de ratas sacrificadas a 6 intervalos diferentes durante el ciclo de 24 horas, indican que la Bmáx. alcanza valores máximos a medianoche, sin modificaciones en la afinidad por el ^{3}H-FNZP (Fig 18).

La pinealectomía produce una modificación en los cambios circadianos del receptor cortical para BZP, suprimiendo el máximo nocturno y provocando una depresión significativa en la concentración de sitios de unión en horas del mediodía (Fig 20). Como las membranas utilizadas en nuestro trabajo fueron rigurosamente lavadas o tratadas con detergente para remover los compuestos asociados que pudieran modificar el "binding" de BZP, los cambios observados se deben muy posiblemente a modificaciones directas del sitio receptor. La alteración por pinealectomía de las variaciones circadianas de la concentración de receptores para BZP no parece estar vinculada a modificaciones del contenido de GABA, pues no se observaron cambios en la afinidad por el radioligando en función de la hora del sacrificio o de la manipulación quirúrgica.

Como se ha mencionado, el candidato más probable para mediar los efectos de la glándula pineal sobre la excitabilidad del SNC es la melatonina. Se realizó, por lo tanto, un estudio dosis-respuesta de la capacidad de la melatonina en la reversión del efecto de la pinealectomía sobre los receptores para BZP. Se determinó una dosis mínima efectiva para la hormona pineal de 25 ug/kg. Esta concentración de melatonina, considerablemente baja, apoya la hipótesis de que las variaciones en el "binding" de BZP

en función del ritmo de 24 h están relacionadas con la secreción hormonal. En conjunto, nuestros resultados indican la existencia de un vínculo entre la glándula pineal en general, y la secreción de melatonina en particular, con los receptores centrales de BZP y sugieren que la actividad del receptor probablemente dependa de la función rítmica pineal. Es posible entonces, que el rol de la pineal como órgano homeostático para la excitabilidad del SNC, pueda estar relacionada con la modificación de la actividad del receptor para BZP.

En la sección (III.1.c) se examinó el vínculo entre la función pineal y otro componente del complejo supramolecular: el propio sitio de unión para el GABA. Los resultados obtenidos indican que la unión de GABA a sitios de alta afinidad tiene un ritmo circadiano de concentración y afinidad en el cerebro de rata (Fig 25). Los animales intactos presentan un mínimo en el "binding" de ^{3}H-GABA en membranas corticales a medianoche. El Kd aumenta durante el día, lo que podría deberse a cambios en la actividad de moduladores de la unión, o bien a cambios en la concentración del neurotransmisor durante el ciclo de 24 h. De acuerdo a esta última posibilidad, es probable que los cambios diarios en el "binding" de alta afinidad estén relacionados con mecanismos de sub y supersensibilidad ("down-" y "up-regulation") de los sitios de unión.

La ritmicidad diaria del "binding" de GABA de alta afinidad depende de la actividad pineal. La depresión observada durante

la noche en la unión específica se evidenció en animales intactos o con operación simulada, pero no en animales pinealectomizados. Por efecto de la ablación pineal se observó un aumento generalizado en la concentración total de sitios receptores, con un pico máximo en horas de la noche (Fig 27). La desnervación pineal por ganglectomía cervical superior no afectó la densidad de receptores pero modificó sustancialmente su afinidad. Además de la supresión pineal, la simpatectomía cervical altera mecanismos neuroendócrinos independientes de la desnervación simpática de esta glándula (327). Estos resultados proveen nuevas evidencias sobre la falta de homología entre la pinealectomía y la ganglectomía cervical superior en cuanto a sus efectos centrales.

Las observaciones sobre el aumento del "binding" de GABA de alta afinidad luego de la pinealectomía, sumadas a los resultados ya discutidos sobre modificaciones a nivel del receptor central de BZP, constituyen una nueva evidencia sobre la alterada función del complejo supramolecular del receptor gabaérgico de tipo A en estas condiciones.

En otra serie de experimentos se examinó la participación de la melatonina en el efecto pineal. En la curva de competencia "in vitro", la melatonina no modificó, en el rango de concentraciones examinadas (10^{-10}-10^{-5}M), la unión de ^{3}H-GABA a su sitio receptor.

En un trabajo reciente se describió un efecto "in vitro" de la hormona pineal sobre receptores gabaérgicos de alta y baja

afinidad, produciendo un aumento en la concentración total de sitios en ambos casos y una significativa disminución en el Kd para el sitio de baja afinidad (299). Este efecto de la melatonina fue revertido por el tratamiento de las membranas con Tritón X 100, detergente que utilizamos de rutina en la determinación de receptores gabaérgicos (170) por su capacidad de remover el neurotransmisor asociado a las membranas y otras moléculas que afectan el "binding". El hecho de haber utilizado Triton X 100 para el tratamiento de membranas en este trabajo de Tesis es la causa probable de no haber detectado en nuestros experimentos el efecto "in vitro" de la melatonina descrito en el trabajo citado (299). En conjunto, estos resultados sugieren que el efecto directo de la melatonina podría estar vinculado a la modulación de alguno de estos componentes asociados al receptor gabaérgico.

En las condiciones de trabajo de los presentes experimentos (efecto "ex vivo" y lavado exhaustivo de las membranas con detergente), la melatonina, a partir de una dosis de 25 ug/kg, indujo 3 h más tarde una disminución significativa en la concentración de receptores gabaérgicos de alta afinidad, revirtiendo el aumento inducido por la pinealectomía. No se observaron cambios en la afinidad por efecto de la hormona. Por lo tanto, nuestros resultados indican la existencia de un vínculo entre la función rítmica pineal y los receptores para GABA de alta afinidad, que podrían, en condiciones fisiológicas, ser modulados por variaciones circadianas de la secreción de melatonina.

El efecto depresor de la melatonina sobre los receptores para GABA podría depender de un aumento en los niveles y liberación del neurotransmisor, que desencadene los mecanismos de "down-regulation" del receptor cortical gabaérgico (216). La hipótesis alternativa es que exista una modificación postsináptica por acción de la hormona sobre el receptor del GABA o de otro componente del complejo supramolecular (como el receptor de BZP). Se examinó la viabilidad de la primera hipótesis, mediante la determinación del efecto de la melatonina sobre el "turnover" de GABA y actividad GAD en el SNC y en la glándula pineal.

De acuerdo a consideraciones ya analizadas en la Introducción, la determinación del "turnover" de GABA se realizó por cuantificación de la acumulación de GABA luego de la inhibición de la enzima de degradación (GABA-T) por γ -acetilenGABA. Los resultados que se presentan en la sección (III.1.c) demuestran que la inyección de melatonina (25-300 ug/kg) 3 h antes, aumenta significativamente la acumulación de GABA en el hipotálamo y provoca un incremento dosis-dependiente de este parámetro en la glándula pineal (Fig 33, 34). Asimismo, se observaron cambios significativos en cerebelo y corteza cerebral luego de la administración de 100-300 ug/kg y 300 ug/kg, respectivamente. Es importante señalar que la sensibilidad diferencial dependiente de tejido se correlaciona con la distribución de receptores para melatonina en el SNC (131).

La melatonina no modifica los niveles basales de GABA determinación en ausencia de γ -acetilenGABA), por lo tanto es pro-

bable que la hormona induzca un aumento, tanto de la síntesis como de la degradación de GABA. El método seleccionado para la determinación del "turnover" del neurotransmisor examina el primero de estos mecanismos, considerado limitante en la neurona gabaérgica (178). Nuestros resultados indican que el efecto de la melatonina para disminuir la concentración de receptores de alta afinidad podría deberse a un aumento del "turnover" de GABA y la consecuente subsensibilidad a nivel del receptor cortical.

Es necesario señalar que la concentración mínima de melatonina necesaria para revertir el efecto de la pinealectomía sobre los receptores corticales de GABA y BZP fue de 25 ug/kg, en tanto que la dosis para inducir el aumento del "turnover" de GABA en la corteza cerebral de rata es de 300 ug/kg. Estas diferencias en las dosis podrían deberse al desarrollo de supersensibilidad a la hormona luego de la pinealectomía, fenómeno documentado en la bibliografía (134).

La siguiente serie de experimentos persiguió como objetivo caracterizar el mecanismo por el cual la melatonina aumenta el "turnover" de GABA. Este efecto, en principio, podría deberse a una modificación hormonal a nivel de la enzima de síntesis, o bien reflejar una inhibición de la liberación, o un aumento en la recaptación del neurotransmisor. No se observaron efectos de la melatonina "in vitro" sobre los dos últimos mecanismos propuestos. Por el contrario, se observaron cambios en la actividad de la GAD por efecto de la hormona pineal.

Se han discutido en la Introducción las evidencias experimentales que indican la existencia de variaciones circadianas en la sensibilidad a la melatonina. En este contexto resultó de interés examinar comparativamente los efectos de la hormona pineal en dos etapas del ciclo de 24 h, elegidos como representantes de momentos de mínima y máxima sensibilidad.

Los resultados presentados en la sección (III.1.d) indican que la inyección de melatonina en horas de la noche produce un incremento de Vmáx. y Km aparente de la GAD hipotalámica en todas las dosis examinadas (25-300 ug/kg). La inyección en horas de la mañana modificó también estos parámetros, pero sólo con la mayor de las dosis (Fig 35). Se observaron también modificaciones de la actividad enzimática en corteza cerebral y cerebelo, que sin embargo, evidenciaron una menor sensibilidad a la hormona. La inyección de melatonina en horas de la tarde, aumentó significativamente, y en la dosis mayor, el Km aparente de la GAD en ambos tejidos y la Vmáx. sólo en la corteza. La inyección en horas de la mañana fue inefectiva aún a las dosis máximas de melatonina en ambos tejidos.

El incremento observado en la Vmáx de la GAD es compatible con la hipótesis de que el aumento en el "turnover" de GABA se debe a una modificación a nivel de la enzima de síntesis del neurotransmisor. Las modificaciones del Km por efecto de la melatonina sugieren en cambio una disminución de la afinidad de la enzima por el sustrato (glutamato). Sin embargo, y en la medida en que la determinación de la actividad de GAD se realizó

en un homogenato de tejido, el valor obtenido es en realidad un Km aparente, de manera tal que el aumento en este parámetro podría reflejar también un incremento en el contenido endógeno del sustrato, o quizás en la accesibilidad de este a la enzima.

En los resultados presentados en la sección (III.1.e) se examinó el efecto de la hormona pineal "in vitro" sobre la respuesta postsináptica asociada al receptor gabaérgico de tipo A en el hipotálamo, o sea el incremento de la conductancia al Cl^-. La melatonina produce un aumento del influjo de $^{36}Cl^-$ en todas las concentraciones de GABA examinadas (10-100 uM). El efecto de la hormona presenta una sensibilidad diferencial dependiendo de la hora de sacrificio del animal. La concentración activa mínima de melatonina, en horas de la mañana, fue de 10^{-6}M y en horas de la tarde de 10^{-7}M. Este efecto de la hormona sobre la entrada de Cl^- podría deberse a una potenciación gabaérgica compatible con los resultados ya mencionados sobre el aumento en la concentración de receptores para GABA por la incubación de la hormona "in vitro" (299), o bien podría tratarse de un efecto directo de la melatonina sobre el ionóforo de Cl^-.

Para examinar esta última posibilidad, se estudió el efecto de la melatonina sobre el influjo de $^{36}Cl^-$ sin el agregado de GABA. En dichas condiciones, la hormona induce un incremento en el "uptake" de $^{36}Cl^-$, también en este caso con una sensibilidad diferencial horaria. La mayor sensibilidad se observó en horas de la noche (concentración mínima: 10^{-8}M), mientras

que en horas de la mañana la concentración mínima fue de 10^{-7}M. Este efecto de la hormona pineal está mediado por el ionóforo de Cl^- asociado al GABA, en vista de la capacidad de la picrotoxina para inhibirlo. Es necesario señalar que la melatonina fue un orden de magnitud más potente para el aumento de la entrada de Cl^-, en ausencia que en presencia de GABA exógeno. Esto podría indicar que la concentración total de GABA (endógeno + exógeno) en este último caso, alcanza un nivel de respuesta supramáximo de manera tal de no permitir que se evidencie el efecto de una señal modulatoria como la melatonina.

De acuerdo a las consideraciones discutidas en la Introducción, una etapa clave en la elucidación del mecanismo de acción de la melatonina, fue la demostración de su capacidad para inhibir la entrada de Ca^{2+} inducida por un estímulo despolarizante de K^+ (148). Teniendo en cuenta los resultados hasta aquí discutidos se planteó la posibilidad de que el efecto de la hormona sobre el influjo de Ca^{2+} pueda deberse a la estimulación de la entrada de Cl^-, que como una señal hiperpolarizante, antagonizaría total o parcialmente la respuesta inducida por el K^+ en la entrada de Ca^{2+}. A fin de examinar la viabilidad de esta hipótesis se determinó la capacidad de la picrotoxina (que antagoniza el efecto de la melatonina sobre la entrada de Cl^-) en revertir el efecto hormonal sobre el influjo de $^{45}Ca^{2+}$. La picrotoxina, que carece de efecto "per se" sobre este parámetro, revirtió la

disminución de la captación de $^{45}Ca^{2+}$ inducida por melatonina, avalando de esta manera la hipótesis mencionada.

Dado que el GABA hiperpolariza la postsinapsis y esto deprime la entrada de Ca^{2+} voltaje-dependiente, la falta de efecto de la picrotoxina podría considerarse como un indicador aproximado de la ausencia de GABA endógeno en la preparación. En estas condiciones se observó que la melatonina disminuye la entrada de $^{45}Ca^{2+}$ inducida por K^+ y que la picrotoxina antagoniza su efecto. Nuestros resultados sugieren así la existencia de un efecto directo de la hormona pineal sobre el ionóforo de Cl^-. El sustrato anatómico para esta interacción podría ser cualquiera de los componentes de la estructura representada en la Fig 9, sobre la cual la melatonina actuaría como un modulador alostérico.

Es importante señalar que los efectos endócrinos de la melatonina descriptos en la bibliografía (84, 104, 106, 109), requieren en forma general para su exteriorización, de la administración crónica de la hormona, de acuerdo a un esquema determinado según se persiga reproducir un modelo de días cortos (invierno) o días largos (verano). Asimismo, algunos efectos de la hormona en ovejas se pueden reproducir experimentalmente por un método de implante de liberación continua, ya sea subcutáneo (328) intra-vaginal (329) o bien por vía oral en el forraje (330). Los resultados presentados en este trabajo de Tesis describen una serie de efectos neuroquímicos de la melatonina, que

contrariamente a lo observado en el área endócrina (particularmente reproductiva) se ponen de manifiesto ya a las 3 h de la administración de la hormona. De esta manera se observa que la melatonina aumenta en forma aguda el "turnover" de GABA en el SNC (principalmente el hipotálamo) y en la glándula pineal, modifica la actividad de la GAD en hipotálamo, corteza cerebral y cerebelo, y revierte el efecto de la pinealectomía sobre los receptores corticales de alta afinidad para BZP y GABA.

Es de destacar que aunque resulta concluyente la participación de la hormona pineal en la sincronización de ritmos circanuales, no resulta por ahora tan evidente el mecanismo por el cual la melatonina, una señal circadiana, informa al sistema neuroendócrino y cómo de esa interacción resulta una respuesta circanual. A la luz de los resultados hasta aquí discutidos se sugiere que los efectos a largo plazo de la hormona son el resultado de la acumulación diaria de cambios agudos como los descriptos en este trabajo, que resultan en una modificación significativa de la intrincada y profusa inervación gabaérgica, particularmente a nivel hipotalámico. Este sistema complejo ha sido involucrado en la capacidad de generar la variabilidad de respuestas que el sistema nervioso requiere para hacer frente a la variada gama de estímulos externos (169). Dada la plasticidad estructural y metabólica de las interneuronas gabaérgicas, se ha sugerido que los circuitos en los cuales participan poseen "creatividad" local que, capacita para el logro de soluciones impredecibles y para la retención de la memoria de esas solu-

ciones (169). Sobre esta capacidad para memorizar una determinada respuesta alojada en el sistema gabaérgico intrahipotalámico podría actuar la hormona pineal, de manera tal que la acumulación de un determinado "pattern" secretorio diario resulte en una determinada respuesta estacional.

Aunque no existen pruebas experimentales que avalen en forma directa nuestra hipótesis, se dispone de una serie de piezas que contribuyen al armado del rompecabezas. Pueden enunciarse, por ejemplo: la importancia funcional del sistema gabaérgico del hipotálamo basal que participa en la regulación de la secreción de la mayoría de las trofinas hipofisarias (165, 168), las pruebas a favor de que el mecanismo de acción de la melatonina involucra receptores específicos concentrados en el hipotálamo (128, 129), la cronodependencia de la respuesta del sistema gabaérgico a la administración de la hormona descripta en el presente trabajo, y, finalmente, el hecho de que las BZP, drogas esencialmente facilitatorias de la neurotransmisión gabaérgica, compartan con la melatonina la propiedad única de resincronizar ritmos circadianos (97).

De acuerdo a esta hipótesis, la melatonina actuaría en un sitio definido del SNC involucrado en la regulación de diversas funciones estacionales. Sin lugar a dudas, el hipotálamo, genuino director de orquesta del sistema endócrino, o más precisamente el sistema gabaérgico intrahipotalámico, de trascendencia funcional en la regulación neuroendócrina, constituyen excelentes candidatos para este fin.

La hipótesis alternativa, que no puede descartarse por el momento, supone múltiples sitios de acción de la melatonina, cada uno de los cuales controlaría el "timing" de una función estacional dada. En aval indirecto de esta hipótesis pueden mencionarse los sitios de acción de la melatonina dentro y fuera del SNC, por ejemplo la retina (331), los folículos pilosos (332) o gonadas (333).

El armado del rompecabezas adquiere una complejidad adicional cuando se considera la posibilidad de que la melatonina pueda, a través de un mecanismo de retroalimentación controlar su propia síntesis. Este efecto se ejercería en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, que es una estación de relevo de la vía multisináptica originada en la retina y que termina en las neuronas postganglionares del ganglio cervical superior. La identificación de receptores para la hormona (128, 129) y de neuronas gabaérgicas en esta estructura, pasibles de ser moduladas por la melatonina, constituyen el sustrato anatómico de este mecanismo de retroalimentación.

Como conclusión de la primera parte del trabajo de Tesis, puede considerarse como establecido un vínculo directo entre la actividad pineal, secreción de melatonina y potenciación pre y postsináptica del sistema gabaérgico central.

La segunda parte del trabajo de Tesis tuvo como objetivo el análisis y caracterización del sistema gabaérgico intrapineal en diversas especies. De acuerdo a los resultados ya analizados en la sección (III.1.c), se observó que la melatonina induce, 3 h

más tarde, y en forma dosis-dependiente, un aumento del "turnover" de GABA en la glándula pineal. A partir de esta observación y teniendo en cuenta una serie de antecedentes que adjudicaban al sistema gabaérgico un rol modulatorio de la función glandular (334), resultó de interés estudiar en detalle el sistema gabaérgico intrapineal. Como entre los antecedentes nombrados se incluía la suposición de que este sistema presenta una variabilidad interespecie (334), se realizó el análisis en 3 especies, rata, vaca y humano, siendo los estudios correspondientes a esta última limitados por la escasa diponibilidad de material.

Se ha postulado que la caracterización de un sistema gabaérgico intrapineal requiere la identificación de los siguientes aspectos (304):

1- Las enzimas de síntesis y de degradación del GABA, GAD y GABA-T, deben existir en neuronas específicas.
2- Debe demostrarse la liberación de GABA de sitios de almacenamiento presinápticos y la Ca^{2+}-dependencia de la liberación
3- Deben existir sitios de unión postsinápticos de alta afinidad para el GABA.
4- Debe demostrarse la respuesta fisiológica asociada a la interacción del GABA con su receptor.
5- El GABA debe ser recaptado por neuronas pineales y/o células gliales.

Se analizaron estos aspectos en las 3 especies mencionadas. En la glándula pineal bovina, trabajos previos habían descrito la presencia de GAD y GABA-T (304). La concentración de GABA en corteza cerebral y glándula pineal bovinas es de 14 y 1 mg/100mg de tejido, respectivamente (334). Asimismo se han descripto receptores para GABA de alta y baja afinidad, este último dependiente de Na^+ (304), y una inhibición dependiente de Cl^- de la activación por NE de la SNAT en la glándula pineal bovina (334).

Con estos antecedentes se realizó el análisis del mecanismo de recaptación de GABA en la glándula pineal bovina, para lo cual se incubaron fragmentos de tejido "in vitro" en presencia de ^{3}H-GABA. De acuerdo a lo ya publicado en cerebro y en tejidos periféricos, se describió mediante análisis cinético la existencia de 2 sitios de recaptación para el GABA, de alta y baja afinidad (277). El mecanismo de recaptación de GABA es dependiente de Na^+, lo cual concuerda con la previa descripción de un sitio de unión también dependiente de este ión, con Kd en el rango micromolar (304).

Según se ha mencionado en la Introducción, tanto neuronas como células gliales y algunas células endócrinas tienen un mecanismo similar de recaptación de GABA. Estos procesos, sin embargo, presentan una sensibilidad diferencial a la inhibición farmacológica. Por ejemplo, el ácido nipecótico es sustrato para el "uptake" glial y neuronal, en cambio la β-alanina es sustrato preferencial de la captación glial (306, 307, 308). La

incubación de fragmentos pineales con ^{3}H-GABA en presencia de 0.5 o 10 mM de GABA o ácido nipecótico inhibió de la misma manera la captación del compuesto marcado. La β-alanina, en cambio, fue, en cantidades equimoleculares, significativamente menos efectiva. Nuestros resultados indican la existencia de un mecanismo de tipo neuronal, además del componente glial, en la recaptación del GABA.

El segundo paso para satisfacer los criterios arriba mencionados fue la caracterización del mecanismo de liberación de GABA en la glándula pineal bovina. Para ello, y según se detalla en Materiales y Métodos, los fragmentos pineales cargados con ^{3}H-GABA fueron expuestos a un estímulo despolarizante de K^{+}. Se observó que el estímulo fue efectivo para inducir la liberación de GABA en forma dosis dependiente, con una concentración efectiva mínima de K^{+} de 20 mM. De acuerdo a los conceptos clásicos, los mecanismos de liberación de transmisores requieren de la entrada de Ca^{2+} a través del terminal presináptico como consecuencia de la despolarización (310). En nuestro sistema, el análisis de la Ca^{2+} dependencia reveló la existencia de un componente independiente de Ca^{2+} extracelular en el mecanismo de liberación. La perfusión del tejido en ausencia de Ca^{2+} y en presencia de EGTA (10 mM) o Mg^{2+} (3.5 mM), así como el agregado de Verapamil (bloqueante de canales de Ca^{2+}), suprimieron sólo parcialmente la liberación de GABA. Si bien puede argumentarse que en estas condiciones no se ha removido completamente el Ca^{2+} (pudiendo quedar cierta

cantidad del catión residualmente unido al tejido) es necesario señalar que en otros trabajos en los que se utilizaron las mismas condiciones experimentales para analizar la liberación de acetilcolina y de GABA en cerebro de ratón, se observó que la liberación colinérgica está suprimida en tanto que la liberación de GABA persiste parcialmente (335).

Se ha sugerido que el mecanismo de liberación de GABA independiente de Ca^{2+} extracelular podría deberse a la inversión del "carrier" de recaptación en respuesta a la despolarización o a la liberación del neurotransmisor a expensas de un pool citosólico no vesicular (335, 336). Cualquiera de estos dos mecanismos podría operar en la glándula pineal bovina.

Con objeto de determinar el tipo celular que participa en la liberación de GABA se realizaron incubaciones de fragmentos pineales con ^{3}H-GABA en presencia de inhibidores de la recaptación: β -alanina, ácido nipecótico y GABA no marcado. En los dos últimos casos, donde la captación tanto glial como neuronal está suprimida, no se observó respuesta ante un estímulo despolarizante de 55 mM de K^{+}. Por el contrario, la capacidad de respuesta a la despolarización subsiste en los fragmentos incubados en presencia de β -alanina (Fig 42), indicando la presencia de un componente de tipo neuronal en la liberación de GABA por fragmentos pineales bovinos. Tampoco en este caso puede descartarse la existencia de un componente glial.

De acuerdo al 4º criterio mencionado para la caracterización de un sistema gabaérgico, es necesaria la demostración de

una respuesta biológica asociada a la interacción del GABA con su receptor. Con este fin, se examinó la respuesta del receptor gabaérgico de tipo A, o sea el aumento de la conductancia al Cl^- en glándula pineal bovina. Los resultados presentados en la Tabla VIII demuestran que el GABA induce, luego de 5 seg, un aumento de la captación de $^{36}Cl^-$ en el "pellet" de 900 g de homogenatos de pineal bovina. Este efecto es revertido por la preincubación con picrotoxina, bloqueante del canal de Cl^-. Nuestros resultados, conjuntamente con la previa descripción realizada por otros autores sobre la presencia de receptores de GABA A (304) y de receptores para BZP de tipo central en este tejido (305), indican la existencia en la glándula pineal bovina del complejo supramolecular mostrado en la Fig 9. Los componentes detectados son: el receptor para GABA, el receptor para BZP de tipo central, el ionóforo de Cl inducible por GABA, y el sitio de unión y bloqueo del canal por picrotoxina.

Se completó la descripción adicional del sistema gabaérgico intrapineal mediante la determinación de la actividad de la GAD. Esta enzima fue inhibida por la incubación con AOAA 1 mM, propiedad de una GAD de tipo neuronal (187). En resumen, nuestros estudios en la glándula pineal bovina indican la existencia de un mecanismo de recaptación de ^3H-GABA que resulta probablemente de la suma de la captación de tipos neuronal y glial. Asimismo se identificó la presencia de un mecanismo de liberación de GABA en respuesta a la despolarización que es sólo parcial-

mente dependiente de Ca^{2+}; su origen podría localizarse fuera y dentro de la glía. Se caracterizó también la enzima de síntesis de GABA en pineales bovinas como de tipo neuronal, y finalmente se demostró la respuesta postsináptica al GABA por aumento del influjo de $^{36}Cl^{-}$. De esta manera se cumplimentaron la mayoría de los requisitos enunciados más arriba que permiten definir la existencia de un sistema gabaérgico local en la glándula pineal bovina.

La información existente sobre la glándula pineal de rata sugiere que el sistema gabaérgico intrapineal tiene una localización preferencialmente glial. Apoyan esta hipótesis las pruebas experimentales según las cuales tanto el contenido de GABA como la actividad de GAD no se modifican luego de la desnervación pineal por gangliectomía cervical superior. Asimismo no se observaron diferencias en el "uptake" pineal de ^{3}H-GABA en ratas gangliectomizadas o controles hasta 8 semanas postcirugía (311, 337). En el presente trabajo de Tesis se examinaron algunas características del sistema gabaérgico en la glándula pineal de rata.

Análogamente a lo observado en la glándula pineal bovina, también en la rata se describió un mecanismo de liberación de ^{3}H-GABA inducible por despolarización con K^{+}. La curva dosis-respuesta indica que una concentración de 20 mM de K^{+} es ya efectiva en la inducción de la liberación del aminoácido pineal. Los resultados obtenidos en el análisis de la Ca^{2+}-dependencia indican que a bajas concentraciones de K^{+} (30 mM)

existe una inhibición parcial de la liberación en el medio libre de Ca^{2+}, y que en presencia de una concentración de K^+ más elevada (50 mM), este componente dependiente de Ca^{2+} extracelular desaparece. Nuestros resultados podrían reflejar el hecho de que a concentraciones elevadas de K^+ la liberación de GABA se hace a expensas de un pool citosólico no vesicular. En cambio, a concentraciones menores podría estar involucrado un pool vesicular o bien un pool citosólico diferente del anterior, dependiente de Ca^{2+} extracelular (315).

La proposición de la localización glial del GABA en la glándula pineal de rata que otros autores han hecho no coincide con los resultados presentados en la sección (III.2.b). Por el contrario, nuestros resultados indican que análogamente a lo observado en la glándula pineal bovina, la preincubación con β-alanina, bloqueante de la captación glial no suprime la liberación de GABA, lo que sí hace la preincubación con DABA (inhibidor de la captación neuronal).

Habida cuenta de que la principal señal que recibe la glándula pineal de rata es la NE que proviene de las fibras postganglionares del ganglio cervical superior, examinamos la capacidad de la NE para inducir la liberación de GABA en glándula pineal de rata. La NE, en forma dosis-dependiente, indujo efectivamente la liberación pineal de GABA. La caracterización del receptor noradrenérgico participante en este efecto se realizó mediante pruebas con agonistas y antagonistas específicos. La

naturaleza α -adrenérgica de este receptor se demostró por la capacidad de la fentolamina (antagonista α) y la refractariedad del propranolol (antagonista β) para revertir el efecto de la NE. Asimismo se demostró que la fenilefrina, agonista de tipo α_1, reproduce el efecto ya en una concentración de 10^{-7}M. En cambio el isoproterenol, agonista de tipo β, requiere para inducir la liberación de ^{3}H-GABA en glándula pineal de rata una concentración de 10^{-5}M, lo cual pone de manifiesto su propiedad intrínseca como agonista α y no la participación de un receptor β (317). Se descartó la participación de receptores α_2 mediante el uso de clonidina, que fue inefectiva en las dosis examinadas. La participación de un receptor α_1 está avalada por la demostración de receptores de este tipo en membranas de pineal de rata, así como por la demostración del aumento de Ca^{2+} citosólico inducido por la interacción de NE con este receptor, en una preparación de pinealocitos dispersos de rata (55).

Se examinó también en el presente trabajo de Tesis la posibilidad de que el GABA modifique la producción de melatonina en cultivos de explantos pineales de rata. Los resultados obtenidos indican que el agregado de GABA o el aumento del contenido endógeno del aminoácido por incubación en presencia de inhibidores de la enzima de degradación (GABA-T), disminuyen la producción de melatonina "in vitro". En el intervalo examinado (6 h), las terminales nerviosas que contienen NE en la glándula han comenzado a degenerar (318), de manera tal que el efecto inhibitorio

del GABA podría deberse a una interacción con la NE que se libera de los terminales pineales en degeneración.

Para examinar esta última posibilidad, se estudió el efecto de distintas concentraciones de GABA (10^{-6}-10^{-4} M) en presencia de NE. En dichas condiciones se demostró que el GABA, a partir de una concentración de 10^{-5}M, inhibe parcialmente el estímulo de la producción de melatonina inducido por NE. La concentración de GABA efectiva está en el rango fisiológico descripto en este sistema. De acuerdo a los resultados expuestos postulamos que la NE, que normalmente desencadena la producción de melatonina a través de un receptor β -adrenérgico, podría a través de un receptor de tipo α ,, inducir la liberación de GABA, el que constituiría una señal negativa en la respuesta al neurotransmisor adrenérgico.

En un estudio farmacológico ulterior, identificamos la naturaleza del receptor gabaérgico involucrado en los fenómenos antedichos como un receptor de tipo A, ya que la bicuculina, un antagonista específico de este tipo de receptor, bloquea el efecto. Asimismo, la picrotoxina (bloqueante del canal de Cl^-) revirtió la inhibición por GABA del estímulo noradrenérgico. El baclofen (agonista de tipo B) fue inefectivo.

Como la bicuculina "per se" produjo un incremento en la producción de melatonina, esto podría interpretarse como una demostración de que la NE liberada por la degeneración de los terminales libera GABA, el que parcialmente, a su vez, inhibe al estímulo noradrenérgico en la respuesta pineal.

Nuestros resultados constituyen una prueba indirecta de la existencia de receptores gabaérgicos de tipo A en la pineal de rata. Sin embargo, y a diferencia de lo observable en la pineal bovina, estos receptores no forman parte de un complejo receptorial supramolecular completo, ya que el receptor para BZP descripto en este tejido es de tipo periférico (319). No obstante, la picrotoxina al igual que la bicuculina antagonizan el efecto del GABA, lo cual parece indicar la participación del ionóforo de Cl^- en este mecanismo.

Como hemos señalado en el Capítulo de Resultados, los antecedentes sobre la función del GABA en la regulación de la producción de melatonina en la rata son contradictorios. Algunos autores detectaron efectos del GABA en la inducción por NE de la SNAT (311); otros trabajos describen aumento o disminución en la transformación de triptofano marcado a indoles, dependiendo de la hora del sacrificio o de la disponibilidad de dadores de metilo (314). Es necesario señalar que en ninguno de estos casos se cuantificaron los niveles hormonales sino que se registraron indicadores indirectos de la actividad de la glándula. En las condiciones empleadas en nuestro trabajo, con la determinación de los niveles de melatonina por RIA, se describió un claro efecto inhibitorio del GABA. De acuerdo a los antecedentes discutidos, la inefectividad del GABA sobre el estímulo noradrenérgico de la SNAT podría indicar que el efecto del aminoácido se produce a nivel de la enzima HIOMT, y no SNAT. De hecho, se ha propuesto que estas dos enzimas podrían estar sujetas a

mecanismos diferenciales de regulación (338). En este sentido, la incubación de explantos pineales con GABA en presencia de NE no revirtió la disminución de 5-HT inducida por ésta, sugiriendo que la inhibición en el camino biosintético de melatonina tiene lugar en etapas posteriores.

Las implicancias fisiológicas del mecanismo estudiado deben analizarse conjuntamente con la observación realizada en el presente trabajo de Tesis sobre la capacidad de la melatonina para inducir "in vivo" el aumento del "turnover" de GABA en la glándula pineal de rata, en forma dosis-dependiente. De esta manera se propone que la melatonina a través del incremento del "turnover" de GABA podría localmente controlar en forma inhibitoria su propia síntesis.

Si bien la escasa disponibilidad de material de autopsia imposibilitó la evaluación de los conceptos antedichos en la glándula pineal humana, pudo examinarse en ésta la presencia de receptores para BZP y GABA en piezas obtenidas de material autópsico sin patología neurológica. Los estudios de unión para BZP en la fracción de membranas aisladas de glándula pineal humana, demostraron que estos sitios son de tipo central de acuerdo a las siguientes características:

a- Afinidad de orden nanomolar bajo por ^{3}H-FNZP

b- Alta afinidad por clonazepam y el antagonista Ro 15-1788

c- Baja afinidad por el Ro 5-4864

d- Capacidad del GABA para estimular la unión específica de bajas concentraciones de ^{3}H-FNZP a las membranas pineales humanas.

Los parámetros cinéticos de los receptores para BZP en este sistema se determinaron en condiciones de equilibrio, a través del aumento de las concentraciones del ^{3}H-FNZP o bien por la transformación de la curva de competencia del FNZP no radiactivo por la unión del radioligando. Ambos métodos arrojaron resultados similares. En este sentido es necesario señalar que la presencia de receptores centrales para BZP en glándula pineal humana coincide con la observación en glándula pineal bovina (305) y difiere de la glándula pineal de rata (319) (en la cual se han descripto receptores de tipo periférico). La facilitación por GABA de la unión de ^{3}H-FNZP podría sugerir la presencia en este tejido del complejo supramolecular.

La estimulación por GABA de la unión de BZP en pineales humanas fue escasa (un 30%), mientras que en otros tejidos como por ejemplo, la glándula pineal bovina se ha descripto una estimulación del 60% (305). Es posible que esto se deba al tiempo transcurrido antes de la congelación de la muestra, ya que las pineales humanas son congeladas aproximadamente 6 h luego del deceso del paciente, y en este tiempo a temperatura ambiente se inactivaría parcialmente el mecanismo de acople entre los receptores de GABA y BZP. La verificación experimental de esta hipótesis se realizó analizando comparativamente corteza cerebral humana y de rata. Se observó así que la capacidad del GABA para estimular el "binding" de ^{3}H-FNZP en corteza cerebral disminuyó con el tiempo de permanencia del tejido a temperatura

ambiente. En todos los casos la bicuculina inhibió el efecto del GABA, aumentando su capacidad inhibitoria con el tiempo de permanencia de la corteza a temperatura ambiente. La pérdida progresiva de la capacidad estimulatoria del GABA y el aumento concomitante de actividad antagonista de la bicuculina pueden depender del aumento en el contenido del GABA, resultante de la inhibición diferencial de las enzimas involucradas en su síntesis y degradación (278). De esta manera, durante el tiempo de permanencia a temperatura ambiente, el aumento de los niveles endógenos de GABA disminuiría la capacidad del GABA exógeno para estimular la unión específica de ^{3}H-FNZP. Este aumento del GABA endógeno explica el efecto de la bicuculina dependiente del tiempo de incubación. Nuestros resultados demuestran, por lo tanto, la presencia del receptor para BZP de tipo central en la glándula pineal humana acoplado a un receptor gabaérgico de tipo A.

La evidencia indirecta sobre la posible existencia de receptores gabaérgicos de tipo A en la glándula pineal humana fue confirmada por los resultados presentados en la Fig 60. El análisis de Scatchard de la unión de ^{3}H-GABA a membranas de glándula pineal humanas tratadas con detergente, demostró la presencia de 2 sitios gabaérgicos de alta y baja afinidad, de parámetros cinéticos semejantes a los descritos en otros tejidos (170).

Las características del receptor gabaérgico de tipo B, no asociado al ionóforo de Cl^- e insensible a bicuculina (210), hacen que condiciones de trabajo para caracterizarlo difieran de las necesarias para el receptor de tipo A. Se debe así omitir el tratamiento con Tritón X100 y agregar Ca^{2+}, catión para el cual el receptor tipo B presenta dependencia absoluta (211). En estas condiciones, y por análisis de competencia, se demostró la existencia de un receptor de tipo B para el GABA en membranas de glándula pineal humana. El análisis del receptor de tipo B se realizó mediante el uso de 2 radioligandos: ^{3}H-GABA (agonista mixto) y ^{3}H-baclofen (agonista B específico). Con el uso de ^{3}H-baclofen se observó que tanto el GABA como el baclofen fueron equipotentes en la competencia por la unión del radioligando. En cambio, con el uso de ^{3}H-GABA se observó que el GABA no radiactivo fue más efectivo que concentraciones equimoleculares de baclofen, lo cual sugiere la participación de receptores de tipo A en la unión total, aun cuando las condiciones no fueran la óptimas para este tipo de unión (211). Dada la limitada disponibilidad de material y la particularidad del receptor de tipo B, que presenta una unión inespecífica muy alta, no pudo llevarse a cabo una caracterización más detallada.

En resumen, y de acuerdo al conjunto de resultados presentados, postulamos en este trabajo de Tesis que el sistema gabaérgico intrapineal presenta en las especies estudiadas un grado de complejidad evolutivamente creciente. La expresión más simple

se observó en la glándula pineal de rata . En este caso el sistema del receptor gabaérgico se encuentra presuntamente en un estadío de desarrollo menor. Hay evidencias sobre la existencia en la glándula pineal de rata de un receptor gabaérgico de tipo A, que no estaría acoplado al receptor de BZP (de tipo periférico) (268, 319). Sin embargo el receptor gabaérgico está vinculado al ionóforo de Cl^-, como lo revela el hecho de que la picrotoxina, que interactúa directamente con el canal, revierte el efecto del GABA en inhibir la producción de melatonina inducida por NE.

La glándula pineal de vaca representa un grado de complejidad intermedia por la presencia de receptores para BZP de tipo periférico y central. Estos últimos están acoplados al receptor gabaérgico. En nuestro sistema se demostró en forma directa la capacidad del GABA de inducir la apertura del canal de Cl^- y la reversión de este efecto por picrotoxina.

La glándula pineal humana representa la estructura de mayor complejidad. Se describe la presencia de receptores centrales para BZP, y su acoplamiento al receptor de GABA tipo A. La mayor complejidad del sistema gabaérgico en la pineal humana resulta de la presencia de receptores para GABA de tipo B, cuya implicancia fisiológica no ha sido aún elucidada. Por el contrario, no se observó la presencia de este tipo de receptor en la glándula pineal bovina.

En relación a la liberación del GABA, los sistemas examinados (en este caso sólo vaca y rata) no mostraron diferencias sustanciales.

Queda por resolver la localización del sistema gabaérgico intrapineal. Las evidencias experimentales obtenidas en rata descartan en forma concluyente la posibilidad de que sean neuronas gabaérgicas provenientes del ganglio cervical superior (337). Esto restringe la posible localización del sistema a 3 sitios (no mutuamente excluyentes): la glía glandular, la inervación central, o los pinealocitos. En forma parcial, y por los resultados presentados en este trabajo de Tesis, se descartan las 2 primeras posibilidades, al menos como únicas. Se ha verificado tanto en pineal bovina como de rata, que el mecanismo de liberación proviene en parte de un depósito no glial. Asimismo, la captación de GABA en la glándula pineal bovina incluye un componente de tipo neuronal, además del aporte glial, y la enzima de síntesis de GABA tiene características compatibles con una naturaleza neuronal.

La posibilidad de terminales gabaérgicos entre las fibras que provienen de la inervación central que alcanza la glándula se descartó en primera instancia mediante la demostración de que fragmentos provenientes de la región apical, medial y proximal de pineales bovinas tienen la misma capacidad de liberación de ^{3}H-GABA frente a un estímulo despolarizante, en tanto que las presuntas fibras pinealopetales de origen central se concentran

casi exclusivamente en la región proximal de la glándula. Asimismo, en nuestros estudios inmunohistoquímicos con un anticuerpo anti-GABA, la marcación fue observada en los pinealocitos, y no en terminaciones neurales.

De acuerdo a estas consideraciones se postula que el sistema gabaérgico intrapineal se localiza en los pinealocitos. Existen evidencias en la bibliografía sobre la naturaleza neuronal de los pinealocitos, así como pruebas a favor de la diversidad de este grupo de células, que por limitaciones experimentales fueron durante mucho tiempo consideradas funcionalmente homogéneas y sincronizadas (339). La diversidad de los pinealocitos se observa a nivel inmunocitoquímico, en estudios de proteínas retinales en la glándula pineal: antígeno S, opsina y transducina (340, 341, 342).

Citoquímicamente se demostró que virtualmente todos los pinealocitos contienen 5-HT (343). Aunque esto podría considerarse como índice de homogeneidad, no lo es necesariamente, dado que el hallazgo no contesta si efectivamente todas las células son capaces de sintetizar la amina, pudiendo ocurrir alternativamente que algunas la capten de las células vecinas. Por el contrario, la inmunocitoquímica de melatonina ha demostrado en forma concluyente que un número sustancial de pinealocitos no son inmunorreactivos (344), mientras que las observaciones respecto a la HIOMT en pineal bovina revelaron que la gran mayoría de los pinealocitos sí lo son (345, 346).

Nuestros resultados sugieren que es erróneo (aunque confortablemente simplificador) suponer "a priori" la homogeneidad de la población celular pineal (339). Ciertamente no existen pruebas absolutas de la diversidad, pero esto probablemente se debe a limitaciones experimentales. De hecho, el aporte proveniente de la inmunocitoquímica ha demostrado que los pinealocitos de los mamíferos tienen características en común con células fotorreceptoras, lo que hace el análisis mucho más complejo (339).

En cuanto a la naturaleza neuronal de los pinealocitos de mamíferos, existen propiedades morfológicas como por ejemplo la presencia de procesos y de "synaptic ribbons" (típicas de receptores sensoriales) (339). Se ha demostrado en registros extracelulares que los pinealocitos de mamíferos presentan potenciales de acción y tienen muchas características comunes con células nerviosas productoras de hormonas (347). Tampoco en este punto se han logrado aún pruebas concluyentes.

En términos generales, los trabajos más recientes han demostrado que no estamos todavía en condiciones de contestar si los pinealocitos de mamíferos son o no neuronas modificadas, pero si parece claro que constituyen una población de naturaleza heterogénea. Para la mayoría de los marcadores químicos usados, se observa que algunas células dan señal positiva y otras no (339). Los pinealocitos tienen características comunes con neuronas por un lado y con células fotorreceptoras por el otro. Aún no se ha estudiado en forma sistemática si cada célula tiene todas o sólo algunas de estas propiedades, y sobre todo si todos los tipos de

pinealocitos están involucrados en la síntesis de melatonina. Es importante que este problema se analice en un marco en el cual los pinealocitos puedan ser examinados desde diferentes ángulos y con la aplicación de técnicas neurobiológicas ya establecidas y en desarrollo, que permitan resolver la elusiva y aún misteriosa fisiología pineal. Dentro de este contexto, de acuerdo a los resultados discutidos se propone que el sistema gabérgico intrapineal o sea, la capacidad de síntesis, liberación, recaptación y efecto del GABA podría albergarse en una subpoblación de pinealocitos que afecten el funcionamiento general de la glándula como señal paracrina. La localización de GABA en las células pineales fue demostrada en la glándula pineal bovina, mediante el uso de un anticuerpo específico antiGABA. Los resultados presentados en las Fig. 45, 46 y 47, demuestran que el GABA está presente en el aproximadamente el 20% de las células estudiadas que exhiben características morfológicas de pinealocitos.

Ahora bien, ¿cuáles son las implicancias fisiológicas de un sistema gabaérgico intrapineal?. Quizás pueda obtenerse una buena pauta examinando este sistema en una estructura embriológicamente muy vinculada a la glándula pineal como es la retina. La retina es una estructura histológicamente compleja, formada por numerosos tipos celulares imprescindibles para llevar adelante la función de discriminación visual. Se ha demostrado que las células ganglionares retinianas de conejo (estación de relevo de la información visual hacia el cerebro) son en muchos ca-

sos direccionalmente selectivas, o sea responden a un estímulo, que por ejemplo se mueve de izquierda a derecha, pero son refractarias al movimiento inverso. En presencia de picrotoxina, esta sensibilidad direccional desaparece, y las células ganglionares responden de la misma manera a estímulos que se mueven en cualquier dirección (151). La explicación para esta observación fue que las neuronas gabaérgicas proveen a las células ganglionares de una capacidad discriminativa. Las células gabaérgicas de la retina (células horizontales y algunas amácrinas) poseen procesos con arreglo horizontal que hacen contacto con fotorreceptores y con las células ganglionares. Una subpoblación del tipo amácrina se distribuye asimétricamente, de modo tal que al ser estimuladas por las células bipolares, inhiben células ganglionares hacia la derecha o a la izquierda, pero no en ambas direcciones. En presencia de picrotoxina, este efecto es revertido y las ganglionares responden indiscriminadamente. De esta manera las células amácrinas proveen a la retina de una característica funcional clave: la capacidad de detectar la dirección de movimientos, lo cual representa sin dudas, un gran beneficio evolutivo.

Existe otro ejemplo interesante vinculado a la vía visual. En gatos se ha demostrado una gran capacidad para discriminar entre estímulos aún muy cercanos aplicados en la piel. Esta capacidad se debe a que ciertas neuronas en el cerebro responden a estímulos sólo en un área circunscripta de la superficie corporal, denominada campo receptivo. Estas neuronas se concentran en la

corteza somatosensorial (151). Cuando se inyecta bicuculina a este nivel, el campo receptivo de las neuronas se expande drásticamente, más allá de sus límites normales. La explicación es que las neuronas gabaérgicas cancelan selectivamente el "input" sensorial. Es posible que las neuronas de la corteza somatosensorial reciban estímulos excitatorios de un área grande en la superficie de la piel, pero que no toda la información de este área se procese de la misma manera. Aquellos estímulos provenientes de la región periférica del campo receptivo están acompañados por una señal inhibitoria que cancela el efecto, mientras que los provenientes de la región central del campo periférico son desinhibidos y definen de esta manera una pequeña región de sensibilidad.

Con estos ejemplos volvemos a uno de los puntos de partida de esta Discusión, es decir, la función de neuronas gabaérgicas dentro de la perspectiva de un sistema generador de variabilidad. Un buen intento de mejorar la función de un sistema operacional relativamente pobre, consiste en mantener sus componentes en mutuo diálogo. La experiencia nos demuestra que las propiedades de auto-organización de los sistemas biológicos los capacitan, en general, para funcionar adaptativamente a todos los niveles, desde el intercelular hasta el del organismo como un todo, una vez que estas interacciones se establecen (169).

En este sentido, el sistema gabaérgico intrapineal descrito en el presente trabajo de Tesis podría tener un rol clave, por ejemplo, para seleccionar en forma alternativa grupos de pinea-

locitos en la producción de melatonina, la que indudablemente constituye una señal de vital importancia en respuesta a la demanda funcional, no sólo a nivel de la señal fotoperiódica sino también de otras variables ambientales.

Finalmente, parece importante señalar que estas consideraciones no atentan contra la idea establecida de la pineal como buen modelo neuroendócrino por su constitución relativamente homogénea (que incluye en un 85% de su estructura un único tipo celular). Muy por el contrario, es en la complejidad más que en la homogeneidad de este sistema, que se apoya su condición de excelente paradigma para la elucidación de algunos de los grandes interrogantes aún por resolver en la Neurobiología.

V CONCLUSIONES GENERALES

Los experimentos discutidos en las secciones precedentes permiten arribar a las siguientes conclusiones generales:

1. La pinealectomía reduce la densidad de los receptores para BZP en corteza cerebral de rata. La administración de melatonina revierte el efecto de la ablación pineal.
2. Existen variaciones circadianas en la concentración de sitios receptores para BZP en corteza cerebral de rata, observándose valores máximos durante la noche. La pinealectomía modificó este ritmo, eliminando el pico nocturno. La dosis mínima de melatonina necesaria para revertir el efecto de la ablación pineal fue de 25 ug/kg.
3. Existen variaciones circadianas en la unión de GABA a receptores de alta afinidad en corteza cerebral de rata. La pinealectomía produjo en forma general un aumento en la concentración de receptores y modificó la ritmicidad diaria, observándose un máximo en la concentración de receptores en horas de la noche. La dosis mínima de melatonina para revertir este efecto fue de 25 ug/kg.
4. La melatonina aumenta la acumulación de GABA "in vivo" en corteza cerebral, cerebelo, hipotálamo y glándula pineal.
5. La melatonina modifica la actividad glutámico-descarboxilasa en hipotálamo, corteza cerebral y cerebelo.

6. La melatonina aumenta el influjo de $^{36}Cl^-$ basal e inducido por GABA en hipotálamo. Este efecto fue revertido por picrotoxina.

7. Existe en la glándula pineal bovina un mecanismo de liberación de ^{3}H-GABA inducido por despolarización con K^+, parcialmente dependiente de Ca^{++} extracelular, que podría resultar de la suma de un aporte de tipo neuronal y uno de tipo glial.

8. Existe un sistema de recaptación de ^{3}H-GABA en fragmentos de pineal bovina, mediado por receptores de alta y baja afinidad, que podría resultar de la suma de un aporte de tipo neuronal y uno de tipo glial.

9. El GABA induce un incremento del influjo de $^{36}Cl^-$ en el pellet de 900 g de homogenato de pineal bovina. Este efecto es revertido por picrotoxina.

10. Existe en la glándula pineal de rata un mecanismo de liberación inducido por despolarización con K^+, parcialmente dependiente de Ca^{++} extracelular a bajas concentraciones de K^+ e independiente de este catión a concentraciones de K^+ mayores.

11. La NE induce la liberación de ^{3}H-GABA en glándula pineal de rata, en forma dosis dependiente. Este efecto está mediado por un receptor de tipo α_1.

12. El GABA exógeno o el aumento del contenido endógeno induce una inhibición en la producción de melatonina por explantos pineales incubados durante 6 h, a través de un receptor de tipo A.

13. El GABA en forma dosis dependiente revierte parcialmente el estímulo noradrenérgico sobre la producción de melatonina, a través de un receptor de tipo A.

14. Existen en la glándula pineal humana receptores para BZP de tipo central.

15. Se describió la presencia de receptores gabaérgicos de tipo A y B en la glándula pineal humana.

BIBLIOGRAFIA

1 Beck-Friis, J; Kjellmen, B. F. ; Ljunggren, J. G. ; Wetterberg, L., (1985). En: The pineal gland and its endocrine role. Brown, G.M. ; Wingright, S.D.; (ed.), Pergamon, New York, : 313-318

2 Lewy, A.J., (1985). En: The pineal gland and its endocrine role. Brown, G.M.; Wainwright, S.D., (ed.), Pergamon, New York, : 203-209

3 Reiter, R.J., (1985). En: The pineal gland and its endocrine role. Brown, G.M.; Wainwright, S.D., (ed.), Pergamon, New York, : 163-168

4 Descartes, R. (1909). En: Oeuvres XI, Ch. and P. Tannery, (eds.), Paris

5 Lerner, A.B.; Case, J.D.; Heinzelman, R.V. (1959). J. Am. Chem. Soc. 81, : 6084-6090

6 Pévet, P. (1981). En: The Pineal Gland vol I. Anatomy and Biochemistry. Reiter, R.J., (ed.) C.R.C. Press, B. Raton, p: 121-154

7 Collin, J.P. (1986). En: Pineal and retinal relationships. O'Brien, P.J.; Klein, D.C., (eds.); Academic Press, p. 15

8 Vollrath, L.; Schroder, H. (1987). En: Fundamentals and clinics in Pineal Research. Trentini, G.P.; De Gaetani, C.; Pevet, P., (eds.), Raven Press, vol 44, p: 13- 25

9 Krstic, R. (1986). Journal of Neural Transmission, Supp. 21, :415-432

10 Kappers, J.A. (1960). Anatomical Record, 136, : 220-221

11 Kenny, G.C.T. Journal of Neuropathology and Exp. Neurol. 20, : 563-570

12 Cardinali, D.P.; Wurtman, R.J. (1975). En: Frontiers in Pineal Physiology. Altschule, M.D., (ed.), The MIT Press, Cambridge, Mass, : 12-20

13 Minneman, K.P.; Wurtman, R.J. (1976). Ann. Rev. Pharm. Toxicol 16, : 33-38

14 Sugden, D. J. (1979). Neurochem., 33, : 811-813

15 Sitarom, B.R.; Lees, G.J. J. of Neurochem., 31, 1978, : 1021-1029

16 Quay, W.B. (1975). En: Pineal Chemistry. Thomas, C.C., (ed), Spingfield, Illinois

17 King, T.S.; Steinlechner, S. (1975). En: Pineal Research Reviews, 3, : 69-113

18 Jaim-Etcheverry, G.; Zieher, L.M. (1986). En: Localization in the autonomic nerves of the rat pineal gland. Zellforsch, Z., (ed.), p. 393-398

19 King, T.S.; Steger, R. W.; Steinlechner, S.; Reiter, R.J. (1984). Exp. Brain Res., 54, : 432-436

20 Snyder, S.H.; Axelrod, J.; Zweig, M. J. (1967). Pharmacol. Exp. Ther. 158, : 206-213

21 Klein. D.C.; Weller, J.L.; Moore, R.V. (1971). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68, : 3107-3110
22 Namboodiri, M.A.A.; Nambodirii, M. A.; Weller, J.L.; Klein, D.C. (1979). J. Neurochem., 32, : 31-39
23 Axelrod, J.; Weissbach, H. (1960). Science, 131, :1312-1320
24 Guchait, R.B.; Grau, J.E. (1978). J. Neurochem., 31, : 921-925
25 Cardinali, D.P.; Wutrman, R.J. (1972). Endocrinology, 91, : 247-253
26 Raikhlin, N.T.; Kvetnoy, I.M.; Tolkachev, V.N. (1975). Nature, 255, : 344-348
27 Mhatre, M.C.; Van Jaarsveld, A.S.; Reiter, R.J. (1988). Bioch. and Biophys. Res. Com., 153, : 1186-1192
28 Arendt, J. (1985). Pineal Research Reviews, 3, 161-213
29 Rollag, M.D.; Morgan, R.J.; Niswender, G.D. (1978) Endocrinology, 102, : 1-8
30 Illnerova, H.; Backstrom M.; Saapf, J.; Wetterberg, L.; Vanebo, B. (1978). Neurosciences Letters, 9, : 189-193
31 Cardinali, D.P.; Lynch, H.J.; Wurtman, R.J. (1972). Endocrinology, 91, : 12-13
32 Pardridge, W.M.; Mietus, L.J. J. (1980). Neurochem., 34, 1761-1764
33 Kappers, J.A.; Pevet, P.(1979). En: The pineal gland of vertebrates including human. Elsevier, Amsterdam, :87-93
34 Hirata, F.; Hayaishi, D.; Fokuyama, T.; Senoh, S.(1974) J. Biol. Chem. , 249: 1311-1318
35 Rogawski, M.A.; Roth, R.H.; Aghajanian, G.K. (1979) J. Neurochem., 32: 1219-1222
36 Vakkuri, O.; Tewo, J.; Luttinen, R.; Ruotsalainen, H.; Rahkamaa, E.; Leppaluoto, J. (1987), Endocrinology, 120: 2453-2459
37 Vitte, P.A.; Harthe, C.; Lestage, P.; Claustrat, B.; Bobillier, P. (1988), J. of Pineal Res., 5: 437-453
38 Anton-Tay, F.; Forray, C.; Ortega-Corona, B.G. (1988), J. of Pineal Res., 5: 125- 134
39 Szentagothai, J.; Flerko, B.; Mess, B.; Halasz, B. (1976). En: Hypothalamic control of the anterior pituitary. Akademiai Kiado, Budapest
40 Kappers, J.A. (1965). En: Structure and function of the epiphysis cerebri. Kappers, J.A., Schode, J.P., (eds.), Elsevier, Amsterdam, p. 87
41 Klein, D.C. (1978). En: The hypothalamus. Ruchelin, S.; Baldessarini, R.J.; Martin, J.B., (eds.), Raven Press, New York, : 303-310
42 Weber, R.A. (1986). Melatonin in humans. Wurtman, R.J.; Waldhauser, F., (eds.), Journal of Neural Transmission Suppl, 21: 323-374
43 Reiter, R.J. (1988). Animal and Plant Sciences, vol 1, 111-116
44 Klein, D.C. (1979). En: Endocrine Rhythms. Krieger, D.T.,

(ed.), Raven Press, New York, : 203-223
45 Vaughan, G.M.; Reiter, R.J. (1987). Endocrinology, 120: 1682-1684
46 Sakai, K.K.; Marks, B.H. (1972). Life Sci., 11: 285-288
47 Davis, G.A. (1978). Endocrinology, 103: 1048-1054
48 Deguchi, T. (1973). Mol. Pharmacol., 9: 184-190
49 Zatz, M. (1978). En: The Pineal Gland. Nir, I.; Reiter, R.J.; Wurtman, R.J., (eds.), Springer Verlog, Viena, p. 97
50 Wurtman, R.J.; Shein, H.M., Axelrod, J.; Larin, F. (1969). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 62: 749-752
51 Morrissey, J.J.; Lovenberg, W. (1978). Arch. Biochem. Biophys., 191: 1-7
52 Sudgen, D.; Klein. D.C. (1983). Brain Res., 265: 348-351
53 Klein, D.C.; Weller, J.L. (1970). Science, 168: 978-982
54 Romero, J.A.; Axelrod, J. (1974). Science, 184: 1091-1092
55 Cardinali, D.P.; Vacas, M.I. (1987) Cellular and Molecular Neurobiology, 7: 323- 337
56 Korf, H.W.; Moller, M. (1984). En: Pineal Research Reviews. Reiter, R. J., (ed.), Liss, A.R., New York, p. 41-87
57 Korf, H.W.; Moller, M. (1985). En: The Pineal Gland. Current State of Pineal Research. Mess, B.; Ruzsas, Cs.; Tima, L.; Pevet, P., (eds.), Académiai Kiadó Budapest, : 47-69
58 Klein, D.C.; Sudgen, D; Weller, J.L. (1983). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 599-603
59 Vacas, M.I.; Lowenstein, P.R.; Cardinali, D.P. (1980). J. Autom. New. Syst., 2: 305-314
60 Zatz, M. (1985). J. Neurochem., 45: 95-100
61 Sudgen, A.L.; Sudgen, D.; Klein, D.C. (1987). J. Biol Chem., 262: 741-745
62 Sudgen, D.; Vanecek, J.; Klein, D.C.; Thomas, T.P.; Anderson, W.B. (1985). Nature, 314: 359-361
63 Vanecek, J.; Sudgen, D.; Weller, J.L.; Klein, D.C. (1986). J. Nuerochem., 47: 678-686
64 Cardinali, D.P.; Ritta, M.N. (1983). Neuroendocrinology, 36: 152-160
65 Vacas M.I.; Keller Sarmiento, M.I.; Etchegoyen, G.S.; Pereyra, E.N.; Gimeno, M.; Cardinali, D.P. (1987). Neuroendocrinology, 46: 412-416
66 Govtrapong, P.; Murrin, L.C.; Ebadi, M. (1984). J. Pineal Res., 3: 223-225
67 Kaku, K.; Tsuchiya, M.; Tahizawa, Y.; Okuya, S.; Inoue, Y.; Kaneko, T.; Yanaihora, N. (1986). Peptides, 7: 193-196
68 Schroder, H.; Vollrath, L. (1986). Neurosci. Lett., 63: 285-289
69 Vacas, M.I.; Keller Sarmiento, M.I.; Pereyra, E.N.; Etchegoyen, G.S.; Cardinali, D.P. (1987). Cell. Molec. Neurobiol., 7: 309-315
70 Govitrapong, P.; Ebadi, M. (1986). Endocrine Res., 12: 293-304
71 Graf, M.V.; Schoenenberg, G.A. (1987). J. Neurochem., 48: 1252-1257

72 Oaknin, S.; Vaughan, M.K.; Troiani, M.E., Vaughan, G.M.; Reiter, R.J. (1987). Comp. Biochem. Physiol. Part C, 86: 23-27
73 Lowenstein, P.R.; Pereyra, E.N.; Gonzalez Solveyra, C.R.; Cardinali, D.P. (1984). Eur. J. Pharm., 98: 261-264
74 Hariharasubramanian, N.; Nair, N.P.V.; Pilapil, C. (1985). Adv. Biosci., 53: 31-36
75 Johnson, L.Y.; Vaughan, M.K.; Richardson, A.; Petterborg, L.J.; Reiter, R.J. (1982). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 169: 416-418
76 Reiter, R.J.; Trakulrungsi, W.K.; Trakulrungsi, C.; Vriend, J.; Morgan, W.W.; Vaughan. M.K.; Johnson, L.V.; Richardson, B.A. (1982). En: Melatonin Rhythm Generating System. Klein, D.C., (ed.), Karger, Basel, : 143-154
77 Cardinali, D.P.; Vacas, M.I.; Rosenstein, R.E.; Etchegoyen, G.S.; Keller Sarmiento, M.I.; Gonzalez Solveyra, C.; Pereyra, E.N. (1987). En: Advances in Pineal Research: 2, Reiter, R.J. Fraschini, F. (eds.), John Libbey: 51-66
78 Arendt, J. (1988). Clinical Endocrinology, 29: 205-229
79 Arendt, J. (1986) Oxford Reviews of Reproductive Biology, 8: 266-320
80 Vivien-Roels, B.; Fevet, P. (1983). Pineal Research Reviews, 1: 92-94
81 Hoffman, R.A.; Reiter, R.J. (1965). Science, 148: 1609-1615
82 Reiter, R.J. (1980). Endocrine Rev., 1: 109-120
83 Reiter, R.J. (1979). En: The pineal. Eden Press, Montreal
84 Cardinali, D.P. (1981). Endocrine Rev., 2: 327-346
85 Lincoln, G.A.; Forbes, J.M. (1984). Society for the Study of Fertility. Abstract N°33
86 Parkes, A.S. (1976) Patterns of Sexuality and Reproduction. Oxford University Press, Oxford
87 Goldman, B.D. (1983). Pineal Research Reviews, 1: 145-181
88 Reiter, R.J. (1983). En: The pineal and its endocrine role. Axelrod, J.; Fraschini, F.; Velo, G.P., (eds.), Plenum Press, New York, : 227-241
89 Kennaway, D.J.; Gilmore, T.A.; Seamark, R.F. (1982). Endocrinology, 110: 1722-1766
90 Kennaway, D.J.; Dunstan, E.A.; Staples, L.D. (1987). Journal of Reproduction and Fertility, Suppl. 34: 187-199
91 Martinet, L.; Allain, D. (1985). En: Photoperiodism, Melatonin and the Pineal. Ciba Fundation Symposium, 117. Evered, D.; Clark, S., (eds.), London, : 170-187
92 Duncan, M.J.; Goldman, B.D. (1984). Journal of Experimental Zoology, 230: 97-103
93 Menoker, M.; Hudson, D.J.; Takahashi, J.S. (1981). En: Biological Clock in Seasonal Reproductove Cycle. Follet, B.K.; Follet, D.E., (eds.), Wright, Bristol, : 171-183
93 b. Underwood, H. (1984). En: The Pineal Gland. Reiter, R.J., (ed.), Raven, New York, : 221-251
94 Takahashi, J.S. (1987). XVIII International Conference on Chronobiology. Proceeding. Pergamon, Oxford

95 Armstrong, S. M.; Redman, J. (1985). En: Photoperiodism, Melatonin and the Pineal. Ciba Foundation Symposium 117, Evered, D.; Clark, S. (eds.), London, : 188-207
96 Redmon, J.; Armstrong, S.; Ng, K.T. (1983). Science, 219: 1089-1091
97 Turek, F.W.; Van Reeth, O. (1988). Trends in Neurosci., 11: 535-541
98 Arendt, J.; Aldhous, M.; Marks, N.; Folkard, S.; English, J.; Marks, V. (1987). Ergonomic, 30: 1379-1393
99 Foster, D.L. (1981). Biology of Reproduction, 25: 85- 92
100 Lehrer, S. (1985). Pineal Research Reviews, 3: 237-257
101 Rivest, R.W.; Aubert, M.L.; Long, V.; Sizonenko, P.C. (1986). Journal of Neural Transmission, Suppl 21: 81-108
102 Kitay, J.I.; Altschule, M.D. (1954). En: The Pineal Gland. Harvard University Press, Cambridge, MA, : 79-95
103 Walchhauser, F.; Steger, H. (1986). Journal of Neural Transmission, Suppl 21: 183-198
104 Trentini, G.P.; Botticelli, A.R.; Botticelli, C.S.; Silva, C.B. (1976). Hormone and Metabolic Research, 8: 234-236
105 Wetterberg, L.; Arendt, J.; Paunier, L.; Sizonenko, P.C.; Van Donselaer, W.; Heyden, T. (1976). Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 42: 185-188
106 Ozaki, Y; Wurtman, R.J.; Alonso, R.; Lynch, H.J. (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 531-534
107 Brzezinski, A.; Seibel, M.M.; Lynch, H.J.; Deng, M.H.; Wurtman, R.J. (1987) Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 316: 1550-1551
108 Vaughan, G.M. (1984). Pineal Research Reviews, 2: 141-201
109 Cardinali, D.P.; Vacas, M.I.; Lowenstein, P.R. (1984). En: The Pineal Gland. Current State of Pineal Research. Mess, B.; Ruzsas, C.; Tima, L.; Pévet, P., (eds.), Akadémiai Kiadó, Budapest, : 273-290
110 Romijn, H.J. (1978). Life Scien., 23: 2257-2274
111 Nir, I; Behroozi, K.; Assael, M.; Ivriani, I.; Sulman, F.G. (1969). Neuroendocrinology, 4: 122-127
112 Bindoni, M.; Rizzo, R. (1965). Arch. Sci. Biol., 49: 223-233
113 Fariello, R.G.; Bubenik, G.A.; Brown, G.M.; Grota, L.J. (1977). Neurology, 27: 567-570
114 Wurtman, R.J.; Lieberman, H.S. (1985). J. Pineal Research, 1: 301-305
115 Sudgen, D. (1983). J. Pharmac. Exp. Ther., 227: 587-591
116 Reiter, R.J.; Morgan, W.W. (1972). Physiol. Behav., 9: 203-208
117 Cramer, H.; Rudolph, J.; Consbruch, V.; Kendel, K. (1974). Adv. Biochem. Psychopharmac., 11: 187-191
118 Grasby, P.M.; Cowen, P.J. (1987) Psychological Medicine, 17 (press)*
119 Lewy, A.J.; Wehor, T.A.; Gold, P.W.; Goodwin, F.K. (1978). En: Catecholamines: Basic and Clinical Frontiers. Usdin, E.; Kopin, I.J.; Barechas, J.; Pergamon, Oxford, vol II, : 1173-1175

120 Ferrier, I.N.; Arendt, J.; Johnstone, E.C.; Crow, T.J. (1982). Clinical Endocrinology, 17: 181-187
121 Lewy, A.J.; Kern, H.E.; Rosenthal, N.E.; Wehr, T.A. (1982). American Journal of Psychiatry, 139: 1496-1498
122 Rosenthal, N.E.; Sack, D.A.; Gillin, J.C.; Lewy, A.J.; Goodwin, F.K.; Davenport, Y.; Mueller, P.S.; Newsome, D.A.; Wehr, T.A. (1984). Archives of General Psychiatry, 41: 72-79
123 Rosenthal, N.E.; Sack, D.A.; Jacobsen, F.M.; James, S.P.; Parry, B.L.; Arendt, J.; Tamarkin, L.; Wehr, T.A. (1986). Proceedings of the First International Conference on Melatonin in Humans, Vienna, Austria. Wurtman, R.J.; Waldhauser, F., (eds.), Elsevier, Amsterdam, : 233-242
124 Wehr, T.A.; Jacobsen, F.M.; Sack, D.A.; Arendt, J.; Tamarkin, L.; Rosenthal, N.E. (1987). Archives of General Psychiatry
125 Lewy, A.J.; Wehr, T.A.; Goodwin, F.K.; Newsome, D.A.; Rosenthal, N.E. (1981). Lancet 1: 383:384
126 Karsch, F.J.; Bittman, E.L.; Foster, D.L.; Goodman, R.L.; Legan, S.J.; Robinson, J.E. (1984). Rec. Prog. Horm. Res., 40: 185
127 Petterborg, J.L. (1985). Adv. Biosci., 53: 133-138
128 Cohen, M.; Roselle, D.; Chabner, B.; Schmith, T.J.; Lippman, M. (1978). Nature, 274: 894
129 Cardinali, D.P.; Vacas, M.I.; Boyer, E.E. (1978). IRCS Med. Sci., 6: 357
130 Niles, L.P.; Wong, V.M.; Mishra, R.K.; Brown, G.M. (1979). Eur. J. Pharmacol., 55: 219
131 Lang, U.; Aubert, M.L.; Sizonenko, P.C. (1981). Pediatr. Res., 15: 80
132 Laudon, M.; Zisapel, N. (1986). Febs Lett., 197: 9
133 Vacas, M.I.; Cardinali, D.P. (1979). Neurosci. Lett., 15: 259
134 Cardinali, D.P.; Vacas, M.I. (1981). Adv. Biosci., 29: 237
135 Laudon, M.; Zisapel, N. (1987). Brain Res., 402: 146
136 Abe, K.; Robinson, G.A.; Liddle, G.W.; Butcher, R.W.; Nicholson, W.E.; Baird, C.E. (1969). Endocrinology, 85: 674
137 Morguestern, E.A.; Vacas, M.I.; Keller Sarmiento, M.I.; Cardinali, D.P. (1983). Com. Biol., 1: 347
138 Vacas, M.I.; Berrfa, M.I.; Cardinali, D.P.; Lascano, E.F. (1984). Neuroendocrinology, 38: 176
139 White, B.H.; Dekura, R.D.; Rollog, M.D. (1987), J. Comp. Physiol, B 157: 153
140 Rudamn, D. (1976). Neuroendocrinology, 20: 235
141 Vacas, M.I.; Keller Sarmiento, M.I.; Cardinali, D.P. (1981). Brain Res., 225: 207-210
142 Vessely, D.L. (1981). Mol Cell. Biochem., 35: 55
143 Cardinali, D.P.; Ritta, M.N.; Fuentes, A.M.; Gimeno, M.F.; Gimeno, A.L. (1980). Eur. J. Pharm., 67: 151
144 Franchi, A.M.; Gimeno, M.F.; Cardinali, D.P.; Vacas, M.I. (1987). Brain Res., 405: 384

145 Leach, C.M.; Reynoldson, J.A.; Thornburn, G.D. (1982). Endocrinology, 105: 1437
146 Zisapel, N.; Laudon, M. (1983). Brain Res., 272: 378
147 Dubocovich, M.L. (1983). Nature, 306: 782
148 Vacas, M.I..; Keller Sarmiento, M.I.; Cardinali, D.P. (1984) Brain Res. 294: 166
149 Cardinali, D.P.; Vacas, M.I.; Rosenstein, R.E. (1988). En: The Pineal Gland and Cancer. Gupta, D.; Attanasio, A.; Reiter, R.J. eds., Brain Res. Promotion, London (en prensa).
150 Roberts, E.; Frankel, S. (1950). J. Biol. Chem., 187: 55-63
151 Gottlieb, D. (1988). Sci. Amer., 258: 82-90
152 Hodgkin, A.L.; Huxley, A.F. (1945). J. Physiol., 104: 176-195
153 Bazemore, A.W.; Elliot, K.A.C.; Florey, E.J. (1957). J. of Neurochem., 1: 334-339
154 Kuffer, S.W.; Edwards, C. (1958). J. Neurophysiol., 21: 589-610
155 Ito, M. (1984). En: The cerebellum and Neural Control. New York, Raven Press.
156 Eccles, J.C.; Ito, M.; Szentagothai, J. (1967). En: The Cerebellum as a Neuronal Machine. New York, Springer
157 Ito, M. (1986). Trends in Neurosciences, 9: 515-517
158 Roberts, E. (1979). En: Advances in Pharmacology and Therapeutics, vol 2. Neurotransmitters. Simon,., (ed), Pergamon Press, New York, : 43-65
159 Johnston, G.A.R. (1978). Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 18: 269-289
160 Roberts, E. (1976). En: GABA in nervous system function. Roberts, E.; Chase, T.N.; Tower, D.B., (eds), Raven Press, New York, : 515-539
161 Pérez de la Mora, M.; Possani, L.D.; Tapia, R.; Teran, L.; Palacios, R.; Fuxe, K.; Hokfelt, T.; Ljungdahl, A. (1981). Neuroscience, 6: 875-895
162 Tappaz, M.L. (1984). Psychoneuroendocrinology, 9: 85-95
163 Okada, Y.; Nitsch-Hassler, C.; Kim, J.S.; Bak, I.J.; Hassler, R. (1971). Expl. Brain Res., 13: 514-518
164 Mokara, G.B.; Rappay, G.; Stark, E. (1975). Expl. Brain Res. 22: 449-455
165 Etchegoyen, G.S.; Cardinali, D.P.; Pérez, A.; Tamayo, J.; Pérez Palacios, G. (1986). Eur. J. Pharmacol., 129: 1-10
166 Racagni, G.; Apud, J.; Masotto, C.; Rovescalli, A.; Cocchi, D.; Locatelli, V.; Muller, E. (1986). En: GABA and Endocrine Function. Racagni, G., Donoso, A. (eds), Raven, New York, : 103-118
167 Mc Cann, S.M.; Rettori, V. (1986). En: GABA and Endocrine Function. Racagni, G., Donoso, A. (eds), Raven, New York,: 173-189
168 De Feudis, F.V. (1985). En: Selected Topics From Neurochemistry. Osborne, N., ed., Pergamon, Oxford, O. 191-206

169 Robert, E. (1986). Experimental Neurology, 93: 279-290
169 b Balazs, R.; Machiyama, Y.; Hammond, B. J.; Julian, T.; Richter, T. (1970). Biochem. J., 116: 445-467
170 De Robertis, E. (1986). En: GABA and Endocrine Function. Racagni, G.; Donoso, A., (eds.), Raven, New York, : 1-12
171 Salganicoff, L.; De Robertis, E. (1963). Life Sci., 2: 85-91
172 Salganicoff, L.; De Robertis, E. (1965). J. Neurochem., 12: 287-309
173 Mc Geer, P.L.; Mc Geer, E.G. (1981). En: Basic Neurochemistry Siegel, G.J.; Albers, R.W.; Agranoff, B.W.; Katzman, R., (eds), Little Brown, Boston, : 233-253
174 Fonnum, F. (1985). En: Neuromethods, vol. 3, Boulton, A.A.; Baker, G.B.; Wood, J.D., (eds), Humana Press, Clifton, New Jersey, : 201-237
175 Patel, J.A. (1982). En: Neurotransmitter Interaction and Compartmentation. Bradford, A.F., (ed), Plenum, New York, : 411-429
176 Van den Berg, C.J. (1973). En: Metabolic Compartmentation in the Brain. Balazs, R.; Cremer, J.E. (eds), Mac Millan : 137-166
177 Van den Berg, C.J.; Matheson, D.F.; Nijenmanting, W.C. (1978). En: Amino Acid as Neurotransmitter. Fonnum, F. ed., NATO Advanced Study Institutes Series A, Life Sciences vol. 16, Plenum, New York : 709-723
178 Baxter, C.F. (1976). En: GABA in Nervous System Function. Robert, E.; Chase, T.N.; Bower, D.B., eds., Raven Press, New York
179 Lam, D.M.K.; Su, Y.Y.T.; Swain, L.; Marc, R.E.; Brandon, C.; Wu, J.y. (1979). Nature, 278: 565-567
180 Mc Laughlin, B.J.; Barber, R.; Saito, K.; Roberts, E.; Wu, J.Y. (1975). J. Comp. Neurol., 164: 305-322
181 Matsuda, T.; Wu, J.Y.; Roberts, E. (1973). J. Neurochem., 21 : 159-166
182 Wu, Y.; Brandon, C.; Su Y.Y.T.; Lam, D.M.K. (1981). Mol. Cell. Biochem., 39: 229-238
183 Mc Laughlin, B.J.; Wood, J.G.; Saito, K.; Barber, R.; Vaughn, J.E.; Roberts, E.; Wu, J.Y. (1974). Brain Res., 76: 377-391
184 Pasik, P.; Pasik, T.; Hamori, J.; Holstein, G.R. (1986). En: GABA and Endocrine Function. Racagni, G.; Donoso, A., (eds), Raven Press, New York : 13-23
185 Erdo, S.L.; Rosdy, B.; Szporny, L. (1982). J. Neurochem., 38: 1174-1176
186 White, H.L.; Sato, T.L. (1978). J. Neurochem., 31: 41-47
187 Haber, B.; Kuriyama, K.; Roberts, E. (1970). Biochemical Pharmacology, vol. 19: 1119-1136
188 Fogel, W.A. (1986). En: GABAergic Mechanism in the Mammalian Periphery. Erdo, s.; Bowery, N.G. (eds), Raven Press, New York : 35-56

189 Caron, P.C.; Kremzner, L.T.; Cote, L.J. (1987). Neurochem. Int., vol 10: 219-229
190 Erdo, S.L. (1985). Trends in Pharmacological Sciences, vol 6, nº5: 205-208
191 Krnjevic, K. (1976). En: GABA in Nervous System Function. Roberts, E.; Chase, T.N.; Tower, D.B., (eds), Raven Press, New York : 269-281
192 Haefely, W.; Kybury, E.; Gerecke, M.; Mohler, H. (1985). En: Advances in Drug Research. Academic Press, London, vol 14 : 165-300
193 Bormann, J.; Hammill, O.P.; Sakmann, B. (1987). J. Physiol., London, 385: 243-286
194 Barker, J.L.; Owen, D.G. (1986). En: Benzodiazepine/GABA Receptors and Chloride Channels. Structural and Functional Properties. Olsen, R.W.; Venter, J.C. (eds), 101-150
195 Barnard, E.A.; Darlison, M.G.; Seeburg, P. (1987). Trends in Neurosc. vol 10, nº12
196 Squires, R.F.; Casida, J.E.; Richardson, M.; Saederup, E. (1983). Mol. Pharmacol., 23: 326-336
197 Squires, R.F. (1986). En: Benzodiazepine/GABA Recptors and Chloride Channels: Structural and Functional Properties. Olsen, R.W.; Venter, J.C. (eds), : 209-224
198 Sigel, E.; Mamaloki, C.; Barnard, E.A. (1982). Febs Lett., 147: 45-48
199 Sigel, E.; Barnard, E.A. (1984). J. Biol. Chem., 259: 7219-7223
200 Stephenson, F.A.; Mamaloki, C.; Barnard, E.A. (1984). J. Recept. Res., 4: 175-188
201 Sigel, E.; Stephenson, F.A.; Mamaloki, C.; Barnard, E.A. (1983). J. Biol. Chem., 258: 6965-6971
202 Mamaloki, C.; Stephenson, F.A.; Barnard, E.A. (1987). EMBO. J. 6: 561-565
203 Taguchi, J.; Kuriyama, K. (1984). Brain Res., 323: 219-226
204 Kirkness. E.F.; Turner, A.J. (1986). Biochem. J., 233: 265-270
205 Casalotti, S.O.; Stephenson, F.A.; Barnard, E.A. (1986). J. Biol. Chem., 261: 15013-15016
206 Deng, L.; Ranson, R.W.; Olsen, R.W. (1986). Biochem. Biophys. Res. Commun., 138: 1308-1314
207 Bormann, J.; Clapham, D.E. (1985). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 2168-2172
208 Yellen, G. (1984). Trends in Neurosci., 7: 457-458
209 Smart, T.G.; Constantini, A.; Bilbe, G.; Brown, G.; Brown, D.A.; Barnard, E.A. (1983). Neurosci. Lett., 40: 55-59
210 Bowery, N.G.; Doble, A.; Hill, D.R.; Hudson, A.L.; Shaw, J.S.; Turnbull, M.J.; Warrington, R. (1981). Eur. J. Pharmacol., 71: 53-70
211 Bowery, N.G.; Hill, D.R.; Hudson, A.L. (1983). Br. J. Pharmacol. , 78: 191-206

212 Ong, J.; Kerr, D.I.B. (1983). Eur. J. Pharmacol., 94: 9- 17
213 Bowery, N.G.; Hill, D.R. (1986). En: Gabaergic Mechanisms in the Mammalian Periphery. Erdo, S.L.; Bowery, N.G., (eds), Raven Press, New York, p. 135-152
214 Anwar, N.; Mason, D.F.J. (1982). Br. J. Pharmacol., 75: 177-181
215 Hill, D.R.; Bowery, N.G. (1981). Nature, 290: 149-152
216 Borman, J. (1988). Vol 11, nº 3: 112-116
217 Dunlap, K.; Fischbach, G.D. (1981). J. Physiol., Londres, 317: 519-535
218 Gahwiker, B.H.; Brown, D.A. (1985). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 1558-1562
219 Durnam, R.S.; Karbon, E.W.; Harrington, C.; Enna, S.J. (1986). J. Neurochem., 83: 800-810
220 Burch, R.M.; Luini, A.; Axelrod, J. (1986). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 7201-7205
221 Newberry, N.R.; Nicoll, R.A. (1984). Nature, 308: 450-452
222 Andrade, R.; Malenka, R.C.; Nicoll, R.A. (1986). Science, 234: 1261-1265
223 Guidotti, A.; Hanbauer, M. (1986). En GABA and Endocrine Function, Racagni, G.; Donoso, A., (eds), Raven Press, 165-172
224 Borman, J.; Clapham, D.E. (1985). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 2168-2172
225 Sternbach, L.H. (1980). En: Benzodiazepines, Today and Tomorrow. Priest, R.G.; Vianna Filho, U.; Amrein, R.; Skreta M., (eds), MTP Press, Lancaster: 5-17
226 Randall, L.O. (1960). Dis. Nerv. System XXI, Sec. 2, Suppl. : 7-10
227 Randall, L.O. (1961). Dis. Nerv. System XXII, Sec. 2, Suppl. : 7-15
228 Goodman Gilman, A.; Goodman, L. S.; Rall, T.W.; Murad, F. Las Bases Farmacológicas de la Terapeutica. 7mma edicidn. (ed. Panamericana) Bs. As., : 334-364
229 Harvey, S.C. (1980). En: The Pharmacological Basis of Therapeutics. Goodman Gilman, A.; Goodman, L.A.; Gilman, A., eds., Mc Millan, New York: 339-375
230 Christensen, J.D. (1973). Acta Pharmacol. Toxicol., 33: 262-272
231 Sepinwall, J.; Cook, L. (1978). En: Handbook of Psychopharmaclogy. Iversen, L.L.; Iversen, S.D.; Snyder, S.H., (eds), Plenum Press, New York, vol 13: 345-393
232 Kay, D.C.; Blackburn, A.B.; Buckingham, J.A.; Karocan, I., (1976). En: Pharmacology of Sleep. Williams, R.L.; Karocan, I., (eds), John Wiley and Sons, New York: 83-210
233 Young, A.B.; Zukin, S.R.; Snyder, S.H. (1974). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71: 2246-2250
234 Curtis, D.R.; Game, C.J.A.; Lodge, D. (1976). Br. J. Pharmacol., 56: 305-311

235 Guidotti, A. (1978). En: Psychopharmacology : a Generation of Progress. Lipton, M.A.; Di Mascio, A.; Killam, K.F., (eds), Raven Press, New York: 1349-1357
236 Haefely, W.; Kulcsar, A.; Molher, H.; Pieri, L.; Polc, P.; Schaffner, R. (1975). En: Mechanism of Action of Benzodiazepines. Costa, E.; Greengard, P., (eds), Raven Press, New York: 307-311
237 Curtis, D.R.; Lodge, D.; Johnston, G.A.R; Brand, S.J. (1976). Brain Res., 118: 344-347
238 Gallager, D.W. (1978). Eur. J. Pharmacol, 49: 133-143
239 Choi, D.W.; Farb, D.H.; Fischbach, G.D. (1977). Nature, 269: 342-344
240 Simmonds, M.A. (1980). Nature, 284: 558-560
241 Olsen, R.W.; Ticku, M.K.; Van Ness, P.C.; Greenlee, D. (1978). Brain Res., 139: 277-294
242 Montarolo, P.G.; Raschi, F. Strata, P. (1979). Brain Res., 162: 358-362
243 Braestrup, C.; Squires, R.F. (1977). Proc. Natl. Sci. USA, 74: 3805-3809
244 Squires, R.F.; Braestrup, C. (1977). Nature, 266: 732-734
245 Molher, H.; Okada, T. (1977). Life Sci., 20: 2101-2110
246 Molher, H.; Okada, T. (1978). Life Sci., 22: 985-996
247 Battersby, M.K.; Richards, J.G.; Molher, H. (1979). Eur. J. Pharmacol., 57: 277-278
248 Braestrup, C.; Nielsen, M.; Biaggio, G.; Squires, R.F. (1979). Neurosci. Lett., 13: 219-224
249 Costa, E.; Guidotti, A.; Toffano, G. (1978). Br. J. Pharmacol., 133: 239-248
250 Leels-Lundberg, L.M.; Olsen, R.W. (1982). Molec. Pharmacol., 23: 315-325
251 Braestrup, C.; Nielsen, M.; Olsen, C.E. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 2288-2292
252 Medina, J.H.; Peña, C.; Novas, M.L.; Paladini, A.C.; De Robertis, E. (1987). Neurochem. Int. (*)
253 Airoksinen, M.M.; Kari, I. (1981). Med. Biol., 59: 21-34
254 Cepeda, C.; Tanaka, T.; Besselievre, R.; Potier, P.; Naquet, R.; Rossier, J. (1981). Neurosci. Lett., 24: 53-57
255 Mennini, T.; Gobbi, M. (1985). J. Neurochem., 44: 80-83
256 Alho, H.; Costa, E.; Ferrero, P.; Fujimoto, M.; Cosenza-Murphy, D.; Guidotti, A. (1985). Science, vol 229: 179-182
257 Hunkeler, W.; Mohler, H.; Pieri, L.; Polc, P.; Bunetti, E. P.; Cunum, R.; Schaffer, R.; Haefely, W. (1981). Nature, 290: 514-516
258 Corda, M.G.; Blaker, W.D.; Mendelson, W.B.; Guidotti, A.; Costa, E. (1983). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 2072-2076
259 Polc, P.; Bunetti, E.P.; Schaffer, R.; Haefely, W. (1982). Arch. Pharmacol., 316: 317-325
260 Jensen, L.H.; Petersen, E.N. (1983). J. Neural. Transm., 58: 183-191

261 Polc, P.; Laurent, J.P.; Scherschlicht, R.; Haefely, W. (1981). Arch. Pharmacol., 321: 260-264
262 Choi, D.W.; Farb, D.H.; Fischbach, G.D. (1981). J. Neurophysiol., 45: 621-631
263 Mac Donald, R.L.; Barber, J.L. (1979). Brain Res., 167: 323-336
264 Study, R.E.; Barber, J.L.(1981). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 7180-7184
265 Barber, J.L.; Owen, D.C. (1986). En: Benzodiazepine/GABA Receptors and Chloride Channels. Structural and Functional Properties. Vol 5, Receptor Biochemistry and Methodology. Olsen, R.W.; Venter, J.C. (eds), Alan R. Liss, New York, : 135-165
266 Polc, P. (1988). Progress in Neurobiology. Kerbut, G.A.; Phillis, J.W. (eds), Pergamon Press, New York, vol nº5: 349-423
267 Braestrup, C.; Squires, R.F. (1978). Eur. J. Pharmacol., 48: 263-270
268 Marangos, P.J.; Patel, J.; Boulenge, J.P.; Clark-Rosenberg, R. (1982). Mol. Pharmacol., 22: 26-32
269 Schoemaker, H.; Boles, R.G.; Horst, W.D.; Yamamura, H.I. (1983). J. Pharmacol. Exp. Ther., 225: 61-69
270 Scatchard, G. (1949). Ann. N.Y. Acad. Sci., 51: 660-672
271 Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951), J. Biol. Chem., 193: 265-270
272 Enna, S.J.; Snyder, S.H. (1975). Brain Res., 100: 81-97
273 Anderson, R.A.; Mitchele, R. (1986). Brain Res., 365: 78-84
274 Beaumont, K.; Chilton, W.S.; Yamamura, H.I.; Enna, S.J. (1978). Brain Res., 148: 153-162
275 Bernasconi, R.; Bittiger, H.; Heid, J.; Martin, P. (1980). J. Neurochem., 34: 614-618
276 Graham, L.T.; Aprison, M.H. (1966). Analyt. Biochem., 15: 487-497
277 Fonnum, F. (1985). En: Neuromethods. Amino Acids. Boulton, A.A.; Baker, G.B.; Wood, J.D. (eds), vol 3: 214-219
278 Gomes, C.; Trolin, G. (1982). J. Neural Transm., 54: 265-274
279 Van der Heyden, J.A.M.; Korf, J. (1978)., J. Neurochem., 31: 197-203
280 Albers, R.W.; Brady, R.O. (1959). J. Biol. Chem., 234: 926-928
281 Vacas, M.I.; Keller Sarmiento, M.I.; Cardinali, D.P. (1984). Brain Res., 294: 166-168
282 Harris, R.A.; Allan, A.M. (1985). Science, 228: 1108-1110
283 Gant, D.B.; Eldefrawi, M.E.; Eldefrawi, A.T. (1987). Toxicol. and Appl. Pharmacol., 88: 313-321
284 Suzdok, P.D.; Schwartz, R.D.; Skolnick, P.; Paul, S.M. (1986). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol 83: 4071-4075
285 Walz, W. (1985). En: Neuromethods. Amino Acids. Boulton, A.A.; Baker, G.B.; Wood, J.D. (eds), vol 3: 239-272
286 Cardinali, D.P.; Ritta, M.N.; Pereyra, E.N.; González, Solveyra, C.R. (1982). Endocrinology, 111: 530-534

287 Anderson, G.M.; Young, G.J.; Cohen, D.J. (1982). Journal of Chromatography, 228: 155-163
288 Somogyi, P.; Hodgson, A.J.; Chubb, I.W.; Penke, B.; Erdei, A. (1985). The Journal of Histochemistry and Cytochemistry vol 33, nº3: 240-248
289 Mc Clure, Ch.; Mc Millan, P.; Miranda, A. (1986). The American Journal of Anatomy, 176: 461-467
290 Axelrod, J. (1974). Science, 184: 1341-1348
291 Cardinali, D.P. (1981). En: Physiopathology of Endocrine Disease and Mechanism of Hormone Action. Soto, R.J.; De Nicola, A.; Blaquier, J. (eds), Alan R. Liss, New York : 179-198
292 Cardinali, D.P. (1983). En: Correo de Medicina. Fundación Argentia (ed) : 1-18
293 Marangos, P.J.; Patel, J.; Hirata, F.; Sondheim, D.; Paul, S.M.; Skolnick, P.; Goodwin, F.K. (1981). Life Sci., 29: 256-267
294 Pang, S.F.; Ralph, C.L.; Petrozza, A. (1976). Life Sci., 18: 961-966
295 Kafka, M.S.; Wirz-Justice, A.; Naber, D.; Marangos, P.J.; O' Donohue, T.L.; Wehr, T.A. (1982). Neuropsychobiology, 8: 41-50
296 Underwood, H. (1984). En: The Pineal Gland. Reiter, R.J. (ed), Raven, New York : 221-251
297 Waszczak, B.L.; Hume, C.; Walters, J.R. (1981). Life Sci., 28: 2411-2420
298 Reiter, R.J. (1987). Life Sci., 40: 2119-2125
299 Coloma, F.M.; Niles, L.P. (1988). Biochemical Pharmacology, vol 37: 1271-1274
300 Ariens-Kappers, J. (1981). En: The Pineal Gland. Anatomy and Biochemistry (1981). Reiter, R.J. (ed), CRC Press, Boca Raton : 1-26
301 Korf, H.W.; Mohller, M. (1984). Pineal Res. Rev., 2: 41-87
302 Korf, H.W.; Oksche, A.; Ekstrom, P.; Gery, I.; Zigler, J.S.; Klein, D.C. (1986). Science, 231: 735-737
303 Ebadi, M.; Chan, A.; Itoh, M.; Hammad, H.; Swanson, S.; Govitraping, P. (1984). En: Dynamic of Neurotransmitter Function. Hanin, I. (ed), Raven Press, New York : 177-187
304 Ebadi, M.; Chan, A. (1980). Brain Res, Bull. 5 (Suppl 2): 175-187
305 Lowenstein, P.R.) Cardinali, D.P. (1983). Neuroendocrinology 37: 150-154
306 Levi, G.; Raitieri, M. (1973). Life Sci., 12: 81-88
307 Schon, F.; Kelly, J.S. (1974). Brain Res., 66: 189-300
308 Tanaka, C.; Taniyama, K. (1986). En: GABAergic Mechanism in the Mammalian Periphery. Erdo, S.L.; Bowery, N.G. (eds)., Raven, New York : 57-75
309 Schousboe, A.; Larsson, O.M.; Drejer, P.; Krogsgaard-Larsen, P., Hertz, L. (1983). En: Glutamine, Glutamate, and GABA in the Central Nervous System. Hentz, L. (ed). Liss. New York : 297-315

310 Oksche, A.; Korf, H.W.; Rodrdguez, E. (1987). Adv. Pineal Res., 2: 1-18
311 Mata, M.M.; Schirer, B.K.; Klein, D.C.; Weller, J.L.; Chiou, C.Y. (1986). Brain Res., 118: 383-394
312 Schon, F.; Beart, P.M. ; Chapman, D.; Kelly, J.S. (1975). Brain Res., 85: 479-490
313 Mimchin, M.C.W.; Beart, P.M. (1975). J. Neurochem., 24: 881-884
314 Balemans, M.G.M.; Mans, P.; Smith, I.; Van Benthem, J. (1983). Reprod. Nutr. Dev., 23: 151-160
315 Orrego, F. (1979). Neuroscience, 4: 1037-1057
316 Santos, M.S.; Goncalves, P.P.; Carvalho, A.P. (1987). Neurochem. Res., 12: 297-304
317 Pluchino, S.; Trendelenburg, V. (1968). J. Pharmacol. Exp. Ther., 163: 257-265
318 Cardinali, D.P.; Vacas, M.I.; Keller Sarmiento, M.I.; Etchegoyen, G.S.; Pereyra, E.N.; Chuluyan, H.E. J. Steriod Biochem., 27: 565-571
319 Quirion, R. (1984). Eur. J. Pharm., 103: 559-560
320 Olsen, R.W. (1982). Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 22: 245-277
321 Philo, R.; Reiter, R.J. (1980). Epilepsia, 19: 485-492
322 Izumi, K.; Donaldson, J.; Munnich, J.; Barbeau, A. (1973). Can. J. Physiol. Pharmacol., 51: 572-578
323 Cramer, H.; Rudolph, J.; Consbruch, U; Kendel, K. (1974). Adv. Biochem. Psychopharmac., 11: 187-191
324 Anton-Tay, F. (1971). En: The Pineal Gland. Wolstenholme, G. E.W.; Knight, I. (eds), Churchill Livingstone, London, : 213-227
325 Brailowsky, S. (1976). Electroenceph. Clin. Neurophysiol., 41: 314-319
326 Fariello, R.; Bubenik, G. (1975). Neurosci. Lett., 3: 151-155
327 Cardinali, D.P.; Vacas, M.I.; Gejman, P.V.; Pisarev, M.A.; Barontini, M.; Boado, R.; Juvenal, G.J. (1983). Acta Physiol et Pharmacol. Latinoam., 33: 205-221
328 Kennaway, D.J.; Dunstan, E.A.; Staples, L.D. (1987). J. of Reprod. and Fert. Suppl. 34: 187-199
329 Nowak, R.; Rodway, R.G. (1985). J. of Reprod. and Fert., 74: 287-293
330 Arendt, J.; Symons, A.M.; Land, C.A.; Pryde, S.J. (1983). J. of Endocrinology, 97: 395-400
331 Dubocovich, M.L. (1985). J. Pharmacol. Exp. Ther., 234: 395-401
332 Weatherhead, B.; Logan, A. (1981). J. of Endocrinology, 90: 89-96
333 Kano, T.; Miyachi, Y. (1976). Biochem. Biophys. Res. Commun., 72: 969-975
334 Ebadi, M.; Hama, Y.; Govitrapong, P.; Awad, A.; (1986). En: GABBAergic Mechanism in the Mammalian Periphery. Erdo, S.L.; Bowery, N.G. (eds), Raven Press, New York : 291-303

335 Arias, C.; Tapia, R. (1986). J. Neurochem., 47: 396-404
336 Jonsson, U.; Lundstrom, M.; Sellstrom, A.; Ehinger, B. (1986). Neuroscience, 4: 1235-1241
337 Waniewski, R.A.; Suria, A. (1977). Life Sci., 21: 1129-1142
338 Sugden, D.; Namboodiri, M.A.A.; Klein, D.C.; Pierce, J.E.; Grody, R.; Mefford, I.N. (1985). Endocrinology, 116: 1960-1967
339 Vollrath, L.; Schroder, H. (1987). En: Fundamentals and Clinics in Pineal Research. Trentini, G.P.; De Gaetani, Pévet, P. (eds), : 13-24
340 Kalsow, C.M.; Wacker, W.B. (1978). Invest. Ophtal. Visual Sci., 17: 774-783
341 Rodrigues, M.M.; Hackett, J.; Gaskins, R.; Wiggert, B.; Lee, L.; Redmond, M.; Chader, G.J. (1986). Invest. Ophtal. Visual Sci., 27: 884-850
342 Foster, R.G.; Korf, H.W.; Schalken, J.J. (1987). Cell Tissue Res., 248: 161-167
343 Matsuura, T.; Takeuchi, Y.; Sano, Y. (1983). Biomed. Res., 4: 261-270
344 Viviens-Roels, B.; Pévet, P.; Dubois, M.P.; Arendt, J.; Brown, G.M. (1981). Cell Tissue Res., 217: 105-115
345 Kuwano, R.; Iwanaga, T.; Nakajima, T.; Masuda, T.; Takahashi, Y. (1983). Brain Res., 274: 171-175
346 Wiechman,A.F.; Bok, D.; Howitz, J. (1985). Invest. Ophtal. Visual Sci., 26: 253-265
347 Weissman, B.A.; Skolnic, P.; Klein, D.C. (1984). Pharmacol. Biochem. Behav., 21: 821-824