

La pinealectomía y la inyección de melatonina tres veces al día tienen la misma influencia sobre el *mesocricetus auratus* en su preferencia por el etanol

Rafael J. Salín-Pascual*(1)
Gabriel Roldán Roldán*(2)
Lourdes Huerto Delgadillo*(2)
Ignacio Camacho Arroyo*(2)

Summary

Changes in ethanol preference were investigated in golden hamsters after pinealectomy (Px), sham operation and three daily injections of melatonin (Mel) or vehicle. Experiment 1 was made with two groups of male hamsters: Px group and sham operated group. Surgery was made after two weeks of free choice two-bottle test with water (H₂O) and ethanol (ETOH). The two groups were followed-up during 4 weeks. After surgery both groups of animals reduced ETOH intake and increased H₂O consumption, but only Px animals shifted ETOH/H₂O ratio for three weeks. Experiment 2 was carried out with three groups of male hamsters: Px animals (4 weeks before free choice two-bottle test); intact animals + Mel (25 µg) three times a day, and intact animals + vehicle three times a day. The three groups were in the free-choice two-bottle test and they were injected during two weeks.

The intact group + Mel increased intake of H₂O and by the second week the ratio of preference of ETOH changed for H₂O. The other two groups increased also H₂O intake, but they did not change the preference. It seems that pineal gland plays an important role in ETOH preference in hamsters, probably not by a mechanism mediated by Mel itself but by other product(s) of this gland. Mel injected three times a day seems to produce a "Px effect". The same effects have been reported in other glands after the exogenous administration of its hormones.

Resumen

Se investigó la preferencia por el etanol (ETOH) o por el agua, de los cricetos dorados después de practicarles la pinealectomía (Px) o la falsa pinealectomía, y de administrarles tres inyecciones diarias de melatonina (MEL) o vehículo. Para investigar lo anterior se realizaron dos experimentos: en el experimento 1 se utilizaron dos grupos de cricetos machos: el primero se pinealectomizó y al otro se le sometió

a cirugía sin quitarle la glándula pineal. Ambos grupos habían estado previamente en un esquema de libre preferencia de etanol/agua (ETOH/H₂O) y mostraban una marcada preferencia por el ETOH. Después de la cirugía se continuó registrando su consumo de una y otra sustancia, durante cuatro semanas. Ambos grupos de animales redujeron la ingestión de ETOH y aumentaron el consumo de H₂O, pero únicamente se encontró una diferencia significativa en los animales Px, los cuales cambiaron su índice de preferencia por el agua durante 2 semanas.

El experimento No. 2 se llevó a cabo en tres grupos de cricetos machos, de los cuales un grupo se pinealectomizó cuatro semanas antes de la evaluación de libre elección ETOH/H₂O. Los animales pinealectomizados y otro grupo de animales intactos recibieron inyecciones de melatonina (25 µg en cada inyección) tres veces al día: a las 09:00, 12:00 y 15:00 hrs, durante una semana, mientras que un tercer grupo de animales intactos recibió únicamente el vehículo, por medio del mismo esquema de administración. Sólo en el grupo intacto + melatonina se encontró que aumentara su consumo de H₂O y que cambiara por agua su anterior preferencia por ETOH.

Al parecer, la glándula pineal juega un papel importante en la modulación de la ingestión de alcohol en el criceto y en otros roedores, posiblemente por un mecanismo no mediado directamente por la melatonina, sino por alguno de sus otros productos. La inyección de melatonina tres veces al día produjo un efecto similar a la pinealectomía. Se ha reportado este mismo efecto en otras glándulas después de la administración exógena de la hormona que secretan.

Introducción

Arvola y Forsander(1), informaron por vez primera que el criceto dorado (*Mesocricetus auratus*) muestra una pronunciada preferencia por las soluciones de etanol (ETOH) cuando se presentan en un paradigma de libre elección la solución etílica y el agua (H₂O), a diferencia de otras especies(2,11).

En trabajos subsecuentes se ha indicado que la hembra del criceto muestra menos preferencia por el ETOH que el macho(18). Moss y cols(12,13) evaluaron la diferente sensibilidad al ETOH en uno y otro género y los niveles de actividad de la deshidrogenasa etílica, encontrando que las hembras toleraban mayores niveles de ETOH plasmático sin perder el reflejo de

* División de Investigaciones Clínicas, Laboratorio de Neurofarmacología, Instituto Mexicano de Psiquiatría. Calz. México-Xochimilco 101, Tlalpan 14370, México, D.F.

1 Departamento de Bioquímica Aplicada, Laboratorio de Neurobioquímica, Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional.

2 Programa Tutorial para la Formación de Investigadores Clínicos (PROTIC).

enderezamiento, y que la actividad de la enzima estaba más elevada que en los machos, y hasta cuatro veces más activa que en la rata de la cepa Fisher, la cual prefiere el ETOH(5).

Cuando las ratas no prefieren la solución etílica en forma espontánea, ésta se les induce dejándolas en oscuridad continua(6) —esta observación se ha hecho extensiva al criceto(8)— pero si se les administra melatonina (MEL) bajo condiciones de luminosidad 12:12 (L-O), también se incrementa su ingestión de alcohol (6).

Rieter y cols(15) informaron que la glándula pineal juega un papel importante en la modulación de la preferencia por el ETOH en el criceto dorado. Si estos animales se mantienen en un ciclo de luz/oscuridad 14:10 y tienen acceso al ETOH y al H₂O, eligen las soluciones etílicas. Además, los animales cegados mostraron una preferencia exagerada por el ETOH, la cual se reduce tanto por la pinealectomía (Px) como por la descentralización del ganglio cervical superior, maniobra que provoca la disfunción permanente de esta glándula. Finalmente, los autores encontraron que la administración diaria de melatonina, mediante inyecciones o implantes subcutáneos de cápsulas, no había cambiado significativamente su preferencia.

Recientemente se ha reportado que la inyección diaria de melatonina (25 µg/animal) da por resultado una ligera reducción de la ingestión de ETOH, probablemente en forma indirecta, debido a que se reduce también el consumo total de líquido(17).

El presente estudio reevalúa los informes anteriores sobre el efecto que tiene la pinealectomía y la administración de melatonina en la preferencia del criceto por el alcohol. Por una parte se extirpó la glándula de los animales que tenían una marcada preferencia por el ETOH y, por la otra, se les inyectó melatonina 3 veces al día. Este tipo de administración repetida a lo largo del fotoperíodo ha mostrado tener efectos evidentes en el criceto sobre su fisiología reproductiva y su consumo de líquido(16,17,20).

Método

Experimento No. 1

Se estudiaron dos grupos de cricetos machos (6 animales en cada uno) de 120 a 130 g. de peso, los cuales fueron expuestos a un paradigma de libre elección entre ETOH al 10% v/v y H₂O, dos semanas antes de practicarles la cirugía. Un grupo fue pinealectomizado y el otro falsamente operado. Ambos se mantuvieron bajo el paradigma de elección antes mencionado, durante 4 semanas. Las condiciones de luz-oscuridad fueron constantes (12:12 con inicio del fotoperíodo a las 6:00 hrs) y la temperatura del cuarto fluctuó entre los 22 y los 24°C durante todo el tiempo que duró el experimento. La cantidad de líquido consumido en cada caja se midió diariamente a la misma hora y se alternó la posición de las botellas para evitar que el lugar en donde se hubieran colocado determinara su preferencia (19). No se colocó un animal en cada caja porque se ha demostrado que éstos son sus-

ceptibles al aislamiento y la soledad puede alterar algunas de sus conductas.

Los valores se expresaron basándose en la cantidad de ETOH y H₂O que consumían diariamente. Posteriormente se obtuvo un promedio semanal del consumo, que se usó para hacer el análisis estadístico. Finalmente, se calculó el índice semanal de ETOH/H₂O que se consumía en cada caja.

Experimento No. 2

Tres grupos de cricetos machos (n = 6), de 120 a 130 g., fueron expuestos a ETOH al 10% y a H₂O, durante dos semanas, antes de aplicarles las inyecciones de melatonina o del vehículo. Un grupo fue pinealectomizado (Px) 4 semanas antes de tener su primer contacto con el ETOH. El grupo Px y el de animales intactos recibieron inyecciones tres veces al día con 25 µg de melatonina s.c. en 0.5 ml de vehículo. Las inyecciones se aplicaron diariamente durante las horas del fotoperíodo (09:00, 12:00 y 15:00). Al tercer grupo de animales se le inyectó únicamente el vehículo, el cual se preparó con etanol al 1% v/v en solución salina isotónica. Estos últimos recibieron el vehículo en la misma forma en la que se les administró la melatonina a los otros grupos. El ciclo luz-oscuridad y la temperatura fueron iguales que en el experimento 1. Las mediciones se hicieron diariamente del mismo modo que en el experimento anterior. Los resultados se analizaron utilizando medidas de tendencia central y análisis de varianza.

Resultados

Experimento No. 1

Los resultados se presentan en la tabla 1. Ambos grupos de animales preferían ETOH que H₂O basalmente una semana antes de la cirugía. Después del procedimiento quirúrgico, el grupo Px redujo dramáticamente su ingestión de ETOH y elevó la de agua, con un cambio del índice de preferencia ETOH/H₂O. En la figura 1 se muestra la preferencia del grupo Px antes de someterlo a la cirugía, y 4 semanas después de este procedimiento; la cuarta semana prefirió nuevamente ETOH. Los animales falsamente operados redujeron su ingestión de ETOH y aumentaron su consumo de H₂O, aunque no cambiaron su preferencia. Dos semanas después de la cirugía, los animales habían recuperado totalmente su preferencia basal por el ETOH.

Experimento No. 2

Durante la semana anterior a que se les inyectara, los 3 grupos de cricetos mostraron claramente su tendencia a ingerir la solución etílica. Cuando se les empezó a inyectar, el grupo de cricetos intactos aumentó su ingestión de H₂O, sin modificar su ingestión de ETOH, mostrando un cambio moderado en su índice de preferencia (tabla 2 y figura 2). El grupo Px que recibió melatonina no cambió sus patrones de

TABLA 1
Experimento No. 1
Cricetos con pinealectomía o falsamente operados
 Promedio día/animal/semana ($\bar{X} \pm DE$)

	Grupo Px (n=6)			Grupo "Falso" (n=6)		
	ETOH 10%	H ₂ O	Indice	ETOH 10%	H ₂ O	Indice
(A)	13.47 ± 2.4	3.6 ± 1.13	3.7	14.16 ± 3.4	1.6 ± 1.8	8.8
(B)	5.3 ± 3.01	13.2 ± 1.4	0.4	10.0 ± 1.7	5.8 ± 2.4	1.72
(C)	5.8 ± 2.4	13.7 ± 4.3	0.4	14.0 ± 4.9	5.2 ± 2.2	2.69

Significancia:

A-B p <.005 A-B p <.005 A-B p <.01 A-B p <.005
 A-C N.S A-C p <.005 A-C N.S. A-C p <.005

(A) semana antes de cirugía; (B) 1a. semana después de cirugía y (C) 2a. semana después de cirugía.

FIGURA 1.- Efecto de la pinealectomía sobre la preferencia entre etanol y agua en un esquema de libre elección ($\bar{X} \pm E.E.$) n = 6. Nivel de significancia con respecto a la basal correspondiente: * p < 0.005; ** p < 0.01; por prueba de T pareada (ver texto).

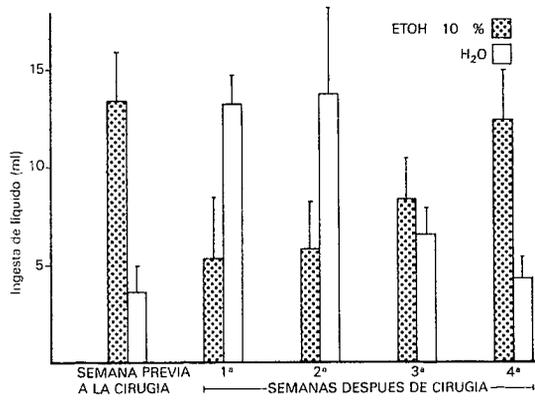


FIGURA 2.- Efecto de la administración de melatonina sobre la ingestación de etanol y agua en los cricetos intactos ($\bar{X} \pm E.E.$) n = 6. Nivel de significancia con respecto a la basal correspondiente: * p < 0.025; ** p < 0.005 por prueba de T pareada (ver texto).

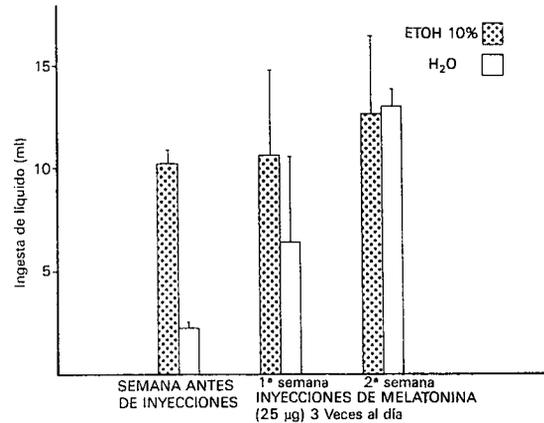


TABLA 2
Experimento No.2
Cricetos con melantonina o vehículo administrado tres veces al día
 Promedio día/animal/semana caja ($\bar{X} \pm DE$)

	Grupo Intacta (n=6)			Grupo Px (n=6)			Grupo Vehículo (n=6)		
	ETOH 10%	H ₂ O	Indice	ETOH 10%	H ₂ O	Indice	ETOH 10%	H ₂ O	Indice
(A)	10.2 ± 0.5	2.2 ± 0.3	4.6	9.5 ± 4.3	4.7 ± 1.6	2.02	13.8 ± 6.8	2.7 ± 1.3	5.1
(B)	10.6 ± 4.02	6.4 ± 4.1	1.67	12.7 ± 6.0	8.7 ± 3.4	1.4	12.7 ± 3.3	5.8 ± 2.2	2.1
(C)	12.6 ± 3.8	13.0 ± 0.8	0.96	14.58 ± 9.0	6.25 ± 1.3	2.3	17.2 ± 4.03	3.47 ± 2.8	4.9

Significancia:

A-B: N.S. A-B: p <.01 A-B: N.S. A-B: p <.01 A-B: N.S. A-B: p <.01
 A-C: N.S. A-C: p <.005 A-C: N.S. A-C: N.S. A-C: N.S. A-C: N.S.

(A) semana antes de la inyección; (B) 1a. semana de inyección y (C) 2a. semana de inyección.
 i=índice

ingestión; aunque sí aumentó su consumo total de ambos líquidos, mantuvo su preferencia por el ETOH. En el grupo de cricetos que recibió el vehículo, los

hallazgos fueron los mismos: aumentó su consumo de H₂O en forma similar al de los otros grupos, durante la primera semana que recibieron las inyecciones.

Discusión

Se observó que la Px reduce la preferencia del criceto por el ETOH, lo que coincide con el informe anterior de Reiter y cols(15). Este efecto no se mantiene por mucho tiempo, lo cual indica que las alteraciones producidas por esta manipulación de los mecanismos que intervienen en su preferencia por el alcohol no son permanentes. Por otro lado, se encontró que sólo el grupo de animales intactos que recibieron melatonina tres veces al día, modificó ligeramente su preferencia de ETOH por H₂O. Sin embargo, la cantidad total de líquido consumido por los grupos que recibieron melatonina aumentó considerablemente, lo que sugiere que se trata de un efecto dipsogénico inespecífico, pues la administración de melatonina no afectó la preferencia de los animales que fueron pinealectomizados antes del experimento. Probablemente en esta especie se requiera de la integridad de la glándula pineal para que pueda ejercer su efecto modulador sobre su preferencia por el ETOH.

El incremento en la ingestión de ETOH en las ratas y en los cricetos mantenidos constantemente en la oscuridad, dio origen a una especulación interesante respecto al funcionamiento pineal y su relación con la inducción a la ingestión de alcohol. Por un lado, la oscuridad aumenta la actividad enzimática de la N-acetiltransferasa y de la hidroxindol-O-metiltransferasa, con el aumento concomitante de la conversión de serotonina (5-HT) a melatonina vía N-acetilserotonina(4, 21). Por otro lado, se ha reportado que la administración de 5-hidroxitriptofano (5-HTP), precursor de la síntesis de 5-HT, disminuye la preferencia de algunos roedores por las soluciones etílicas. Esta reducción se ha atribuido a que aumentan en los niveles de 5-HT cerebral(7); además, la administración de para-clorofenilalanina, droga que provoca la depresión

de un gran porcentaje de 5-HT a nivel central, a veces aumenta la ingestión de alcohol(7). De este modo, si la serotonina disminuye durante los períodos de oscuridad, parece razonable que aumente la preferencia por el ETOH.

Antón-Tay y cols(3) encontraron que la administración intraperitoneal de melatonina en la rata aumentó más la concentración de la 5-HT cerebral en el cerebro medio; este efecto fue notable después de una sola inyección. Sin embargo, es posible que el grupo intacto haya experimentado algunos cambios en los niveles de 5-HT cerebral después de la administración crónica de melatonina, pero como el efecto de la hormona en los animales pinealectomizados no fue tan evidente, pensamos que la glándula interviene por sí misma en la modificación de la serotonina y otras indolaminas, como el triptofol, después de la administración de melatonina.

Respecto al experimento No. 1, suponemos que la pinealectomía modifica la concentración de 5-HT en el cerebro, aunque no tenemos pruebas de que sea así, pero la concentración de 5-HT en la glándula pineal se elevó más que en cualquier otra área del cerebro u órgano analizado. Además, se observó una variación circadiana con la 5-HT en la glándula pineal: durante la fase luminosa su concentración es de aproximadamente 0.5 nM(14) la cual cae dramáticamente durante la noche, ya que se utiliza para la síntesis de la melatonina(9,10). Respecto a los animales pinealectomizados del primer experimento, suponemos que debido a la disrupción de la barrera hematoencefálica y a la falta de reservorio pineal se presenta una sobrecarga de 5-HT cerebral. El que los animales vuelvan a preferir las soluciones de ETOH podría deberse al reajuste de dicha sobrecarga. Sin embargo, es necesario continuar investigando sobre este tema para poder evaluar las especulaciones anteriores.

BIBLIOGRAFIA

1. ARVOLA A, FORSANDER O: Hamsters in experiments of free choice between alcohol and water. *Q.J. Studies on Alcohol* 24:591-597, 1963.
2. ARVOLA A, FORSANDER O: Comparison between water and ethanol consumption in six animal species in free-choice experiments. *Nature* 191:819-820, 1961.
3. ANTON-TAY F, CHOU C, ANTON S, WURTMAN R: Brain serotonin concentration: Elevation following intraperitoneal administration of melatonin. *Science* 162:277-278, 1978.
4. BINKLEY S, REIBMAN J, KELLY K: The pineal gland: A biological clock in vitro. *Science* 202:1198-1201, 1978.
5. DEITNICH R, BACKER R: Initial sensitivity of rat inbred strains to acute alcohol. *Alcoholism: Clin Exp Res* 8:487-490, 1984.
6. GELLER I: Ethanol preference in the rat as a function of photoperiod. *Science* 173:456-459, 1971.
7. GELLER I: Effects of para-chlorophenylalanine and 5-hydroxy-tryptophan on alcohol intake in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1:361-365, 1973.
8. GELLER I, HARTMANN R J: En: *Alcohol Intoxication and Withdrawal: Experimental Studies*. M.M. Gross ed, Vol. III b 223-233, 1977.
9. KLEIN D C, WALLER J: Indole metabolism in the pineal gland: Circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science* 169:1993-1995, 1970.
10. KLEIN D C, AVERBACH A, NAMBOODIRI A, WHELER G: Indole metabolism in the mammalian pineal gland. En: *The Pineal Gland*, Vol. I, Russel, J. Reiter ed. 199-277, CRC Press, 1981.
11. KULKOWSKY P, CORNELL N: Free-choice ethanol intake and ethanol metabolism in the hamster and rat. *Pharmacol Biochem Behav* 11:438-444, 1980.
12. MOSS H, SALIN-PASCUAL R J, RATHNAGIRI P, GOLDMAN D, TAMARKIN L: Sex differences in ethanol sensitivity and metabolism in the syrian hamster. *15th Annual Meeting. Society for Neuroscience* (part. 1):290 (Abstract), 1985.
13. MOSS H, SALIN-PASCUAL R J, RATHNAGIRI P, GOLDMAN D, TAMARKIN L: Sex-differences in ethanol sensitivity and alcohol and aldehyde dehydrogenase activities in the syrian hamster. *Alcohol and Drug Research* 7:301-307, 1987.
14. QUAY W B: Circadian rhythms in the rat pineal serotonin and its modification by estrous cycle and photoperiod. *Gen Comp Endocrinol* 3:473-479, 1963.
15. REITER R J, BLUM K, WALLACE J, MERRITT J: Pineal

- gland: Evidence for an influence on ethanol preference in the male Syrian hamsters. *Comp Biochem Physiol* 47A: 11-16, 1974.
16. REITER R J, VAUGHAN M, BLASK D, JOHANSON L: Melatonin: Its inhibition of pineal antigonadotrophic activity in the male hamsters. *Science* 185:1169-1171, 1974.
 17. RUDEEN K, SYMMERS S: Pineal gland and melatonin influence on chronic alcohol consumption by hamsters. *Pharmacol Biochem Behav* 14:143-147, 1980.
 18. SINCLAIR J, SHEAFF B: A negative alcohol-deprivation effect in hamsters. *Q.J. Studies on Alcohol* 34:71-77, 1977.
 19. SLIGHTER R JR: Alcohol selection and position selection in hamsters caged singly and in groups. *Q.J. Studies on Alcohol* 31:20-27, 1970.
 20. TAMARKIN L, HOLLISTER C, LEFEBURE N, GOLDMAN B: Melatonin induction of gonadal quiesence in pinealectomized syrian hamsters. *Science* 198:953-955, 1977.
 21. WURTMAN R J, AXELROD J, PHILLIPS L: Melatonin synthesis in the pineal gland: Control by light. *Science* 142:1071-1073, 1963.