

## VALORACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE MELATONINA TRAS UN TEST DE ESTÍMULO CON CIPROHEPTADINA EN NIÑOS.

A. Muñoz Hoyos, J. Uberos Fernández, F. Peña Díaz, A. Peinado Garrido, J. Ochoa Herrera, A. Molina Carballo.

*Departamento de Pediatría. Hospital Clínico. Universidad de Granada. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Granada.*

### RESUMEN.

**Objetivo.** Determinar el nivel de respuesta epifisaria tras un estímulo con ciproheptadina en niños, durante el día y durante la noche e intentar definir un test de función pineal que permita describir anomalías funcionales de dicha glándula.

**Material y métodos.** Se seleccionaron 30 pacientes en edad pediátrica en tratamiento con ciproheptadina, determinándose los niveles de melatonina plasmática antes y 2,5 y 7 horas tras la administración del fármaco. Dicha determinación se realizó mediante RIA, el análisis estadístico de los datos se realizó mediante la aplicación de un análisis de la varianza de un vía y un estudio de regresión múltiple.

**Resultados.** No se observaron diferencias significativas entre niveles de melatonina en horas diurnas y nocturnas tras la administración de ciproheptadina; tampoco se halló ascenso significativo en el valor de melatonina durante el día tras la administración de ciproheptadina. Sin embargo, sí se observaron incrementos claros en los niveles circulantes de melatonina tras administración de ciproheptadina en las horas nocturnas, siendo éstos significativos en la determinación realizada a las 7 horas de la ingesta del antiserotoninérgico.

**Comentarios.** La estimulación serotoninérgica con ciproheptadina es capaz de modificar positivamente la producción de melatonina, representando un estímulo positivo de acción lenta que alcanza su mayor grado 7 horas tras su administración. Aparece así una nueva perspectiva en la búsqueda de un test de función pineal.

**Palabras clave:** glándula pineal, melatonina, ciproheptadina, función pineal, ritmo circadiano, serotonina.

Trabajo recibido: 10/12/02

Investig Clin 2003; 6: 22-26

Aceptado: 10/01/03

### INTRODUCCIÓN.

La serotonina es una amina biógena compuesta por un anillo indólico y una cadena lateral etilamina. Se localiza y es sintetizada en las neuronas serotoninérgicas del SNC y en las células enterocromafines del tracto gastrointestinal. En las plaquetas sólo se almacena por un mecanismo de transporte. La glándula pineal contiene gran cantidad de serotonina<sup>1</sup>. Por otra parte la glándula pineal está ligada al fotoperíodo a través de un circuito nervioso que, partiendo de la retina llega al hipotálamo, pasa a médula espinal, desde donde salen raíces que van a parar al ganglio cervical superior (SCG) y de éste parten terminaciones nerviosas  $\beta$ -adrenérgicas que llegan hasta la glándula pineal<sup>2</sup>.

El mecanismo más comúnmente aceptado para la formación de melatonina (aMT) pasa por la estimulación de los receptores beta seguido de un aumento de la concentración intracelular de AMPc<sup>3</sup>. Esto ocasiona que cada noche aumente 30-70 veces la actividad de la serotonina N-acetiltransferasa que convierte la serotonina en acetilserotonina, la cual se transformará en melatonina por acción de la hidroxindol-O-

metiltransferasa (HIOMT)<sup>4,5,6</sup>. Por tanto, serotonina y melatonina se encuentran ligadas desde un punto de vista anatómico y funcional, y dado que la ciproheptadina es un antagonista de la serotonina actuando sobre los receptores 5-HT<sub>2A</sub><sup>7</sup>, nos propusimos describir el nivel de respuesta epifisaria tras un estímulo con ciproheptadina en niños tanto en el transcurso de las horas diurnas como nocturnas y, al mismo tiempo intentar definir un test de función pineal que permita describir anomalías funcionales tanto en situaciones de normalidad como en diversas situaciones patológicas (trastornos del sueño, etc.).

### MATERIAL Y MÉTODOS.

El material seleccionado para la realización del presente proyecto, lo constituyeron 30 pacientes en edad pediátrica atendidos en la Unidad de Endocrinología Infantil del Hospital Militar de Sevilla, el motivo de consulta fue la anorexia en todos los casos. No existía enfermedad orgánica subyacente que justificase el mencionado síntoma. Los sujetos del estudio tenían edades comprendidas entre los 3 y 12 años. Se constituyeron dos grupos, formados por 15 niños cada

uno, a todos los niños se les administró una dosis oral de 2.66 mg/m<sup>2</sup> de ciproheptadina (un tercio de la dosis diaria utilizada en la práctica clínica habitual), obteniéndose muestras en condiciones basales (justo antes de administrar el fármaco) y a las 2, 5 y 7 horas de la administración del mismo, determinándose los niveles plasmáticos de melatonina en cada muestra sanguínea. La diferencia entre ambos grupos de niños radica en el momento de la administración del fármaco: en el primer grupo la extracción basal con posterior administración de ciproheptadina por vía oral se realizó a las 08.00 horas (grupo día), y en el segundo grupo a las 20.00 horas (grupo noche). Uno de los niños del grupo noche no completó las distintas determinaciones y fue excluido del estudio. El estudio fue realizado con el consentimiento de los padres y/o tutores previa aprobación del Comité Ético del Hospital.

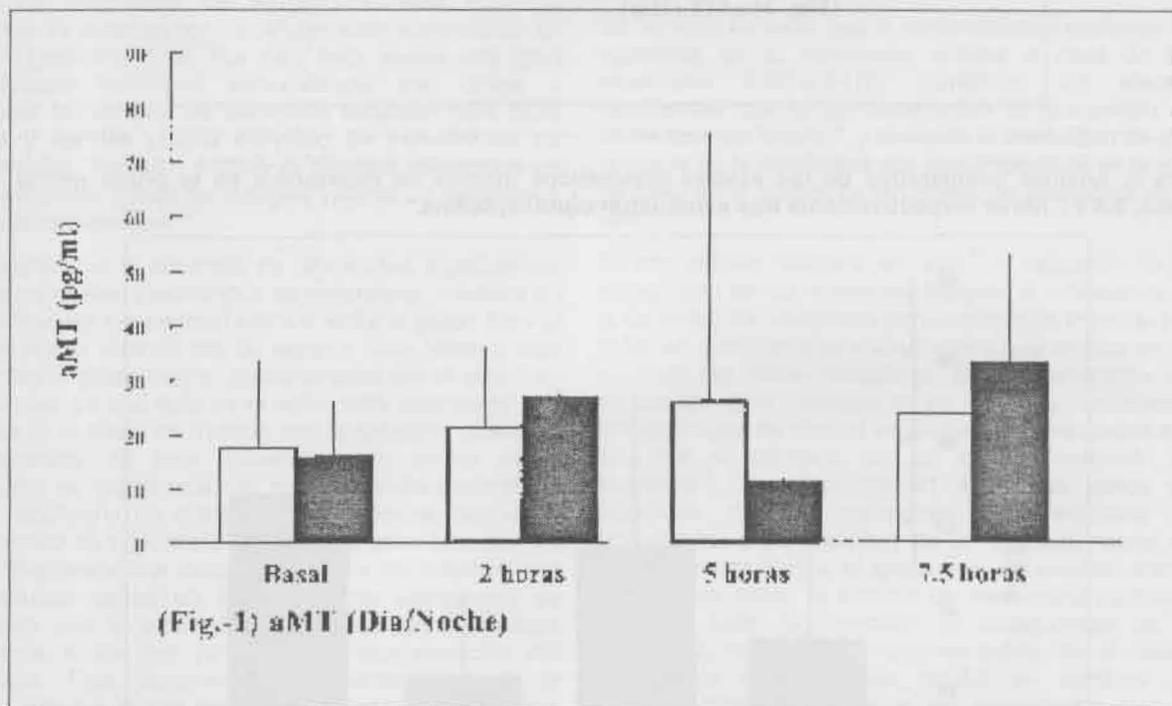
Se determinaron los niveles plasmáticos de melatonina mediante RIA. Para este método necesitamos: calibrador de melatonina (vial con 0.5 ml de líquido con concentración de melatonina de 12800 pg/ml, estandarizado con método GC/MS), anticuerpos antimelatonina, melatonina marcada con <sup>125</sup>I, gammaglobulina antianticuerpo de melatonina. Se realiza una curva estándar tomando 0.05ml de calibrador.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la aplicación de un test de comparación múltiple de medias mediante el análisis de la varianza de una vía, y un estudio de regresión y correlación.

**RESULTADOS.**

En primer lugar comparamos si los valores de melatonina obtenidos en condiciones basales, y a las 2, 5 y 7 horas respectivamente de la administración de ciproheptadina eran iguales o no en los grupos estudiados a diferente factor tiempo, es decir, si los valores de melatonina obtenidos en el curso de las horas diurnas y nocturnas eran o no homogéneos. Ambas muestras son independientes y los datos siguen una distribución normal por lo que usamos un test paramétrico de comparación de medias. A diferencia de lo que ocurre en circunstancias normales, no se observaron diferencias significativas en los niveles de melatonina para los distintos momentos horarios entre el grupo día y el grupo noche (basal: 17.44±16.09 pg/ml vs. 15.69±10.35 pg/ml; a las 2 horas: 21.12± 14.60 pg/ml vs. 26.66± 18.74 pg/ml; a las 5 horas: 25.72± 49.13 pg/ml vs. 10.85±9.92 pg/ml, y a las 7.5 horas: 23.57±21.35 pg/ml vs. 33.06±19.78 pg/ml). (Fig.-1).

Figura 1. Análisis comparativo de los valores plasmáticos medios de melatonina en los grupos día y noche: basales, 2,5 y 7 horas respectivamente tras administrar ciproheptadina.



Tras la administración de ciproheptadina a las dosis pediátricas habituales, pudimos observar que en el grupo día (Fig.- 2) la tasa basal de melatonina pasaba de 17.44±16.09 pg/ml a un valor de 23.57±21.35 pg/ml al finalizar el estudio, lo que no supuso un ascenso significativo en sus niveles. La ausencia de significación en el análisis de la varianza de una vía nos informa que no existen diferencias significativas entre los valores de

melatonina determinados en los distintos momentos horarios en el grupo que se estudió durante las horas diurnas. Por el contrario en el grupo noche (Fig.- 3), sí que se obtiene significación al aplicar el análisis de la varianza, por lo que resultó preciso examinar las medias de cada muestra y la magnitud de las diferencias entre ellas con el objeto de estudiar a qué se debía la significancia encontrada en el análisis global de los

datos. Para ello, se aplicó el método de Bonferroni, observándose que las diferencias radicaban en las comparaciones siguientes: a) Melatonina basal-melatonina 7.5 horas ( $15.69 \pm 10.35$  pg/ml vs.  $33.06 \pm 19.78$  pg/ml ;  $t=3.05$ ,  $p<0.05$ ). b) Melatonina 2

horas- melatonina 5 horas ( $26.66 \pm 18.74$  pg/ml vs.  $10.84 \pm 9.92$  pg/ml ;  $t=2.74$ ,  $p<0.05$ ). c) Melatonina 5 horas- melatonina 7 horas ( $10.84 \pm 9.92$  pg/ml vs.  $33.06 \pm 19.78$  pg/ml ;  $t=3.97$ ,  $p<0.01$ ).

Figura 2. Análisis comparativo de los valores plasmáticos medios de melatonina en el grupo día : basales, 2,5 y 7 horas respectivamente tras administrar ciproheptadina.

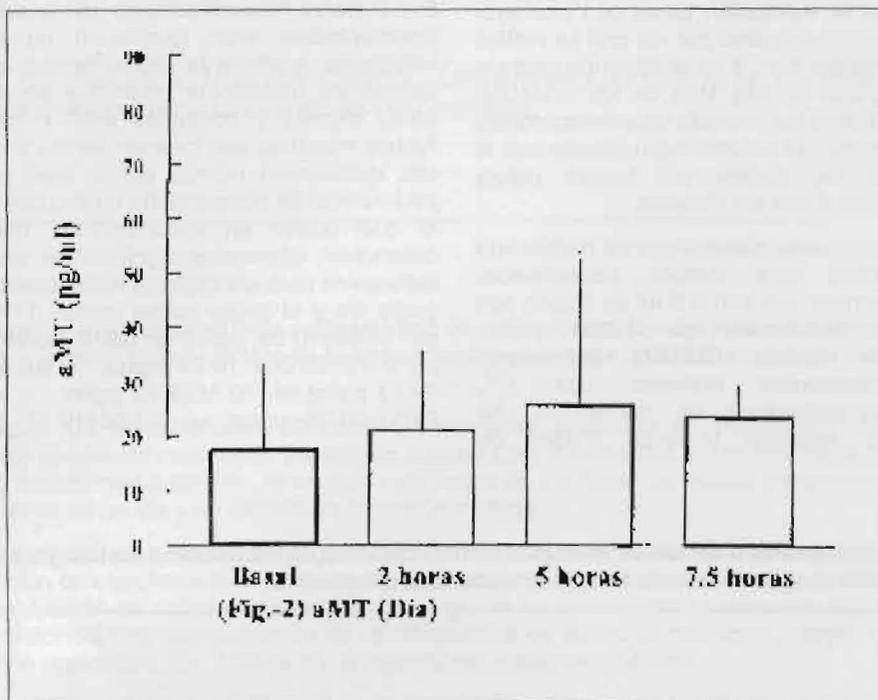
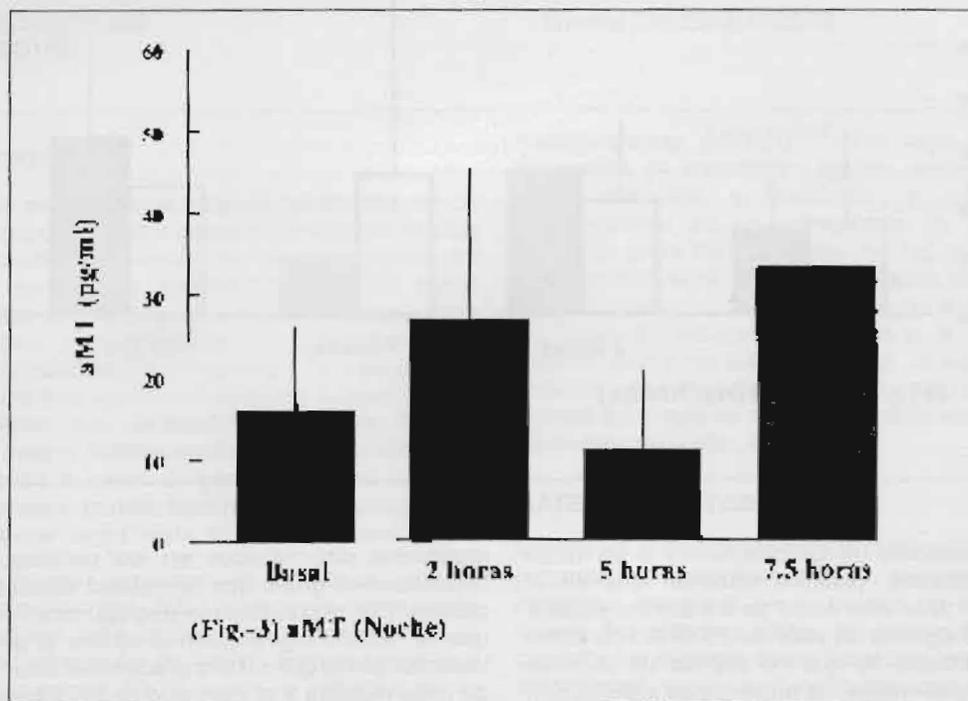


Figura 3. Análisis comparativo de los valores plasmáticos medios de melatonina en el grupo noche : basales, 2,5 y 7 horas respectivamente tras administrar ciproheptadina.



Es significativo el ascenso de los niveles plasmáticos de melatonina en la última determinación medida en el grupo estudiado durante la noche, llamando la atención los bajos valores obtenidos a las 5 horas de la administración de ciproheptadina.

Para verificar la posibilidad de que las variaciones de una de las variables estudiadas dependiera no sólo de una sino de varias simultáneamente aplicamos un estudio de regresión múltiple, en el que pudimos observar que existe una relación (dependencia) significativa de la melatonina plasmática determinada a las 7.5 horas de la administración de ciproheptadina en el grupo que se estudió durante el día ( $r=0.78$ ;  $p < 0.01$ ) en relación a las determinaciones basales, 2 y 5 cinco horas, relación que disminuye significativamente en el grupo estudiado durante la noche ( $r=0.38$ ).

**DISCUSIÓN.**

Como ocurre con otras estructuras y órganos endocrinos parece lógico que se intente buscar algún test funcional que permita definir la normo, hipo o hiperfunción pineal. Ya existen diversos trabajos al respecto<sup>8,9</sup>. Sin embargo, al abordar este tema nos encontramos con ciertos problemas que dificultan el logro de este objetivo. Debemos aceptar que esta prueba estaría dirigida fundamentalmente a la valoración de las tasas plasmáticas de melatonina, principal hormona secretada por la glándula pineal, pero hay que tener presente que aunque esta glándula es la principal productora de melatonina, esta hormona también se sintetiza por las células enterocromafines del tracto gastrointestinal. Por otro lado, existe una gran variabilidad individual, circunstancia que obliga a conocer los valores de referencia estándar para cada edad y las del propio individuo en condiciones de normalidad. También existen ya algunas referencias en la bibliografía donde se recogen valores de melatonina en sujetos normales.<sup>10</sup>

Es destacable la ausencia de diferencias significativas entre los niveles plasmáticos de melatonina, medidos en los diferentes momentos horarios, entre el grupo día y el grupo noche cuando era de esperar unos valores más altos en el grupo noche condicionados por el ciclo luz-oscuridad, ya que éste es el factor más importante que regula la síntesis de indoles por la glándula pineal, el responsable de este ascenso tanto diurno como nocturno de melatonina. No se ha descrito mecanismo que condicione un aumento de melatonina diurno. El clorhidrato de ciproheptadina es bien absorbido por vía oral. Siguiendo una dosis oral simple de radiofármaco en adultos sanos en el periodo de abstinencia se observó que el pico de la concentración plasmática aparecía a las 6-9 horas de la administración del fármaco. Esta característica farmacocinética de la ciproheptadina puede ayudar a explicar los altos valores plasmáticos de melatonina encontrados a las 7.5 horas tanto en el grupo día como en el grupo noche.

Se ha sugerido que las drogas antiserotoninérgicas puedan bloquear los canales iónicos del calcio, y que el efecto de la ciproheptadina en la profilaxis de la migraña se ejerza a través del bloqueo de los canales del calcio. Este mecanismo podría estar implicado en el efecto de la droga antiserotoninérgica sobre la secreción de melatonina, dada la importancia que tiene el calcio en la producción de esta hormona pineal. No obstante, hay

estudios que indican que las interacciones de la serotonina y melatonina con la calmodulina, proteína reguladora del calcio, son más débiles de lo que se ha descrito y que es improbable que tengan un significado fisiológico<sup>11</sup>.

Hay datos que indican que la liberación de serotonina desde los pinealocitos depende de la disponibilidad de serotonina en el citoplasma, lo cual es altamente dependiente de la actividad triptófano hidroxilasa. Por otra parte, se ha visto que la incubación de células pineales de ratas con elevadas concentraciones de serotonina o con un agonista selectivo del receptor 5-HT<sub>2</sub>, el alfa-metil-5-hidroxitriptamina, revierte parcialmente el efecto inhibitorio que el p-clorofenilalanina, un inhibidor de la triptófano hidroxilasa, tiene sobre la síntesis de melatonina estimulada por el isoproterenol. En contraste, el antagonista 5-HT<sub>2</sub>, ketanserina, resultó en una inhibición de la liberación de la melatonina ocasionada por el estímulo con isoproterenol<sup>12</sup>. Estos resultados que sugieren que la liberación de serotonina puede tener un papel en la expresión de la actividad de la N- acetil transferasa inducida por estímulo β- adrenérgico, aunque obtiene una menor liberación de melatonina por la pineal de la rata tras la administración de un antagonista 5-HT<sub>2</sub>, apoya el hecho de que el mecanismo por el cual actúa la ciproheptadina ha sido capaz de producir un aumento de la secreción de melatonina en el niño, debe estar mediado por mecanismos diferentes al estímulo β- adrenérgico.

Se ha visto en ratas que la administración periférica de agonistas de la serotonina activos a nivel de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>/5-HT<sub>7</sub> mimetizan los efectos cambiantes que la luz tiene sobre la producción de melatonina en la rata<sup>13</sup>, y aumenta la posibilidad de que la senda de la serotonina sea más importante de lo que se creía en el control de la síntesis de serotonina en la rata.

En otro estudio realizado en ratas<sup>14</sup> la utilización de un antagonista de los receptores bloqueó el incremento de la densidad de receptores para melatonina inducida por la luz en el núcleo supraquiasmático, y el empleo de un agonista de estos receptores 5HT<sub>1A</sub> incrementa los receptores para melatonina en un 10%, careciendo ambas drogas de efectos en animales no expuestos a la luz. Por el contrario, en un estudio realizado en humanos<sup>15</sup>, la administración a adultos sanos de agonistas de los receptores de serotonina d-fenfluramina y paroxetina, y de un agonista parcial de los receptores 5HT<sub>1A</sub>, el ipsapirone, no tuvieron efecto significativo sobre la síntesis de melatonina nocturna. Por otro lado, la inyección de antagonistas de la serotonina, metisergida y ciproheptadina, en el núcleo accumbens de las ratas resultó en cambios de comportamiento similares a los encontrados tras el tratamiento con melatonina, mientras que el tratamiento con serotonina inyectada en el citado núcleo inhibía completamente las respuestas conductuales inducidas por la melatonina<sup>16</sup>. En la especie humana se ha observado una diferencia significativa entre los niveles de serotonina diurnos y nocturnos desde el nacimiento. El ritmo circadiano de la N-acetil serotonina aparece entre el primer y tercer mes de vida, mientras que el de la melatonina se presenta más tarde<sup>17</sup>. Puede que la edad sea un factor que modifique la respuesta de los

antagonistas de la serotonina.

Como puede observarse, los resultados obtenidos en diferentes estudios son muy distintos, mientras unos encuentran una disminución en la secreción de melatonina producida por los antagonistas de la serotonina<sup>12,14</sup>, otros no encuentran variación en estos niveles<sup>15</sup> y otros encuentran un efecto similar entre la acción de la melatonina y de los antagonistas de los receptores de la serotonina<sup>16</sup>. Es posible que el comportamiento sea diferente según las distintas especies, la edad del paciente, que varíe según la dosis administrada, el momento del día en que se tome la droga o el tipo de receptor para serotonina preferentemente ocupado; pero aunque hacen falta más estudios, al menos con la dosis aplicada y en niños, la ciproheptadina se comportó como una sustancia capaz de modificar la secreción de melatonina con la particularidad de ser un estímulo positivo de acción lenta que alcanza su mayor grado de acción a las 7 horas de su administración, y con la importante característica de haber sido capaz de aumentar los niveles de melatonina tanto de día como de noche, con la ventaja que supondría para el paciente la posibilidad de realizar un test de función pineal durante las horas diurnas.

#### BIBLIOGRAFÍA.

- 1 Kappers AJ: Comparative gross and fine morphology of the mammalian pineal gland. In: J Axelrod, F Fraschini and GP Velo, eds: The pineal gland and its endocrine role, pp37-59. Plenum Press, New York, 1983.
- 2 Ramón y Cajal S: Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados TUU, 2ª parte. Moya, Madrid, 1904.
- 3 Strada. S.J.; Klein, D.C.; Sèller, J.; Weiss, B.: effect of norepinephrine on the concentration of adenosine 3',5'-monophosphate of rat pineal gland in organ culture. *Endocrinology* 1972;90:1470.
- 4 Sugden, D.; Klein, D.C.: Regulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase in neonatal and adult rats. *J Neurochem* 1983; 40: 1647.
- 5 Sugden D, Klein DC: Adrenergic stimulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyl transferase. *Brain Res*, 1983; 256: 348-351.
- 6 Sugden D, Klein DC: Beta-Adrenergic control of rat pineal hydroxyindol-O-methyl-transferase. *Endocrinology*, 1983; 113 : 348-353.
- 7 Simons FFE, Luwosli JL, Becker AAAB, Simons KJ. Comparison of the effectes of single doses of the new H<sub>1</sub> - receptor antagonists loratadine and terfenadine versus placebo. *J Pediatr* 1991; 118:298-300.
- 8 Huber E. Análisis de la secreción de hormona de crecimiento y melatonina tras un test de estímulo con propranolol en niños. Tesis Doctoral. Granada, 1997.
- 9 Fernández JM. Análisis de las interrelaciones hormonales entre epifisis e hipófisis tras un test de estímulo con clonidina. Tesis doctoral. Granada. Diciembre, 1993.
- 10 Bergiannaki JD, Saldafis CR, Paparrigopoulos TJ, Sirenuelas M, Stefanis CN. Low and high melatonin excretors among healthy individuals. *J pineal Res*. 1995 ; 18:159-64.
- 11 Ouyang H, Vogel HJ. Melatonin and serotonina: interactions with calmodulin: NMR spectroscopic and biochemical studies. *Biochim Biophys Acta*. 1998 ; 1383; 37-47.
- 12 Miguez JM, Simonneaux V, Pevet P. The role of the intracellular and extracellular serotonin in the regulation production in rat pinealocytes. *J Pineal Res*. 1997 ; 223:63-71.
- 13 Kennaway DJ. Light, neurotransmitters and the suprachiasmatic nucleus control of pineal melatonin production in the rat. *Bio Signals*. 1997 ; 6:247-54.
- 14 Recio J, Pevet P, Masson-Pevet M. Serotonergic modulation of photically induced increase in melatonin receptor density and Fos immunoreactivity in the suprachiasmatic nuclei of the rat. *J Neuroendocrinol* 1996; 8:839-45.
- 15 Nathan PJ, Normal TR, Burrow GD. Nocturnal plasma melatonin concentration in healthy volunteers: effect of single doses of d-fenfluramine, paroxetine, and ipsapirone. *J Pineal Res*. 1996 ; 21:55-58
- 16 Gaffori O, Van Ree JM. Serotonin and antidepressant drugs antagonize melatonin-induced behavioural changes after injection into the nucleus accubens of rats. *Neuropharmacology*. 1985 ; 24:237-44.
- 17 Attanasio A, Raager K, Gupta D. Ontogeny of circadian rhythmicity for melatonin, serotonin, and N-acetylserotonin in humans. *J Pineal Res* 1986; 3:251-256.