

90  
24-



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA



“CARACTERIZACIÓN DE LAS ACCIONES ANSIOLÍTICAS  
PRODUCIDAS POR LA ADMINISTRACIÓN  
INTRACEREBROVENTRICULAR DE MELATONINA,  
CLORDIAZEPÓXIDO Y BUSPIRONA EN RATAS EN EL MODELO DE  
PLUS-MAZE”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ALEJANDRO ORTIZ OSORNIO

MÉXICO D. F.



1998

EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUÍMICA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

262512



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado

Presidente	Profra. VÁZQUEZ ÁLVAREZ ANA MARÍA
Vocal	Profra. NARANJO RODRÍGUEZ ELIA BROSLA
Secretario	Profr. MIRANDA ANAYA MANUEL
1er. suplente	Profra. PÉREZ SEVERIANO FRANCISCA
2do. suplente	Profr. PONCE MONTER HÉCTOR ANTONIO

Sitio donde se desarrolló el tema

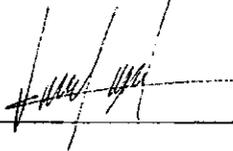
Sección de Farmacología Lab. 1-E y Bioterio. Facultad de Química

Asesor del tema:



Dra. Elia Brosla Naranjo Rodríguez

Supervisor técnico:



M. en C. Victor Mendoza Fernández

Sustentante:



Alejandro Ortiz Osomio

## AGRADECIMINETOS

Con el pasar del tiempo, te das cuenta de que te pasan cosas buenas y malas, las cuales te ayudan posteriormente a tomar decisiones buenas o malas, dependiendo del cristal con que lo veas, pero, lo importante de todo esto, es, que nunca pienses que tuviste un fracaso, sino un pequeño tropiezo hacia el éxito.

ALEZ

Este trabajo se lo dedico a mis padres Dámaso Ortiz Vega y María Tomasa Osornio Piña por el apoyo brindado así como por el cariño y la educación que procuraron darme y, creo que esto es pequeño, en comparación a todo lo que me han dado, MIL GRACIAS POR ESTAR A MI LADO !!!.

También doy gracias a mis hermanos Miryam (La que cree que la ciencia lo es todo) y Edgar (El que cree en todas las utopías) por estar conmigo, creo que sin ellos la vida seria muy aburrida y monótona, espero que muy pronto lleguen a culminar algo mejor que esto.

A mis familiares en general por darme una visión de las diferentes formas de vida, en especial a mis primos Jorge e Iván, por brindarme gratos momentos, a la familia Osornio Pichardo por ayudarme en todo lo que han podido y a mis tíos Angel y Arturo por tratarnos tan bien.

Este trabajo también es en memoria de mis difuntos abuelos, ¡Que en paz descansen!.

Un profesor no es aquella persona que se para al frente y sabe mucho, sino aquella que sabe transmitir las cosas haciendo que estas se vean fáciles.

(ignoro donde lo leí u oí)

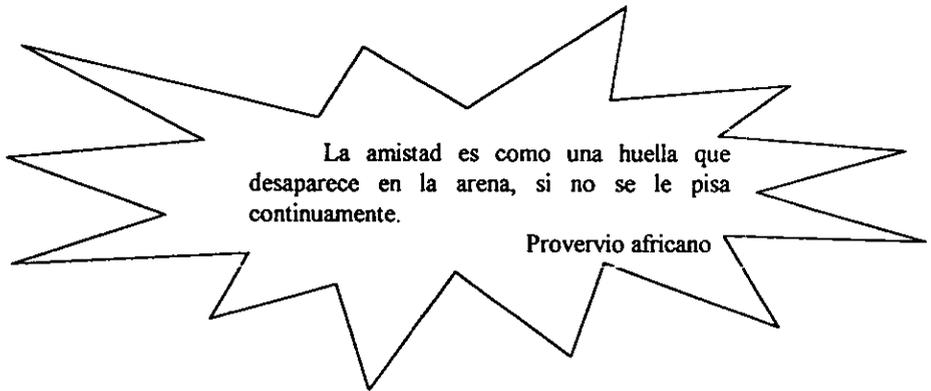
Con cariño a todos mis profesores, que de alguna forma ayudaron en mi formación, gracias por preocuparse por nosotros.

A la Doca. Elia, quien confió en mi y me brindo todo su apoyo para la elaboración de este trabajo, espero que nunca cambie y que siga con sus chispas de buen humor.

A mis sinodales Ana María Vázquez y Manuel Miranda por la atención prestada y los comentarios hechos para que este trabajo haya sido lo mejor posible, así como a Victor por ayudarme en la planeación del proyecto.

Al MVZ Atonatiu, por prestarme sus sagradas instalaciones y aguantarme mientras hacia mis experimentos en el bioloco.

A Noemi Meraz por iniciarme en la investigación así como a Federico y Nathalie personas a quienes extraño mucho y que espero volver a ver.



A todos mis amigos, por estar conmigo en los buenos y en los malos momentos.

De la infancia: Francisco, Mario, Israel, Gustavo, Gerardo, José Manuel y Enrico, todos ellos con diferentes cualidades pero igual de locos que yo (bueno eso creo yo).

A mis amigos de la prepa: Netz, Luis y Juan, de quienes tengo gratos recuerdos y a quienes estimo mucho.

A Rosalba (Ross) una persona que tengo poco de conocerla pero que es a toda M...

A los chicos de Jóvenes a la Investigación, quienes me apoyaron en este trabajo, sobre todo a Maricela, Elenka, Mariana y Ros.

A mis compañeros del laboratorio, que han sido varios; de quienes he recibido apoyo de una u otra manera y que me aguantaron todos mis desplantes, no puedo mencionarlos a todos porque son bastantes pero, quiero expresarles mi gratitud sin excepciones.

En general a todos mis amigos de la carrera, en especial a Vanesa, quien siempre estuvo a mi lado, a Helena Kostoglodova y Helena Brito, dos grandes tipas que siempre me han apoyado, a Gus por ser un gran amigo, al grupo de los seis con quien compartí la mayor parte de mi carrera y gente que estimo mucho; GRACIAS!!!!: Greñas, Pecos, Chapis, Kikis, Dulce y... Gaby, a quien además de estimar, quiero mucho y a quien NUNCA OLVIDARE!!!!.

A Lucy, una gran amiga, moradora del bioloco, y a quien estimo mucho.

A Ruth, gracias por soportarme y ayudarme hasta donde has podido, te quiero mucho.

# INDICE

1.- Introducción.....	1
2.- Generalidades	
2.1 Ansiedad.....	2
2.2 Terapéutica de la ansiedad.....	4
2.2.1 Benzodiazepinas.....	6
2.2.2 Buspirona.....	9
2.3 Melatonina.....	7
2.3.1 Síntesis y metabolismo de la melatonina.....	13
2.4 Receptores involucrados en la ansiedad	
2.4.1 Receptores a GABA.....	18
2.4.2 Receptores a serotonina (5-HT).....	20
2.4.3 Otros receptores involucrados.....	22
2.5 Modelos de ansiedad y Plus-Maze.....	22
3.- Planteamiento del problema.....	29
4.- Objetivos.....	31
5.- Hipótesis.....	32
6.- Material y métodos.....	33
7.- Resultados.....	43
7.1 Influencia del tipo de luz en el comportamiento de los animales en el Plus-Maze.....	43
7.2 Influencia de la operación quirúrgica en el comportamiento de los animales en el Plus-Maze.....	47
7.3 Evaluación del efecto ansiolítico de los compuestos administrados IcVtr.....	50
7.4 Evaluación del efecto ansiolítico de los vehículos.....	55
7.5 Comparación del efecto ansiolítico de los vehículos.....	58
7.6 Histología.....	60
8.- Discusión.....	61
9.- Conclusiones.....	72
10.- Bibliografía.....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	5 hidroxitriptamina
BUS	Buspirona
BZP	Benzodizepinas
CCK	Colecistocinina
CDP	Clordiazepóxido
DZP	Diazepam
ESM	Error estándar medio
GABA	Ac. Gamaaminobutírico
GP	Glándula pineal
HIOMT	Hidroxiindol-O-metiltransferasa
HPA	Eje hipotálamo-Pituitario-Adrenal
I M	Intramuscular
IcVtr	Intracerebroventricular
IP	Intraperitoneal
MEL	Melatonina
N	Tamaño de la muestra
NAT	N-acetiltransferasa
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
PEG	Polietilenglicol
PTZ	Pentilentetrazol
SNA	Sistema nervioso autónomo
SNC	Sistema nervioso central
SSI	Solución salina isotónica
U	Unidades

## 1.- Introducción

El medio ambiente en el que se desenvuelve el ser humano, puede producir alteraciones en el funcionamiento del organismo. Tales alteraciones como por ejemplo la ansiedad, que apesar de ser un mecanismo de adaptación a situaciones adversas, llega a ser patológico cuando se torna en un estado continuo o bien de lapsos recurrentes, teniendo en este último caso que tratarse con una terapia adecuada.

Existen varios fármacos involucrados en el tratamiento de la ansiedad, las benzodiazepinas han dado un buen resultado, sin embargo, sus efectos adversos sugieren el desarrollo de nuevos fármacos, bajo este contexto surgió la buspirona, un compuesto no benzodiazepínico y que ha tenido una buena aceptación en el tratamiento de la ansiedad. La melatonina, una hormona secretada por la glándula pineal, ha sido reportada como un agente ansiolítico y provoca efectos conductuales muy similares a las benzodiazepinas, por lo cual sugiere un posible uso terapéutico en el tratamiento de la ansiedad.

Por otro lado, se tiene que estructuras como el hipotálamo, están relacionadas con los estados afectivos del hombre dentro de los cuales tenemos a la ansiedad, esta estructura queda rodeada por los ventrículos laterales y, además, es una estructura en la cual se han encontrado receptores a melatonina.

En el presente trabajo se pretende caracterizar las acciones ansiolíticas de una benzodiazepina como lo es el clordiazepóxido, la buspirona y la hormona melatonina administrados intracerebroventricularmente en ratas.

Estas acciones ansiolíticas se evaluarán en el modelo del Plus-Maze, que a diferencia de otros modelos ansiolíticos, no utiliza estímulos nocivos ni situaciones estresantes, sino un comportamiento conductual que es más natural en los individuos.

## 2.- Generalidades

### 2.1 Ansiedad.

La ansiedad, es un mecanismo que nos permite adaptarnos a situaciones adversas que ponen en peligro la homeostasis o equilibrio corporal y psíquico de un individuo, esta íntimamente relacionada a la idiosincrasia del mismo y puede presentarse ante diferentes circunstancias como el estrés (provocado por el medio en el que se desenvuelve el individuo), factores de origen físico (intervenciones médico-quirúrgicas), patológicos (infarto al miocardio, angina de pecho, etc.) y emocionales (sensaciones de miedo, situaciones únicas o reiterativas, etc.) ( 8, 24, 32).

Considerando lo anterior, la ansiedad se clasifica en: ( 22, 68 )

- Ansiedad de tipo **secundaria**, como una consecuencia de circunstancias tanto físicas como patológicas.
- Ansiedad de **momento**, cuya causa principal es debida a situaciones emocionales únicas o reiterativas.
- Ansiedad por **pánico**, debida a situaciones de temor que obligan a adquirir personalidades desvalidas.
- Ansiedad **anticipatoria**, en ella, el temor es menor y es debida a una previa evaluación de una posible situación de peligro.

Considerando la frecuencia de estas enfermedades, se ha visto que la ansiedad afecta principalmente a adolescentes y jóvenes adultos, con una duración aproximada de 5 a 10 años (51).

En general, la ansiedad se presenta como una serie de trastornos psiconeuróticos, razón por la cual su explicación biológica o psicológica es difusa. Las manifestaciones

fisiológicas, que se presentan cuando la ansiedad ha dejado de ser un mecanismo de defensa para convertirse en una situación patológica, se pueden explicar mediante una hipótesis, en la cual, se cree que la ansiedad es capaz de estimular al sistema nervioso autónomo (SNA) produciendo descargas adrenérgicas, las cuales son responsables de las manifestaciones fisiológicas presentadas por la ansiedad, entre las que se encuentran: pulso acelerado, aumento de la presión sanguínea, sudoración excesiva, dificultad para respirar con subsecuente sensación de asfixia, diarrea, vértigo, micción frecuente, transpiración, dolores musculares, insomnio y temores irrazonables. Estos síntomas, no son exclusivos de la ansiedad y por eso se realizan evaluaciones para encontrar una posible enfermedad causante de las mismas (enfermedad primaria) y en caso de que se encuentre ésta, no se debe descartar un posible tratamiento de la ansiedad, aunque, generalmente los síntomas de la ansiedad están relacionados con la depresión y trastornos distímicos (depresión neurótica) como los trastornos de pánico, fobias, padecimientos obsesivo-compulsivos, así como alteraciones de la personalidad ( 19, 24, 59 ).

En el ser humano, una de las principales causas de la ansiedad, es el estrés al cual está sometido todos los días. El estrés, es un término que se refiere a una respuesta de adaptación en la cual hay cambios fisiológicos y conductuales, puede ser producido por una serie de excesivas estimulaciones debidas a efectos desgastantes, sobrestimulación nerviosa provocada por elevada responsabilidad, disgustos y un ambiente familiar tenso ( 8, 10 ). En su mayoría, las actividades cotidianas del ser humano como el trabajo, vida social y familiar, etc., suelen presentar las estimulaciones excesivas que pueden causar ansiedad ( 17, 20, 24, 25 ).

La ansiedad, por ser una alteración psicológica en la cual hay un sentimiento subjetivo de tensión aumentada, se manifiesta como una experiencia consciente que reporta

un temor interno el cual es debido a una reacción emocional a objetos o factores identificados así como a situaciones que simbolizan conflictos e impulsos inconscientes, esto último la diferencia del estrés (32, 59, 68).

## 2.2 Terapéutica de la ansiedad.

La ansiedad, debe ser tratada terapéuticamente cuando deja de convertirse en un mecanismo de defensa y se torna en un estado continuo o bien de lapsos recurrentes (patología).

El primer paso en el tratamiento de la ansiedad está encaminado a eliminar a aquellos factores que producen las alteraciones del equilibrio corporal, sin embargo, debido a su complicada etiología, se recurre al tratamiento con fármacos.

Los fármacos utilizados en el tratamiento de la ansiedad, son denominados ansiolíticos, se encuentran entre los de mayor venta en todos los continentes al igual que aquellos que son utilizados como antidepresivos. El tratamiento de la ansiedad es prolongado (5-10 años) razón por la cual se ha puesto especial cuidado en los fármacos utilizados en el tratamiento de esta enfermedad (20, 24, 51).

De los primeros fármacos empleados contra la ansiedad (figura 1) tenemos a el etanol, el cual alcanzó un amplio uso en el siglo pasado. En aquellos tiempos, otros compuestos como el hidrato de cloral y el paraldehído (con efectos similares al etanol), así como las sales de bromuro, fueron introducidos como sedantes y, por lo mismo, empleados en el tratamiento de la ansiedad. Los barbitúricos, compuestos que fueron sintetizados a principios de 1900, tienen propiedades sedantes-hipnóticas y fueron también utilizados como fármacos en el tratamiento de la ansiedad (24, 70).



Figura 1. En esta figura se muestran las estructuras de algunas sustancias que fueron utilizadas en un principio como fármacos ansiolíticos (24, 70).

Los fármacos mencionados anteriormente, tienden a producir ciertos efectos sobre el sistema nervioso central (SCN), estos efectos, como la sedación e incluso la hipnosis resultan adversos, también presentan un efecto relajante de las funciones motoras y/o mentales, por lo cual no son muy específicos para la ansiedad, además, los barbitúricos, son compuestos que llegan a causar tolerancia y dependencia física (24, 70, 34). La fórmula general de los barbitúricos se presenta en la figura 2.

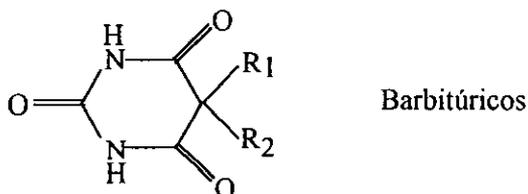


Figura 2. Los barbitúricos son una serie de fármacos que fueron usados a principios de siglo en el tratamiento de la ansiedad. Estos provienen de la condensación del ácido malónico y de la urea (34).

En el tratamiento de la ansiedad, lo que se busca es tener un efecto terapéutico con una mínima interacción adversa en las funciones del SNC, por lo que se intentó sintetizar fármacos con una actividad específica sobre la ansiedad, con lo cual surgieron las benzodiazepinas (BZP) y, más tarde, la buspirona (BUS) (20, 24, 34, 68).

### 2.2.1 Benzodiazepinas (BZP)

Las BZP son una familia de fármacos que producen sedación y alivian los estados de ansiedad. En los roedores como la rata y el ratón, ejercen una acción tranquilizante, inhibitoria de la actividad motora y del castigo. En el hombre son capaces de reducir la aprehensión, la tensión y son potentes relajantes musculares (38).

Los fármacos representativos de esta familia y que son usados en el tratamiento de la ansiedad son el clordiazepóxido (CDP) y el diazepam (DZP), posteriormente a estos compuestos han surgido una gran cantidad de derivados benzodiazepínicos. Su fórmula general se presenta en la figura 3 (24, 42).

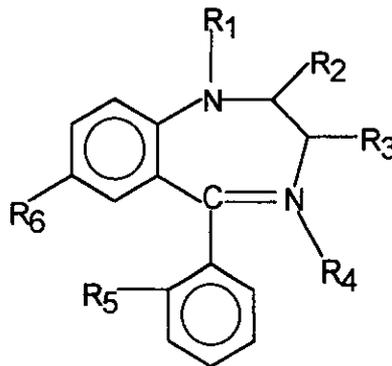


Figura 3. Estructura general de las benzodiazepinas. R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub>, variarán dependiendo de la benzodiazepina en cuestión (24).

Después de su administración por vía oral, las BZP se distribuyen bien en todo el organismo, sin embargo, debido a su estructura química que tiene grupos hidrofóbicos, tienen preferencia por los tejidos ricos en lípidos como el adiposo y el cerebro, son metabolizados principalmente en hígado por oxidación microsomal (reacciones de fase I) y

excretados por riñón después de ser conjugados como glucurónidos (reacciones de fase II). Los metabolitos formados de las BZP pueden ser en ocasiones activos e incluso con un tiempo de vida media mucho mayor al de la benzodiazepina de la cual provienen (figura 4)<sup>(64)</sup>.

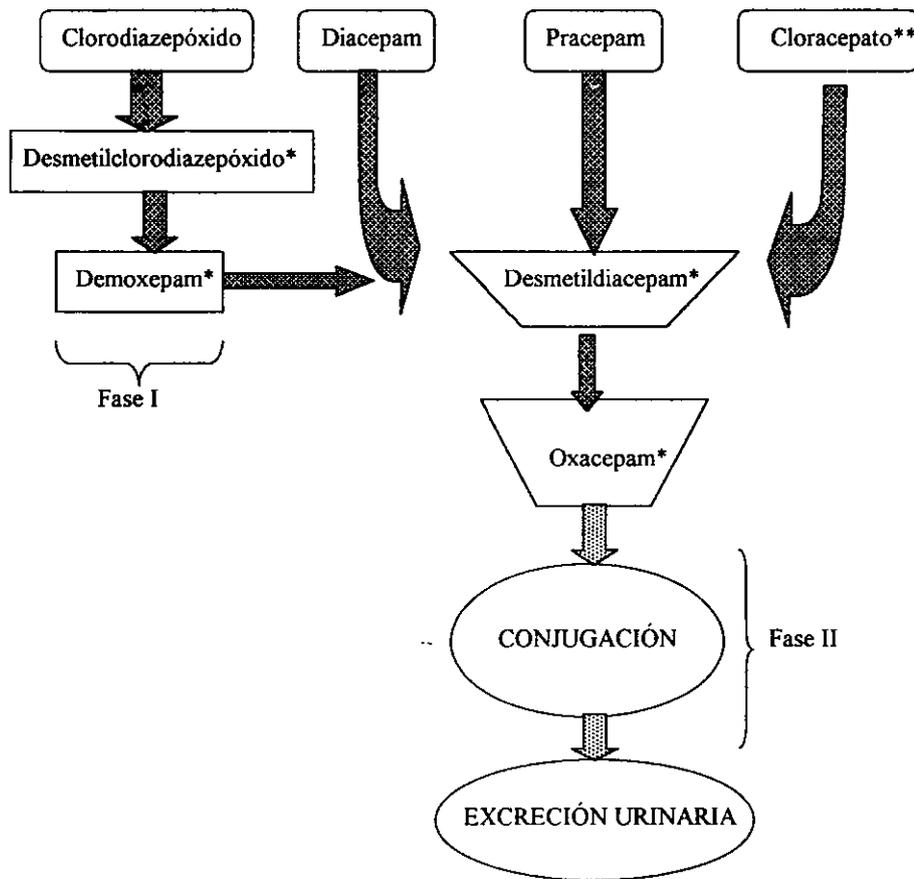


Figura 4. El metabolismo de algunas BZP, nótese que en las reacciones de fase I, se obtienen metabolitos activos (\*), lo cual aumenta su tiempo de vida media, en cambio, otras no tienen actividad (\*\*) y al metabolizarse se vuelven activas <sup>(24, 64)</sup>.

Los principales efectos de las BZP en el hombre son: anticonvulsivos, relajante muscular, ansiolítico y sedante-hipnótico, lo cual sugiere que el efecto ansiolítico es también apoyado por el relajante y el sedante, ya que estos últimos, por sí solos, no son capaces de llevar a cabo un efecto ansiolítico (64). En general, las BZP son utilizadas en el tratamiento de la ansiedad, insomnio y sedación antes de procedimientos médico-quirúrgicos, en el tratamiento de la epilepsia y estados convulsivos así como auxiliares diagnósticos en psiquiatría (34).

Las BZP potencian la neurotransmisión GABAérgica, aumentando, al parecer, la inhibición sináptica como producto de la disminución de descarga neuronal debida al ácido gammaaminobutírico (GABA) en diversas partes del cerebro (34).

A pesar de que las BZP son un grupo de compuestos que poseen cierta especificidad como fármacos ansiolíticos, no dejan de tener innumerables efectos adversos como: ataxia, cefalea, fiebre, somnolencia, náuseas, vómitos, diarrea, etc., además de reportarse efectos teratogénicos y alteraciones del periodo menstrual. Cuenta también con efectos psicológicos como disminución de la capacidad cognoscitiva y de la concentración, así como tolerancia y dependencia psicológica y física (25, 34, 29, 61).

El CDP (figura 5) fue sintetizado en 1957 por Sternbach (56), su nombre genérico es el librium y fue de las primeras BZP, posteriormente vino el diazepam y otras BZP.

El CDP se encuentra en tabletas y cápsulas de 5, 10 y 25 mg, así como en polvo con 100 mg para administración parenteral, tiene una vida media de 5 a 30 hr. y sufre reacciones de fase I y II (figura 4).

El CDP, al biotransformarse, da metabolitos activos como lo son el desmetilclorodiazepóxido, demoxacepam, desmetildiazepam y el oxacepam (figura 4), de

estos, el demoxacepam y el oxacepam se encuentran disponibles para uso clínico, su biodisponibilidad es baja por vía intramuscular (34, 38).

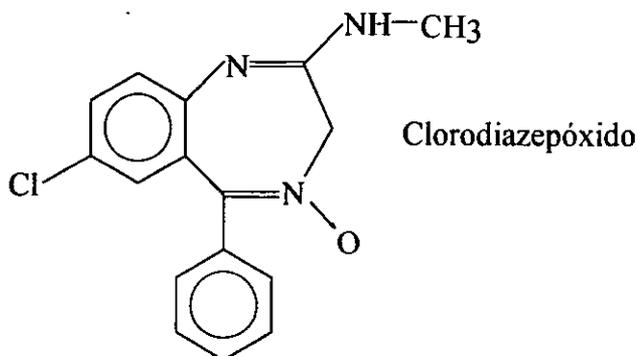


Figura 5. El CDP, fue de las primeras BZP de uso clínico, sintetizado en 1957 por Sternbach, su nombre químico es 7-cloro-5-fenil-2-metilamino-4-oxi-1,4 benzodiazepina, este compuesto presentó en un principio actividades farmacológicas como relajantes musculares y anticonvulsivas(56).

Este fármaco produce sedación y es utilizado principalmente en el tratamiento del insomnio y la ansiedad a dosis de 10-20 mg 2 a 3 veces al día, presenta interacciones con otros medicamentos, en especial con los depresores del SNC, con los cuales tiene un efecto aditivo. En presencia de cimetidina que inhibe el metabolismo hepático, es capaz de aumentar su vida media (34).

### 2.2.2 Buspirona

Posterior a las BZP y en la década de los 80's, surge un nuevo grupo de fármacos ansiolíticos que actúa sobre receptores serotoninérgicos (5-HT) de los cuales, la buspirona (BUS) es su prototipo y, cuya estructura se presenta en la figura 6 (60).

La BUS, es un fármaco con estructura diferente a la de los medicamentos ansiolíticos existentes. Su mecanismo a diferencia de las benzodiazepinas, no es a nivel GABAérgico

sino a nivel serotoninérgico, ya que actúa sobre los receptores de subclase 5HT<sub>1A</sub> para serotonina, fue descubierta en el año de 1983 por Glasser y Traver (24, 28, 34, 46, 60).

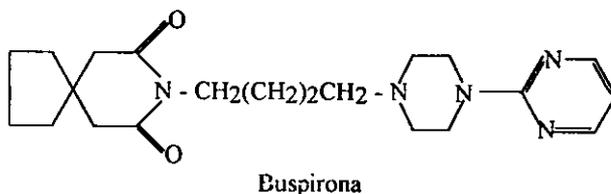


Figura 6. Fórmula estructural de la buspirona (8-[4-(2-pirimidil)-1-piperazimil]-butil)-8-azaspiro-(4,5)-decano-7,9-diona, un fármaco utilizado específicamente para el tratamiento de la ansiedad y, que a diferencia de las benzodiazepinas, actúa sobre receptores 5-TH<sub>1A</sub> (21, 24).

La BUS se utiliza en el tratamiento de la ansiedad sin producir sedación y se ha visto que tiene un efecto similar al diazepam (21, 34).

Este fármaco se absorbe rápidamente por el tubo digestivo, se distribuye bien y sufre metabolismo de primer paso a nivel hepático principalmente por las reacciones de hidroxilación y N-desalquilación, dando metabolitos con actividad farmacológica. Tiene una vida media de 2 a 4 hr. y al parecer no hay mayor problema por acumulación del fármaco en el organismo (34).

A diferencia de las BZP, la BUS no afecta la actividad motora o el conocimiento, es un buen agente ansiolítico que no posee propiedades hipnóticas, anticonvulsivas ni las desventajas de los efectos adversos de las BZP aunque en ocasiones pueden presentarse taquicardias, palpitaciones, molestias gastrointestinales y parestesias con mayor frecuencia que con las BZP (16, 24, 34, 60).

La BUS junto con la azapirona, son utilizadas como medicamentos de elección en enfermedades de ansiedad generalizada, se utiliza generalmente en dosis de 30 mg dos o tres veces al día, se utiliza en el tratamiento de la ansiedad en niños, además, debido a que no produce dependencia física, interacciones con alcohol, ni desórdenes psicomotrices en usos prolongados como lo es el tratamiento de la ansiedad, es preferida con respecto a las BZP, sin embargo, en el tratamiento de la fobia social y del pánico no ha mostrado resultados convincentes (9, 51, 62, 63).

En el tratamiento de la ansiedad, además de las BZP y de la BUS, existen otras azapironas, así como antidepresivos, estos últimos son preferidos en algunos casos de fobias (9, 51).

### 2.3 Melatonina.

La melatonina (MEL) es una hormona que al igual que otros polipéptidos se producen en la glándula pineal (GP), fue reconocida inicialmente por McCord y Allen en 1917, pero es hasta 1958 que Lerner y col., la aislaron de un extracto de GP bovina y un año después, lograron ellos mismos establecer su estructura (figura 7) (15, 36, 37, 41, 45).

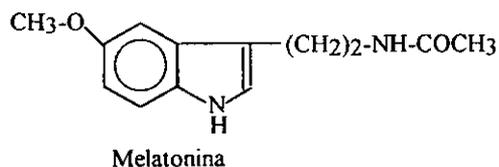


Figura 7. La MEL es un compuesto metoxiindólico de naturaleza lipofílica y no ionizada, es la principal hormona producida por la glándula pineal su nombre químico es la 5 metoxi-N-acetiltryptamina (4).

Esta hormona pertenece al grupo de los indoles, es un metoxiindol identificado como N-acetil-5-metoxi-triptatmina. Es un compuesto de naturaleza lipofílica y no ionizada. Su nombre se debe a la semejanza funcional con la melanina, ya que es capaz de producir el aclaramiento de la piel de los renacuajos producto de una acumulación de melanina alrededor de los melanóforos (4, 36, 37, 45).

La GP no es el órgano exclusivo para sintetizar a la MEL, ya que hay sitios extrapineales que también pueden sintetizarla. En la retina, el intestino y la glándula Harderiana de los roedores hay indicios de la presencia de Hidroxiindol-O-metiltransferasa (HIOMT), enzima que participa en la conversión de serotonina (5-HT) a MEL, además, por medio de técnicas inmunohistoquímicas se ha verificado la conversión de (5-HT) en MEL por la retina y por otro lado, se han detectado niveles de MEL residuales después de una pinealectomía, tanto en oveja como en rata, sin embargo, la GP es la responsable de sintetizar la mayor cantidad de MEL presente en el organismo (4, 15, 41, 65).

La MEL es capaz de producir diferentes efectos endocrinos y conductuales en mamíferos y vertebrados inferiores. Muchos de estos efectos han sido relacionados con los ciclos reproductivos y de iluminación ambiental. (4, 15, 36, 37, 45, 50, 71)

Axelrod y Wurtman encontraron que la GP de los mamíferos sintetizaba MEL en función de la iluminación ambiental dándole la propiedad de transductor neuroendócrino. Reiter encontró que los ciclos circanuales de reproducción del hámster están regulados por la GP (4, 15).

Estudios en ovejas como los de Woodfill y cols., han encontrado una relación entre la GP los fotoperíodos y los ciclos reproductivos anuales. Otros estudios (O'Callaghan y cols.), han relacionado las pinealectomías con ciclos de luz cortos (8.5h) y los ciclos

reproductivos encontrando algunas diferencias entre los controles usados y los animales tratados (50, 71).

Esta hormona pineal, además de producir ciertas funciones neuroendocrinas como son la sincronización del ciclo de reproducción, presenta varios efectos farmacológicos como: sueño y sedación (Holmes and Sudgen, 1982), analgesia y actividad anticonvulsiva (Sudgen, 1983), así como efectos ansiolíticos (Golombek y Cardinali, 1993), todos ellos estudiados en ratas (4, 23, 41).

Actualmente, se sabe que los efectos de la MEL dependen de la fase del ciclo circadiano en que se administre, siendo mayor la respuesta alrededor de la transición del ciclo luz-obscuridad (23).

El efecto ansiolítico producido por la administración de MEL, presenta una variación durante el día y se ha visto que conforme se va acercando la fase de obscuridad, el efecto ansiolítico se incrementa llegando a un máximo en la noche alrededor de las 12 a las 2 a. m. (23)

### 2.3.1 Síntesis y metabolismo de la MEL.

La síntesis de MEL comienza en los pinealocitos ya que estos captan al aminoácido triptofano, el cual es modificado por una serie de enzimas hasta sintetizarse la MEL.

El primer cambio que sufre el triptofano es debido a la triptofano hidroxilasa, la cual nos da como producto al 5-hidroxitriptofano, una posterior descarboxilación por una enzima que participa también, en la biosíntesis de las catecolaminas, actúa sobre ésta última molécula obteniéndose de esta forma la 5-HT (4).

La 5-HT sufrirá dos pasos enzimáticos antes de ser convertida en MEL. El primero de ellos es una acetilación, la cual es llevada a cabo por la serotonina-N-acetiltransferasa

(NAT), el metilo será donado por la acetilcoenzima A y se obtendrá como producto la N-acetilserotonina. El segundo paso, el cual nos dará como producto final la MEL, se lleva a cabo por la enzima Hidroxiindol-O-metil transferasa (HIOMT), la cual se encarga de transferir un grupo metilo de la S-adenosil-meteonina al grupo 5-hidroxi de la N-acetilserotonina (figura 8)<sup>(4)</sup>.

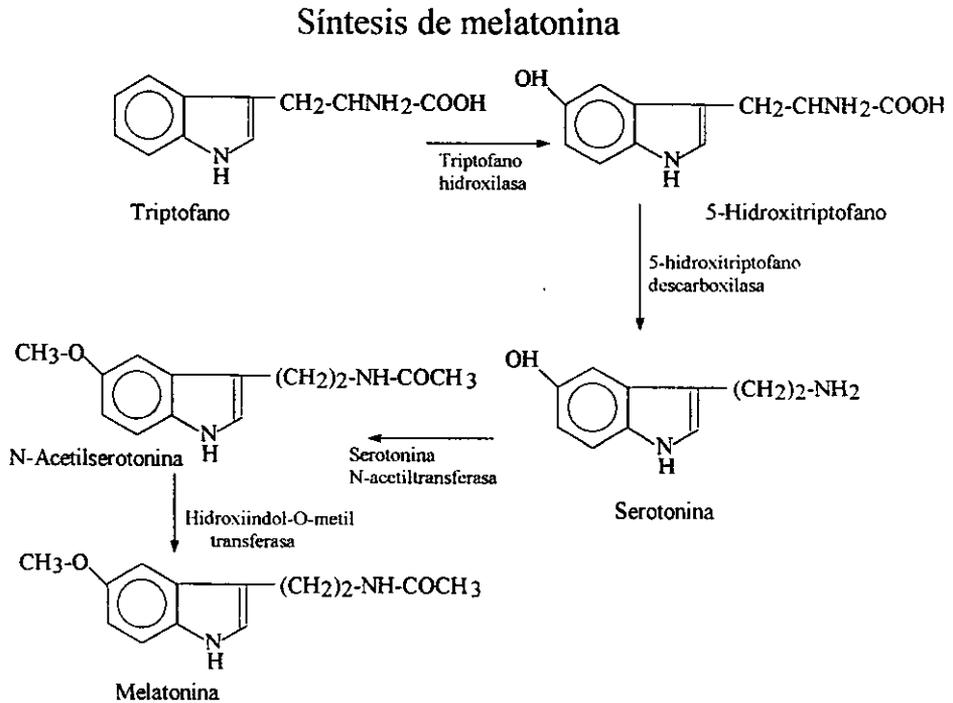


Figura 8. La síntesis de MEL se lleva principalmente en la GP, se sintetiza a partir del triptofano y por medio de una serie de reacciones enzimáticas en las cuales la enzima HIOMT dará como producto final la melatonina <sup>(4)</sup>.



En el cerebro de rata, se ha encontrado que la MEL administrada por vía intracisternal, es rápidamente metabolizada. En administraciones ventriculares e intracisternales, la MEL se concentra principalmente en el hipotálamo (4).

Se han encontrado receptores a melatonina, los cuales pueden identificarse con iodomelatonina (un radioligando de alta afinidad), estos receptores se dividen en ML1 y ML2, lo cual se debe al grado de afinidad que estos presentan por la iodomelatonina así como a diferentes propiedades farmacológicas y cinéticas, los receptores ML1, se han subdividido en 3 subtipos, ML<sub>1a</sub>, ML<sub>1b</sub>, y ML<sub>1c</sub>, los cuales han sido determinados por hibridación "in situ" de mRNA, mediante la reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa y autoradiografía con iodomelatonina (15, 41).

Los receptores a MEL, se han encontrado en tejidos tanto neuronales como no neuronales de varias especies de vertebrados incluyendo al hombre, y la distribución de los mismos puede cambiar tanto en especie como en sexo (15, 49).

Los receptores a MEL en la retina y los colículos superiores están implicados en la regulación de funciones visuales, mientras que los que se encuentran en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, están relacionados con los ciclos circadianos y reproductivos. Los receptores a MEL en el núcleo paraventricular del tálamo, se relacionan con la función límbica. Los receptores no neuronales del pars tuberalis están relacionados con los ciclos reproductivos, mientras que los que están en arterias tanto cerebrales como caudales regulan la función cardiovascular y de temperatura (15, 41, 49).

Se han propuesto mecanismos diferentes para ambos tipos de receptores, de ahí que los receptores ML1 se caractericen por pertenecer a la familia de receptores acoplados a proteína G y que son capaces de inhibir la adenilato ciclasa, se han visto relacionado con los

ritmos circadianos y la reproducción, en cambio, los receptores ML2, pertenecen a los receptores que activan la hidrólisis de fosfoinositol vía proteína G, sin embargo, su localización presenta diversas dificultades y por lo tanto es difícil de predecir sus funciones fisiológicas, en ambos casos, estos receptores son dependientes de GTP, el cual mediaría sus posibles acciones sobre las enzimas como la adenilato ciclasa y la fosfolipasa (15, 41, 49).

La estructura de los receptores a MEL, es correlacionada con la de las proteínas G; utilizando el mRNA del melanóforo de *X. Laevis*, se logró codificar una proteína con gran afinidad a iodomelatonina. Ésta proteína, tiene 420 aminoácidos con siete dominios hidrofóbicos transmembrana, sin embargo, contrariamente a lo que se suponía, presenta una baja homología con los receptores acoplados a proteína G (15, 41).

Se han estudiado una serie de análogos a MEL, encontrando que el grupo metoxi y la amina están involucrados en la unión de la MEL a su receptor ML1, mientras que el grupo indol no es tan esencial ya que soporta ligeros cambios en lo que respecta a las posiciones 2 y 6, además, éste grupo puede ser sustituido por un naftaleno sin pérdida de la afinidad, la sustitución del N en el indol por bioisómeros como el O y S resulta en una ligera pérdida de afinidad, mientras que grupos voluminosos como el fenilo pueden resultar en compuestos antagonistas como el luzindol. Para el receptor ML2, se tienen pocos datos e relación a su estructura-actividad (15, 41, 43).

La MEL podría ser utilizada en el tratamiento de enfermedades relacionadas con los ritmos circadianos, el fenómeno del Jet-Lag, insomnio, epilepsia y convulsiones, ansiedad, e incluso se ha planteado su uso en el tratamiento de las depresiones de temporada o invernales (estacionales) (41).

## 2.4 Receptores involucrados en la ansiedad.

### 2.4.1 Receptores a GABA

Las BZP actúan sobre los receptores asociados al GABA, esto ha sido demostrado por estudios de autoradiografía, así como con diferentes antagonistas de este receptor y que son capaces de desplazar a las BZP del mismo (61).

Hay investigaciones que demuestran que la MEL interactúa con el GABA, siendo capaz de disminuir las concentraciones de GABA en cerebro y modificar la unión GABA-benzodiazepina en membranas neuronales. También, se ha visto que los efectos sobre la actividad locomotriz, así como anticonvulsivos, analgésicos y ansiolíticos producidos por la MEL, son bloqueados por el flumazenil, un antagonista de los sitios centrales de unión a BZP y por ende a GABA (23).

No solo las BZP son capaces de unirse a los receptores a GABA, también los barbitúricos y otra gran cantidad de compuestos tanto depresores como estimulantes del SNC se unen a estos receptores (34).

El receptor de GABA es una glucoproteína heterooligomérica de 200 a 400 kDa constituida al menos por tres subunidades distintas y de estequiometría aún desconocida, estas subunidades se han denominado alfa( $\alpha$ ), beta( $\beta$ ) y gamma( $\gamma$ ). La unión de estas subunidades forma canales al ión cloro ( $\text{Cl}^-$ ). Los receptores a GABA pueden contener diferentes tipos de subunidades lo que les confiere diferente actividad farmacológica y mientras que el GABA requiere de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  para unirse, las BZP requieren de la subunidad  $\gamma$  (5, 34).

En la figura 10 se presenta un modelo hipotético del receptor GABAérgico y su relación con los canales iónicos de  $\text{Cl}^-$ .

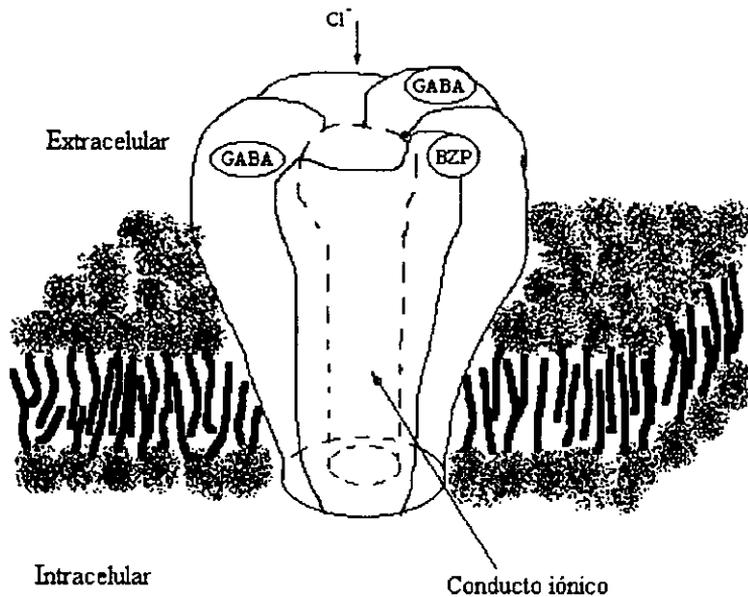


Figura 10. En este modelo se puede apreciar el complejo macromolecular de la proteína heterooligomérica que conforma al receptor GABAérgico, así como la unión a las BZP y como rodean al canal iónico de  $\text{Cl}^-$  con el cual están íntimamente relacionados (3, 34).

El GABA es un neurotransmisor inhibitor del SNC y se sabe que las BZP potencian esta neurotransmisión en todos los niveles del neuroeje como médula espinal, hipotálamo, hipocampo, sustancia nigra, corteza cerebelosa y corteza cerebral. La potenciación producida por las BZP se debe a una hiperpolarización de membrana reduciendo así la frecuencia de descarga de las neuronas. Las BZP no sustituyen al GABA, sino que interactúan con él aumentando la conductancia de iones  $\text{Cl}^-$  debido a una mayor frecuencia en la apertura de estos canales (34).

Por otro lado, los fármacos introducidos en el tratamiento de la ansiedad y que actúa sobre receptores a serotonina (5-HT), en específico de 5-HT<sub>1A</sub>, como la BUS, han dejando a un lado el clásico complejo benzodiazepina-GABA-canal de cloro (3, 34).

#### 2.4.2 Receptores a serotonina (5-HT)

Los receptores 5-HT, pueden estar involucrados en la regulación de la ansiedad, esto lo han demostrado numerosos experimentos con compuestos que actúan sobre los mismos y que han sido evaluados en diversos modelos de ansiedad (5). Los receptores 5-HT son numerosos en el cerebro encontrándose 4 tipos de receptores (5-HT<sub>1-4</sub>) con 5 subtipos de receptores 5-HT<sub>1</sub>, (5-HT<sub>1A-E</sub>), de los cuales el 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1C2</sub> y 5-HT<sub>3</sub> están implicados en la ansiedad. Los receptores 5-HT<sub>1A</sub> han sido ampliamente estudiados en lo que se refiere a su distribución, localización, mecanismos de acción y estructura (3, 12, 33).

En la rata, estos receptores se encuentran ampliamente distribuidos en las neuronas del hipocampo, septum y raphe (3, 28, 33).

Los compuestos antagonistas de los receptores 5-HT<sub>1C2</sub> como la ritanserina, pueden utilizarse en el tratamiento de la ansiedad, ya que hay datos experimentales que sugieren que estos receptores están involucrados en la expresión de síntomas y respuestas autonómicas condicionadas de la ansiedad (3).

En el caso de los receptores 5-HT<sub>3</sub>, se menciona el posible potencial de los antagonistas a tales receptores en el tratamiento de la ansiedad, como lo muestran estudios ansiolíticos en algunos animales y estudios preliminares en humanos. Este tipo de receptores se encuentra en sistema nervioso periférico, por lo cual puede mediar algunas de las acciones estimulantes de los receptores 5-HT (3, 12).

Se plantean varios mecanismos (figura 11) por medio de los cuales estos receptores (principalmente el 5-HT<sub>1A</sub>) pueden llevar a cabo su efecto ansiolítico, sin embargo, esto aún es incierto.

Entre los mecanismos planteados, esta el de un efecto postsináptico del hipocampo sobre el raphe, es en esta última estructura en donde se encuentran autoreceptores a 5-HT, los cuales son capaces de reducir la síntesis y liberación de la misma, sin embargo, se han hecho experimentos que demuestran que el efecto también puede ser presináptico (3, 19, 28, 33, 39).

Otro mecanismo planteado es que los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, mimetizan la función inhibitoria de la 5-HT sobre células piramidales y la cual es debida a una posible hiperpolarización por la apertura de canales de K<sup>+</sup>, esta inhibición es dada por la inervación de raphe sobre hipocampo, la cual es inversa al primera en donde la acción postsináptica es sobre raphe y no sobre hipocampo (1, 33).

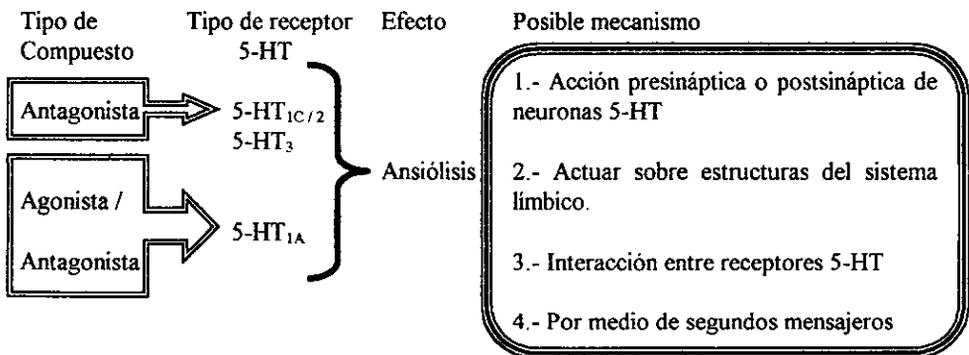


Figura 11. Los mecanismos por los cuales se obtiene un efecto ansiolítico involucrando receptores 5-HT, son aún difusos y solo se tienen hipótesis obtenidas en base a los experimentos realizados con compuestos tanto agonistas como antagonistas a estos receptores, la posibilidad de que éstos compuestos actúan de diferente forma, tiene sus ventajas ya que, también la ansiedad es una enfermedad bastante compleja (3, 28, 33)

Hay datos que indican que una interacción de los receptores 5-HT puede ser la causante del efecto ansiolítico, esto se ha dado debido a que los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2</sub>,

pueden ser bloqueados por el agonista 8-OH-DPAT el cual es específico para receptores 5-HT<sub>1A</sub>, también, se ha visto que los receptores 5-HT<sub>1A</sub> son capaces de disminuir el número de receptores tanto 5-HT<sub>2</sub> como 5-HT<sub>3</sub> (3).

Esta última propuesta, puede ser la causante de los efectos tan controvertidos que se han obtenido al evaluar el efecto ansiolítico de los compuestos que actúan sobre receptores 5-HT, por otro lado, pueden presentar ventajas sobre aquellos compuestos que actúan sobre un solo tipo de receptor, ya que la ansiedad involucra varios sistemas y es más compleja de lo que se creía (3, 33).

El último mecanismo de acción planteado, es el de que los receptores 5-HT no tengan una actividad intrínseca sino que actúen por medio de segundos mensajeros como las proteínas Gi o Gi acopladas, esta hipótesis surge debido que los resultados obtenidos con compuestos que actúan sobre receptores 5-HT varían dependiendo del nivel cerebral al que se administren (1, 3, 33).

#### 2.4.3 Otros receptores involucrados

Entre los receptores que más se mencionan y que tienen relación con la ansiedad están los sistemas a colecistocinina (CCK), neuropéptido Y, factor liberador de corticotropina, adenosina, el sistema vía N-Metil-D-Aspartato (NMDA) y vías dopaminérgicas (3, 19).

#### 2.5 Modelos de ansiedad y Plus-Maze.

El desarrollo de nuevos fármacos de tipo ansiolítico, se ha incrementado por varias razones, la primera es que las benzodiazepinas que son comúnmente empleadas en el tratamiento de la ansiedad, muestran una serie de efectos indeseables como la sedación la

amnesia y la dependencia, la segunda es porque actualmente, los tratamientos para la ansiedad no tienen una adecuada farmacoterapia y la tercera es debida a la baja sensibilidad de los modelos sobre receptores 5-HT<sub>(31, 52)</sub>.

Los modelos utilizados para evaluar compuestos ansiolíticos deben contar con 3 puntos principales:

1. No dar falsos positivos, es decir que la actividad se presenta tanto en el modelo como en casos clínicos (27).
2. No dar falsos negativos, debidos a que el fármaco no es detectado por el modelo, y que este si tenga en realidad actividad en casos clínicos (27).
3. Que tenga una fuerte correlación entre la eficacia clínica y la actividad mostrada en el modelo (27).

Actualmente, se planea la concepción de nuevos modelos que permitan evaluar el perfil ansiolítico de los compuestos sintetizados, esta concepción está basada en que varios de los modelos utilizados para determinar el perfil ansiolítico, recurren a estímulos nocivos como choques eléctricos, situaciones estresantes y procedimientos tales como privación del agua y/o alimento y, que no tienen relación alguna con los casos clínicos, mecanismos neuronales o bioquímicos del hombre incluso, en ocasiones, no hay una similitud entre el tratamiento farmacológico en humanos y los modelos animales ( 3, 27, 52).

El diseño de modelos que puedan sustituir a los ya existentes, debe considerar antes que nada la sensibilidad a los fármacos ansiolíticos de tal forma que se puedan evaluar la conducta y los mecanismos psicológicos por medio de los cuales actúan y, que por lo tanto permitan el cernimiento de nuevos fármacos tanto de origen natural como sintéticos con un posible efecto ansiolítico( 58 ).

Los modelos para evaluar el efecto ansiolítico se pueden clasificar de la siguiente manera:

### 1. Pruebas de castigo.

Estos procedimientos también son llamados pruebas de conflicto, han sido ampliamente usados para evaluar los efectos ansiolíticos y se basan en presentar un estímulo adverso que se contrapone a un comportamiento normal del animal, sin embargo, la respuesta dada entre el estímulo y el comportamiento ha impedido establecer la sensibilidad de las mismas ya que la respuesta dependerá de la intensidad del castigo. Este castigo será mejor tolerado cuando se administren sustancias que puedan de alguna manera suprimir el miedo a tal castigo, (3, 27, 58). En este tipo de pruebas se tiene la desventaja de presentar falsos positivos (27), como ejemplo de estas pruebas están las siguientes:

1.1 Prueba de los cuatro platos.

1.2 Privación de agua.

1.3 Respuesta operante condicionada.

1.4 Comportamiento pasivo.

### 2. Respuesta condicionante con estímulo adverso.

Este tipo de pruebas es usado en la evaluación y cernimiento de fármacos ansiolíticos. Estas pruebas involucran la asociación de un comportamiento animal con un estímulo adverso el cual será controlado por el mismo, ya que si cesa de emitir la respuesta castigada, entonces, es posible evadir el estímulo adverso sin embargo, se ha notado que no hay comportamientos particulares cuando se utilizan este tipo de pruebas ya que son llevadas bajo condiciones especiales y que no necesariamente están relacionadas con la ansiedad (27, 58). Estas técnicas, son referidas comúnmente como procedimientos de conflicto.

Aunque hay autores que no confían en estos métodos debido a que tienen poca validez como modelos de ansiedad clínica, otros los consideran válidos ya que hay otras pruebas que usan estímulos adversos y que son utilizados en la evaluación de fármacos con posible efecto ansiolítico (58). Entre las pruebas que caen dentro de este apartado tenemos:

2.1 Supresión condicionada.

2.2 Respuesta inicial potenciada.

### 3. Comportamiento explorador.

Las pruebas que evalúan la actividad motriz y la exploración son ampliamente utilizadas en el estudio de fármacos psicotrópicos. Hay una gran variedad de pruebas que tienen la ventaja de ser rápidas y no requerir de equipos caros y complejos, pero a veces estos cambios conductuales observados y cuantificados no son muy claros y por lo tanto la interpretación de la acción del fármaco se ve complicada. La evaluación de este tipo de pruebas surge de la hipótesis de que los roedores tienen por naturaleza el explorar nuevos lugares y que por consiguiente les produce ansiedad, la cual dependerá de lo novedoso de la situación (27, 31, 52, 58). Obviamente, aquellos fármacos que puedan reducir estos mecanismos, serán capaces de aumentar los niveles exploradores y reducir la ansiedad. Muchos procedimientos han sido utilizados bajo estas condiciones y, que además se ha visto que tienen cierta sensibilidad a fármacos con posible acción ansiolítica (58). Entre las pruebas más utilizadas están:

3.1 Prueba de la escalera.

3.2 Laberintos elevados.

3.3 Interacción social.

3.4 Prueba de luz-obscuridad

### 3.5 Prueba de los hoyos.

#### 4. Interacción con fármacos ansiogénicos.

En la prueba de interacción con fármacos ansiogénicos, se utiliza el compuesto pentilentetrazol (PTZ) y se basa en la interacción de los compuestos ansiolíticos con este para revertir los efectos causados por el mismo y que de alguna manera nos representan un estado de ansiedad. Este método presenta un paradigma ya que tiene la desventaja de actuar sobre receptores tipo GABA y por lo tanto aquellos compuestos que actúen mediante otro mecanismo no serán detectados pero, por otro lado, presenta una correlación con una  $r=0.89$  entre el efecto ansiolítico y las dosis clínicas (27, 58).

En lo que se refiere a los modelos contenidos en los apartados de pruebas de castigo y respuesta condicionada con estímulo adverso, se encuentra la principal desventaja que radica en que los estímulos nocivos utilizados no son “naturales” completamente además, alteran el comportamiento del individuo, siendo por lo tanto un comportamiento condicionado. Aunque, muchos compuestos benzodiazepínicos así como algunos análogos han sido evaluados en este tipo de modelos se ha visto que la BUS, presenta resultados que no han sido reproducibles en varios de ellos (3, 58).

De esta manera, los modelos que toman en cuenta el comportamiento conductual natural y no el condicionado para la evaluación de fármacos ansiolíticos son mejor aceptados por varios grupos de investigadores (3, 58).

En los últimos 10 años, se ha venido utilizando un modelo que se basa en el comportamiento explorador de los roedores y que esta incluido en el apartado de laberintos elevados, este modelo es el **Plus-Maze** (52, 58).

Este modelo se basa en estudios hechos por Montgomery en 1958 quien observó que en los laberintos elevados y abiertos, se creaba un conflicto cuando los roedores se acercaban o alejaban de los bordes, en cambio, cuando se utilizaban laberintos elevados cerrados el comportamiento explorador era mayor (31, 52).

Con estas observaciones, en 1985 Pellow y col. (31, 52) desarrollaron y validaron un nuevo modelo para la evaluación del perfil ansiolítico en roedores como la rata y el cual denominaron **Plus-Maze** (52).

En este modelo, encontraron que las ratas prefieren los brazos o zonas cerradas, lo cual se refleja por el número de entradas así como el tiempo de permanencia en los mismos y que es mayor al compararlo con el número de entradas y tiempo de permanencia en las zonas o brazos abiertos, ya que estos últimos reflejaban una aversión provocada por la ansiedad debida a lo novedoso de la situación, por otro lado, la entrada y salida total de los brazos nos representa una correlación de la actividad motriz (31, 52).

Este modelo experimental además de ser barato y sencillo, es rápido y está basado en cuantificar el comportamiento espontáneo de los roedores sin tener algún estímulo que pueda representar un condicionamiento. Además, es capaz de diferenciar entre compuestos con efecto ansiolíticos y ansiogénicos (31, 52).

Los resultados obtenidos en el **Plus-Maze** cuando se administran compuestos que actúan sobre sistemas GABA, son reproducibles y consistentes y, se ha visto que cuando se evalúan compuestos 5-HT, los resultados no son tan consistentes y reproducibles debido a una variabilidad que es dependiente de la cepa usada así como del sitio de administración y las condiciones experimentales utilizadas, lo cual nos habla de una variedad multifactorial (12,

Un factor importante en el **Plus-Maze** es la iluminación usada, ya que cuando ésta es muy brillante, se provoca una aversión por los brazos abiertos, esto último no siempre ha sido observado, sin embargo, cuando la luz es tenue con respecto al lugar en que originalmente se encuentran los animales, se hace más sensible la detección del efecto ansiolítico (31).

El **Plus-Maze** ha sido empleado por un gran número de investigadores de tal forma que en los cinco años anteriores a 1996 ha sido reportado su uso en mas de 100 laboratorios de investigación así como en muchas compañías farmacéuticas para la evaluación de la ansiedad así como de nuevos compuestos con potencial ansiolítico (31).

### 3.- Planteamiento del problema.

La ansiedad es un comportamiento común del individuo, sin embargo, por diversas causas o motivos puede llegar a situaciones extremas en donde tiende a desencadenar patologías dando origen a la depresión la cual es difícil de tratar ( 8, 24, 32 ).

Los fármacos utilizados en el tratamiento de la ansiedad se denominan ansiolíticos, son de uso prolongado, por lo cual se tienen ciertas precauciones en su uso, debido a la presencia de reacciones adversas ( 20, 24, 51 ). Estos fármacos actúan sobre diferentes receptores entre los que tenemos el GABA que es el caso de las BZP o bien de tipo serotoninérgico como la BUS ( 3, 28, 48, 61 ). Hasta la fecha, se ha reportado que las BZP no solo tienen un efecto ansiolítico, sino que también producen reacciones adversas, las cuales al parecer no se han visto en el tratamiento de la ansiedad con la BUS ( 21, 24, 34, 61 ).

En el caso de la MEL, se habla de un posible efecto ansiolítico, el cual puede ser mediado por receptores a GABA, vías serotoninérgicas o bien ambos ( 5, 23, 41, 47, 55 ).

También se han realizado estudios sobre diferentes zonas del cerebro que pueden estar relacionadas con la ansiedad, entre las zonas de las cuales se tiene referencia, están la amígdala central y basolateral, el núcleo medio del raphe, el periacueducto dorsal gris, hipocampo dorsal y el septum. ( 1, 5, 44, 53, 54 )

En el presente, trabajo se utilizan tres tipos de compuestos, dos fármacos como el CDP que pertenece a la familia de las BZP y que actúa sobre receptores tipo GABA así como la BUS que es un fármaco ansiolítico mediado por receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>, y por último la MEL que es la principal hormona de la GP y que se ha reportado con efecto ansiolítico y de la cual se desconoce su mecanismo de acción.

A estos tres compuestos se les caracterizará el efecto ansiolítico después de ser administrados vía intracerebroventricular (IcVtr) en la rata, ya que se ha visto que en administración IcVtr, la MEL se fija principalmente en hipotálamo, lugar en donde se encuentran receptores a MEL y que también pueden estar involucrados en el proceso de la ansiedad o bien el mismo hipotálamo puede regular este proceso (2, 4, 10, 15, 19, 35, 46, 49).

También se han encontrado receptores a GABA en el hipotálamo así como influencias de tipo serotoninérgico (5, 47, 48, 73).

El efecto ansiolítico se evaluará en el modelo del Plus-Maze que utiliza un comportamiento conductual de los animales y no estímulos nocivos y situaciones estresantes controladas que no solo alteran la conducta del animal, sino que también son situaciones que no están muy ligadas con la ansiedad, además, el Plus-Maze es un modelo de ansiedad en el cual fármacos como la buspirona ha presentado mejores resultados que con los métodos que utilizan estímulos nocivos (3, 26, 27, 28, 31).

Este trabajo, nos permitirá determinar si la MEL tiene un efecto ansiolítico al ser administrada a este nivel, así como de datos que nos indicarian si las estructuras que rodean a los ventrículos como el hipotálamo tienen o no relación con el proceso de la ansiedad, además de indicarnos con que tipo de receptores podría estar relacionada su actividad.

#### **4.- Objetivos**

##### **Objetivo general.**

1. Determinar el efecto ansiolítico de CDP, BUS y MEL cuando se administran IcVtr, utilizando el modelo del Plus-Maze.

##### **Objetivos particulares.**

1. Evaluar el efecto ansiolítico del CDP en el modelo del Plus-Maze después de administrarlo IcVtr.
2. Determinar el efecto ansiolítico en el Plus-Maze la BUS cuando se administra IcVtr.
3. Determinar si la hormona MEL, tiene efectos ansiolíticos en el modelo de Plus-Maze al administrarse por vía IcVtr en ratas.
4. Realizar un análisis comparativo de los resultados obtenidos en el modelo de Plus-Maze y la administración de los fármacos CDP, BUS y la hormona MEL administrados IcVtr en ratas.

## 5.- Hipótesis

1. Si el hipotálamo, es una zona cerebral que puede estar involucrada en la regulación de la ansiedad, entonces la administración IcVtr en rata del CDP producirá un efecto ansiolítico en el modelo del Plus-Maze.
2. La BUS al igual que las BZP es un fármaco utilizado en el tratamiento de la ansiedad, su administración por vía IcVtr, producirá en el modelo del Plus-Maze un efecto ansiolítico.
3. La MEL es una hormona que tiene efectos farmacológicos como lo son: promoción del sueño, sedación, analgesia, actividad anticonvulsiva e incluso ansiolíticas. Hay una gran afinidad de MEL a nivel de hipotálamo, por lo cual la administración IcVtr de la misma registrará un efecto ansiolítico en el modelo del Plus-Maze.

## 6.- Material y métodos.

### Material biológico

Se utilizaron 70 ratas macho de la cepa Wistar con peso entre los 250-300g. Todos los animales provienen del bioterio de la Facultad de Medicina y no han sido sometidos a experimentación previa. Los animales de experimentación se mantienen en cajas individuales de acrílico transparente de dimensiones 35X35X25 cm y rejilla de acero inoxidable. Las condiciones ambientales son en un cuarto cerrado bajo ciclos de luz-obscuridad 12:12 las ratas tienen acceso libre de agua y alimento (Purina Rat Chow).

### Material quirúrgico

Pinzas bulldog

Pinzas de disección

Pinzas de disección con dientes

Bisturí (mango #4)

Hoja de bisturí #22

Tijeras curvas cortas

Tijeras curvas largas

Tijeras rectas largas

Portaagujas

Sutura absorbible con aguja 4-0 Dexón.

### Soluciones

Benzal al 10% diluido en agua destilada.

Solución salina isotónica estéril, ABBOT (SSI) a 0.9%

Polietilenglicol al 25%

Acrílico blanco con disolvente. ARIAS.

#### Fármacos y reactivos

Hidrocilina 400, suspensión inyectable, Laboratorios Grossman.

Buspirona hidrocloreuro (Sigma), preparado a 20 mg/mL en SSI estéril

Clordiazepóxido hidrocloreuro (Roche), preparado a 20 mg/mL en SSI estéril

Melatonina (Sigma), preparado a 10 mg/mL en polietilenglicol 200 25%

Anestesal (SmithKline Beechman), Pentobarbital sódico 63 mg/mL.

#### Equipo fijo y aparatos

Plus-Maze. Este equipo se elaboró en la Facultad de Química.

Mesa de operación quirúrgica con plancha térmica, C. F. Palmer.

Estereotáxico con torre marca David Kopf.

Taladro dental marca Emesco con banda No. 908, vel. 12000 r.p.m. y 1/8 H.P.

Rasuradora marca WHAL Senior mod. 850

#### Procedimiento

Se formaron siete grupos aleatoriamente con una n entre 8 y 10, (el grupo 1 tuvo una n=18), los cuales recibieron el siguiente tratamiento:

Grupo 1: Ratas íntegras sin operar.

Grupo 2: Ratas operadas sin tratamiento.

Grupo 3: Ratas operadas tratadas con CDP.

Grupo 4: Ratas operadas tratadas con BUS.

Grupo 5: Ratas operadas administradas con MEL .

Grupo 6: Ratas operadas tratadas con solución salina isotónica (SSI-vehículo).

Grupo 7: Ratas operadas administradas con polietilenglicol al 25% (PEG-Vehículo).

#### Diseño experimental:

Todos los experimentos se realizaron entre las 12:00 y las 16:00 hr. El laboratorio donde se llevaron a cabo es de 2.50 X 6.00 m. se aisló de tal manera que no entre más luz que la proporcionada durante los experimentos, un diagrama de flujo se muestra al final de esta sección.

#### 1) Influencia del tipo de luz en el comportamiento de los animales en el Plus-Maze.

El grupo 1 se dividió en dos subgrupos (cada uno con n=9), uno de los cuales fue sometido al modelo del Plus-Maze con luz blanca (80 lux) proporcionada por las lámparas fijas del laboratorio de experimentación. El segundo grupo se sometió a experimentación con luz roja proporcionada con las mismas lámparas solo que emitían luz roja.

#### 2) Influencia de la cirugía sobre el comportamiento de los animales en el Plus-Maze.

Una vez que se ha elegido el tipo de luz con la cual se va a experimentar, se compararon el grupo control íntegro con el grupo de las ratas operadas. Esta prueba se llevó a cabo como mínimo una semana después de realizada la operación.

#### 3) Caracterización del efecto ansiolítico de los compuestos.

Los fármacos se administraron *IcVtr* en los animales y se evaluó su efecto ansiolítico en el modelo del Plus-Maze bajo las condiciones seleccionadas.

#### 4) Caracterización del efecto ansiolítico de los vehículos.

Los vehículos utilizados para disolver a los fármacos son solución salina isotónica para BUS y CDP y PEG al 25% para la MEL. Estos vehículos se administraron *IcVtr* y se

evaluó su efecto ansiolítico en el Plus-Maze bajo las condiciones establecidas.

### Implantación de cánula intracerebroventricular (IcVtr).

La rata se anestesió con una dosis de 45mg/Kg de anestésico vía intraperitoneal (IP). Se rasuró la parte superior de la cabeza con la ayuda de una rasuradora eléctrica para después colocarla sobre un colchón y una plancha térmica. La cabeza se fijó con la ayuda de un estereotáxico. Se realizó una asepsia con benzal diluido al 10% sobre la zona rasurada. Sobre la línea media sagital se hace un corte separando piel y periostio para dejar al descubierto el cráneo. Con la ayuda del atlas estereotáxico para rata (figura 12) se obtuvieron las coordenadas del ventrículo lateral del cerebro de la rata.

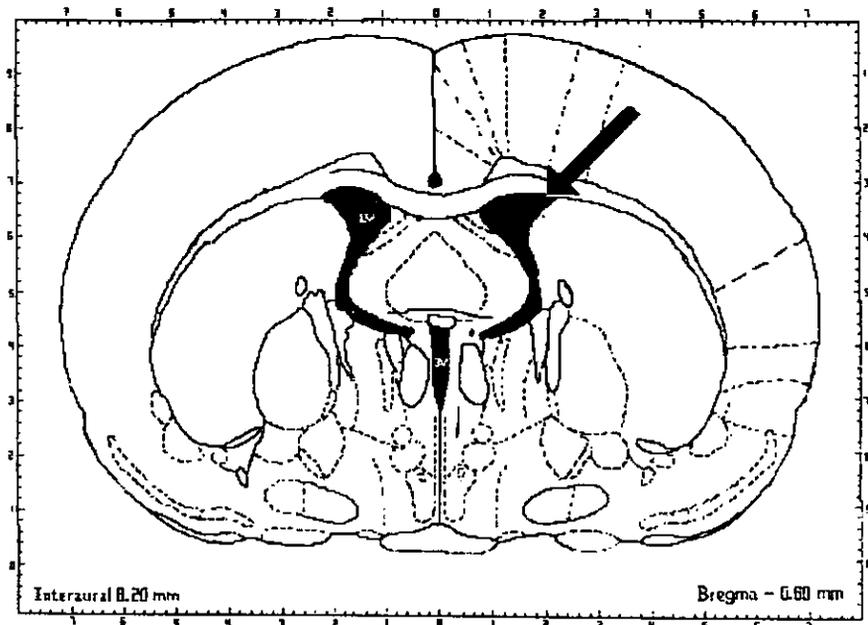


Figura 12. Del atlas estereotáxico para rata (Paxinos and Watson, 1986), se obtienen las coordenadas (flecha en el figura) para la fijación de la cánula en el ventrículo lateral de la rata. La cánula nos permitirá la administración tanto de los vehículos como de los compuestos probados.

Se establecieron las coordenadas para la colocación de la cánula IcVtr. las cuales son: 0.8 mm posterior y 1.4 mm derecha con respecto a bregma, en ese punto, se hace un trépano para la colocación de una cánula de acero inoxidable de 1cm de longitud la cual se hizo a partir de agujas de 21X32 mm. Con ayuda de la torre del estereotáxico, se coloca la cánula y se fija a 3.6 mm de profundidad con acrílico dental y un tornillo que se fija al cráneo de la rata (figura 13).

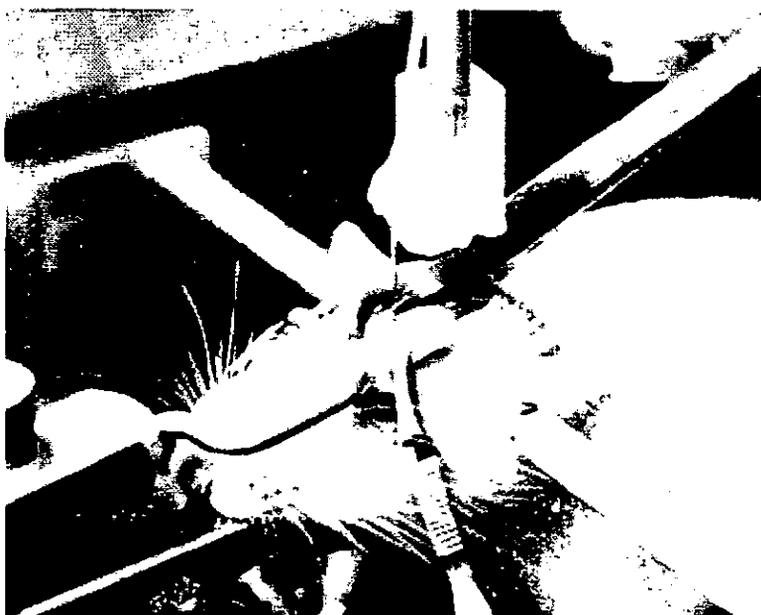


Figura 13. En esta ilustración se aprecia la colocación de la rata en el aparato estereotáxico así como la fijación de la cánula de acero inoxidable con la ayuda de la torre del estereotáxico.

Una vez operados los animales, se les administró 0.2 mL (equivalente a 20 000 U de penicilina) de una suspensión de hidroclina por vía intramuscular (IM) en 1 administración única. Se colocaron en cajas individuales y se dejaron recuperar como mínimo una semana

a las condiciones anteriormente descritas. En caso de infección en la zona operada, se realizó una asepsia con agua oxigenada y violeta de genciana.

### Caracterización del efecto ansiolítico

Administración de los fármacos. A las ratas operadas, se les administraron las sustancias y/o los vehículos entre las 12:00 y las 16:00 hr., ya que en ese horario la secreción de MEL es mínima. Se administraron los fármacos utilizando agujas dentales con una longitud de 11 mm en uno de los extremos, mientras que el otro se une a una cánula de plástico con una longitud de 15 cm aproximadamente. Esta cánula se acopló a una microjeringa Hamilton de 10  $\mu$ l con la cual se administraron las soluciones de los fármacos BUS y CDP así como su vehículo (SSI) en volumen de 0.5  $\mu$ l y 1  $\mu$ l para MEL y su vehículo (PEG).

Experimentos con el modelo del Plus-Maze. El Plus-Maze consiste en un laberinto elevado y que tiene forma de cruz (figura 14). Consta de 2 zonas o brazos abiertos con dimensiones de 50X10 cm y los cuales están encontrados y, dos zonas o brazos cerrados también encontrados y con dimensiones de 50X10X40 cm, en la zona de intersección de los cuatro brazos, se forma un cuadro central cuyas dimensiones son de 10x10 cm, este cuadro es abierto, el Plus-Maze se encuentran sostenido por una plataforma que lo mantienen a 50 cm del piso (31, 52, 58). Las paredes y el piso del Plus-Maze así como la base que lo mantiene elevado son de madera barnizada, las paredes que cubren los brazos cerrados son de color negro, mientras que el piso de los cuatro brazos así como la base es de color gris claro. Posteriormente a la administración, los animales se colocaron por 5 min. en una caja de arena como sugiere Pellow (52) pasado este tiempo e inmediatamente, se colocaron en el cuadro central del Plus-Maze con la cara viendo hacia uno de los brazos abiertos. Se

registró durante 5 min. observando y cuantificando la entrada y salida tanto a las zonas abiertas como a las cerradas, también se registró el tiempo que los animales permanecían en cada una de las zonas, el cuadro central se contará como zona abierta.

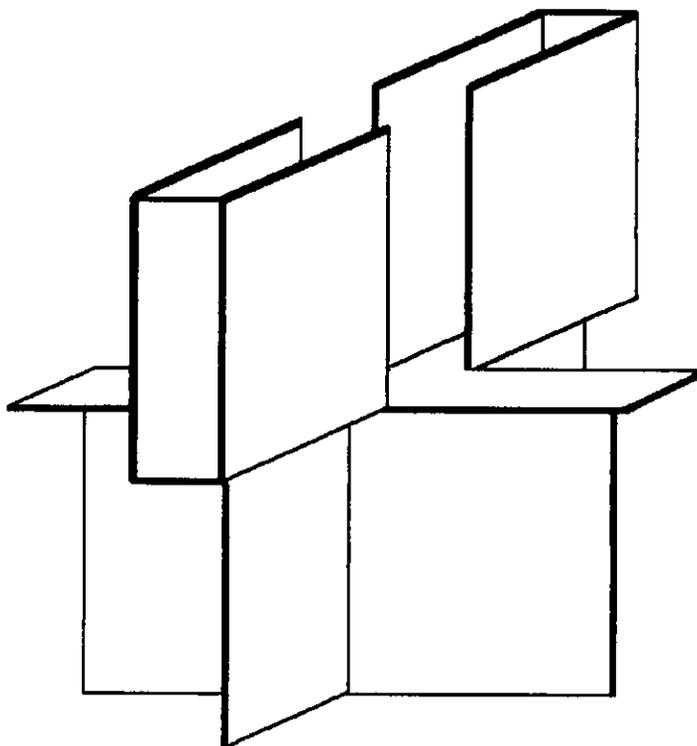


Figura 14. El Plus-Maze consiste de un laberinto en forma de cruz, el cual está a 50 cm del piso. Cuenta con dos brazos abiertos y dos cerrados los cuales son opuestos entre sí<sup>(2,3)</sup>.

En el Plus-Maze se evaluaron los siguientes parámetros:

- 1.- Número total de entradas, el cual se obtiene de la suma obtenida entre las entradas a la zona cerrada y las entradas a la zona abierta.
- 2.- Porcentaje de entradas a cada zona: Es la razón obtenida de las entradas ya sea a la zona

abierta o a la zona cerrada entre el promedio del total de entradas y multiplicado por 100.

3.- Porcentaje de tiempo de permanencia en cada zona el cual es la razón del tiempo de permanencia en la zona abierta o cerrada entre el total del tiempo de prueba que es de 5 min. y multiplicado por 100.

Para el efecto ansiolítico se toma en cuenta el porcentaje de permanencia en la zona o brazos abiertos, ya que éste parámetro nos refleja el grado de ansiedad presente en el animal.

Antes de iniciar los experimentos, se limpió cada una de las zonas Plus-Maze con una solución de jabón y agua, se secó, y posteriormente se lavó con una solución de benzal diluido para después enjuagarse y secarse. Este procedimiento se repite entre cada animal experimentado y es con la finalidad de eliminar rastros que puedan indicar peligro a los siguientes animales por experimentar.

Todos los experimentos realizados se llevan a cabo con el mismo procedimiento y bajo las mismas condiciones. En los experimentos para evaluar la influencia del tipo de luz, solo se omite la administración, al igual que en el control con las ratas operadas.

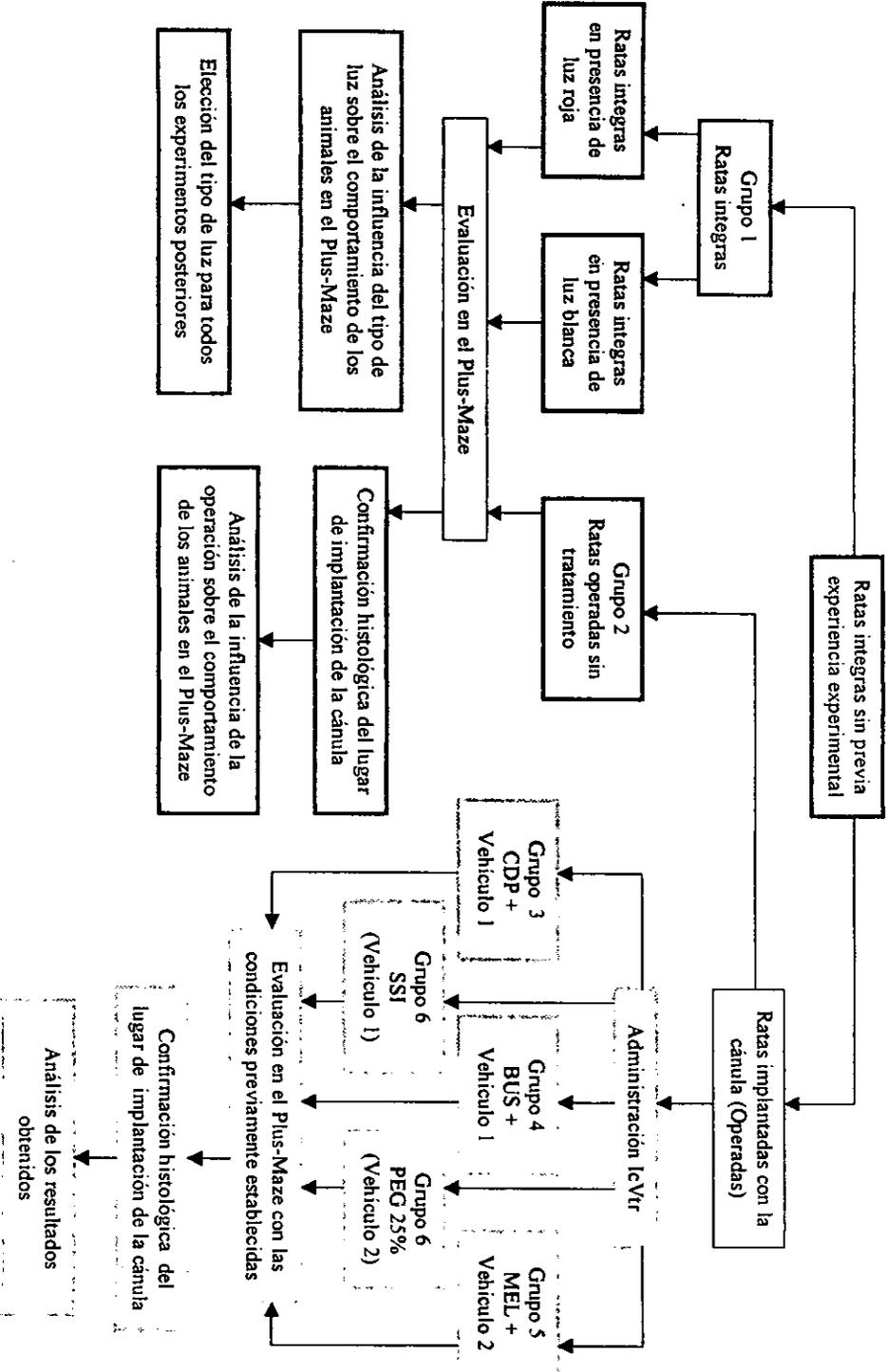
Los resultados son tratados con la prueba estadística de  $\chi^2$  de Bartlett para demostrar la homogeneidad de varianzas. Se hizo una prueba para análisis de promedios con la prueba t-student para varianzas homogéneas o bien la t-studen-Welch para varianzas no homogéneas seguidas con la prueba F para análisis de varianzas homogéneas o la prueba F de Cochran para análisis de varianzas no homogéneas (6).

### Histología

Después de someterlos al Plus-Maze, los animales se sacrifican por dislocación cervical y se perfunden con una solución de formaldehído al 10% para después extraer el

cerebro y colocarlo en una solución de formaldehído al 10% por un mínimo de 1 semana antes de hacer los cortes histológicos, Los cortes se realizan por el método de congelación con carbógeno y con un microtomo. El espesor de los cortes es de 50 micras y se realizan con la finalidad de corroborar el sitio de colocación de la cánula.

DIAGRAMA DE FLUJO



## 7.- Resultados

Con los resultados en los experimentos realizados se elaboraron los cuadros y las gráficas correspondientes.

### 7.1 Influencia del tipo de luz en el comportamiento de los animales en el Plus-Maze.

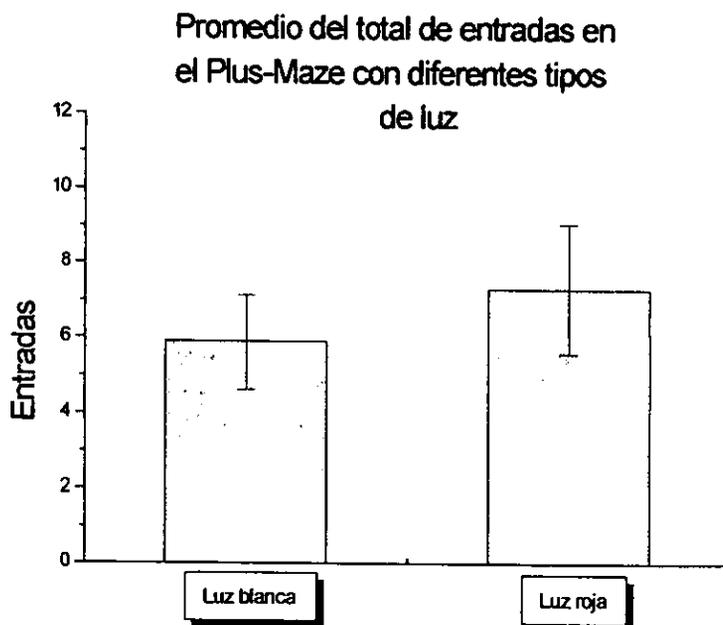
En el cuadro No. 1 se encuentran los resultados promedio ( $\pm$ ESM) de los parámetros medidos en el Plus-Maze como lo son: número total de entradas, porcentaje de entradas en zona abierta y zona cerrada así como los porcentajes de los tiempos de permanencia en la zona abierta y en la zona cerrada. El cuadro nos muestra los resultados de cada grupo tratado (luz roja y luz blanca) en donde se tiene para cada uno una  $n=9$ .

Cuadro No. 1  
Comparación del comportamiento explorador de los animales tanto para luz roja como para luz blanca.

Tipo de luz	Total de entradas	% entradas en zona cerrada	% de entradas en zona abierta	% permanencia en zona cerrada	% permanencia en zona abierta
Blanca	5.88 $\pm$ 1.27	73.58 $\pm$ 14.97	26.42 $\pm$ 9.84	87.37 $\pm$ 5.83	12.63 $\pm$ 5.83
Roja	7.33 $\pm$ 1.74	87.83 $\pm$ 19.69	12.12 $\pm$ 6.60	90.29 $\pm$ 4.02	9.71 $\pm$ 4.02

Cuadro No. 1. Este cuadro nos muestra el comportamiento explorador de las ratas en el Plus-Maze, tanto bajo luz blanca como bajo luz roja. Los resultados muestran el promedio ( $\pm$ ESM) del número de entradas tanto totales como a cada una de las zonas así como el tiempo de permanencia en cada zona del Plus-Maze.

Con los datos del cuadro No. 1 se elabora la gráfica No. 1 en la cual se comparan los promedios del número de entradas totales a los brazos (tanto abiertos como cerrados) del Plus-Maze en cada uno de los tipos de luz utilizados, este parámetro dará un indicio de cómo afecta la iluminación en cuanto a la actividad motriz del animal.

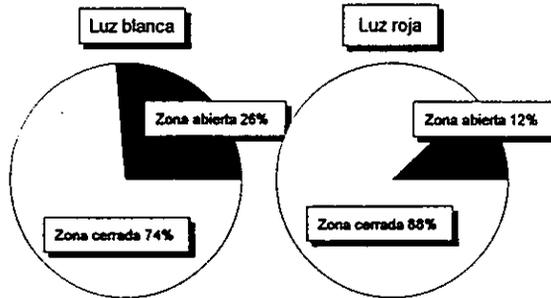


Gráfica No. 1. En esta gráfica se muestra el promedio ( $\pm$  ESM) del número total de entradas para cada tipo de luz. Para esto se toma tanto las entradas a la zona cerrada como a la zona abierta del Plus-Maze. Cada grupo cuenta con una  $n=9$ . No hay diferencias estadísticamente significativas con la prueba "t-student" y la prueba "F".

En la gráfica No. 1, se puede apreciar el efecto que tuvo tanto la luz blanca como la luz roja en el número total de entradas en el Plus-Maze, en ella, se observa que con la luz roja hay un mayor número de entradas con respecto a la luz blanca, sin embargo, no es estadísticamente significativa esta diferencia al aplicar la prueba de "t-student" seguida de la prueba "F".

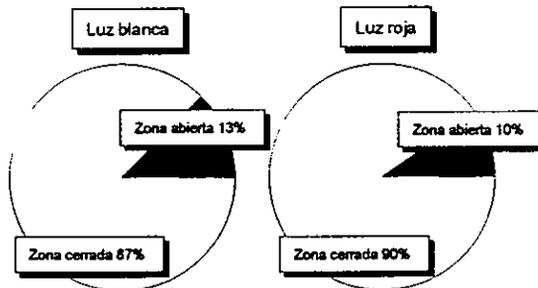
En las gráficas 3 y 4, se observa la distribución de las entradas y de los tiempos en cada zona del Plus-Maze con cada tipo de luz.

**Promedio de entradas en cada zona expresado como un % del total de entradas para cada tipo de luz**



Gráfica No. 2. Esta gráfica muestra el promedio del porcentajes de entradas tanto a la zona abierta como a la cerrada, este porcentaje es obtenido en base al promedio del número total de entradas hechas en cada zona del Plus-Maze. Con la prueba "t-student" y la prueba "F" no hay diferencias estadísticamente significativas.

**Promedio de tiempo en cada zona expresado como % del tiempo total para cada tipo de luz**



Gráfica No. 3. El promedio del porcentaje de tiempo de permanencia en ambas zonas tanto en luz blanca como en luz roja, es muy parecido como se ve en la gráfica, al igual que con el número de entradas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con prueba "t" y la prueba "F".

La comparación del promedio de entradas, expresado como un porcentaje del total de las entradas a la zona abierta así como en la zona cerrada del Plus-Maze, se observa en la gráfica No. 2, en esta gráfica se ven las diferencias mostradas en las entradas cuando los animales son sometidos a los diferentes tipos de luz.

De la gráfica No. 2, se puede apreciar que con luz roja, la distribución de las entradas en la zona cerrada (12.12 %) es mucho menor que en la zona blanca (26.42%), sin embargo, al aplicar la prueba "t-student" y la prueba de "F", estos valores no son estadísticamente significativos.

La gráfica No. 3 muestra la distribución del tiempo que permanece el animal tanto en la zona cerrada como en la zona abierta del Plus-Maze, también se hace una comparación entre los resultados obtenidos con los tipos de luz utilizados, los promedios expresados como un porcentaje son tomados con respecto al tiempo total de la prueba que es de 5 min.

Al igual que como sucede con el número de entradas en cada zona del Plus-Maze para cada tipo de luz, no hay una diferencia estadísticamente significativa en el tiempo de permanencia en la misma zona, y esto se puede apreciar en la gráfica No. 3, en donde el tiempo de permanencia en la zona abierta para la luz blanca es aproximadamente del 13.0 % el cual es muy parecido al presentado por la luz roja que es del 10.0%.

Con las gráficas anteriores y las pruebas de hipótesis, nos damos cuenta de que las entradas así como el tiempo de permanencia en la zona abierta que son los parámetros que nos permitirá evaluar el estado ansioso de los animales sometidos al Plus-Maze (1), no presenta una diferencia significativa entre los dos tipos de luz empleados.

## 7.2 Influencia de la operación quirúrgica en el comportamiento de los animales en el Plus-Maze

En este apartado, se comparó un grupo control (grupo tratado con luz roja) contra un grupo operado (implantado con la cánula) evaluándose su comportamiento en el Plus-Maze. El grupo operado también está bajo la influencia de luz roja.

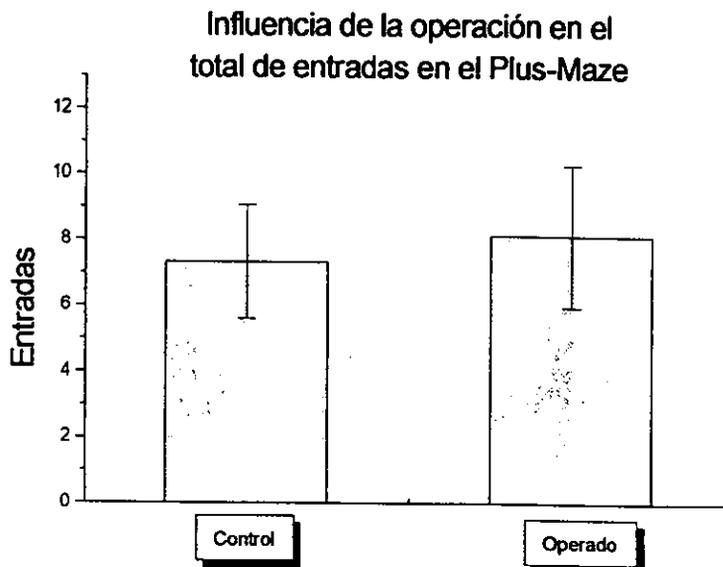
En el cuadro No. 2 se encuentran los resultados promedio ( $\pm$ ESM) del número de entradas totales y de los porcentajes de los parámetros de entradas y tiempos de permanencia en cada una de las zonas del Plus-Maze tanto para el grupo control como para el operado.

**Cuadro No. 2**  
Comparación del comportamiento explorador en el Plus-Maze de los animales íntegros y operados.

Grupo	Total de entradas	% entradas en zona cerrada	% de entradas en zona abierta	% permanencia en zona cerrada	% permanencia en zona abierta
Control	7.33 $\pm$ 1.74	87.83 $\pm$ 19.69	12.12 $\pm$ 6.60	90.29 $\pm$ 4.02	9.71 $\pm$ 4.02
Operado	8.14 $\pm$ 2.17	71.93 $\pm$ 21.00	28.07 $\pm$ 12.19	88.38 $\pm$ 4.07	11.57 $\pm$ 4.25

Cuadro No. 2. Este cuadro nos muestra los datos del comportamiento explorador de las ratas en el Plus-Maze, tanto para los animales íntegros como para los operados. En esta tabla se cuantifica el promedio ( $\pm$ ESM) del número de entradas totales así como el promedio ( $\pm$ ESM) del porcentaje de entradas y el tiempo de permanencia en cada zona del Plus-Maze. El grupo control tiene una n=9 mientras que el operado tiene una n=7.

Una representación del promedio del número de entradas totales en el Plus-Maze, se presenta en la gráfica No. 4, en este aspecto, no se observa un incremento o disminución estadísticamente significativa del promedio del número de entradas en el Plus-Maze del grupo operado con respecto al grupo control.



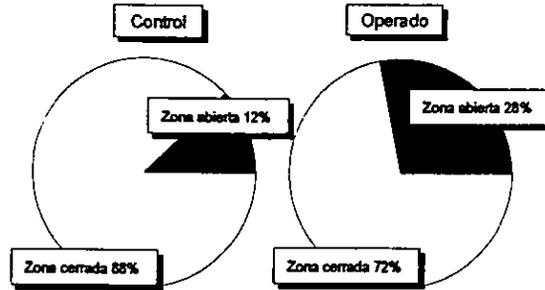
Gráfica No. 4. En esta gráfica se aprecia que el promedio ( $\pm$ ESM) del número total de entradas en cada una de las zonas del Plus-Maze, es similar tanto para el grupo control como para el operado, en ambos grupos, no hay diferencias estadísticamente significativas.

Las gráficas 5 y 6 se elaboraron a partir de los resultados del cuadro No. 2. En ellas se comparan los promedios expresados como porcentajes del número de entradas y los tiempos de permanencia en cada zona para cada grupo tratado.

De la gráfica No. 5 se puede observar que las entradas en la zona abierta son mayor para los animales operados que para los íntegros, sin embargo, la prueba "t-student" y la prueba "F" nos indica que no son estadísticamente significativos.

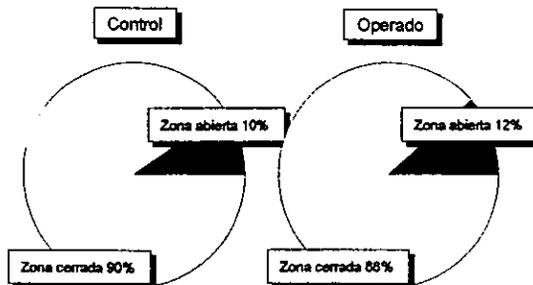
En las gráficas 5 y 6, se puede apreciar que la operación no tiene influencia en el número de entradas y tiempo de permanencia en la zona abierta tanto para el grupo íntegro como para el grupo operado.

**Promedio de entradas en cada zona expresado como un % del total de entradas tanto para grupo control como operado.**



Gráfica No. 5. Está gráfica muestra el promedio del número de entradas tanto en la zona abierta como en la zona cerrada, estas son expresadas como un porcentaje del número total de entradas hechas en el Plus-Maze. No hay diferencia estadística con la prueba de "t" y la prueba "F".

**Promedio del tiempo en cada zona expresado como un % del tiempo total para cada tratamiento.**



Gráfica No. 6. El promedio del porcentaje de tiempo de permanencia en ambas zonas del Plus-Maze con cada tipo de luz, es muy similar como se puede apreciar en la gráfica. Las pruebas de hipótesis utilizadas no muestran diferencias estadísticas.

Al igual que con los tipos de luz, se ve que la operación no tiene una influencia estadísticamente significativa en el número de entradas ni en el tiempo de permanencia en la zona abierta que son los parámetros más importantes en la evaluación del efecto ansiolítico.

### 7.3 Evaluación del efecto ansiolítico de los compuestos administrados IcVtr.

En la administración de los compuestos que al igual que las soluciones vehículo fueron administrados por la vía IcVtr, se obtuvieron los resultados que se presentan en la cuadro No. 3. Los parámetros evaluados son: promedio ( $\pm$ ESM) del número total de entradas, entradas en la zona abierta del Plus-Maze y tiempo de permanencia en la zona abierta del mismo, estos dos últimos datos son expresados como el promedio( $\pm$ ESM) del porcentaje del total en cada uno de ellos.

Cuadro No. 3  
Evaluación del efecto ansiolítico de los fármacos en el Plus-Maze

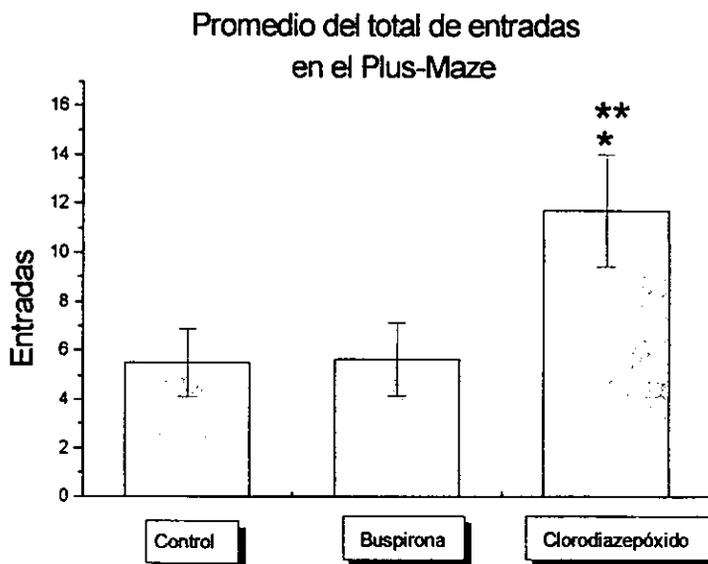
Grupo	Concentración de la solución	Volumen administrado ( $\mu$ L)	Entradas Totales	% de entradas en zona abierta	% permanencia en zona abierta
Melatonina*	10 mg/mL	1.0	7.7 $\pm$ 1.97	33.08 $\pm$ 15.69	24.1 $\pm$ 8.95
Clordiazepóxido**	20 mg/mL	0.5	11.75 $\pm$ 2.30	26.59 $\pm$ 9.43	29.1 $\pm$ 7.01
Buspirona**	20 mg/mL	0.5	5.66 $\pm$ 1.49	5.88 $\pm$ 5.87	8.0 $\pm$ 1.94

\* Vehículo: Polietilenglicol 25%    \*\*Vehículo: SSI

Cuadro No. 3. En la tabla se muestran los promedios( $\pm$ ESM) de la evaluación del efecto ansiolítico de los compuestos administrados IcVtr en las ratas en el Plus-Maze, esta tabla muestra un incremento en el tiempo de permanencia en la zona abierta del Plus-Maze tanto para CDP como para MEL, no así para la BUS en donde este parámetro es menor con respecto a los anteriores. Para la MEL se tiene una n=10, CDP n=8 y BUS n=6.

El número de entradas totales entre los fármacos BUS y CDP con respecto a su grupo control, se muestra en la gráfica No. 7. En ella se puede apreciar que el CDP presenta

un aumento en el número de entradas totales, este aumento es significativo a  $p < 0.05$  con respecto al grupo control y  $p < 0.05$  con respecto a la BUS.

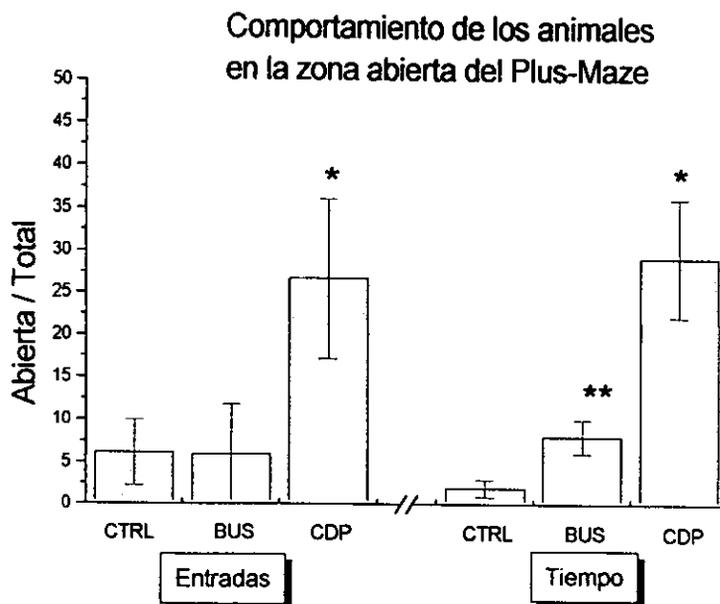


Gráfica No. 7. La gráfica muestra el promedio ( $\pm$ ESM) del número de entradas totales al Plus-Maze. En esta se observa que el CDP aumenta el número de entradas con respecto a su grupo control ( $*p < 0.05$ ) y a la BUS ( $**p < 0.05$ ). El grupo control tiene una  $n=6$ , la BUS  $n=6$  y el CDP  $n=8$ .

La gráfica 8 nos presentan los efectos obtenidos con los fármacos CDP y BUS con respecto a su grupo control., en ellas, el CDP es el que presenta los resultados mas elevados en ambos aspectos (Cuadro No. 3), y que son estadísticamente significativos  $p < 0.05$  en el caso de las entradas a la zona abierta y  $p < 0.005$  en el tiempo de permanencia en la misma zona y con respecto a su grupo control.

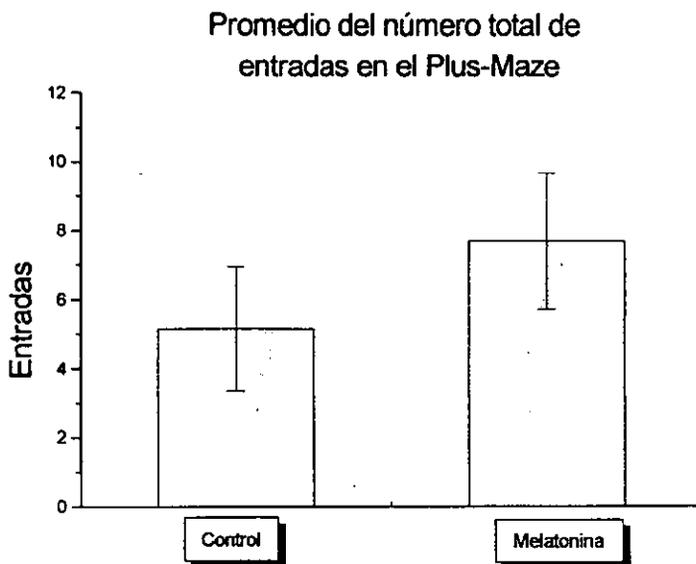
La BUS no presenta un efecto importante en el número de entradas (gráfica 8) ya que es muy parecido al del grupo control y no presenta diferencias estadísticas con las

pruebas aplicadas, sin embargo, en lo que respecta al tiempo de permanencia, se observa que si hay una diferencia con respecto al control, esta diferencia es estadísticamente significativa con  $p < 0.01$ .



Gráfica No. 8. En esta gráfica se aprecia el promedio ( $\pm$ ESM) del número de entradas en la zona abierta expresada como un porcentaje del total (izquierda). La BUS no influye de manera significativa, sin embargo, el CDP aumenta significativamente el número de entradas ( $*p < 0.05$ ) con respecto al grupo control (vehículo = SSI). Los volúmenes administrados así como la concentración de los fármacos se expresan en el cuadro No. 5. También se presenta el promedio ( $\pm$ ESM) del tiempo de permanencia en la zona abierta (derecha) siendo estadísticamente significativo para el CDP  $*p < 0.005$  y para la BUS  $**p < 0.01$ , ambos fueron comparados con un grupo control.

Los resultados obtenidos con la administración de la MEL se compararon con los obtenidos al administrar la solución vehículo de PEG al 25%, en la gráfica No. 9 se aprecia que la MEL no presenta un cambio estadísticamente significativo en el promedio del número de entradas totales.

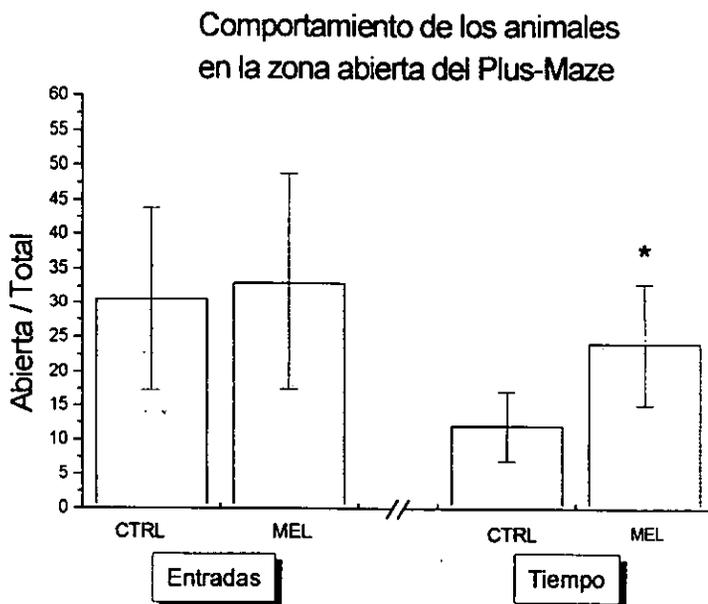


Gráfica No. 9. El promedio ( $\pm$ ESM) del número de entradas totales entre la MEL y su grupo control es similar, las pruebas estadísticas aplicadas no presentan diferencias estadísticamente significativa. Control n=7 y MEL n=10.

Los parámetros que nos sirven para determinar el efecto ansiolítico como lo es el número de entradas y el tiempo de permanencia en la zona abierta se muestran en la gráfica 10, en ella se presentan los promedios ( $\pm$ ESM), de los parámetros medidos.

Al analizar estos parámetros, encontramos de la gráfica No. 10, que la MEL y su grupo control no presentan diferencias estadísticamente significativas en el número de entradas a la zona abierta, sin embargo, cuando se comparan los tiempos de permanencia (gráfica No. 10, derecha) en la misma zona, se muestra un efecto estadísticamente significativo a  $p < 0.05$  entre los dos grupos, razón por lo cual la MEL puede ser un compuesto con carácter ansiolítico.

En las gráficas 7 y 9, se puede ver que de todos los compuestos utilizados, solo el CDP incremento significativamente el número de entradas totales con respecto a su grupo control.



Gráfica No. 10. El promedio ( $\pm$ ESM) del número de entradas (izquierda), como lo presenta esta gráfica, es similar entre la MEL y su grupo control (PEG al 25%). No hay diferencia estadística, en ambos casos se administró un volumen de 1.0  $\mu$ L. La concentración de la MEL fue de 20 mg/mL. El promedio ( $\pm$ ESM) del tiempo de permanencia en la zona abierta (derecha), como lo presenta esta gráfica, es mayor para MEL que para su grupo control (PEG 25%), presenta una diferencia estadísticamente significativa a  $*p < 0.05$  entre ambos grupos.

En las gráficas 8 y 10 se puede observar que tanto la MEL, BUS y CDP tienen influencia en el promedio del tiempo de permanencia al compararlos con sus respectivos controles (grupos tratados con soluciones vehículo), sin embargo, en el parámetro de número de entradas a la zona abierta, se observa de las mismas gráficas que BUS y MEL no

presentan un incremento en el promedio del número de entradas a la zona abierta con respecto a sus controles, mientras que el CDP sí tiene un efecto significativo incrementando el promedio del número de entradas a la zona abierta con respecto a su grupo control ( $p < 0.05$ ).

#### 7.4 Evaluación del efecto ansiolítico de los vehículos.

Las soluciones vehículo, también fueron evaluados en el Plus-Maze para cerciorarse de que no producen un efecto ansiolítico. Estas se administraron IcVtr, los resultados promedio ( $\pm$ ESM) obtenidos después de la administración de estas soluciones se reportan en el cuadro No. 4 y se compararon con un grupo control que es el de los animales íntegros.

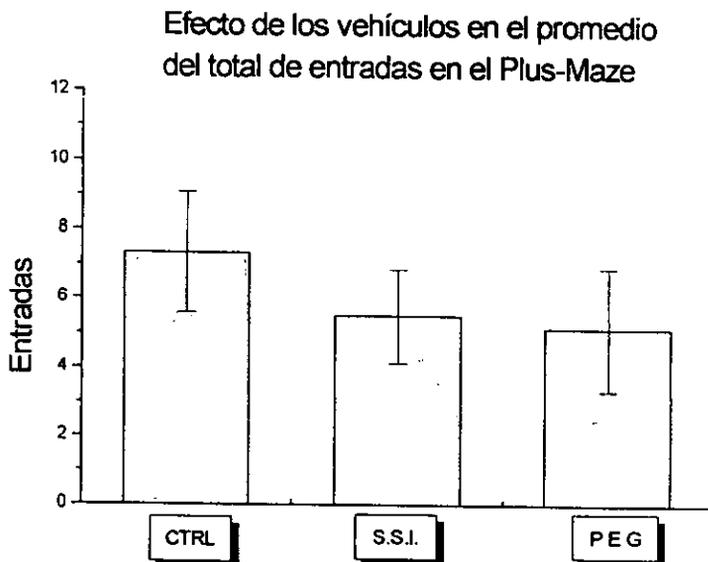
Cuadro No. 4  
Evaluación del efecto ansiolítico de los vehículos en el Plus-Maze

Grupo	Entradas totales	% de entradas en zona abierta	% permanencia en zona abierta
Control	7.33 $\pm$ 1.74	12.12 $\pm$ 6.60	9.71 $\pm$ 4.02
S.S.I.	5.50 $\pm$ 1.38	6.06 $\pm$ 3.83	1.88 $\pm$ 1.00
Poliétilenglicol 25%	5.14 $\pm$ 1.80	30.35 $\pm$ 13.31	11.95 $\pm$ 5.03

Cuadro No. 4. El cuadro muestra el promedio ( $\pm$ ESM) del comportamiento explorador de las ratas en el Plus-Maze, cuando se administran las soluciones vehículo. La solución salina isotónica (S.S.I.) se administra en un volumen de 0.5  $\mu$ L, mientras que el poliétilenglicol fue en cantidad de 1  $\mu$ L. El grupo con S.S.I. tienen una  $n=6$ , el de poliétilenglicol  $n=7$  y el grupo control  $n=9$ .

Con los datos del cuadro No. 4, se elaboró la gráfica No. 11, en la cual se representan los resultados del promedio ( $\pm$ ESM) del número de entradas totales en el Plus-Maze después de ser administrados IcVtr.

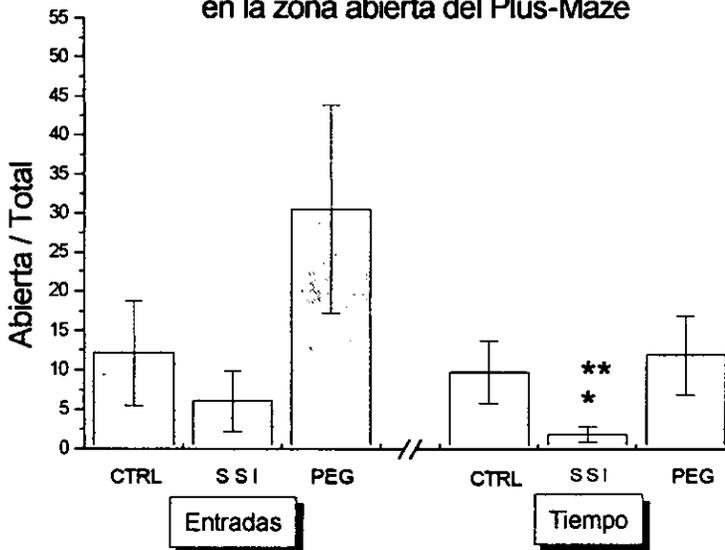
La gráfica 11 nos muestra que la administración de los vehículos no afecta el comportamiento motriz de los animales, la prueba estadística "t-student" y la prueba de "F", nos indican que los resultados obtenidos no presentan diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica No. 11. El promedio ( $\pm$ ESM) del número total de entradas en el Plus-Maze tanto para el grupo control como para cada una de las soluciones vehículo después de administrarse IcVtr, no presenta diferencias estadísticamente significativas. El grupo control tiene una  $n=9$ , el grupo con S.S.I. tiene una  $n=6$  y el grupo con PEG tiene  $n=7$ .

Al analizar los parámetros del promedio ( $\pm$ ESM) del número de entradas así como del tiempo de permanencia en la zona abierta del Plus-Maze, se observa de la gráfica No. 12 (izquierda) que el PEG, aumenta considerablemente el promedio del número de entradas en la zona abierta sin embargo, este aumento no es estadísticamente significativo.

### Comportamiento de los animales en la zona abierta del Plus-Maze



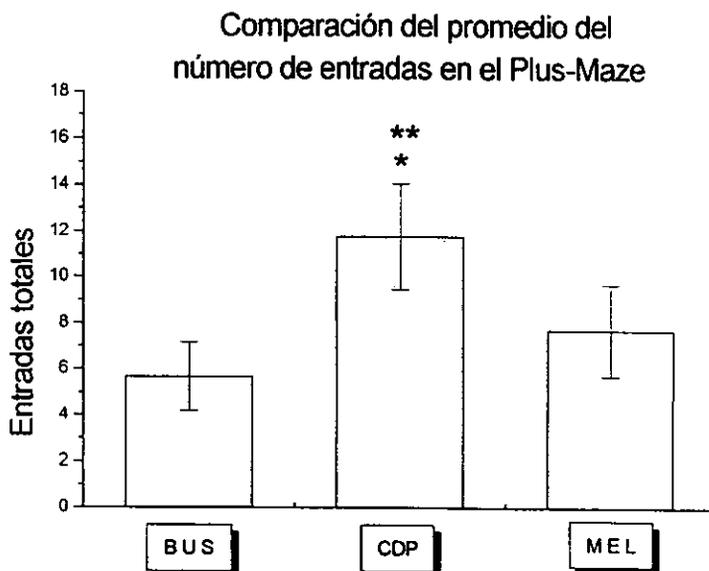
Gráfica No. 12. Esta gráfica nos presenta el promedio ( $\pm$ E.S.M.) del número de entradas en la zona abierta (izquierda) para las ratas control, así como, para las soluciones vehículo utilizadas (S.S.I. y polietilenglicol al 25 %). Estas soluciones son administrados *l.c.vtr.* No hay diferencia estadística con la prueba de t y la prueba F. Los promedios ( $\pm$ ESM) de los resultados correspondientes al tiempo de permanencia en la zona abierta (derecha) para las ratas control, así como, para las soluciones vehículo utilizados (S.S.I. y polietilenglicol al 25 %). No hay diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y el polietilenglicol, sin embargo para la S.S.I. si hay diferencia estadística \* $p < 0.1$  con respecto al grupo control. Entre PEG y SSI si hay diferencia \*\* $p < 0.01$ .

Los resultados del promedio ( $\pm$ ESM) del tiempo de permanencia en la zona abierta, se aprecia en la misma gráfica (derecha). En está, se observa que los promedios de los tiempos de permanencia entre los grupos control y de PEG son similares, la prueba de "t" y la prueba "F" nos indica que no hay diferencia estadística significativa, sin embargo, el grupo de la SSI en donde hay una disminución del tiempo de permanencia, presenta una diferencia estadísticamente significativa con la prueba "t-student" ( $p < 0.1$ ).

### 7.5 Comparación del efecto ansiolítico de los compuestos.

En las gráficas 13 y 14 se hace una comparación entre los compuestos administrados IcVtr.

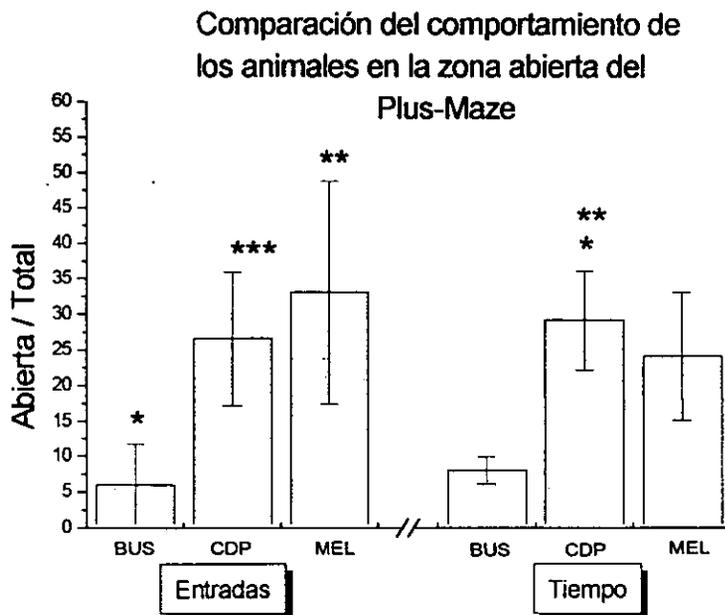
En la gráfica No. 13 se hace la comparación de los compuestos con referencia a los promedios ( $\pm$ ESM) del número total de entradas.



Gráfica No. 13. La gráfica muestra la comparación de los promedios ( $\pm$ ESM) del número de entradas totales en el Plus-Maze para cada uno de los compuestos. La BUS presenta diferencias con respecto al CDP ( $p < 0.05$ ) al igual que la MEL ( $p < 0.1$ )

De la gráfica 13, se observa que la BUS y la MEL presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto al CDP, mientras que entre la BUS y la MEL no se presentan diferencias estadísticamente significativas.

En la gráfica 14 (izquierda) se compararon los resultados de los promedios ( $\pm$ ESM) del porcentaje de entradas a la zona abierta del Plus-Maze.



Gráfica No. 14. La gráfica muestra el promedio(±ESM) del porcentaje de entradas a la zona abierta (izquierda). Hay diferencias estadísticas entre BUS y CDP (\* $p < 0.1$ ), BUS y MEL (\*\* $p < 0.01$ ) y MEL contra CDP (\*\* $p < 0.05$ ). A la derecha, la gráfica presenta el efecto ansiolítico de los compuestos administrados IcVtr. Hay diferencias significativas entre BUS y CDP (\* $p < 0.01$ ) y CDP contra MEL (\*\* $p < 0.01$ ).

La gráfica No. 14, nos muestra como el CDP, BUS y MEL presentan diferencias estadísticamente significativas, en ella también se aprecia que la MEL tiene el mayor valor (33.08±15.69), seguido por el CDP (26.59±9.43) y finalmente la BUS (5.88±5.87).

Finalmente, la comparación de los promedios (±ESM) de los porcentajes del tiempo de permanencia en la zona abierta del Plus-Maze después de administrar los compuestos IcVtr, se presentan en la misma gráfica (derecha), en donde el CDP es el que presenta el mayor valor.

### 7.5 Histología

La corroboración de la implantación de la cánula se hizo mediante cortes histológicos como el de la figura No. 15 y en base al Atlas de Paxinos and Watson, 1986.

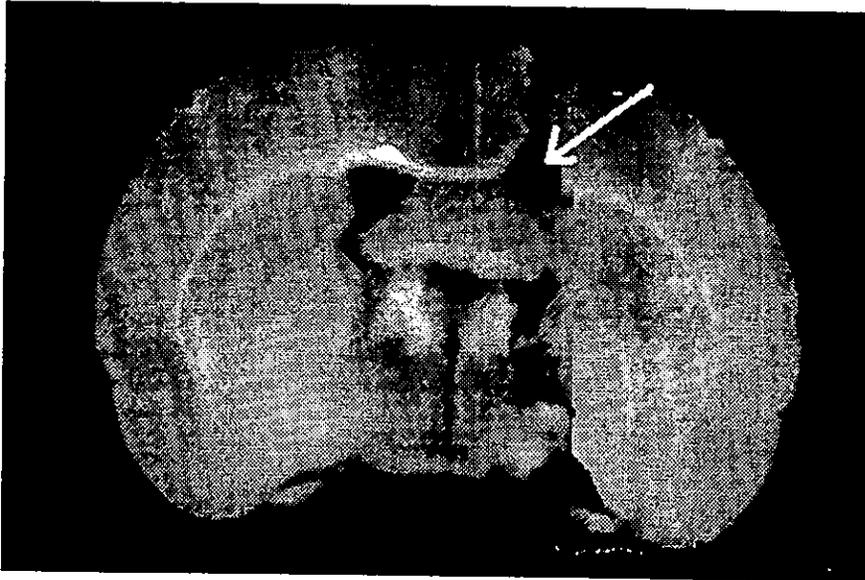


Figura No. 15. La figura muestra el corte histológico de un cerebro al que se le implantó la cánula, la flecha indica el lugar de la fijación de la misma y el camino recorrido por ella, hasta llegar a ventrículo derecho.

## 8.- Discusión

El presente estudio nos muestra el efecto "ansiolítico" discriminado en el modelo del Plus-Maze de diferentes compuestos así como de sus soluciones vehículo.

Los fármacos CDP y BUS al igual que la hormona MEL presentaron un efecto "ansiolítico" en el modelo de Plus-Maze después de administrarse IcVtr.

El comportamiento explorador de los animales en el Plus-Maze fue mayor en la zona abierta para los compuestos experimentados con respecto a sus respectivos controles.

El CDP como otras BZP, ha presentado resultados reproducibles en este modelo (14, 52), no así la BUS, en la cual se han presentado resultados variados como efectos ansiolíticos (Kostowsky, 1989; Luscombe, 1992), ansiogénicos (Critchley, 1992; Moser, 1989; Pellow, 1987; Kostowsky, 1990) e incluso sin efecto (Moulton, 1988), estos efectos se atribuyen entre otras cosas a la diferencia de condiciones experimentales como tipo de luz, manejo de los animales, lugar de administración, etc (3, 19, 26, 28).

En nuestro experimento evaluamos primero la influencia del tipo de luz y la influencia de la intervención quirúrgica en el comportamiento de los animales en el Plus-Maze.

Con los resultados del cuadro No. 1 y la gráfica No. 1, podemos observar que el promedio ( $\pm$ ESM) del número de entradas totales en el Plus-Maze, tanto para luz blanca, como roja fue similar  $5.88 \pm 1.27$  y  $7.33 \pm 1.74$  respectivamente, el análisis estadístico no muestra cambios significativos.

La distribución de estas entradas tanto en la zona abierta como en la cerrada para cada tipo de luz se muestra en la gráfica No. 2 en el cual se aprecia que con luz blanca se incrementa las entradas a la zona abierta y aunque estadísticamente no es significativa la

diferencia observada, puede que ésta se deba a las sombras causadas por la luz blanca y en la cual son mas marcadas que con luz roja, lo cual puede de alguna manera "engañar" al animal entre lo que es la zona abierta y lo que es la zona cerrada.

En el siguiente parámetro evaluado y que es el que se refiere al tiempo de permanencia en cada una de las zonas, podemos apreciar tanto en el cuadro No. 2 como en la gráfica No. 3 que el tiempo de permanencia en la zona abierta y cerrada es muy similar en los dos tipo de luz, no presentando diferencias estadísticas significativas.

Los parámetros de número de entradas y de tiempo de permanencia en la zona abierta nos indicará el grado de ansiedad del animal (52).

Este experimento se hizo con la finalidad de corroborar que no hay un cambio de comportamiento en los animales en el Plus-Maze cuando se utiliza cualquiera de los dos tipos de luz, además de que se ha reportado que una luz más tenue que aquella a la cual están usualmente acostumbrados los animales, es mejor ya que hace mas sensible la detección del efecto ansiolítico (31) y, por otro lado, también se ha visto que la luz brillante puede ser ansiogénico (69).

Es importante también conocer la influencia de la luz roja y la luz blanca en los parámetros medidos ya que la melatonina está regida por ciclos de luz oscuridad (23, 67, 72) y al parecer el cambio en el tipo de luz no llega a alterar el tiempo de permanencia en la zona abierta y que es en sí lo que mas nos interesa para medir el efecto ansiolítico.

La influencia de la intervención quirúrgica también se evaluó, en el cuadro No. 2 se aprecia que el promedio ( $\pm$ ESM) del número de entradas totales para el grupo control y el operado es similar  $7.33 \pm 1.74$  en el primer caso y  $8.14 \pm 2.17$  en el segundo. Estos valores estadísticamente no presenta diferencias significativas y se muestran en la gráfica No. 4.

La distribución de las entradas en el Plus-Maze se observa en la gráfica No. 5 y aunque estos resultados no son estadísticamente diferentes, si hay un aumento en el número de entradas a la zona abierta en el grupo operado, lo cual puede ser atribuido a la cánula implantada o bien a la misma operación, sin embargo, en lo que respecta al tiempo de permanencia en la zona abierta, se observa tanto en el cuadro No. 2 como la gráfica No. 6, que el grupo operado y el grupo control tienen valores muy similares y estadísticamente no presentan diferencias significativas, por lo cual en general la operación no modifica significativamente los parámetros que nos servirán para evaluar el efecto ansiolítico.

Al evaluar los compuestos en el Plus-Maze, después de ser administrados IcVtr, la BUS así como el CDP fueron comparados con su grupo control (S.S.I.).

En el cuadro No. 3 se registran los datos obtenidos del comportamiento explorador de los animales en el Plus-Maze.

El CDP administrado IcVtr, muestran un efecto ansiolítico al igual que la BUS.

El CDP aumenta tanto el número de entradas totales ( $p < 0.05$ ) así como el número de entradas en la zona abierta ( $p < 0.05$ ) y el tiempo de permanencia en la misma zona ( $p < 0.005$ ), como se aprecia en las gráficas 7 y 8 respectivamente, este comportamiento ha sido reportado en otros trabajos y con el mismo método aunque no por la misma vía de administración (13, 18), por lo cual el clordiazepóxido se comporta de manera similar cuando es administrado IcVtr, no así el caso de la BUS, quien solo tuvo un efecto estadísticamente significativo en el tiempo de permanencia en la zona abierta (gráfica 8, derecha) del Plus-Maze ( $p < 0.01$ ).

En el caso del CDP se ha hablado de una posible confusión entre el efecto ansiolítico y la actividad locomotriz observada con este modelo (13) y que aquí se reproduce de forma

similar (gráfica 7), sin embargo, esta actividad motriz elevada puede ser la responsable de que también se observe un cambio significativo en el porcentaje de entradas a la zona abierta del Plus-Maze y quizá también nos "infla" el valor obtenido en el porcentaje del tiempo de permanencia en la zona abierta, los cuales se observan en la gráfica 8 (derecha).

La BUS, no presenta un incremento ni tampoco una disminución en la actividad locomotriz como la mostrada por el CDP en este modelo (gráfica 7) y que puede ser, quizá, relacionada con algunos de los efectos adversos que presentan las BZP, y los cuales en el caso de la BUS son menores.

Estos resultados se pueden deber entre otras cosas a que las BZP actúan sobre receptores  $GABA_{(48)}$  mientras que la BUS lo hace sobre receptores  $5HT_{1A(3, 28, 21)}$ .

La luz roja utilizada en nuestro experimento puede ser la responsable de encontrar un efecto ansiolítico de la BUS, ya que esto nos permite mayor sensibilidad en el método  $(31)$ , por otro lado, el efecto ansiolítico también pudo haber sido debido a que al administrarse  $leVtr$ , la buspirona llega a un sitio que permitiera obtener un efecto ansiolítico de la misma, evitando en cierto grado los efectos antagónicos del sistema hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), al cual se le atribuyen los resultados variables obtenidos con la BUS  $(10, 19, 46)$ .

Nosotros nos inclinamos a que este efecto sea mediado por hipotálamo y no tanto por receptores a serotonina ya que hay evidencia de que los principales lugares donde hay receptores  $5HT_{1A}$ , son en raphé, septum e hipocampo  $(1, 19, 33, 57)$ .

El efecto obtenido por la BUS puede ser debido a que hay una relación entre el eje HPA y los sistemas centrales serotoninérgicos como el del hipocampo, esto se debe principalmente a que los glucocorticoides provenientes de este sistema pueden incrementar la unión a receptores  $5-HT_{1A(11)}$ , y que son a los cuales tal vez llegó la BUS por difusión.

En el hipotálamo, el cual está rodeado por los ventrículos laterales, que es en donde se administro el fármaco se han encontrado receptores a GABA (48).

Estos receptores a GABA pueden ser los responsables del efecto ansiolítico encontrado con el CDP, además del incremento de la actividad motriz como se observa en la gráfica 7.

Los receptores GABA han sido ampliamente estudiados en el proceso ansiolítico (3, 40, 53, 64) e incluso se ha pensado que la MEL puede tener este efecto gracias a que actúa por medio de estos receptores (5, 55) o bien regulando las concentraciones de su neurotransmisor (23).

Se encontró un efecto ansiolítico de la MEL al administrarse IcVtr y compararlo con su control ( $p < 0.05$ ) como se observa en la gráfica 10 (derecha). La MEL, así como la BUS, no presentó un incremento en el número de entradas totales ni en el número de entradas a la zona abierta al compararla con su grupo control (gráficas 9 y 10).

Estos datos nos harían pensar por un lado que el efecto ansiolítico de la MEL es debido quizá a los receptores tipo GABA que se encuentran en hipotálamo (73) y que serían los responsables del mismo como en el caso del CDP, sin embargo, hay otra cuestión y es la de que en el hipotálamo también se encuentran receptores a MEL (2, 15, 49).

La evidencia que nos sugiere un efecto de la MEL sobre sus propios receptores es que se ha visto que el efecto ansiolítico varía dependiendo de la hora de administración (23) y esto es lógico ya que la secreción de MEL es regulada circadianamente por medio de la luz, además, también se ha visto también que la afinidad de los receptores también cambia con el tiempo (67, 72).

En nuestro caso utilizamos un horario entre las 12:00 y las 14:00 hr. debido a que en este horario es cuando se tienen receptores de mayor afinidad y es cuando también, se empieza a obtener el mayor efecto ansiolítico de la MEL (23) y por otro lado, en este horario es cuando tendríamos la menor interferencia por MEL endógena (2, 49), que pudiera intervenir en los resultados obtenidos.

También se ha encontrado que las células de hipotálamo son capaces de regular cambios en las conductancias de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ , las cuales se han relacionado con mecanismos mediados por proteína G (74), mismo mecanismo propuesto para los receptores a MEL (2, 15).

Por otro lado, la MEL puede disminuir las concentraciones de corticosterona y modificar la actividad serotoninérgica en hipotálamo mediante cambios metabólicos de 5-HT (47), lo cual, nosotros creemos, puede indirectamente afectar la actividad del hipocampo.

Al parecer, nuestras condiciones experimentales no influyen en los comportamientos de los animales en el Plus-Maze al ser tratados con MEL, como lo demuestran los experimentos previos con luz roja y con luz blanca, sin embargo, si hay reportes acerca de los vehículos y del manejo de animales que puedan interferir con los resultados obtenidos (7, 30, 31), razón por la cual evaluamos también el efecto ansiolítico de los compuestos comparándolos con el grupo control de animales íntegros ambos en presencia de luz roja, los resultados aparecen en el cuadro No. 4 y en las gráficas 11 y 12.

Los vehículos utilizados en este experimento fueron el PEG al 25% en el cual se solubilizó la MEL y la S.S.I. en la cual se solubilizaron los fármacos CDP y BUS.

Los resultados obtenidos no presentan efectos significativos en el promedio del número total de entradas (gráfica 11), sin embargo, los resultados son variables tanto en el

número de entradas, como en los tiempos de permanencia en la zona abierta entre el grupo control y cada uno de los vehículos, los cuales se presentan en la gráfica 12.

En lo que se refiere al promedio de entradas a la zona abierta para el grupo control y las soluciones vehículo no se presentan diferencias estadísticamente significativas como se aprecia en la gráfica 12 (izquierda), pero, en lo que respecta al promedio de tiempo de permanencia en la zona abierta (gráfica 12, derecha) tenemos, que el grupo control y el PEG presentan resultados similares y sin diferencia estadística significativa, no así para la S.S.I. y el grupo control en donde hay una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.1$ ).

Estos datos nos indica que aunque los vehículos no alteran el porcentaje del número de entradas a la zona abierta, si hay alteraciones en lo que respecta al tiempo de permanencia en la misma zona, de lo cual surgiría que la S.S.I. es ansiogénico, debido a que aumenta el tiempo de permanencia en la zona cerrada con respecto al grupo control.

Hay reportes acerca de que la S.S.I. es ansiogénico <sup>(31)</sup>, sin embargo, no es muy claro debido a que no se ha podido dilucidar a si es la S.S.I. la causante de esto, o bien el manejo o la administración misma del vehículo en los animales lo cual también se ha visto causa ansiedad a los animales <sup>(30)</sup>.

En el caso de que el manejo y/o la administración del vehículo a los animales cause un efecto ansiogénico en el Plus-Maze, surge una pregunta ¿por qué con el PEG no se observó lo mismo?

El PEG comparado con el grupo control no presenta diferencias estadísticamente significativas en lo que respecta al tiempo de permanencia en la zona abierta (gráfica 12, derecha), sin embargo, haciendo un análisis estadístico con respecto a la S.S.I. se encuentran diferencias estadísticamente significativas con  $p < 0.01$ .

Se han registrado datos acerca de que el PEG puede tener efecto ansiolítico (33), aunque estos fueron reportados en un modelo de ansiedad de Vogel y la concentración del mismo fue de 40%.

Haciendo un registro de todo lo que se hizo con estos tres grupos encontramos que el manejo de los animales fue el mismo en los tres casos y que lo único que fue diferente entre el grupo control y los grupos con vehículo es la operación y la administración, por lo cual se hace una comparación estadística entre el grupo operado y los grupos administrados con vehículo (datos no presentados).

La estadística hecha es la misma que en los demás casos y tenemos en base a esto que la S.S.I. presenta diferencias significativas con  $p < 0.01$  tanto para el número de entradas como para el tiempo de permanencia, lo cual no sucedía con respecto al grupo control integro en el cual solo había diferencias en lo que respecta al tiempo de permanencia. Para el PEG no se presentan diferencias en cada uno de los parámetros evaluados en el Plus-Maze en comparación con el grupo operado y que es lo mismo que sucede al compararlos con el grupo control integro.

En el caso del vehículo con S.S.I. a pesar de que hay diferencias tanto en el número de entradas como en el tiempo de permanencia con respecto a los animales operados, hay que tomar en cuenta que de hecho la operación ya presentaba ligera diferencia y que aunque esta no era estadísticamente significativa comparándola con el grupo control integro, si pudo haber sido la causante de las diferencias presentadas al compararla con el grupo administrado con S.S.I.

El segundo punto que puede ser el causante del efecto ansiogénico es el de la administración misma de los vehículos, a este respecto, no se hizo un procedimiento en el

cual se simulara toda la administración desde que se sujeta el animal hasta que se coloca la sonda en la cánula, por lo cual no se tienen resultados para comparar tal proceso.

En base a todo lo anterior, podemos inferir 2 cosas:

1. La maniobra de administrar a los vehículos es la causante del efecto ansiogénico presentado por la S.S.I., este efecto no se presenta en el caso del PEG ya que este se ha visto que puede tener efectos ansiolíticos y que podrían ser los causantes de que se aprecie un efecto parecido al del grupo control y no similar al de la S.S.I.
2. La S.S.I. tiene propiedades ansiogénicas, lo cual explicaría los resultados observados, en cambio el PEG no presenta efecto alguno sobre los parámetros evaluados en el Plus-Maze y por lo tanto la maniobra de administración del vehículo tampoco interfiere con los parámetros evaluados.

Haciendo una comparación entre los tres compuestos probados y a reserva de que no sea tan válida por las diferencias mostradas entre los distintos vehículos utilizados, se tiene que de la gráfica 14 (izquierda), hay diferencias entre los tres grupos (CDP, BUS y MEL) en cuanto al promedio del número de entradas a la zona abierta. Estas diferencias pueden ser dadas por el CDP que presentan un valor elevado en el número de entradas totales y que es estadísticamente significativo a  $p < 0.05$  con respecto a BUS y  $p < 0.1$  con respecto a MEL (gráfica 13).

Este incremento significativo del número de entradas totales, podría ser el causante indirecto de las diferencias presentadas entre los valores obtenidos al comparar los porcentajes de entradas a la zona abierta.

En este contexto, tenemos que el CDP es estadísticamente diferente de la BUS ( $p < 0.05$ ) y de la MEL ( $p < 0.1$ ), mientras que entre las diferencias presentadas entre la MEL y

la BUS ( $p < 0.01$ ) puede ser debida al PEG que se utilizó como vehículo para administrar a la MEL.

En lo que se refiere al efecto ansiolítico, representado por el tiempo de permanencia en la zona abierta y que se aprecia en la gráfica 14 (derecha), se observan solo diferencias entre la BUS y CDP ( $p < 0.01$ ) así como entre la CDP y MEL ( $p < 0.01$ ), no habiendo diferencias entre la MEL y BUS.

Estas diferencias observadas pueden ser debidas por un lado a que la BUS no esté actuando de manera eficaz debido a que no altere de una forma significativa las vías serotoninérgicas existentes a este nivel y por lo tanto su efecto ansiolítico sea el menor de los tres, este compuesto no presentó incremento de la actividad motriz.

En cuanto a la MEL, se puede decir que funciona como una mezcla de ambos fármacos, ya que por un lado presenta un efecto ansiolítico similar al del clordiazepóxido pero sin presentar un incremento en la actividad locomotriz al compararlo con su vehículo.

Esta posible mezcla se puede deber a que se ha sugerido que la melatonina actúa regulando las concentraciones de GABA o bien sobre receptores de este neurotransmisor al igual que la BZP como lo es el CDP.

Por otro lado, quizá pueda actuar sobre vías serotoninérgicas como lo indican estudios que relacionan a la MEL con cambios sobre los niveles de serotonina, lo cual puede ser dado por su relación estructural similar a la serotonina o bien por vías reguladas a nivel de hipotálamo, ambos mecanismos, tanto receptores GABA como vías serotoninérgicas mediante receptores 5-HT están relacionados con la ansiedad.

No podemos descartar los receptores a MEL, entre ellos los que están a nivel de hipotálamo y del núcleo paraventricular del tálamo y, pueden ser los responsables de los

efectos ansiolíticos observados de la MEL ya que estos receptores se ha propuesto funcionen como proteínas G, las cuales mediante segundos mensajeros podrían actuar indirectamente sobre canales iónicos como en el caso del sistema GABAérgico o bien regulando el flujo de información a otras zonas del cerebro mediante la regulación de vías serotoninérgicas ya sea directa o indirectamente por el eje HPA.

Finalmente, el efecto marcado del CDP se debió a la interacción del mismo con los receptores a GABA existentes a este nivel, los serían quizá también los responsables del incremento de la actividad motriz presentada con este modelo.

De esta forma, podemos suponer que el hipotálamo juega un papel importante en la regulación de la ansiedad, ya que se ha visto que en el hipotálamo se pueden llevar a cabo una actividad funcional coordinada, la cual depende de los estados motivacionales-emocionales (35), además de tener una relación cercana con el eje HPA (19) y vías tipo GABA (66) que pueden activar el sistema nervioso simpático, el cual puede ser responsable de algunas de las manifestaciones fisiológicas presentadas por la ansiedad.

Por último, el hipotálamo, además de presentar la existencia de vías mediadas por GABA y relaciones con el sistema serotoninérgico, de las cuales las que interactúan con hipocampo son las principales en la regulación de la ansiedad, es posible que haya una regulación mediante MEL ya sea por vías GABA, 5-HT o ambas en forma directa o indirectamente mediante los receptores a MEL y que son abundantes a este nivel. Esta posible regulación planteada, nos permite continuar con el estudio de la ansiedad, utilizando mecanismos encaminados para alcanzar tal fin.

## 9.- Conclusiones

1. El CDP presenta un importante efecto ansiolítico en el modelo de Plus-Maze al administrarse IcVtr, ya que aumento el número de entradas y tiempo de permanencia en la zona abierta del mismo. También se observó un efecto sobre la actividad motriz como el reportado en la bibliografía; estos efectos encontrados pueden ser debidos a la existencia de receptores a GABA a nivel de hipotálamo.
2. La BUS también presento un efecto ansiolítico al ser evaluada en el modelo de Plus-Maze y aunque no fue marcado como en el caso del CDP, si careció de un efecto sobre la actividad motriz como el presentado por el CDP al ser administrados IcVtr, el efecto ansiolítico de la BUS, puede ser indirecto, ya sea mediado por hipotálamo o bien por difundirse a sitios con receptores  $5HT_{1A}$ .
3. La MEL al ser administrada IcVtr., presento un efecto ansiolítico similar al del CDP, la actividad motriz observada con ella es incierta ya que el vehículo utilizado para su administración también presento valores altos en este aspecto, los efectos ansiolíticos de la MEL quizá se debieron a interacción directa con receptores a GABA o indirecta sobre vías serotoninérgicas, sin embargo, no podemos descartar un posible efecto sobre receptores a MEL, los cuales indirectamente actuarían sobre receptores a GABA o bien vías serotoninérgicas.
4. El efecto ansiolítico mostrado por los compuestos administrados IcVtr, nos permite en cierta forma relacionar la zona hipotalámica adyacente a los ventrículos laterales como

una mediadora del efecto ansiolítico de los mismos, y de la cual aún es incierto el mecanismo por la que actúe, siendo de mayor importancia el sistema mediado por receptores GABA, seguido de un posible mecanismo mediado por vías serotoninérgicas y sin dejar a un lado la posibilidad de los receptores a MEL, tampoco hay que descartar su posible relación coordinadora involucrando de esta manera a los mecanismos anteriormente descritos en la regulación del proceso ansiolítico.

**10.- Bibliografía.**

1. Andrews, N., Hogg, S., Gonzales, E.L., File, S.E. 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the median raphe and dorsal hippocampus may mediate anxiolytic and anxiogenic behaviours respectively. *Eur. J. Pharmacology* 264: 259-264 (1994)
2. Arendt, J. Melatonin. *Clin. Endocrinology* 29: 205-229 (1988)
3. Barret, J. E. and Vanover, K. E. 5-HT receptors as targets for the development of novel anxiolytic drugs: models, mechanism and future directions. *Psychopharmacology* 112: 1-12 (1993)
4. Cardinali, D. P. Melatonin: a mammalian pineal hormone. *Endocrine Rev.* 2:327-343 (1981)
5. Cardinali, D. P., Lowenstein, P.R., Rosenstein, R.E., Gonzales Solveyra, C., Acoña Castroviejo, D. Functional links between benzodiazepine and GABA receptors and pineal activity; GABA and Endocrine Function. Raven Press, New York, p155-164, 1986.
6. Castilla, L.; Cravioto, J. Estadística simplificada, Ed. Trillas, México, 1991.
7. Castro, A. C.; Hogan, J. B.; Benson, K. A.; Shehata, C. and Landauer, M.R. Behavioral effects of vehicles: DMSO, ethanol, Tween 20, Tween 80 and emulphor-620. *Pharmacol. Biochem. and Behav.* 50 (4): 521-526 (1995)
8. Cofer, S. N. and Appley, M. H. *Psicología de la motivación. Teoría e investigación.* 8ª edición, Ed. Trillas, México, 1987.
9. Cunningham, L. A. Depression and anxiety in the primary care setting. *Compr. Ther.* 23 (6): 400-406 (1997)
10. Charney, C. N. and Redmond, D. E. Neurobiological mechanism in human anxiety. *Neuropharmacology* 22 (12B): 1531-1536 (1983)
11. Chauloff, F.; Kulikov, A.; Sarrieau, A. and Mormede, P. Male Fischer 344 and Lewis rats display differences in locomotor reactivity, but not in anxiety-related behaviours: relationships with the hippocampal serotonergic system. *Brain Research* 693: 169-178 (1995)
12. Chopin, P. and Briley, M. Animal models of anxiety: The effect of compounds that modify 5-HT neurotransmission. *Trends in Pharmacological Sciences* 8: 383-388 (1987)

13. Dawson, G. R.; Crawford, S. P.; Collinson, N.; Iversen, S. D. and Tricklebank, M. D. Evidence that the anxiolytic-like effects of chlorodiazepoxide on the elevated Plus-Maze are confounded by increases in locomotor activity. *Psychopharmacology* 118 (3): 316-323 (1995)
14. Dawson, R. G. and Tricklebank, M. D. Use of the elevated Plus-Maze in the search for novel anxiolytics agents. *Trends in Pharmacological Sciences* 16: 33-36 (1995)
15. Dudocovich, M. L. Melatonin receptors: are there multiple subtypes?. *Trends in Pharmacological Science* 16 (2): 50-56 (1995)
16. Duncan, P.; Taylor, L. A.; Riblet, L. A.; Stanton, H. C.; Eison, A. S. and Temple, D. L. Dopamine and antianxiety activity. *Pharmacol. Biochem.* 17(1): 25-35 (1982)
17. Falcon, J. And Collin, J. P. Photoreceptors in the pineal of lower vertebrates: Functional aspects. *Experientia* (45): 909-913 (1989)
18. Fernandes, C. and File, S. E. The influence of open arms ledges and maze experience in the elevated Plus-Maze. *Pharm. Biochem. and Behav.* 54 (1): 31-40 (1996)
19. File, S. E. Recent developments in anxiety, stress and depression. *Pharmacol. Biochem. and Behav.* 54 (1): 3-12 (1996)
20. Freedman, A. M. Psychopharmacology in psychotherapy in the treatment of anxiety. *Pharmacopsychiat. Neuropsychopharmacol.* (13): 277-289 (1980)
21. Goldberg, H. L. Buspirone: A new antianxiety agent not chemical related to any presently marketed drugs. *Psychopharmacology Bulletin* 15(2): 90-92 (1979)
22. Goldman, B. D. The physiology of melatonin in mammals. *Pineal Research Rev.* Vol. 1, Ed. R. J. Reiter., Ala, R. Inc. New York, p145-186, 1983.
23. Golombek, D. A., Martini, M., and Cardinali, D. P. Melatonin as an anxiolytic in rats: time dependence and interaction with the central GABAergic system. *Euro. J. Pharmacol.* 237: 231-236 (1993)
24. Goodman, A. G.; Rall, T. W.; Nies, A.S. y Taylor, P. (Baldessarini, R.J.). *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Capítulo 18. Los Fármacos y el Tratamiento de las Enfermedades Psiquiátricas.* 8ª. Edición, Capítulo 18, Ed. Panamericana, México, 1991.
25. Goth, A. y Vesell, E. (Clark, W., Brater, D. y Johnson, A.). *Farmacología Médica principios y conceptos. Sección 3a. Psicofarmacología.* 13ª edición. Ed. Mosby. Barcelona, España, 1993.

26. Griebel, G. 5-hidroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. *Pharmac. Ther.* 65: 319-395 (1995)
27. Gyertyan, I. Animals models of anxiety: A critical review. *Acta Physiologica Hungarica* 79 (4): 369-379 (1992)
28. Handley, S. L. and McBlain, J. W. 5-HT drugs in animal models of anxiety *Psychopharmacology* 112: 13-20 (1993)
29. Hendler, N., Cimini, C. Lang, T. and Long, D. A comparison of cognitive impairment due to benzodiazepines and narcotics. *Am. J. Psychiat.* 137: 828-830 (1980)
30. Hilakivi-Clarke, L. A. Injection of vehicle is not a stressor in Porsolt's swim test. *Pharmacol. Biochem. and Behav.* 42: 193-196 (1992)
31. Hogg, S. A review of the validity and variability of the elevated Plus-Maze as an animal model of anxiety. *Psychopharmacol. Biochem. Behav.* 54(1): 21-30 (1996)
32. Jarvik, M. E. *Psychopharmacology in the practice of medicine.* Appleton Century Crofts Press. New York, 1977.
33. Kataoka, Y., Shibata, K., Miyazaki, A., Tominaga, K. And Niwa, M. Involvement of the dorsal hippocampus in mediation of the antianxiety action of tandospirone, a 5-HT<sub>1A</sub> agonist anxiolytic. *Neuropharmacology* 30 (5): 475-480 (1991)
34. Katzung, B. G. (Trevor, A.J., Walter, L. y Way, M.D.) *Farmacología Básica y Clínica.* Capítulo 21. Sedantes-Hipnóticos. Ed. El Manual Moderno. 6ª Edición, México, 1996.
35. Kozhedub, R. G.; Zaichenko, M. I.; Raigorodskii, Y. V. and Yakupova, L. P. Features of the coordinated activity functionally identified neurons in the hypothalamus in different motivational-emotional states. *Neurosc. Behav. Physiol.* 27 (2): 137-144 (1997)
36. Lerner, A. B. and Case, J. D. Melatonin. *Fed. Prod.* 19: 590-593 (1960)
37. Lerner, A. B.; Case, J. D.; Takahashi, Y.; Lee, T. H.; and Morri, W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.* 80: 2387 (1958)
38. Litter, M. *Compendio de Farmacología.* Capítulo 10. Los Tranquilizantes, y Capítulo 11. Drogas Anticonvulsivantes y Relajantes Musculares Centrales. 4ª edición. Ed. El Ateneo, Argentina, 1988.
39. López-Rubalcava, C. Pre or postsynaptic activity of 5-HT<sub>1A</sub> compounds in mice depends on the anxiety paradigm. *Pharmacol. Biochem. and Behav.* 54 (4): 677-686 (1996)

40. López-Rubalcava, C.; Saldívar, A. and Fernández-Guasti, A. Interaction of GABA and serotonin in the anxiolytic action of diazepam and serotonergic anxiolytics. *Pharmacol. Biochem. and Behav.* 43: 433-440 (1992)
41. Mahle, C. D., Takaki, K. S., Watson, A. J. Melatonin receptor ligands and their potencial clinical applications. *Ann. Rep. in Med. Chem.* 32, Robertson Ed., p31-40, 1997.
42. Marks, J. The benzodiazepines for good or evit. *Neuropsychobiol.* 10: 115-126 (1983)
43. Martinet, L., Guardiola, B., Mocaer, E. Entrainment of circadian rhythms by S-20098, a melatonin agonist, is dose and plasma concentration dependent. *Pharm. Biochem. and Behav.* 54 (4): 713-718 (1996)
44. Matheus, M. G., Nogueira, R. L., Carobrez, A. P., Graeff, F. G. Anxiolytic effect of glycine antagonist microinjected into dorsal periaqueductal grey. *Psychopharmacology* 113: 565-569 (1994)
45. McCord, C.P. and Allen, F. P. Evidences assosiating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J. Exp. Zool.* 23: 217-224 (1917)
46. McNaughton, N., Panickar, K. S., Logan, B. The pituitary-adrenal axis and the different behavioral effects of buspirone and clordiazepoxide. *Pharm. Biochem. and Behav.* 54(1): 51-56 (1996)
47. Miguez, J. M.; and Aldegunde, M. Changes in the hypothalamic serotonergic function may mediate the endocrine effects of melatonin. *Rev. Esp. Fisiol.* 52(4): 239-245 (1996)
48. Möhler, H; and Okada, T. Benzodiazepine receptor : Demonstration in the central nervous system. *Science* 198: 849-851 (1977).
49. Morgan, J. P., Barrett, P., Howell, E. and Helliwell, R. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem. Int.* 24 (2): 101-146 (1994)
50. O'Callaghan, D., Karsch, F.J., Boland, M.P. and Roche, J.F. Role of short days in the onset and duration of reproductive activity in ewes under artificial photoperiods. 44(1): 23-28. (1991)
51. Pecknold, J. C. A risk-benefit assesment of buspirone in the treatment of anxiety disorders. *Drug Safety* 16 (2): 118-132 (1997)
52. Pellow, S.; Chopin, P.; File, S. E. and Briley, M. Validation of open : close arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. of Neuro. Met.* (14): 149-167 (1985)

53. Pesold, C., Treit, D. The central and basolateral amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Brain Res.* 671: 213-221 (1995)
54. Pesold, C., Treit, D. Septal lesions inhibit fear reaction in two animal models of anxiolytic drug action. *Physiology and Behavior* 47: 365-371 (1990)
55. Pierrefiche, G.; Zerbib, R. and Laborit, H. Anxiolytic activity of melatonin in mice: involvement of benzodiazepine receptors. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 82 (2): 131-142 (1993)
56. Randall, L. O.; Schallek, G. A.; Herse, E. F. and Bagdon, R. E. The psychosedative properties of methaminodiazepoxide. *J. Phar. Exp. Ther.* 129: 163 (1960)
57. Rogawsky, M. A. and Aghajanian, G. K. Serotonin autoreceptors on dorsal raphe neurons: structure activity relationships of tryptamine analogs. *The J. of Neuroscience* 1(10): 1148-1154 (1981)
58. Sanger, D. J. Animal models of anxiety and the screening and development of novel anxiolytic drugs. *Neuromethods* Vol. 19: Animal models in psychiatry, II, 1991.
59. Sarason, I. G. *Psicología anormal*, 4ª edición, Ed. Trillas, México, 1981.
60. Schuckit, M. A. Clinical studies of buspirone. *Psychopathology* 17(3): 61-64 (1984)
61. Szara, S. I. and Ludford, J. P. *Benzodiazepines: A review of research results*, 1980. NIDA research monograph 33, a RAUS review report, 1981.
62. Schweizer, E., Rickels, K. Strategies for treatment of generalized anxiety in the primary care setting. *J. Clin. Psychiatry.* 58 Suppl 3: 27-31 (1997)
63. Sramek, J. J., Frackiewicz, E. J. and Cutler, N. R. Efficacy and safety of two dosing regimens of buspirone in the treatment of outpatients with persistent anxiety. *Clin. Ther.* 19 (3): 498-506 (1997)
64. Tallman, J. F. Paul, S. M., Skolnick, P. Gallagher, D. W. Receptors for the age anxiety: Pharmacology of the benzodiazepines. *Science* 207(18): 274-281 (1980)
65. Tang, P. L. and Pang, S.F. Changes in melatonin levels in the pineal, serum, and brain in male rats following the removal of the retina and retina plus Harderian gland. *Neuros. Lett.* 10 (suppl): 473 (1988)
66. Tellioglu, T.; Akin, S.; Ozkutlu, U. and Onat, F. The role of brain acetylcholine in GABAA receptor antagonist induced blood pressure changes in rat. *Eur. J. Pharmacol.* 317 (2-3): 301-307 (1996)

67. Tenn, C. and Niles, L. P. Physiological regulation of melatonin receptors in rat suprachiasmatic nuclei: diurnal rhythmicity and effects of stress. *Molecular and Cellular Endocrinology* 98: 43-48 (1993)
68. Uriarte, V. *Psicofarmacología*. 2ª edición, Ed. Trillas, México. 1985.
69. Walker, D. L. and Davis, M. Anxiogenic effects of high illumination levels assessed with the acoustic startle response in rats. *Biol. Psychiatry*. 42 (6): 461-471 (1997)
70. Wesley, G. C. *Farmacología Clínica*. 12ª edición. Ed. Panamericana, México, p207-219, 1991.
71. Woodfill, C.J., Robinson J.E. Malpoux, B. and Karsch, F.J. Synchronization of the circannual reproductive rhythm of the ewe by discrete photoperiodic signals. *Biol. Reprod.* 45 (1): 110-121 (1991)
72. Yasin, S. A.; Grossman, A. and Forsling, M. L. Diurnal variation in the effect of melatonin on neurohypophysial hormone release from the rat hypothalamus. *Brain Research Bull.* 39 (1): 1-5 (1996)
73. Ye, J. H. and McArdle, J. J. Waglerin-1 modulates gamma-aminobutyric acid activated current of murine hypothalamic neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282 (1): 74-80 (1997)
74. Zhu, M.; Neubig, R. R.; Wade, S. M. and Summers, C. Modulation of  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  currents in cultured neurons by angiotensin II type 1<sup>a</sup> receptor peptide. *Am. J. Physiol.* 273: 1040-1048 (1997)