



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTOS DE LA MELATONINA SOBRE LA TRANSMISIÓN
SINÁPTICA GLUTAMATÉRGICA EN LA REGIÓN CA1 DE
REBANADAS DEL HIPOCAMPO DE RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ADRIANA MARTÍNEZ MARTÍNEZ



MÉXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2005

m. 349401



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.

DEDICATORIAS

A mis padres

*Por darme todo el amor y comprensión,
Por conducirme por la vida sin dejar de luchar hasta alcanzar mis sueños,
Por estar siempre a mi lado cuando más los he necesitado,
Por todas sus enseñanzas y sacrificios,
Por dejarme ser, por dejarme creer,
Por dejarme soñar,
Por absolutamente todo,
Pero especialmente por confiar en mí,
Gracias.
Los amo*

A Braulio Arath

*Por regalarme la alegría y el milagro de ser mamá,
Por estar en mi mente y en mi corazón todos los días de mi vida,
Por que tus ojos iluminan mi alma y tu vida es mi inspiración,
Por que con tu presencia me has permitido ver y sentir muchas cosas de forma diferente,
Por todos los desvelos y alegrías,
Por los hermosos momentos,
Por tolerar mis ausencias,
Por permitirme verte crecer cada uno de tus días,
Por brindarme día a día un "te quiero mucho mami",
Por hacerme tan feliz.
Te amo*

A mis hermanos José Luis, Alejandro y Roberto Carlos

*Les agradezco su amor, apoyo y por enseñarme que estando juntos es más fácil salir adelante,
por el crecimiento como verdaderos y únicos hermanos, por darnos la mano en las buenas y en
las malas, por los momentos tan especiales. Los quiero mucho*

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Profra. Elia Brosla Naranjo Rodríguez.

VOCAL: Profr. Alejandro Ortiz Osornio

SECRETARIO: Profra. Maria Eva González Trujano

1er. SUPLENTE: Profra. Ruth Bustamante García.

2do. SUPLENTE: Profr. Jesús Arrieta Valencia

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

LABORATORIO DE NEUROFARMACOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE FARMACIA,
EDIFICIO "A", ANEXO LABORATORIO 1/ E, UNAM.

ASESOR DEL TEMA



Dra. ELIA BROS LA NARANJO RODRÍGUEZ

SUPERVISOR TÉCNICO



Dr. CARLOS BARAJAS LÓPEZ

SUSTENTANTE



ADRIANA MARTÍNEZ MARTÍNEZ

Los hombres deben de saber que el cerebro es el responsable exclusivo de las alegrías, placeres, risa y diversión, y la pena, aflicción, desaliento y las lamentaciones. Y gracias al cerebro, de manera especial, adquirimos sabiduría y conocimientos, y vemos, oímos y sabemos lo que es repugnante y lo que es bello, lo que es malo y lo que es bueno, lo que es dulce y lo que es insípido... Y gracias a este órgano nos volvemos locos y deliramos, y los miedos y terrores nos asaltan... Debemos soportar esto cuando el cerebro no está sano... Y en este sentido soy de la opinión de que esta viscera ejerce en el ser humano el mayor poder.

Hipócrates. Sobre las enfermedades sagradas, siglo IV a. C.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Profesores y a la Sección 024 del AAPAUNAM de la Facultad de Química, UNAM, por la Cátedra "Fernando Orozco Díaz" otorgada a este proyecto, durante el semestre 2005-I (Anexo I).

A la Dra. Elia Brosta Naranjo Rodríguez, por la confianza y apoyo brindado durante el desarrollo de esta tesis; sobre todo en los momentos difíciles. Gracias por todas sus enseñanzas y experiencias que tuve durante mi estancia en su laboratorio.

Al Ing. Jorge Zamorano Velasco por su apoyo técnico en el manejo del software para el análisis de datos de este proyecto.

Al Programa de Apoyo a Licenciatura (PAL) y al Programa de Apoyo al Posgrado (PAIP) con clave 6390-21, de la Facultad de Química de la UNAM.

Al Programa de Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIT-DGAPA-UNAM) con número de proyecto IN205905, de la Facultad de Química de la UNAM.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química, por brindarme un espacio en esta máxima casa de estudios, y proporcionarme las herramientas para formarme profesionalmente.

ÍNDICE	PÁGINA
I.- LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
II.- INTRODUCCIÓN.....	2
III.- ANTECEDENTES.....	4
1.1 Glándula Pineal.....	4
1.1.1 Anatomía.....	6
1.1.2 Composición Bioquímica.....	8
1.1.3 Fisiología.....	9
1.2 Melatonina.....	13
1.2.1 Biosíntesis y Metabolismo.....	15
1.2.2 Efectos Fisiológicos.....	18
1.2.3 Receptores de Melatonina.....	19
1.3 Transmisión Sináptica.....	21
1.4 Hipocampo.....	24
1.5 Potenciación a Largo Plazo.....	27
1.5.1 Base Molecular de la Potenciación a Largo Plazo.....	29
1.5.2 Depresión de Largo Plazo.....	32
1.6 ATP como Neuromodulador.....	33
1.7 Planteamiento del Problema.....	38
2.0 Hipótesis.....	39
2.1 Hipótesis Generales.....	39
3.0 Objetivos.....	39
3.1 Objetivos Generales.....	39
3.2 Objetivos Particulares.....	39
IV.- METODOLOGÍA.....	40
1. Preparación de las rebanadas del hipocampo de rata (región CA1)	40
2. Cámara de Registro.....	42
3. Registro de la actividad eléctrica de las neuronas piramidales.....	45
4. Análisis estadístico.....	49
V.- DESCRIPCIÓN DE RESULTADOS.....	51
1. Efecto de la melatonina sobre la transmisión sináptica glutamatérgica.....	51
2. Efecto del ATP sobre la transmisión sináptica glutamatérgica.....	57
VI.- DISCUSIÓN.....	61
VII.- CONCLUSIONES.....	63
VIII.- PERSPECTIVAS.....	64
XI.- BIBLIOGRAFÍA GENERAL.....	65
X.- ANEXOS.....	73

I. LISTA DE ABREVIATURAS

ANADEVA	Análisis de Varianza
ACTH*	Hormona Adrenocorticotrópica
ATP	Adenosin-5'- trifosfato
AMPA	α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato
BHE	Barrera Hematoencefálica
DS	Desviación estándar
EPSPs*	Potenciales Postsinápticos Excitadores
GP	Glándula Pineal
GSCS	Ganglio Simpático Cervical Superior
HIOMT	Hidroxiindol-O-metiltransferasa
5-HT	5-Hidroxitriptamina
IPSPs*	Potenciales Postsinápticos Inhibidores
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
LCRA	Líquido Cefalorraquídeo Artificial
LTD*	Depresión de Largo Plazo
LTP*	Potenciación a Largo Plazo
MEL	Melatonina
NAT	N-Acetiltransferasa
NMDA	N-metil-D-aspartato
SN	Sistema Nervioso
SNA	Sistema Nervioso Autónomo
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
TRH*	Hormona tirotrópica

* por sus siglas en inglés

II. INTRODUCCIÓN

La melatonina (MEL) es una hormona secretada por la glándula pineal (GP) durante la escotofase del ciclo día-noche. Se planteó que la MEL tiene un efecto sobre las neuronas del hipocampo por acción en los receptores MT2 a MEL, receptor prevaletiente en esta región. Hasta la fecha no se tiene claro el mecanismo de acción por el cual la MEL lleva a cabo sus efectos fisiológicos; y con el fin de conocer tal mecanismo, realizamos un estudio preliminar electrofisiológico en rebanadas del hipocampo de cerebro de rata, donde observamos el efecto de la MEL sobre la transmisión sináptica glutamatérgica. La transmisión sináptica, permite a las células del Sistema Nervioso Central (SNC), comunicarse eficientemente entre ellas. Ésta se realiza a través de contactos funcionales entre las neuronas, denominado sinapsis. La sinapsis química permite la comunicación celular por medio de la secreción de neurotransmisores por parte de la neurona presináptica, produciendo posteriormente, el flujo de la corriente en la neurona postsináptica, por la activación de receptores específicos. En el hipocampo, el principal neurotransmisor de tipo excitador que media la comunicación entre las células piramidales de la región CA1, es el glutamato. Éste actúa mediante la interacción de receptores ionotrópicos (NMDA) y metabotrópicos (AMPA y Kainato). En esta estructura, se han descrito también varias sustancias capaces de modular la comunicación sináptica glutamatérgica entre las células piramidales durante procesos fisiológicos. En el presente proyecto se analizaron los efectos del adenosin-5'-trifosfato (ATP) y la MEL sobre la transmisión sináptica excitadora en neuronas piramidales de la región CA1 en hipocampo. El ATP se ha descrito como una sustancia neuromoduladora del Sistema Nervioso Periférico (SNP) y en la unión neuromuscular, es liberado con acetilcolina y glutamato en varias partes del cerebro, incluyendo la corteza, cerebelo e hipocampo recientemente se la ha involucrado en la protección del hipocampo, durante procesos hipóxicos. Actualmente, sabemos que la MEL ejerce varios efectos neuromoduladores.

Los objetivos del presente proyecto fueron 1) implementar la metodología de rebanadas de hipocampo de rata en el laboratorio de Neurofarmacología y 2) comprobar la eficacia del modelo utilizando ATP y MEL para determinar el efecto de estas sustancias sobre la transmisión sináptica glutamatérgica en la región CA1 de rebanadas del hipocampo de rata. Este estudio nos permitirá conocer la relación existente entre el glutamato y dos sustancias que modulan la comunicación neuronal.

III. ANTECEDENTES

1.1 GLÁNDULA PINEAL

La glándula pineal (GP) o "*epifisis cerebri*" se describió por primera vez en el año 325 a. C., por Herófilo³⁹ anatomista Alejandrino, quien la relacionó con las funciones reguladoras de la memoria. En el siglo II, Galeno la relacionó con los nódulos linfáticos y posteriormente Descartes en el siglo XVII, consideraba que la pineal controlaba el flujo del "espíritu animal" por movimientos a través de nervios motores, y de esta manera influenciaba también, en los movimientos generales del cuerpo (fig. 1). De ahí que se considerara la ubicación del alma en la GP, idea que prevaleció durante 250 años^{34, 98}.

El nombre actual de la GP fue propuesto por el anatomista inglés Thomas Gibson (en: *the anatomy of human bodies epitomized* "1682") del latín "pineus", ya que su forma es semejante a una piña de conífera¹⁰⁷.

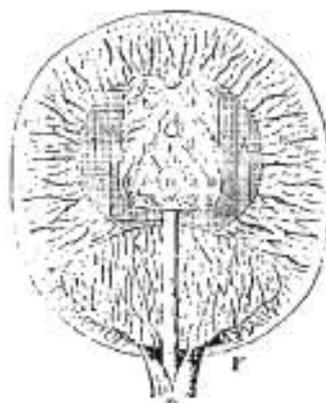


Fig. 1. Esquema representativo de la GP, realizado por Rene Descartes en 1646⁸⁵.

En 1880 Ahlhom y de Graaf⁶⁰ inician la investigación sistemática de la GP en mamíferos y en 1943 Bargmann propone que la regulación de la GP vía Sistema Nervioso Central (SNC)⁶¹.

Sin embargo, fue hasta la década de los años 50 cuando se inició su estudio sistemático con la identificación por Lerner y cols., de un compuesto pineal, la melatonina (MEL). llamada así por su semejanza funcional con la melanina, debido a que es capaz de producir la aclaración de la piel de los renacuajos por la acumulación de melanina alrededor de los melanóforos^{64, 65}.

La MEL tiene la capacidad de producir distintos efectos endocrinos y conductuales en mamíferos y vertebrados inferiores. Con estos hallazgos bioquímicos y fisiológicos establecieron que en mamíferos, incluido el hombre, se sintetizaba la MEL en función de la iluminación ambiental, es decir, por un sistema de regulación fotoneuroendócrino^{66, 65, 70}.

En 1965 Hoffman y Reiter⁴⁸ mostraron el papel que ejerce la GP en la regulación foperiódica de la conducta reproductora del hámster. En la misma década Wurtman y Axelrod acuñaron para esta propiedad en nombre de "transductor neuroendocrino", es decir, es un órgano que convierte un impulso eléctrico neural proveniente de la retina en una respuesta endocrina; la MEL^{24, 35}.

En general la GP es una estructura epitalámica rodeada por el sistema ventricular cerebral que está presente en todos los vertebrados, a excepción del armadillo y cocodrilo⁶. En especies, como los reptiles, el parénquima de la GP está conformado por células fotorreceptoras organizadas de tal manera que sugieren una función básicamente sensorial, aunque tiene la capacidad secretora (transductor fotoncral). En las aves, los fotorreceptores pineales tienen la capacidad de transformar la energía luminica en respuesta

secretora (transductor fotoendócrino). En mamíferos, la GP tiene una función endocrina y carece de fotorreceptores típicos (transductor neuroendócrino), es decir pierde su propiedad fotorreceptiva y la conexión se produce en la retina neural^{24, 26, 35}. Por lo que se ha propuesto que la función endocrina y secretora, esta estrechamente relacionada con los cambios hormonales en las diversas especies. Existen evidencias de su participación en la regulación de la función de diversos órganos como: hipotálamo, hipófisis, suprarrenales y gónadas⁵⁶ por lo tanto se designa a la GP como neurotransmisor endócrino⁹⁶.

1.1.1 ANATOMÍA

La GP de los mamíferos es una pequeña estructura lenticular intracraneal unida por un tallo al techo de tercer ventrículo entre la comisura posterior por arriba del techo del mesencéfalo, ubicada entre los tubérculos cuadrigéminos superiores, lo que le proporciona acceso directo al líquido cefalorraquídeo (LCR)¹⁰⁷ (fig. 2).

Embriológicamente, la GP se desarrolla a partir de la porción media del prosencéfalo donde origina la placa del techo diencefálico, la porción más caudal de este se abulta dorsalmente y forma un divertículo cuyas paredes engruesan hasta ocupar gradualmente la cavidad que constituye a la GP, la cual alcanza su máximo desarrollo en la etapa postnatal y posteriormente presenta cambios regresivos¹⁰⁷.

En la rata, la GP es una estructura hipotalámica en forma de esfera, reside en la parte más posterior del cerebro y en la línea media, por debajo de la confluencia del seno venoso sagital con los senos venosos laterales, descansando sobre los colículos superiores y opuesta al cerebelo²².

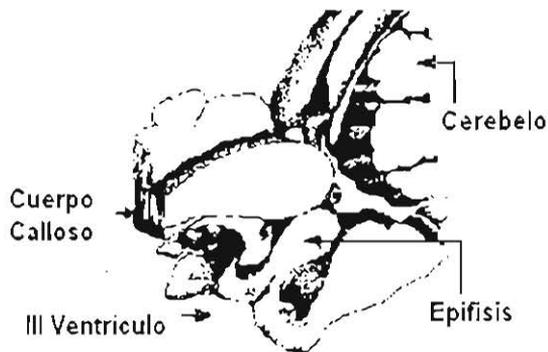


Fig. 2. Localización de la GP en el humano, dicha glándula está unida al techo del tercer ventrículo⁹⁴.

La GP esta constituida por dos clases de células²²: las neuroectodémicas, contenidas en el divertículo del techo del tercer ventrículo donde origina dos tipos de células: los pinealocitos y la glía, por otro lado se encuentran las células mesenquimatosas de la piamadre que reviste el divertículo, las cuales derivan en fibroblastos que constituyen la cápsula, trabéculas y tabiques que subdividen a la GP en lóbulos⁹⁰. El aspecto de estos lóbulos varía de acuerdo a la especie de que se trate, consisten en conjuntos de pinealocitos y células neurogliales separadas por trabéculas irregulares y tabiques incompletos de tejido conectivo, el cual lleva un abundante riego capilar proveniente de las arterias coroides posteriores¹¹⁰. Con la edad se acumula en la GP residuos de material calcificado (arenilla cerebral), compuestos principalmente por carbonatos y fosfatos de calcio, indicio de un fenómeno degenerativo¹⁰⁷.

El parenquima de la GP está constituido por pinealocitos los cuales representan el 55% de la masa pineal y cuya función es secretora⁴¹. Son células de gran tamaño y nucleólos destacados, su citoplasma presenta cúmulos de material basófilo (RNA y DNA), además contiene una gran cantidad de mitocondrias y sitios de almacenamiento de

productos de secreción. El endotelio de la GP es fenestrado, permitiendo así la salida y entrada de moléculas relativamente grandes desde y hacia el espacio intersticial de la GP⁶⁷.

1.1.2 COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA

En los mamíferos la GP contiene altas concentraciones de Cu^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+} en comparación con otras regiones del cerebro¹¹¹, esto se debe, por un lado a su relación con las enzimas contenidas en la GP, y por otro lado, a su asociación con pigmentos y concreciones conocidas como depósitos calcáreos⁹².

Alrededor del 3-10 % del peso de la GP esta constituido por lípidos que conforman la fracción lipídica y más del 50% de ellos son fosfolípidos³², los cuales se encuentran en forma de pequeñas gotas alrededor del núcleo. Se ha observado que en animales expuestos a la luz continua disminuye notablemente la cantidad de lípidos⁷⁵, efecto que es bloqueado al seccionar los nervios ópticos, lo cual demuestra la regulación circadiana del funcionamiento de la GP¹⁴.

Se ha observado la presencia de algunos carbohidratos como el ácido neuramínico y el ácido siálico, los cuales forman partes de lípidos, polisacáridos y mucoproteínas localizadas en el glucocálix de la membrana celular⁷⁵. Otro compuesto presente que es importante para el almacén nutritivo de los tejidos animales, es el glucógeno, el cual sufre un decremento importante en su concentración en ratas expuestas a la luz continua.

Por lo que respecta a los aminoácidos son importantes las concentraciones de aquellos susceptibles de donar un grupo metilo requerido en la biosíntesis de la MEL y principalmente la presencia de una gran cantidad de triptófano circulante el cual es captado por el pinalocito²⁶.

Aunque la principal hormona secretada es la MEL, la GP posee las enzimas necesarias para el metabolismo de diversos indoles del tipo de la MEL como son: 5-ácido-hidroxi-indol-3-acético, 5-hidroxi-triptofol o 5-metoxi-triptofol y serotonina⁵⁹. Además la GP contiene una extensa variedad de sustancias neurotransmisoras como adrenalina, histamina, dopamina, octopamina, y somatostatina, (el factor liberado de la tirotropina), los cuales son péptidos hipotalámicos y un péptido único que es la vasotocina. análoga a la vasopresina y a la oxitocina. De las numerosas sustancias biológicamente activas presentes en la GP, la MEL ha sido estudiada más intensamente⁴⁰.

1.1.3 FISIOLÓGÍA

La inervación de la GP proviene del ganglio simpático cervical superior (GSCS) del Sistema Nervioso Autónomo (SNA), donde se ha demostrado que las terminaciones nerviosas llegan directamente a los pinealocitos. La actividad enzimática que interviene en la síntesis de serotonina y MEL en la GP esta controlada por estimulación beta-adrenérgica del pinealocito^{55, 60}.

La vía de inervación de la GP es la que conduce al estímulo fotónico que proviene de la retina, los impulsos nerviosos que proceden de la retina y van hacia la GP llegan al cerebro a través del tracto retinohipotalámico que termina en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo^{59, 81, 82}. La información nerviosa es transferida desde el núcleo supraquiasmático hacia el segmento torácico de la médula espinal por una vía que se proyecta caudalmente a las áreas periventricular y tuberal del hipotálamo lateral y finalmente neuronas de esta localización establecen conexión con la columna intermediolateral de la médula cervical, desde donde se originan las fibras preganglionares

que terminan en el GSCS conformando el nervio conario^{7, 55, 60} (fig 3).

Hay evidencia de la existencia de otra vía de innervación de la GP, consistente en pequeñas fibras de origen también simpático que llega a ella a través del tallo, el cual parece contener fibras de la comisura habenular y la comisura posterior en varios mamíferos⁶⁰.

En los mamíferos, la función de la GP no se ha establecido por completo. Existen trabajos donde se le atribuyen diversas funciones tales como su participación en la maduración postnatal del cerebro⁹², en la regulación del metabolismo en general¹⁰⁹ y en la termorregulación⁵, para lo cual se ha sugerido la existencia de una regulación bidireccional entre la GP y el sistema hipófisis-hipotálamo en los mamíferos^{53, 91, 93}.

Esto nos indica que la principal función de la GP es proveer a los órganos endocrinos, a través del eje neuroendocrino de la información necesaria sobre el estado ambiental, en especial de la iluminación ambiental; esta información es utilizada para ajustar acordeamente la actividad del eje hipotálamo-hipofisario^{53, 91, 93}.

Específicamente, se le atribuye una función secretora, ya que desde el punto de vista metabólico los pinealocitos son muy activos y secretan dos sustancias serotonina y MEL, de estructura semejante, sin embargo, no secretan ambas simultáneamente⁹³.

Por lo tanto, la característica fundamental de la GP es su capacidad para producir y secretar hormonas de acuerdo al patrón fotoperiódico^{9, 12}; en el cual la luz juega un papel supresor. En consecuencia durante la ecotofase la concentración de MEL proviene de la GP alcanzando su máximo nivel (30-50)pg/mL), mientras que en presencia de luz ambiental, se reduce tanto la producción como la secreción¹⁰⁹ (5ng/mL) (fig. 4). Esta asociación entre la función de la GP y el fotoperiodo es indicativo del papel que juega la GP en la regulación

de las variaciones fotoperiódicas y estacionales en las funciones de los seres vivos^{26, 48}.

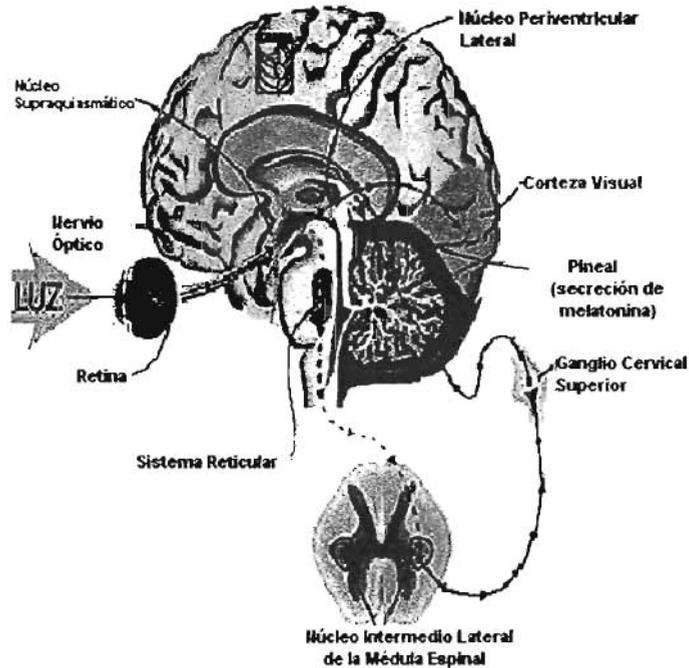


Fig. 3. Mecanismo de acción de la luz sobre la GP⁵⁰.

En ratas y en hámsters hembra, el déficit de MEL provoca hiperfuncionamiento gonadal, ya que tiene un efecto directo sobre el hipotálamo y ejerce un efecto antigonadotrópico, o bien la pinealectomía origina desarrollo sexual precoz, ya que probablemente inhibe en forma directa la secreción gonadal^{13, 56, 84, 96}.

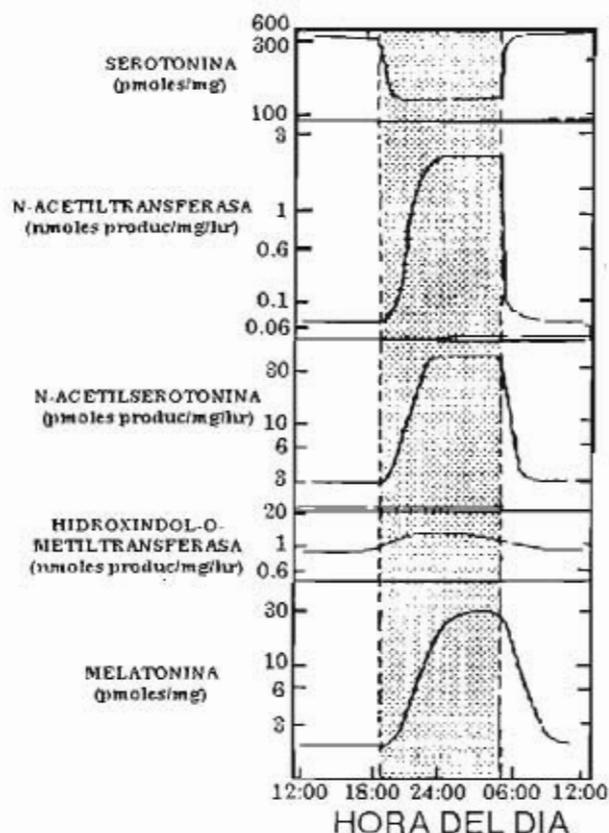


Fig. 4. Variación de las concentraciones de las enzimas de la GP responsables de la síntesis de MEL, las cuales siguen un ritmo circadiano en las ratas⁹³.

En animales neonatos no puede sintetizarse, sin embargo, se ha demostrado que la MEL materna es transportada a través de la placenta⁹⁸ y la leche, donde juega un importante papel en la maduración sexual⁹⁷, incluso en el humano se le atribuye una relación en la regulación gonadal⁹⁷.

En algunas especies se ha demostrado un efecto en la GP sobre la tiroides, puesto

que la exposición de un animal a oscuridad continua causa hipertrofia de la GP con depresión de la función tiroidea, efecto que se consigue también mediante la administración de MEL, mientras que la exposición a la luz constante atrofia la GP e incrementa la secreción de hormonas tiroideas en varias especies, efecto que se logra también con la pinealectomía. Probablemente, el efecto depresor sea causado a través de la inhibición en la síntesis y liberación del factor liberador de la hormona tirotrópica⁵⁷ (TRH), hay experimentos que demuestran que si se modifica el ciclo luz-oscuridad, se registra un cambio en la actividad de la GP y en tan sólo 6 días se sincroniza el nuevo ritmo, lo cual indica que el ritmo diario es endógeno pero sincronizado a la luz ambiental, por lo que se requiere un reloj que sincronice la actividad al nuevo ritmo^{16, 17, 27, 39, 107}.

El reloj biológico que actúa como oscilador e influye en las células pineales, para regular las variaciones en los niveles de MEL y serotonina en el ritmo endógeno pineal de tipo circadiano, es el núcleo supraquiasmático; se ha demostrado en la rata que las lesiones a este nivel provoca la desaparición del ritmo diario en el metabolismo de las indolaminas, y muy probablemente suceda en el humano⁴⁰, por tal motivo la GP ha sido objeto de diversas investigaciones, ya que proporciona un modelo experimental para el estudio de ritmos circadianos, además de la regulación que ejerce sobre otros órganos^{40, 43}.

1.2 MELATONINA

La MEL fue descubierta por McCord y Allen en 1917⁷⁴, pero fue hasta que 1958 Lerner y cols. aislaron a la melatonina (MEL) y estructuralmente la denominaron N-acetil-5-metoxitriptamina⁶⁵ (fig. 5), fue aislada, identificada y llamada MEL cuando observaron en ranas y renacuajos a los que se les aclaraba la piel después de administrarles extractos de

GP provenientes de bovinos. El mecanismo de esta acción consiste en una agregación de gránulos de melanina alrededor de los núcleos celulares. Posteriormente Lerner y cols., mostraron que este efecto es opuesto al que produce la hormona estimulante de los melanocitos, la cual es liberada por la hipófisis intermedia de estos animales^{36, 65, 70}. A partir de este hallazgo, se inició el estudio de las funciones de la pineal a través de la investigación de la influencia de la MEL sobre diversos órganos.

La MEL es sintetizada principalmente en los pinealocitos de la GP, aunque también en otros sitios extrapineales como en la retina, el intestino y en la glándula Harderiana de los roedores^{25, 36, 65}.

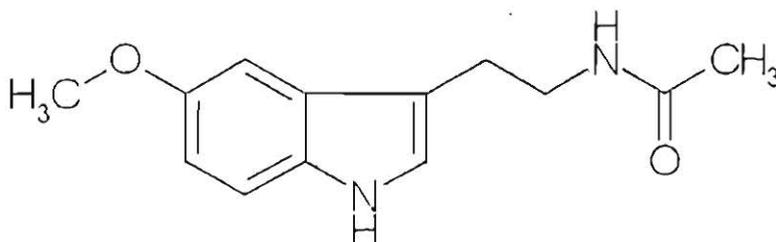


Fig 5. Estructura de la MEL, compuesto metoxiindólico, es la principal hormona producida por la GP su nombre químico es N-acetil-5-metoxitriptamina⁶⁵.

Diversos estudios en los últimos años han demostrado que la MEL provee una señal interna de sincronización del ritmo sueño-vigilia y de otros numerosos ritmos circadiano, por lo que interviene en numerosas funciones biológicas, las siguientes propiedades de la MEL han sido repetidamente observadas: efecto antigonadotrópico²⁹, efecto fortalecedor evidente sobre el sistema inmunológico⁶⁹, refuerza los antioxidantes que protegen a las

células contra el daño por radicales libres^{76,77,98}, desacelera el crecimiento de tumores^{13, 99}, regula la presión sanguínea²⁹, limita y en ciertos casos frena la pérdida de memoria¹, resuelve problemas de cambios de horario⁴⁵ (jet-lag), actúa como ansiolítico^{85, 61} y además tiene un efecto sedativo⁸⁵.

1.2.1 BIOSÍNTESIS Y METABOLISMO

La biosíntesis del derivado indólico MEL, como la de todos los indoles comienza en los pinealocitos con la captación del triptofano de la circulación. Una vez en el pinealocito, parte del triptofano es utilizada para la síntesis proteica, mientras una fracción mayor es metabolizada a través de la vía de los indoles. Para la biosíntesis de MEL, inicialmente el triptofano es oxidado en la posición 5 del anillo indólico por la acción de la triptofano hidroxilasa. El 5-hidroxitriptofano producido es rápidamente descarboxilado por la descarboxilasa de *L*-aminoácidos aromáticos y forma la serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT)^{25, 66, 75}.

La 5-HT de la GP, sigue por una parte, la ruta catabólica a otros tejidos y por otra, la formación de MEL. En esta última vía, es primero acetilado en el nitrógeno de la etilamina por la acción de la enzima *N*-acetiltransferasa, (NAT) para formar la *N*-acetilserotonina, la cual es a su vez *O*-metilada por efecto de la enzima hidroxindol-*O*-metiltransferasa (HIOMT). Esta enzima está presente en el citoplasma de las células parenquimatosas de la GP y transfiere el grupo metilo activo de la *S*-adenosilmetionina al grupo hidroxilo de la posición 5 del núcleo indólico formándose *N*-acetil-5metoxitriptamina o MEL. En vertebrados, la síntesis se realiza en la GP, así como en varios tejidos periféricos^{25, 66, 75} (fig. 6).

Una de las principales acciones fisiológicas de la HIOMT es que al convertir indolaminas, como la 5-HT, la que no puede atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), a compuestos metoxilados como la MEL, éstos tienen un fácil acceso al cerebro¹⁰⁴.

La GP produce MEL durante la noche merced a un estímulo nervioso procedente de la retina y de diferentes núcleos cerebrales. Mientras que la luz frena la producción de MEL, la oscuridad estimula su síntesis en todas las especies animales incluyendo al ser humano^{90, 93, 96}.

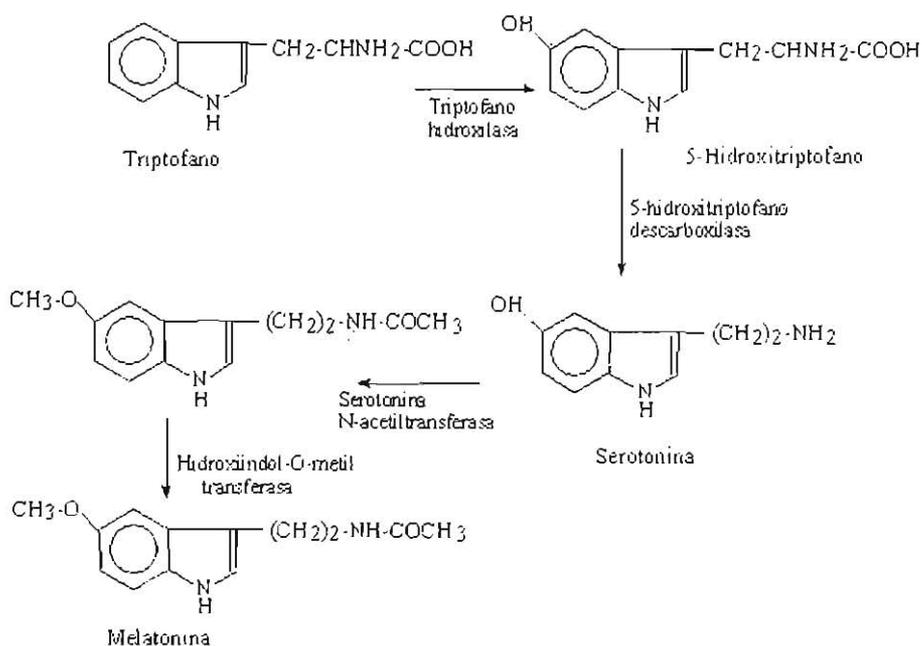


Fig. 6. La síntesis de la MEL se lleva a cabo en los pinealocitos de la GP, se sintetiza a partir del triptófano y por medio de reacciones enzimáticas dan como producto final a la MEL.²⁵

Sólo la MEL producida por la GP entra en el plasma por un mecanismo de difusión simple donde se une a la albúmina, llega a diferentes órganos efectores, comprendidos tanto

por el SNC como por tejidos periféricos. La MEL pineal representa en el organismo una señal circulante del tiempo, reguladora del sistema circadiano y de los ritmos diarios y anuales^{16, 18, 24, 28}.

El metabolismo de la MEL comienza en el hígado, en donde se hidroxila a un compuesto sin actividad biológica denominada 6-hidroximelatonina que posteriormente se conjugará con ácido glucurónico o sulfúrico, el cual será excretado en orina y heces. Del 70 al 80% de MEL se encuentra como sulfatos en orina, mientras que el 5% se encuentra como glucurónidos, 15% como N-acetil-5-metoxiquinurenamina, 0.5% como ácido 5-metoxiindolacético y menos del 1% permanece inalterado (fig. 7)²⁵.

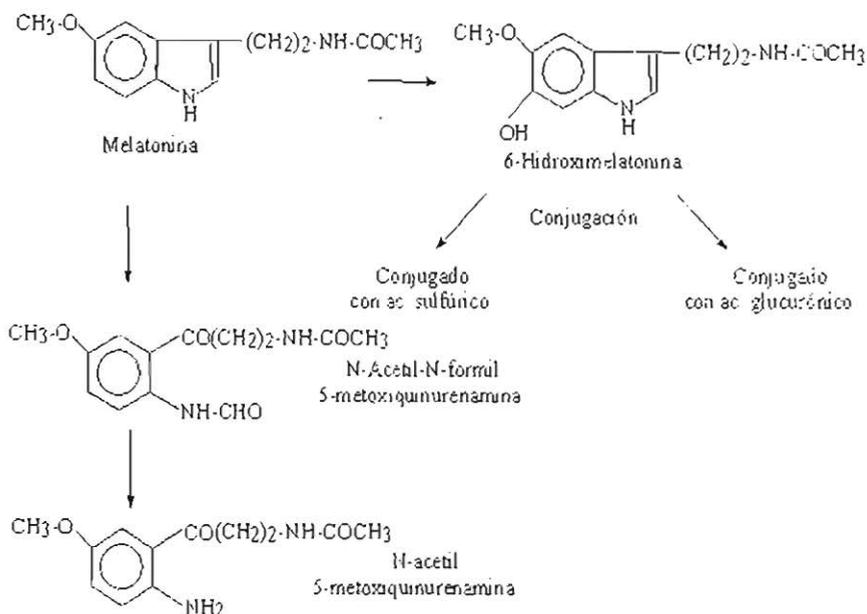


Fig. 7. El metabolismo de la MEL se lleva a cabo principalmente en el hígado²⁵.

1.2.2 EFECTOS FISIOLÓGICOS

Se dice que la MEL previene ataques cardiacos resultantes del estrés, disminuyendo la producción de corticosteroides los cuales pueden dañar el músculo del corazón. La MEL puede también reducir la tensión sanguínea al disminuir el ritmo cardiaco²⁹.

También, se ha observado que en personas con insomnio los niveles nocturnos de MEL están disminuidos. En estudios recientes se ha verificado que la MEL afecta al sueño modificando dos mecanismos distintos: aumenta la propensión al sueño y sincroniza el reloj circadiano⁴⁵.

La participación de la MEL ha estado asociada con procesos de ritmos endógenos, que permiten la adaptación del sueño en diferentes horarios y el reajuste de procesos metabólicos regulados hormonalmente, fenómeno que la ha valido el calificativo de "reloj biológico" que todas las especies poseen para su adaptación a su entorno ambiental^{44,45,88}.

En el ser humano la MEL actúa como un sincronizador de la temperatura corporal, la secreción del cortisol y la hormona adrenocorticotropica (ACTH). Este efecto permite acelerar el acoplamiento al horario local tras un viaje transoceánico, reduce el efecto del jet-lag y puede ser útil en personas con turnos rotatorios de trabajo⁵.

La función de la MEL descubierta más recientemente ha sido la de comportarse como un potente antioxidante natural, con una capacidad antioxidante cinco veces mayor que el glutatión y más efectiva en la eliminación de los radicales libres que la vitamina E. El mecanismo consiste en fijación de los radicales hidroxilo, potentes oxidantes, mediante apertura del núcleo indólico y producción de un derivado de la kirurenina. Dado que la melatonina es altamente lipófila y que sus efectos se han observado solamente a concentraciones más altas de las normales para los receptores, es posible que los efectos

antioxidantes se realicen con independencia de dichos receptores^{76, 77, 98}.

En años recientes, la posible relevancia terapéutica de la MEL en la enfermedad de Alzheimer ha sido indicada por estudios *in vitro*. En cultivos de neuronas, la MEL protege a éstas células contra la toxicidad de β -amiloides (proteínas anómalas que se depositan en los tejidos durante el transcurso de diversas enfermedades)¹.

La posibilidad de detectar niveles suprimidos de MEL en plasma es significativamente mayor en pacientes con demencia. En vista de los datos experimentales en animales que indican que la MEL tiene actividad antioxidante, antiapoptótica y antagonista del β -amiloide en el SNC, es posible que esta sea útil en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer¹.

Las mujeres con disminución grave de la capacidad visual tienen menor riesgo de desarrollar cáncer mamario¹³, lo que tendría relación con el efecto de la luz visible sobre la secreción de MEL. Se ha señalado que la MEL es útil para combatir los síntomas de epilepsia y de la enfermedad de Parkinson. En los epilépticos, el tratamiento agudo con MEL produce mejoría clínica muy marcada, lo mismo que el tratamiento subagudo y crónico en pacientes con Parkinson. El mecanismo por el cual la MEL produce este efecto es desconocido, sin embargo, se cree que puede deberse a la capacidad de la MEL para alterar el balance de algunos neurotransmisores del SNC¹.

1.2.3 RECEPTORES DE MELATONINA

En los mamíferos se han descrito la presencia de tres tipos diferentes de receptores a la MEL los MT1, MT2 los cuales fueron identificados con iodomelatonina (radioligando de alta afinidad) y MT3 el cual es clonado. Los dos primeros están acoplados a sistemas de

proteínas G y el tercero pertenece a la familia de las quininas reductasas³⁶.

Estos receptores consisten de una simple cadena polipeptídica de 39 a 47 KDa y 346 a 420 aminoácidos, están constituidos por siete dominios transmembranales (MT I, II, III, IV, V, VI, VII y VIII) conectados por asas intracelulares y extracelulares, el amino N-terminal está del lado extracelular y presenta uno o dos sitios de glucosilación, mientras que el carboxilo terminal es intracelular^{36,70}.

El receptor MT1 el cual se expresa en el núcleo supraquiasmático en el hipocampo y en vasos sanguíneos donde esta relacionado con los ritmos circadianos y la reproducción. Además de las regiones específicas el receptor MT1 se expresa en otras regiones del cerebro y tejidos periféricos y este receptor está acoplado a una gran variedad de proteínas G que pueden inhibir la adenilato ciclasa que le atribuye su actividad fisiológica¹¹³.

El papel fisiológico del receptor de MEL MT2 en mamíferos aún no está esclarecido, sin embargo sabemos que está involucrado con la fisiología de la retina, en la modulación circadiana y en las respuestas inflamatorias en la microcirculación¹¹³.

Un subtipo del receptor MT2, el MTRs tiene restringida su localización en cerebelo, hipotálamo, retina, riñón, ovario y vasos cardíacos¹¹³.

Los receptores de MEL se han encontrado en tejidos, tanto neuronales como no neuronales de varias especies de vertebrados incluyendo al hombre en donde la distribución de los mismos puede cambiar tanto en especie como en sexo¹¹³.

Los receptores de MEL en la retina y los colículos superiores están implicados en la regulación de las funciones visuales, mientras que los que se encuentran en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, están relacionados con los ciclos circadianos y reproductivos. Los receptores de 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 temperatura¹¹³.

Los efectos desencadenados por la MEL son consecuencia de una acción mediada a través de receptores específicos localizados en la membrana de las células blanco¹¹³.

1.3 TRANSMISIÓN SINÁPTICA

En el siglo XIX de Cajal y Golgi²³ fueron los primeros en demostrar que las neuronas son la unidad funcional del SNC. Las neuronas son estructuras especializadas en la generación y el procesamiento de señales eléctricas para lo cual están organizadas en circuitos. La neurona comprende un cuerpo celular que contiene un núcleo y la mayor parte de los organelos celulares. El cuerpo o soma celular se prolonga a través de las dendritas, que son extensiones cortas y cuyo diámetro disminuye conforme se alejan del cuerpo neuronal (fig. 8). Otra extensión nerviosa es el axón el cual es particularmente largo y mantiene su diámetro constante. La mayoría de los contactos sinápticos, se establecen en las dendritas donde los axones de otras neuronas terminan. Considerando la funcionalidad de las neuronas, estas se clasifican en sensoriales, interneuronas y motoras. Las primeras llevan información de la periferia hacia el Sistema Nervioso (SN) y su cuerpo neuronal se encuentra en los ganglios sensoriales. Las neuronas motoras llevan información del SN a los órganos efectores como los músculos, las glándulas, etc. Las interneuronas son células cuyos axones terminan dentro del mismo centro neuronal, estas constituyen el 99% de todas las neuronas y se encargan de realizar el procesamiento de señales⁵⁴.

Las sinapsis pueden ser químicas o eléctricas. Las primeras usan sustancias

(neurotransmisores), las cuales son liberadas en la terminal axónica para influenciar la membrana (postsináptica) de la célula receptora. En las sinapsis eléctricas, el citoplasma de las dos células se comunica mediante canales especializados, conocidos como uniones comunicantes. Estas uniones tienen una baja resistencia eléctrica y permiten que las señales eléctricas de una neurona se propaguen a la segunda y permiten el flujo pasivo directo de la corriente eléctrica de una neurona a otra^{54, 116}.

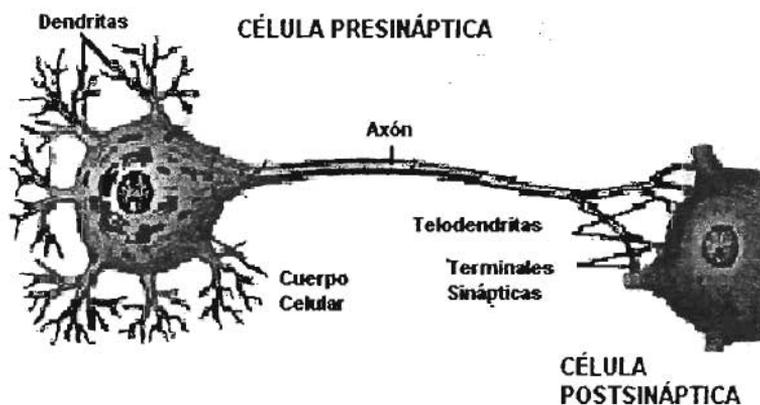


Fig. 8. Estructura de una neurona multipolar y su sinapsis⁵⁴.

Las sinapsis químicas de tipo excitador e inhibitor representaron el modelo más sencillo para describir la transmisión sináptica central y neuromuscular. Este modelo se desarrolló para poder explicar la mayoría de las observaciones fisiológicas de los tejidos excitables. Así que, el modelo más adecuado tenía que contemplarse con base a un tipo de sinapsis más compleja, la cual incluye alguna de las siguientes características: la participación de diferentes primeros mensajeros (neurotransmisores y/o neuropéptidos),

actuando a través de diferentes receptores y activando diferentes sistemas de segundos mensajeros. A este tipo de mecanismos de mayor duración se les denomina *Neuromodulación* ¹⁰².

Por otro lado y específicamente en el hipocampo el proceso de neuromodulación de la transmisión sináptica ha sido objeto de gran variedad de estudios, tomando aspectos como la interacción de los diferentes neurotransmisores y neuropéptidos, que las neuronas piramidales co-expresan y co-liberan por la estimulación de las fibras aferentes y analizando cual es el papel que éstas interacciones juegan en los procesos fisiológicos que regulan esta estructura. Las preparaciones de rebanadas de hipocampo *in vitro* ⁴⁷ permiten analizar la comunicación de sinapsis individuales y de circuitos en una región de tejido estable y donde las manipulaciones farmacológicas pueden realizarse a través de un baño de solución de líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA).

Con este tipo de estudios, se ha podido establecer que la comunicación sináptica en el hipocampo, mediada principalmente por el glutamato como neurotransmisor excitador formando parte de los circuitos neuronales implicados en los mecanismos de memoria y aprendizaje. Por lo tanto las alteraciones en la eficiencia de la transmisión sináptica son estudiadas por varios investigadores debido a que son la base neurofisiológica de estos mecanismos. El papel aparente de estos circuitos neuronales en la enfermedad de Alzheimer ha incitado la investigación de los mecanismos de la modulación sináptica y la plasticidad sináptica en el hipocampo.

1.4 HIPOCAMPO

El hipocampo, recibe su nombre por su semejanza con los caballos de mar (del griego *hippo* = caballo, *kampos* = monstruo de mar), es la estructura cortical mejor caracterizada. Su organización es ideal para el desarrollo de estudio de investigación fisiológica y anatómica. Se conoce bastante sobre su organización sináptica y de las características del funcionamiento de las neuronas que lo conforman. Esta estructura es de gran interés para diversos grupos de investigadores por su relación con algunas patologías neurológicas, así como por el papel importante que juega en las funciones cognitivas de diversos organismos⁴⁶.

Estudios neurofisiológicos, sugieren que el hipocampo juega un papel clave en ciertos aspectos del aprendizaje y la memoria. Aunque la naturaleza exacta de las funciones mnemónicas que realiza el hipocampo permanecen aún desconocidas⁴⁶.

El hipocampo está dividido en cuatro regiones las cuales han sido tradicionalmente designadas como CA1 a CA4 (cuyas siglas provienen del latín *cornu Amon*) (fig. 8). El *gyrus dentate*, el *subiculum*, y la corteza *entorhinal* se incluyen en un término más general conocido como formación hipocampal o la región hipocampal. En la rata, básicamente el hipocampo está constituido por las regiones CA1 y CA3. La región CA2 es muy pequeña e indistinguible en algunas especies. El área que se encuentra localizada entre el *gyrus dentate* y el estrato *granulosum* de la región CA3 se le denomina región *hilar*, *polimórfica* o *hilus*. Tanto el hipocampo como el *gyrus dentate* son estructuras corticales de tres láminas. Las tres láminas fundamentalmente del hipocampo son: la polimórfica (estrato *oriens*), la piramidal (estrato *pyramidale*) y la molecular (estrato *radiatum* y estrato *lacunosum-moleculare*)^{4, 15}.

La morfología de las células piramidales varía gradualmente en función del sitio en que se localicen en el hipocampo; por ejemplo, el soma es más grande en CA3 que en CA1, las dendritas apicales se vuelven más largas, más delgadas y más regulares en la forma de sus arbolizaciones en CA1 que en CA3^{4, 15}.

Las conexiones sinápticas en el hipocampo son principalmente de tipo axo-dendríticas y axo-somáticas, guardando una estructura convencional. Los axones colaterales de Schaffer de las neuronas piramidales de CA3 están parcialmente mielinizados, con nódulos de Ranvier de los cuales salen de dos a tres axones no mielinizados, que siguen una trayectoria paralela a las fibras que les dieron origen. Las sinapsis que forman las fibras colaterales de Schaffer presentan una membrana asimétrica rodeada por vesículas irregulares; dichas sinapsis se realizan sobre las espinas dendríticas⁴.

Las sinapsis que forman las fibras colaterales de Schaffer sobre las neuronas piramidales de CA1 son las más extensamente estudiadas en el cerebro de mamíferos, debido a que representan un modelo experimental bastante adecuado para el análisis de la actividad sináptica y los mecanismos involucrados en su modulación. Tal ventaja se debe a que el tracto de fibras presinápticas, las áreas de contacto sináptico y la lámina de cuerpos celulares postsinápticos, pueden ser visualizadas bajo inspección microscópica de baja resolución, de tal forma que los electrodos de registro y estimulación pueden ser colocados bajo control visual. Esta sinapsis se utiliza ampliamente para hacer estudios intracelulares de la plasticidad sináptica¹⁵.

La organización funcional de la sinapsis en el hipocampo que forma los axones colaterales de Schaffer presentan la siguiente disposición: las fibras de camino perforante hacen sinapsis sobre las células granulares del giro dentado; estas células granulares envían

axones conocidos con el nombre de fibras de mossy a la región CA3 donde hacen sinapsis con las neuronas piramidales; las cuales a su vez a través de las fibras colaterales de Schaffer en la región CA1 forman sinapsis con las neuronas piramidales⁴.

En las neuronas piramidales de CA1 se pueden observar potenciales postsinápticos espontáneos a potenciales de membrana de reposo. Varios potenciales postsinápticos pueden ser registrados cuando se aplica un estímulo adecuado a las neuronas presinápticas con pulsos eléctricos con duraciones iguales o menores a 0.5ms. Con este método se provoca un potencial de acción que viaja a lo largo de la terminal nerviosa e induce la liberación de neurotransmisores al activar canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en la terminal nerviosa^{47, 68}.

Con este método se ha determinado, que en el hipocampo se llevan a cabo los procesos de memoria y aprendizaje, y para corroborar esto, se han realizado experimentos en esta estructura que involucran la actividad eléctrica denominados electrofisiológicos y diversos parámetros como la Potenciación a Largo Plazo (LTP, del inglés Long Term Potentiation)¹⁵.

1.5 POTENCIACIÓN A LARGO PLAZO (LTP)

Desde hace tiempo se ha sospechado que la memoria y el aprendizaje tienen su base molecular en el fortalecimiento de conexiones sinápticas particulares. Durante los últimos años, se han logrado muchos procesos de comprensión de la plasticidad sináptica. Como el LTP (fig. 9), que se caracteriza por la transmisión aumentada en sinapsis que sigue a la estimulación de alta frecuencia. El mejor ejemplo estudiado fue a comienzos de la década de 1970, en donde Tim Bliss y cols., descubrieron que algunos segundos de estimulación

eléctrica de alta frecuencia de una vía de fibras del hipocampo del conejo aumenta la transmisión sináptica entre los axones estimulados y las células postsinápticas, y que este cambio persiste durante semanas. Si bien, se observó por primera vez en animales de experimentación intactos, el progreso en el conocimiento de su base celular se ha basado en preparaciones de cortes encefálicos *in vitro*. Gran parte de la investigación sobre el LTP se ha centrado en las conexiones sinápticas entre las células piramidales de CA3 y CA1, en parte por que muestran una forma particularmente fuerte de LTP, pero también debido a que el daño de la región CA1 tiene efectos espectaculares sobre la memoria humana^{31, 78}.

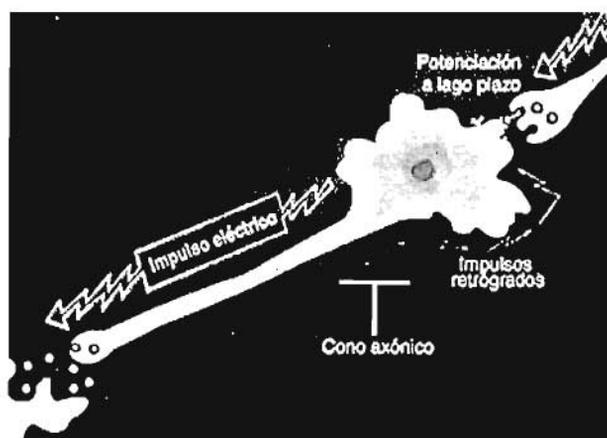


Fig 9. Representación esquemática de la potenciación a largo plazo (LTP)

La estimulación eléctrica sobre las colaterales de Schaffer genera potenciales postsinápticos excitadores (EPSPS) en las células CA1 postsinápticas. Los EPSPS pueden ser registrados en células individuales con electrodos intracelulares o como una respuesta del efecto de muchas neuronas postsinápticas registradas mediante un electrodo

extracelular. Los EPSPS registrados en las neuronas, presentan una duración de 50 a 100 ms y amplitudes de 20 a 25 mV, estos potenciales son mediados por la liberación de glutamato y la subsecuente activación de receptores no-NMDA (receptores AMPA a KA) en la membrana postsináptica⁶⁸.

También se generan potenciales postsinápticos inhibitorios (IPSPS), que presentan una duración de 60 a 110 ms y amplitudes de 4 a 12 mV, estos potenciales son mediados por la liberación de GABA y su interacción con receptores GABA_A en las membranas postsinápticas^{4, 46, 47}.

1.5.1 BASE MOLECULAR DEL LTP

El SN se mantiene en un estado de comunicación constante cuyo código de comunicación radica en las modificaciones de las propiedades eléctricas de los estímulos que emiten y reciben las neuronas. Los neurotransmisores son las moléculas responsables en un alto porcentaje de la comunicación neuronal, representados por una amplia diversidad de moléculas entre las que se incluyen aminas biogénicas, péptidos y aminoácidos¹⁰³. En concordancia con los objetivos del presente trabajo nos orientamos al estudio de un tipo particular de neurotransmisor, el glutamato.

El glutamato es un aminoácido preponderantemente excitador y su actividad como neurotransmisor se conoce desde mediados de la década de los 50⁶². Es ampliamente reconocida la participación de los receptores a glutamato en los eventos excitadores de transmisión rápida del SNC de los vertebrados, en eventos de plasticidad sináptica en el desarrollo cerebral y en el cerebro adulto, así como en desórdenes neurológicos asociados a excitotoxicidad o enfermedades neurodegenerativas^{31, 78}.

Hay tres tipos de receptores para glutamato identificados. Dos son canales iónicos regulados por ligandos denominados, respectivamente receptores NMDA y receptores AMPA/kainato. Su nombre deriva de los agonistas que los activan: NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato) y ácido káinico. Los receptores AMPA/kainato también se denominan receptores no NMDA. El tercer tipo de receptores para glutamato es el receptor metabotrópico mGluR, el cual modula los canales iónicos postsinápticos al activar las proteínas G. Los receptores NMDA y AMPA/kainato suelen ser más selectivos para los cationes monovalentes más que para los divalentes^{62, 71, 72}.

Los receptores AMPA/kainato están formados por varias subunidades de proteínas que pueden reunirse de diferentes maneras para producir una amplia gama de tipos de receptores. El poro central está formado por estas subunidades permite el paso de Na^+ y de K^+ y, en algunos casos, de pequeñas cantidades de Ca^{2+} ^{71, 72, 105}.

La subfamilia de NMDA de los receptores para glutamato también forman canales iónicos selectivos de cationes con múltiples subunidades. Los canales iónicos de los receptores NMDA permiten la entrada de Ca^{2+} además de cationes monovalentes como Na^+ y K^+ . En consecuencia, los EPSPS producidos por los receptores NMDA pueden aumentar la concentración de Ca^{2+} en el interior de la neurona postsináptica; entonces el cambio de concentración de Ca^{2+} puede actuar como segundo mensajero para activar cascadas de señalamiento intracelular^{71, 72, 105}.

Los elementos claves para el mecanismo del LTP son el bloqueo voltaje-dependiente del canal de NMDA por las concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} , y la permeabilidad inusual del canal de NMDA a los iones Ca^{2+} . Durante la transmisión sináptica de baja frecuencia, el glutamato liberado desde las terminaciones axónicas de las

colaterales de Schaffer se unen a los receptores de glutamato tanto NMDA como no NMDA. Sin embargo, si la neurona postsináptica se encuentra en su potencial de membrana negativo normal, los canales de los NMDA están bloqueados por los iones Mg^{2+} ; en consecuencia, no fluye corriente a través de estos canales con puerta de ligando. Durante la estimulación de baja frecuencia, entonces la corriente que produce el EPSPS fluye casi exclusivamente a través de los canales no NMDA, los cuales son permeables al Na^+ . Sin embargo, el bloqueo por Mg^{2+} de los canales NMDA es voltaje-dependiente: aunque el canal está bloqueado con el potencial de membrana de reposo, la oclusión desaparece cuando la célula está muy despolarizada. Por lo tanto la función de sinapsis cambia mucho cuando la célula postsináptica está significativamente despolarizada, como sucede durante la estimulación de alta frecuencia o cuando la célula es despolarizada directamente. A continuación el Mg^{2+} es expulsado del canal de NMDA y la corriente fluye a través tanto de estos canales como de los canales no NMDA. En comparación con los canales de los receptores no NMDA, el poro del canal NMDA es mucho más permeable al Ca^{2+} , un segundo mensajero importante, fundamental para el establecimiento del LTP. Por lo tanto el receptor NMDA, se comporta como compuerta molecular y como canal: se abre solo cuando el glutamato se une a los receptores NMDA y la célula postsináptica es despolarizada para eliminar el bloqueo por el Mg^{2+} (fig. 10)^{8,71, 72, 105}.

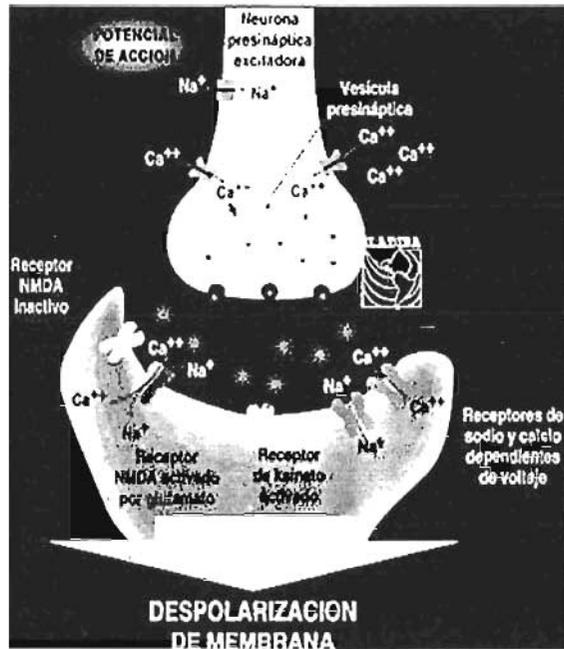


Fig. 10. Activación de los canales iónicos dependientes del receptor NMDA para glutamato. Inicia la secuencia de eventos gracias a los cuales es posible la modificación estructural de la terminal postsináptica.

1.5.2 DEPRESIÓN DE LARGO PLAZO (LTD)

Actualmente, se tiene bien establecido otro evento de larga duración el cual se induce con un estímulo de baja frecuencia que causa una depresión de largo plazo (LTD). Este evento se desarrolla en la sinapsis entre las colaterales de Schaffer y las células piramidales CA1. El LTD se desarrolla cuando las colaterales de Schaffer son estimuladas con baja frecuencia aproximadamente 1 Hz durante periodos prolongados con una duración igual o mayor a los 15 min. Aunque la inducción del LTD y LTP son diferentes, sorprendentemente comparten varios elementos clave, por ejemplo, ambas necesitan la

activación de receptores de glutamato de tipo NMDA, y ambas implican la entrada de Ca^{2+} en la célula piramidal CA1. El principal determinante del hecho de que la entrada de Ca^{2+} a través del receptor NMDA produzca LTD y LTP parece ser la cantidad de Ca^{2+} no ligada en el interior de la célula postsináptica. Los pequeños aumentos en el Ca^{2+} intracelular desencadenan una serie de eventos que llevan a la LTD, mientras que los grandes incrementos desencadenan LTP. Estos efectos se llevan a cabo por la presencia de sustancias endógenas como nucleótidos⁷¹.

1.6 EL ATP COMO NEUROMODULADOR

El adenosin-5'-trifosfato (ATP), químicamente es un nucleótido formado por una base nitrogenada, la molécula de adenina, unida a un azúcar de 5-carbonos, la ribosa y a tres grupos fosfatos (fig. 11). Su función principal es capturar la energía libre procedente de los procesos catabólicos para posteriormente ceder esta energía libre a aquellas reacciones que requieren energía. Se trata pues de una molécula extraordinariamente útil a la que se le conoce como la moneda energética universal en los sistemas biológicos y está disponible, por lo tanto, en todas las células vivas, incluidas las neuronas⁷⁹.

El ATP neuronal se produce en su mayor parte por fosforilación oxidativa en las mitocondrias, usando como combustible la glucosa que se toma del medio extracelular (las neuronas tienen una capacidad muy limitada de almacenamiento de glucosa, de manera que la reducción de la glucosa disponible en el medio produce un detrimento del estado energético de la neurona). En ausencia de glucosa otras sustancias que quedan, como el piruvato o el lactato pueden ser usadas para la respiración mitocondrial, aunque la disponibilidad de estos metabolitos termina rápido y la producción de ATP cesa.

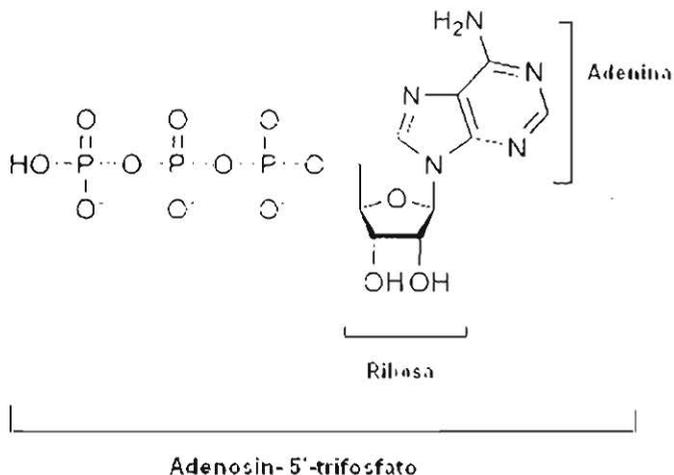


Fig. 11. La molécula de ATP compuesta por una adenina, una ribosa y un grupo fosfato.

En la actualidad el ATP y la adenosina son considerados como neurotransmisores^{38, 101} en varios tejidos incluyendo el músculo liso, neuronas periféricas y en el SNC. Y se ha establecido el concepto de neurotransmisión purinérgica que regula entre otros sistemas, el flujo sanguíneo coronario. Asimismo se han reconocido los receptores purinérgicos los cuales fueron clasificados en dos tipos llamados P1, los cuales son selectivos a adenosina, actuando a través de la adenilato ciclasa y P2 los cuales son selectivos para nucleótidos, los receptores P2 están clasificados en dos subclases: los P2X (asociados a un canal iónico) y la familia de receptores P2Y (acoplados a una proteína G). Los receptores P2Y acoplados a proteínas G, poseen siete dominios transmembranales, el extremo aminoterminal se encuentra en el espacio extracelular, mientras que el extremo carboxiterminal se localiza en la parte intracelular. Los sitios en donde se une el ATP a este receptor han sido

identificados en los dominios transmembranales seis y siete de la molécula (fig. 12A). Por otro lado, los receptores P2X presentan sólo dos dominios transmembranales, con extremos amino y carboxiterminal cortos en la parte intracelular, también tienen una asa extracelular con 10 cisteínas (fig. 12B)^{20, 21, 86}.

El ATP es liberado como consecuencia de la actividad fisiológica en las células neuronales y ejercen efectos potentes sobre las funciones neuronales y sinápticas del SNC. Una de las principales funciones que se les ha dado a los nucleótidos dentro del SNC es la neuroprotección, la cual se lleva básicamente por la inhibición de la liberación de glutamato, debido a que esta acción puede resultar en una maniobra efectiva de protección neuronal durante la hipoxia especialmente en el hipocampo donde se encuentran las neuronas que la sufren más rápidamente (células piramidales de CA1)⁵¹.

El ATP es sintetizado en la terminal nerviosa presináptica, el cual es cubierto por vesículas sinápticas para protegerlo de la degradación. Esta sustancia se encuentra en las vesículas sinápticas junto con neurotransmisores como la ACh y la NA. El ATP se libera por un proceso dependiente de Ca^{2+} en cantidades estequiométricas con el principal neurotransmisor, el cual la mayoría de las veces es glutamato. En ciertos sitios dentro del SNC se libera como el principal neurotransmisor. Extracelularmente, parte del ATP que es liberado durante la transmisión sináptica es hidrolizado por medio de las ecto-5'-ATPasas y por la ecto-5'-nucleotidasas¹¹⁵.

Además reportes recientes han demostrado que el ATP liberado al medio extracelular per se, puede estimular a receptores específicos (P2Y) y transmitir la información a las neuronas generando un cambio en la conducta neuronal durante la comunicación sináptica, sin la necesidad de su hidrólisis para llegar hasta adenosina⁷⁹. Con

esto se abre la posibilidad de que el ATP puede proteger las funciones cerebrales de la sobreestimulación por mensajeros químicos como el glutamato y nos muestra la posibilidad de acción del ATP, además de la dependiente de su hidrólisis hasta adenosina.

Específicamente en el hipocampo, existen receptores P2Y en la membrana de las neuronas presinápticas y P2X en las neuronas pos-sinápticas. Dependiendo de la interacción del ATP con los receptores en los dos diferentes niveles, se obtendrá una respuesta específica de este neurotransmisor, por ejemplo, una potenciación en la plasticidad sináptica del hipocampo si actúa a través de receptores P2X presentes en la membrana postsináptica¹¹² o una inhibición en la liberación de glutamato si interactúa con receptores P2Y presentes en la neurona presináptica⁷⁹.

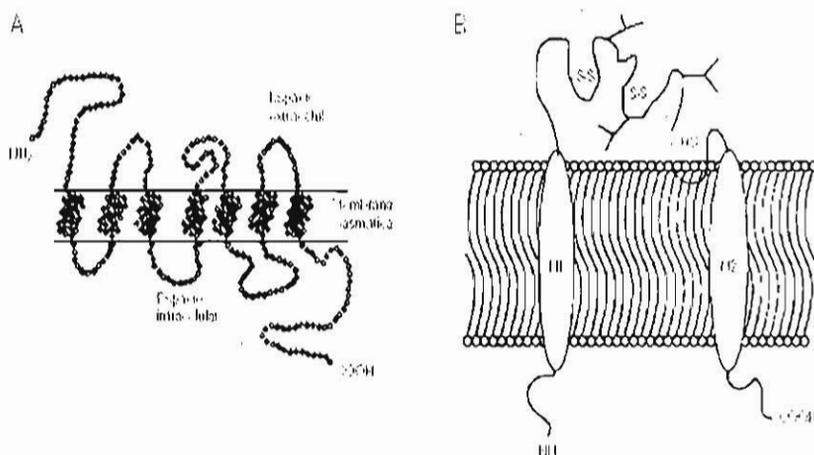


Fig. 12. Características estructurales de los receptores a ATP en la membrana celular. A. Diagrama esquemático de la secuencia de aminoácidos del receptor P2Y. B. Esquema que muestra la topología transmembranaral del receptor P2X. Las cadenas en el asa extracelular representan cadenas de N-glucanos^{20, 21}.

El segundo mecanismo de regulación, involucra la interacción de ATP con receptores P2Y presentes en la membrana de las terminaciones nerviosas de las fibras colaterales de Schaffer, hecho que se determinó mediante la inducción eléctrica de EPSPs, los cuales están mediados por la liberación de glutamato y su interacción con receptores NMDA presentes en las neuronas piramidales de la región CA1. En estas condiciones, el ATP fue más potente que la adenosina para inhibir los EPSPs, lo que está relacionado con la liberación de glutamato, ya que el ATP no inhibe la despolarización de las neuronas piramidales de hipocampo inducida por la aplicación de glutamato exógeno.

1.7 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta la fecha, se conocen diversos efectos de la MEL y quizás faltan más por investigar, sin embargo, los mecanismos por los cuales actúa no son del todo claros y por lo mismo hay diversos planteamientos en torno a ello. En base a esto, se han realizado estudios tanto *in vivo* como *in vitro* y se han caracterizado algunos efectos sin saber a ciencia cierta que mecanismos los producen, por esta razón realizamos en el laboratorio de Neurofarmacología, experimentos que tienen una estrecha relación con el estudio del mecanismo de acción de la MEL.

Con base a los antecedentes mostrados, en el presente trabajo planteamos realizar, implementar la metodología de rebanadas de hipocampo de cerebro de la rata para realizar en un estudio preliminar el análisis de la MEL y el ATP, en la comunicación sináptica excitadora de las neuronas. Para realizar esto, se tomó como modelo de comunicación sináptica el que se presenta en las células piramidales de la región CA1 del hipocampo y los axones colaterales de Schaffer. En esta sinapsis se evaluará el efecto de MEL y ATP sobre la actividad sináptica de las neuronas piramidales por medio de un registro extracelular a través de un microelectrodo, analizando la sinapsis a nivel presináptico y postsináptico. Estos resultados nos permitirán conocer la relación que existe entre el glutamato; principal neurotransmisor en el hipocampo, y sustancias que modulan la comunicación neuronal como la MEL y el ATP.

2.0 HIPÓTESIS

HIPÓTESIS GENERALES

- a) La MEL juega un papel importante en la modulación de la excitabilidad neuronal en el hipocampo⁸³, por lo tanto, podría facilitar la comunicación sináptica de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo mediada por glutamato.
- b) El ATP inhibe la liberación de glutamato⁷⁹ a través de su interacción con receptores localizados en la terminal presináptica de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo, entonces, la MEL producirá el mismo efecto que ATP.

3.0 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el efecto de MEL y el ATP en la transmisión sináptica glutamatérgica en rebanadas del hipocampo de cerebro de rata.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Implementar la metodología de rebanadas de hipocampo de cerebro de rata en el laboratorio.
2. Determinar el posible efecto de MEL sobre la transmisión sináptica en rebanadas de cerebro de rata, específicamente en las neuronas de la región CA1 del hipocampo.
3. Determinar el efecto de ATP en rebanadas del hipocampo de cerebro de rata como control para compararlo con el efecto de MEL.

IV. METODOLOGÍA

1. Preparación de las rebanadas de hipocampo (región CA1)

Las rebanadas hipocampales (400 μm) fueron obtenidas de ratas Wistar hembra o macho (Laboratorio Harlan, México, S. A. De C.V., Ver Anexo II) de 21 a 22 días de edad, con un peso promedio de de $40\pm 2\text{g}$, mantenidas en condiciones constantes de temperatura, agua y alimento.

Los animales se sacrificaron por decapitación con una guillotina para ratas (World Precision Instruments, Inc. Sarasota, Fl. USA). El cráneo se cortó con pinzas tipo gubias, a lo largo de la línea media de éste. La duramadre fue eliminada con la punta de unas tijeras, con una espátula pequeña el cerebro se levantó suavemente de la cavidad craneal, cortando cuidadosamente los nervios craneales y olfatorios (fig. 13).

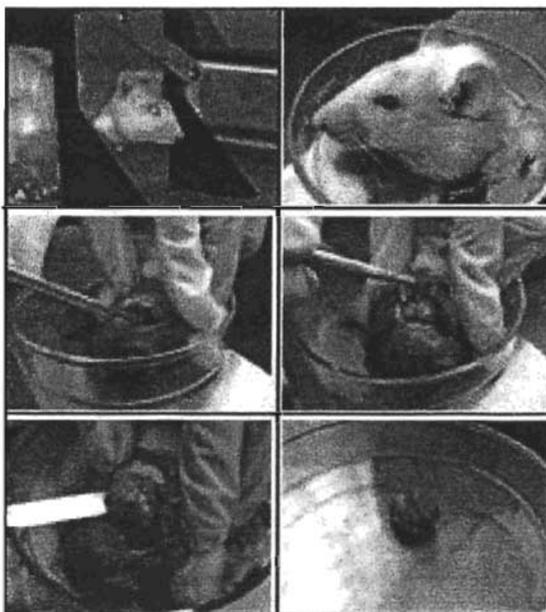


Fig. 13. Se muestra la metodología de la extracción del cerebro de la rata.

Una vez extraído el cerebro se colocó en una caja Petri con LCRA a 4 °C estabilizada con una mezcla de O₂ y CO₂ al 95% y 5% respectivamente (gas carbógeno). El LCRA es una solución fisiológica artificial, esta se preparó con agua destilada con las siguientes concentraciones de sales 120 mM de NaCl, 1.3 mM de MgSO₄, 1.8 mM de CaCl₂, 26 mM NaHCO₃, 3.3mM de KCl, 1.23mM de NaH₂PO₄ y 11 mM de glucosa (todas estas sustancias son de Sigma- Aldrich, Inc. St. Louis MO, USA). El objetivo fue reducir la demanda de oxígeno por parte de las células y dar al cerebro la suficiente firmeza para cortarlo en rebanadas. El cerebro se colocó ventralmente hacia arriba, en una caja Petri con LCRA, cortando la parte anterior del cerebro a la altura del quiasma óptico y por la parte posterior a la altura del cerebelo. Este bloque, se fijó con una capa delgada de cianoacrilato (QuickTite) a la base de la cámara del "Vibro Slice" (Vibratome 1000 Plus-Pelco.Ted Pella, Inc. Mountain Lakes Blvd. Redding, CA).

Se obtuvieron ocho rebanadas por cortes coronales por cada cerebro de rata, generalmente las dos primeras rebanadas del hipocampo se desecharon, para asegurar que la rebanada contenga el hipocampo anterior con la región CA1. La duración de todo este proceso desde que se sacrificó al animal hasta la obtención de las rebanadas fue de aproximadamente 5min. Las rebanadas se sumergieron en la solución de LCRA a temperatura ambiente (22 ± 3°C) y con burbujeo constante de gas carbógeno, mientras eran utilizadas para los registros, en esta solución se consideraron 30 min de estabilización para la primera rebanada. La estabilización de las otras rebanadas dependió del tiempo que duró el protocolo experimental con respecto a la primera rebanada.

2. Cámara de registro

Para mantener a las rebanadas de hipocampo en condiciones fisiológicas durante el experimento, se utilizó una cámara de registro, localizada en la parte central de un bloque de acrílico (4.1 x 3.2 x 1.2 cm). La cámara tiene una cavidad con 1.3 cm de diámetro, con una profundidad 0.4 cm y una capacidad de 1 mL o 1 cm³. Posteriormente, se transfirió una rebanada a la cámara de registro y continuamente se perfundió con una solución de LCRA (36 ± 1 °C) a una velocidad de perfusión de 1.5-2 mL/min y oxigenada con gas carbógeno. Para mantener el volumen constante de la perfusión, la cámara está conectada a una aguja de succión la cual a su vez esta conectada al vacío. El LCRA que perfundió a la rebanada llegó a la cámara de registro por medio de una presión constante ejercida por la fuerza de gravedad a través de una pipeta. La solución se mantuvo en un frasco Mariotte colocado a 50 cm de la cámara y equilibrada con gas carbógeno, para mantener el pH = 7.4 y a una temperatura de 36 ± 1°C, mediante un sistema de recirculación. La solución que se encontraba en contacto con la rebanada se mantuvo en un rango de temperatura de 36 ± 1°C, la cual se midió durante todo el registro. La velocidad de perfusión fue de 1.5 a 2 mL/min. Para evitar efectos indeseables debido al goteo de las soluciones contenidas en la pipeta, ésta fue siempre colocada aproximadamente a 500 µm del lugar de la expulsión

Una vez colocada la rebanada en la cámara se le colocó una maya de nylon formada por una herradura de plata (6 mm de diámetro) con 3 hilos de nylon en posición paralela, con la finalidad de que la rebanada se mantenga fija (figs. 14 y 15).

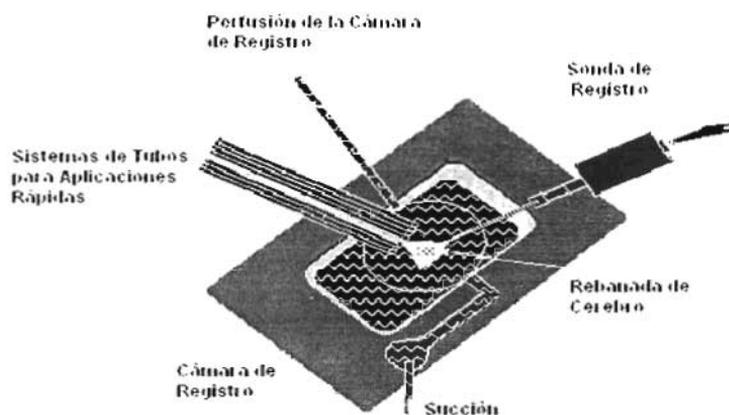


Fig. 14. Se muestra la cámara de registro con el sistema de perfusión, succión de la solución y los electrodos. (Figura modificada por Barajas-López C., y Cols.)¹⁰.

Una vez realizado este procedimiento, a la rebanada se le colocaron los electrodos de registro y de estimulación, posteriormente se buscó la espiga poblacional y se registró. La espiga poblacional o potencial de campo poblacional es el reflejo del número de neuronas piramidales activadas².

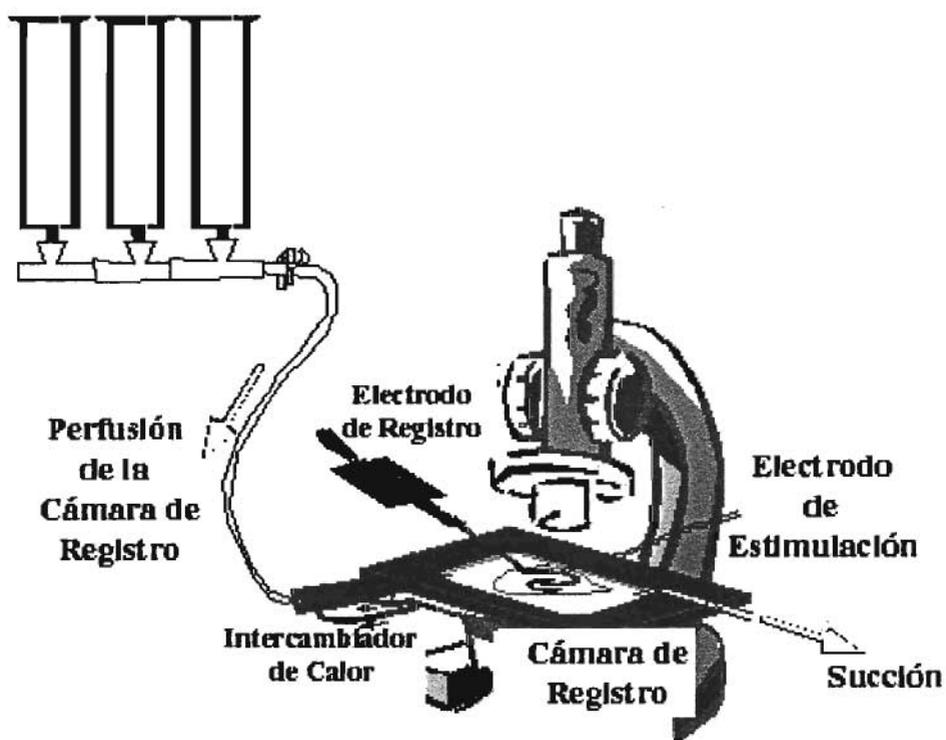


Fig. 15. Equipo para perfundir y visualizar las rebanadas hipocampales. Las rebanadas hipocampales fueron colocadas para registrar su actividad en una cámara de acrílico y perfusión constante con LCRA calentado a 36 ± 1 °C. (Ilustración preparada por Barajas-López C., y Cols.)¹⁰.

3. Registros de la actividad eléctrica de las neuronas piramidales.

Los registros extracelulares se realizaron utilizando microelectrodos llenos de solución de NaCl 2M, con una resistencia de 2-6 M Ω . El potencial de membrana de un conjunto de neuronas se midió con un preamplificador Axopatch (Axon Instruments Inc., USA). La salida de este preamplificador se conectó a un osciloscopio (Tektronix, TDS 3032), para observar las señales registradas, las cuales se almacenaron para su posterior análisis en una computadora, con la ayuda de los programas previamente instalados AxoScope y pClamp (Axon Instruments) (fig. 16). Un registro extracelular basal característico se obtuvo satisfactoriamente si el potencial de membrana era mayor o igual -55mV y la amplitud de los potenciales de acción fue mayor o igual 60mV. Los potenciales postsinápticos excitadores por glutamato se obtuvieron con pulsos eléctricos (20-100 μ s de duración), aplicados con una frecuencia de 1Hz a las fibras colaterales de Schaffer, usando un electrodo bipolar de una aleación de tungsteno y platino de 50 μ m de diámetro (cubierto con teflón). La intensidad de la estimulación fue de 36 V, esta intensidad se ajustó para obtener aproximadamente del 40 al 50 % de la amplitud máxima de la espiga (fig. 17). En esta figura se muestran una serie de registros obtenidos inicialmente, con aplicación de estímulos a diferentes intensidades (6, 16, 26, 36, 46V) para determinar el tamaño de la espiga. Posteriormente, se obtuvieron los registros a 36 V los cuales se analizaron en presencia de MEL y ATP.

El potencial de campo fue monitoreado y los experimentos fueron realizados solamente con las rebanadas que mostraban una respuesta estable con los mismos parámetros de estimulación por 5min.

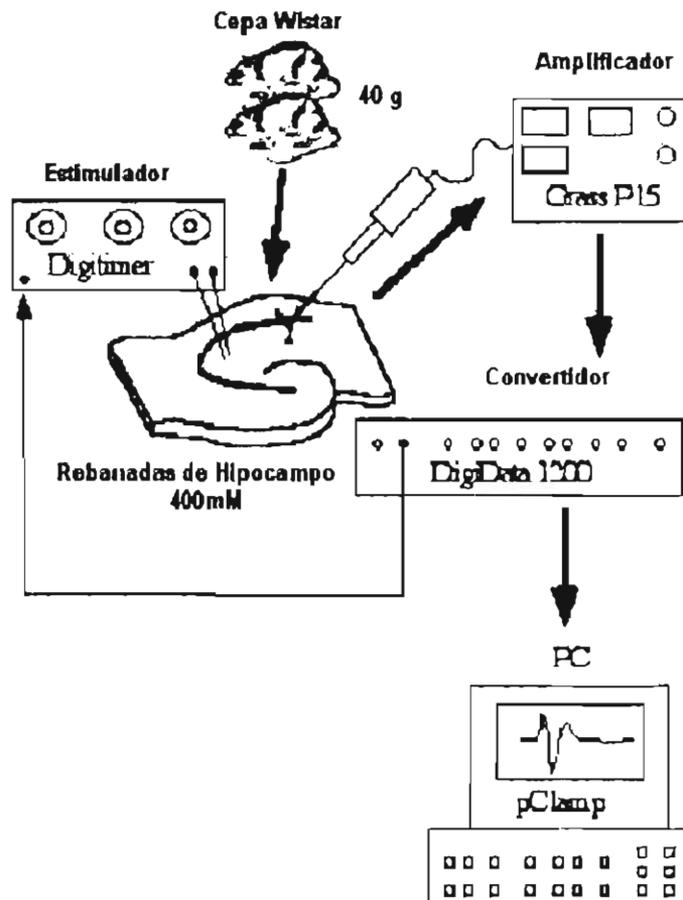


Fig. 16. Diagrama del equipo utilizado para el registro, captura y análisis de los potenciales de campo de rebanadas hipocampales de rata. Los potenciales fueron evocados por pulsos eléctricos cuadrados aplicados y registrados en el *stratum pyramidale* de CA1. El estimulador eléctrico fue controlado por la computadora a través del convertidor analógico-digital (A-D) utilizando el software (pClamp, Axon Instruments) y una computadora. La ilustración fue preparada por Carlos Barajas-López¹⁰.

Los fármacos utilizados fueron los siguientes: Adenosin-5-trifosfato (ATP, Sigma) esta sustancia se preparó en LCRA. Melatonina (Sigma), la MEL se disolvió previamente en una mezcla de etanol (20%) (Merck), propilenglicol (20%) (Merck) y agua destilada (60%), antes de mezclarse en LCRA. Las concentraciones de MEL con las que se trabajó fueron 15, 30 y 45 μM y ATP a 30 μM . Las soluciones de MEL y ATP se prepararon 15 min antes de los experimentos. Para conocer la concentración de ATP nos basamos en los reportes de la literatura, para las concentraciones de MEL se realizó un estudio piloto, con siete concentraciones de MEL; dos previas a 15 μM ; una entre 15 y 30 μM y una entre 30 y 45 μM . Una vez iniciado el registro, éste se sometió al siguiente protocolo experimental (tabla 1):

Protocolo Experimental	Procedimiento
Registro Control	- Se registra la actividad de la espiga (5min), con perfusión constante de LCRA durante todo el registro. -Administrar pulsos eléctricos de 36 V de 20-100 μs de duración, con una frecuencia de 1Hz
Administración de la sustancia	-Se aplicó MEL o ATP por un intervalo de 5min y se observó la respuesta. -La respuesta se registró por 90 min.
Inducción del LTP	- Se aplican trenes de descarga de alta frecuencia (100 Hz) durante 10 seg. Se observa la respuesta de la neurona al LTP, indicativo de viabilidad, por 5 min.

Tabla 1. La tabla muestra el protocolo experimental utilizado para determinar la actividad de las sustancias aplicadas sobre la transmisión sináptica.

Los parámetros medidos a cada conjunto de células fueron: la duración de la espiga, la amplitud y el número de espigas por pulso así como el potencial de membrana en reposo.

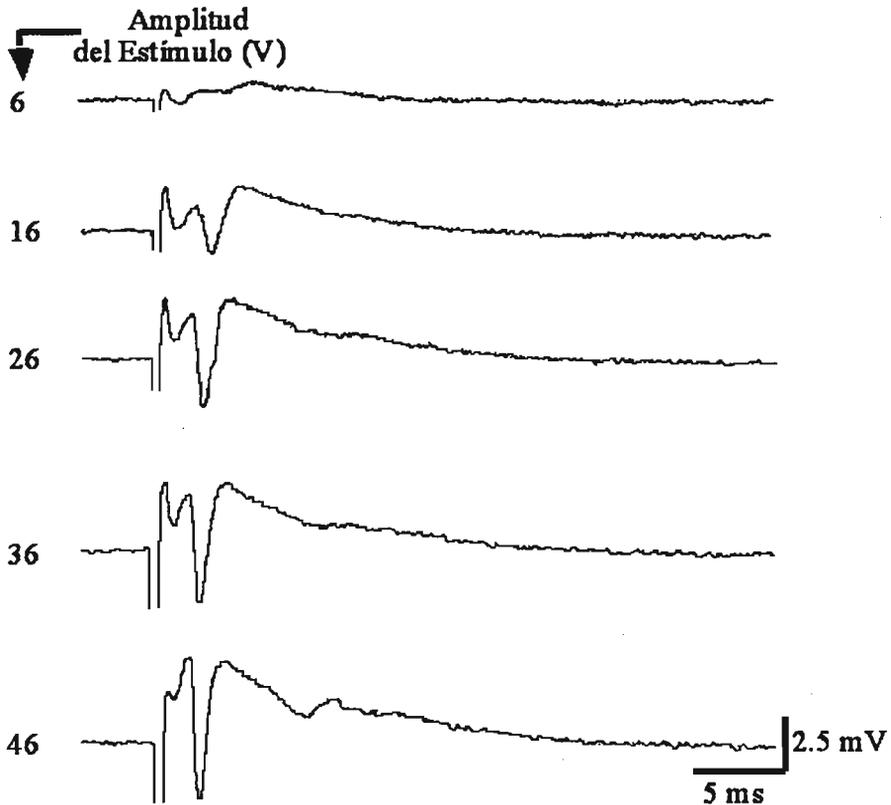


Fig. 17. En esta fig. se muestran registros de potencial de campos típicos en el Stratum Pyramidale de la región hipocampal CA1. Se observan respuestas dependientes del estímulo. También, se muestran 5 potenciales provocados por la aplicación de un solo pulso de 200 mseg de duración, 0.05 Hz y las intensidades (voltaje). A baja intensidad (6V) la población de las espigas es muy pequeña como se observa en el primer potencial, los campos de los potenciales se incrementaron cuando se incrementó el voltaje de estimulación, las estimulaciones generaron espigas secundarias. En este ejemplo, la máxima amplitud de las espigas se obtuvo con 36 V.

4. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos son de 3 rebanadas para cada una de las concentraciones de MEL y 2 rebanadas para ATP, se presentan como el promedio \pm D. S., y el número de rebanadas se indicó como n. Los datos obtenidos se analizaron inicialmente con una ANADEVIA (de 1 factor) para homogeneizar varianzas, posteriormente, se aplicaron las pruebas de t de Student pareada para cuantificar las diferencias entre los valores promedio obtenidos en la misma espiga poblacional y la no pareada para analizar las diferencias entre los grupos de la espiga poblacional. Las diferencias estadísticamente significativas, se consideraron utilizando una curva gaussiana de doble cola con una $p < 0.05$ ³⁰. El análisis estadístico y la graficación se llevó a cabo con el software Excel (Microsoft, CA, USA). Los registros de cada conjunto de neuronas se analizaron como se muestra en la fig. 18. En esta figura se muestra, como se calcula la amplitud de la espiga utilizando el programa ClampFit (pClamp, Axon Instruments).

Por otro lado, las propiedades electrofisiológicas de las neuronas utilizadas para el análisis fueron las siguientes: la media del potencial de membrana fue de 65 ± 4 mV con un rango de -55 a 69 mV, una media de resistencia de membrana de 54 ± 9 M Ω , con un rango de 34 a 67 M Ω , y una media de la constante de tiempo de 12 ± 1.2 ms, con un rango de 11 a 116 ms. Para evaluar los efectos de las sustancias se consideró el valor promedio de la amplitud de los potenciales de acción que fue de 73 ± 4 mV con un rango de 64 a 86 mV, el cual se comparó con el potencial de membrana en reposo, en esta evaluación al control se le consideró como el 100%¹⁰.

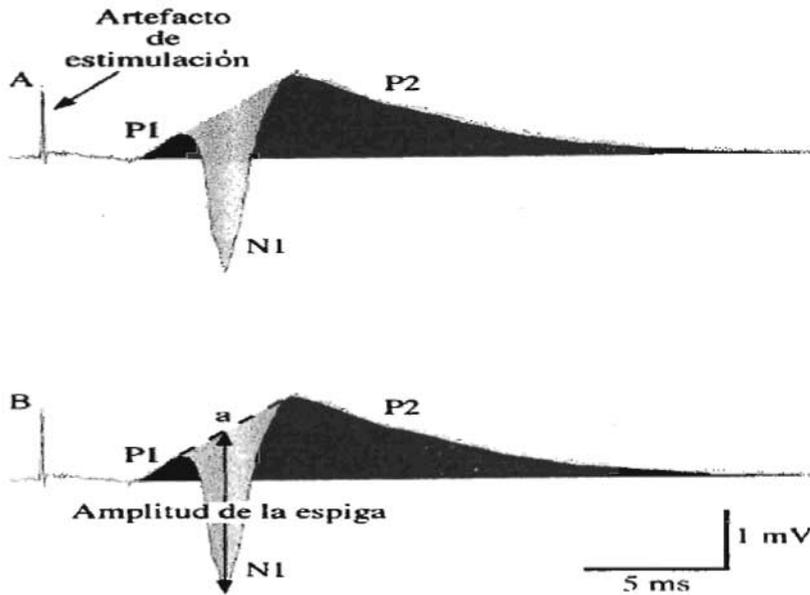


Fig. 18. Potencial de campo típico en el registro de estrato *piramidale* del área hipocámpal CA1. A) Usualmente se observan 3 ondas P1, N1 y P2. P1 y P2 corresponden al potencial postsináptico y N1 corresponde a la población de espigas. B). La amplitud de esta espiga se calculó usando el ClampFit (pClamp, Axon Instruments). Se trazó una línea punteada en "a". Se calculó la amplitud de la población de las espigas como se indica (Figura tomada de Barajas-López C¹⁰).

V. DESCRIPCIÓN DE RESULTADOS

I. Efecto de la MEL sobre la transmisión sináptica del hipocampo

Con los datos obtenidos se realizaron las curvas para cuantificar el efecto de la MEL sobre la transmisión sináptica en la región CA1 del hipocampo, las cuales se muestran en las figs. 19 a 21, se grafica la amplitud de la espiga (% control) en función del tiempo (min). Los resultados obtenidos a las concentraciones que se trabajaron (15, 30 y 45 μM) nos muestran que a menores concentraciones de MEL (15 μM), la respuesta obtenida sobre la transmisión sináptica fue un efecto excitador de dicha transmisión, es decir observamos los EPSPs aumentados con respecto al control.

Los parámetros medidos se muestran en la tabla 2.

Tratamiento	Control	MEL 15 μM	MEL 30 μM	MEL 45 μM
Duración (ms)	9.5 \pm 2	10.1 \pm 3	12 \pm 2	11.9 \pm 2
Amplitud (mV)	84 \pm 2	95 \pm 2	61 \pm 1.5	59 \pm 4
Número de espigas inducidas por un pulso de 100 ns	10 \pm 1	10 \pm 1	10 \pm 1	10 \pm 1
Potencial de membrana (mV)	63 \pm 4	63 \pm 4	63 \pm 4	63 \pm 4

Tabla 2. Parámetros representados como la media \pm D. S. de los potenciales de acción provocados por la aplicación de trenes, característicos en las neuronas de la región CA1 del hipocampo, registro control y en presencia de la MEL (15, 30 y 45 μM).

En la Fig. 19 y tabla 3 se observa que la MEL a 15 μM produce un aumento de la respuesta, la cual se mantiene por 75 min, se incrementa nuevamente y se mantiene por 15 min sin cambios, que es justo el tiempo donde finalizó el registro y se aplicó el LTP para

ver la viabilidad de las células, este incremento nos permite inferir que el efecto de la MEL es de tipo excitador⁶², lo que implica un incremento de los EPSPs ($20\pm 2\%$) con respecto al control, con lo cual se ha comprobado un aumento sobre la transmisión sináptica glutamatérgica, ya que en el hipocampo encontramos la mayor concentración de glutamato con respecto a otras regiones del cerebro.

Tiempo (min)	Aumento de la amplitud de la espiga (%) con respecto al control
-5	-
15	15*
30	21*
45	24*
60	31*
75	43*
90	58*
93	127*

Tabla 3. Se muestran los promedios del aumento de la amplitud de la espiga (%) a $15\mu\text{M}$. * $p < 0.01$ t student en comparación con el control

En las figs. 20 y 21, tablas 4 y 5 se muestran el efecto producido por la perfusión de MEL a concentraciones de $30\mu\text{M}$ y $45\mu\text{M}$. En la fig. 18 en el panel A observamos que la respuesta se ve disminuida significativamente ($p < 0.01$) comparada con el control, este decremento alcanza un pico máximo a los 45 min postadministración ($16\pm 2\%$), para incrementarse sin cambio aparente y mantenerse constante, donde se inicia la recuperación de las descargas neuronales (postadministración de MEL), finalmente, se aplicó LTP para verificar la viabilidad de las células. En esta misma figura, pero en el panel B, se muestran los registros obtenidos de estas células donde a (control), b, c y d (postadministración) correlacionan con la gráfica.

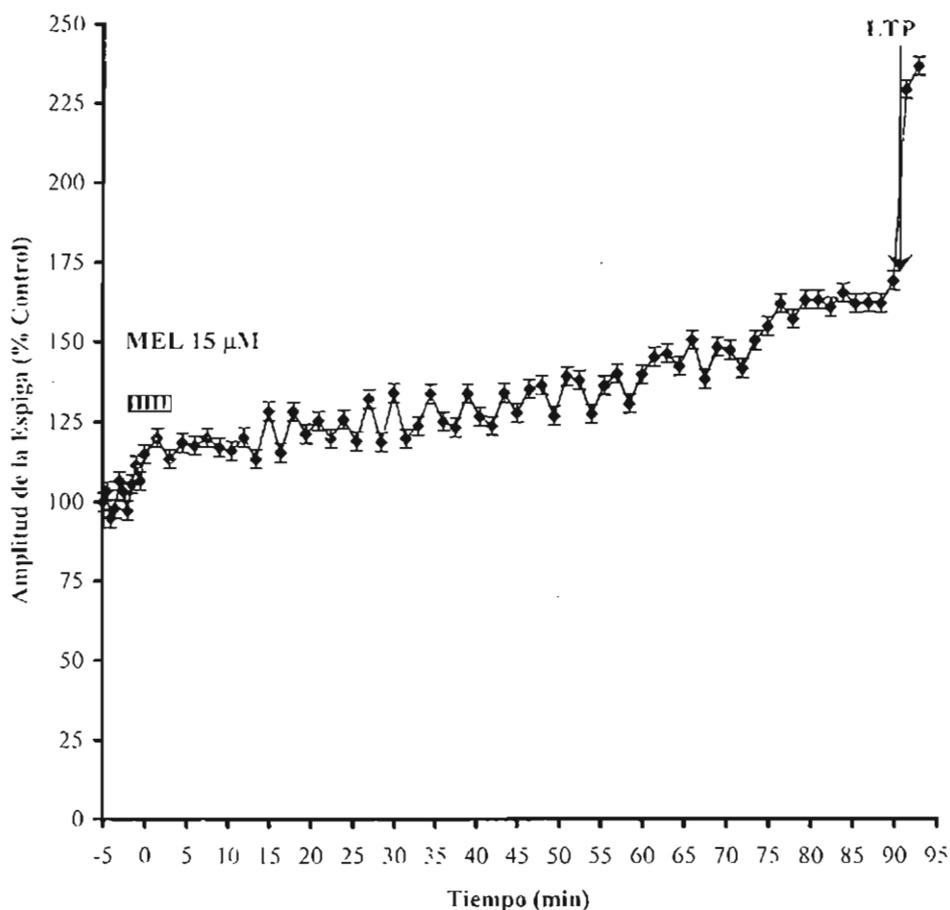


Fig.19. En esta figura se observa que la MEL a una [15 μ M] aumenta la transmisión sináptica sobre la región CA1 hipocámpal. Se muestra la amplitud de la espiga (% control) en función del tiempo. La MEL aplicada por 5 min, esta indicada por la barra horizontal. La tetanización por LTP estimula la transmisión sináptica.

Tiempo (min)	Disminución de la amplitud de la espiga (%) con respecto al control
-5	-
15	11*
30	12*
45	18*
60	18*
75	17*
90	15*
93	1

Tabla 4. Se muestran los promedios de la disminución de la amplitud de la espiga (%) a 30 μ M de MEL. * $p < 0.01$ t student con respecto al control

En la fig. 21 podemos observar la respuesta inducida por MEL a 45 μ M, donde se ve una disminución de la respuesta comparada con la control, la cual se mantiene sin cambios por 30 min, posteriormente, presenta un incremento del 20 \pm 2%, después del 25 \pm 3%, subiendo un 10 \pm 2% más hasta llegar a una respuesta similar al control, finalmente, se aplica el LTP correspondiente. Si observamos esta gráfica con MEL a 45 μ M, la respuesta es "oscilante", situación que no se observó con las concentraciones previas de MEL.

Tiempo (min)	Disminución de la amplitud de la espiga (%) con respecto al control
-5	-
15	12*
30	19*
45	15*
60	10*
75	9*
90	1*
93	-

Tabla 5. Se muestran los promedios de la disminución de la amplitud de la espiga (%) a 45 μ M de MEL. * $p < 0.01$ t student con respecto al control

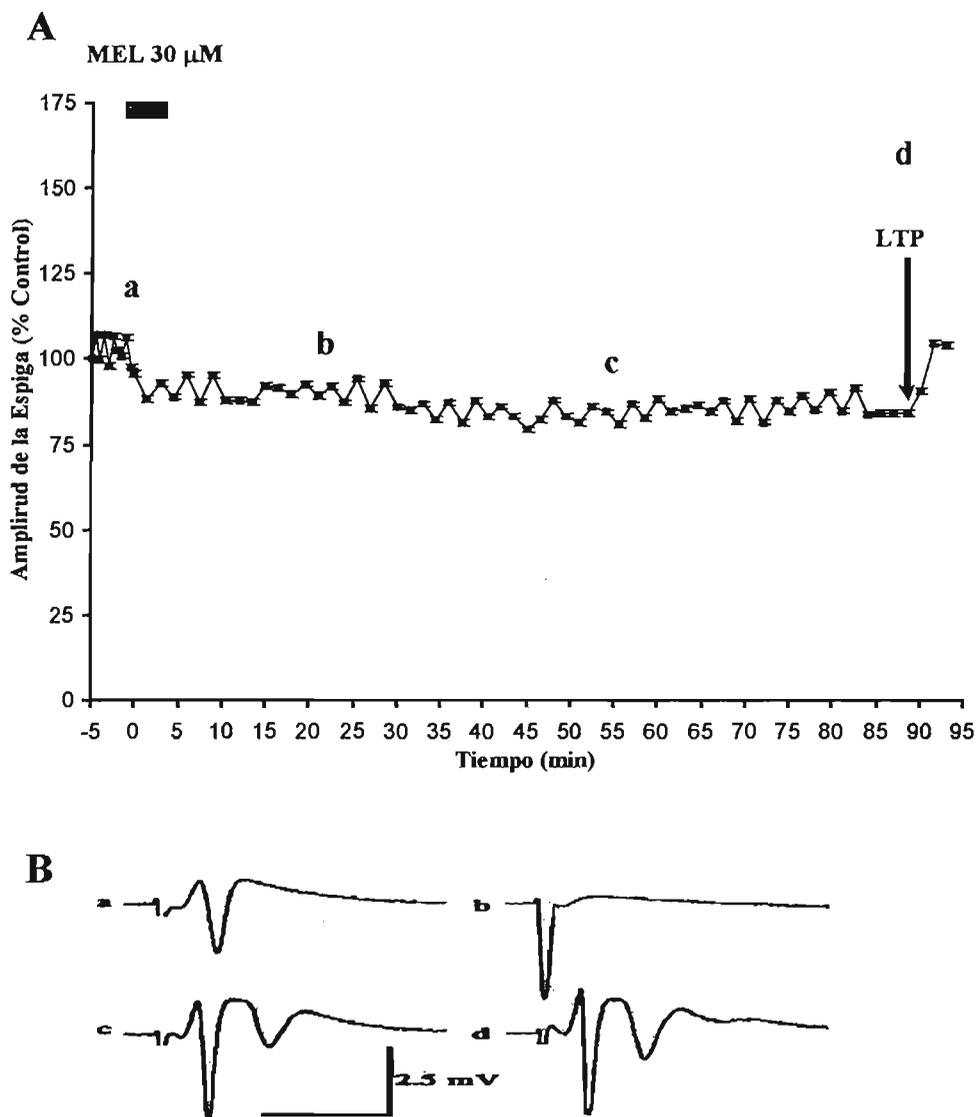


Fig. 20. La MEL a 30 μ M inhibe la respuesta de la transmisión sináptica de forma reversible sobre la región CA1 hipocámpal. A) En la figura se muestra la amplitud de la espiga (% control) en función del tiempo. La aplicación de MEL esta indicada por la barra horizontal. El LTP estimula la transmisión sináptica ya que incrementa la respuesta. Los símbolos son el promedio \pm D.S(ϕ). B) Los trazos de las espigas son representaciones de una rebanada hipocámpal a los tiempos indicados por las letras. El trazo (┘) indica la calibración.

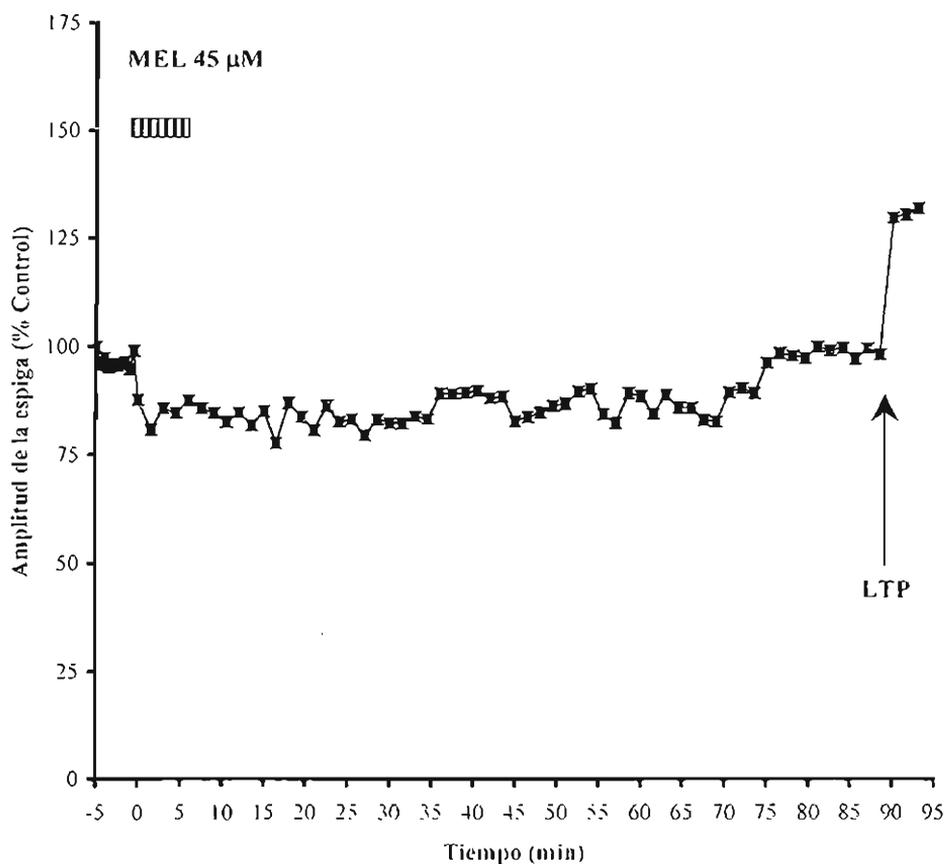


Fig. 21. La MEL a $45\mu\text{M}$ decrementa la respuesta comparada con el control. En la figura se muestra la amplitud de la espiga (% control) en función del tiempo. La MEL aplicada está indicada por la barra horizontal. El LTP estimula la transmisión sináptica. Los símbolos son el promedio \pm D.S (ϕ).

En la fig 22 se muestran las respuestas obtenidas con las tres concentraciones de MEL a $15\mu\text{M}$ ($p<0.01$), se observa un incremento de la respuesta ($20\pm 2\%$) del potencial de campo (cspiga) y a las concentraciones de 30 y $45\mu\text{M}$, la respuesta del potencial de campo se ve disminuida ($16\pm 2\%$ y 25 ± 3 , $p<0.01$), este incremento y disminución de la respuesta, depende de la concentración utilizada y nos habla del efecto bifásico reportado para MEL en otros modelos^{37,89,106}.

2. Efecto del ATP sobre la transmisión sináptica de la región CA1 del hipocampo.

En la segunda parte del experimento se aplicó ATP como se observa en la fig. 23 y tabla 6. En ella se muestra en A la espiga poblacional que correlacionan con la gráfica en B. En A se observa que la perfusión de ATP disminuyó la amplitud y la duración de los EPSPs de las neuronas analizadas ($n=2$). El efecto inhibitor del ATP presenta las siguientes características de cinética: se observa que dentro de los 60 seg postadministración del ATP a la rebanada en la cámara de registro alcanza un efecto máximo aproximadamente a los 1.5 min. La respuesta es reversible a los 20 min, ya que la neurona inicia una etapa de recuperación, que se observa por el aumento en la magnitud de los EPSPs. Por lo tanto, el ATP a $30\mu\text{M}$ inhibe los EPSPs, los cuales presentan un valor promedio de 14 ± 1.6 mV, tuvo un efecto de inhibición del $84\pm 2\%$ ($p<0.005$) en las neuronas CA1 del hipocampo, por la estimulación de las colaterales de Schaffer. Las respuestas obtenidas con ATP se representan gráficamente en B. Donde se observa que el registro control sufre una caída drástica que dura 20 min, posteriormente, se recupera la actividad de la espiga poblacional gradualmente hasta alcanzar una respuesta basal a los 50 min, efecto que dura por 40 min, posteriormente se aplicó el LTP correspondiente.

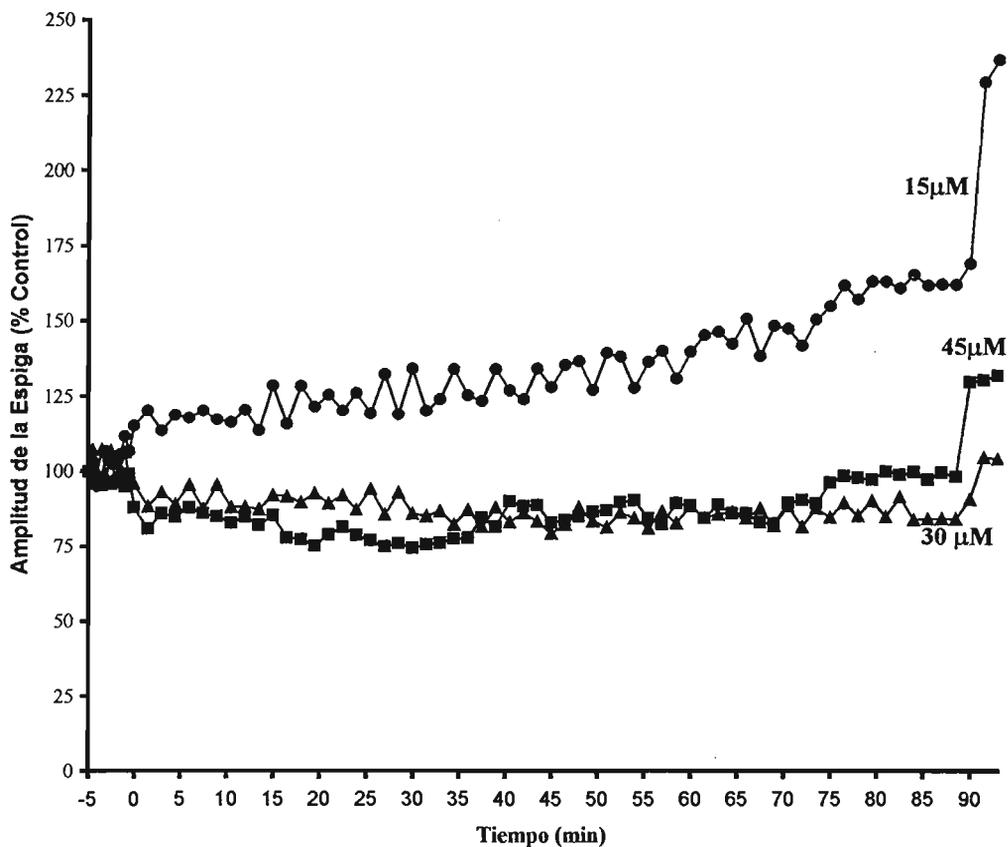


Fig. 22. Se muestran las concentraciones utilizadas y el tipo de respuesta que se obtiene después de la aplicación de MEL. La gráfica esta representada por la amplitud de la espiga (% control) contra el tiempo. La gráfica muestra, un efecto excitador a 15 μM y un efecto inhibitor a 30 y 45 μM (efecto bifásico).

Tiempo (min)	Disminución de la amplitud de la espiga (%) con respecto al control
-5	-
15	29*
30	30*
45	9
60	1
75	1
90	1
93	-

Tabla 6. Se muestran los promedios de la disminución de la amplitud de la espiga (%) a $30\mu\text{M}$ de ATP. * $p < 0.005$ t student con respecto al control.

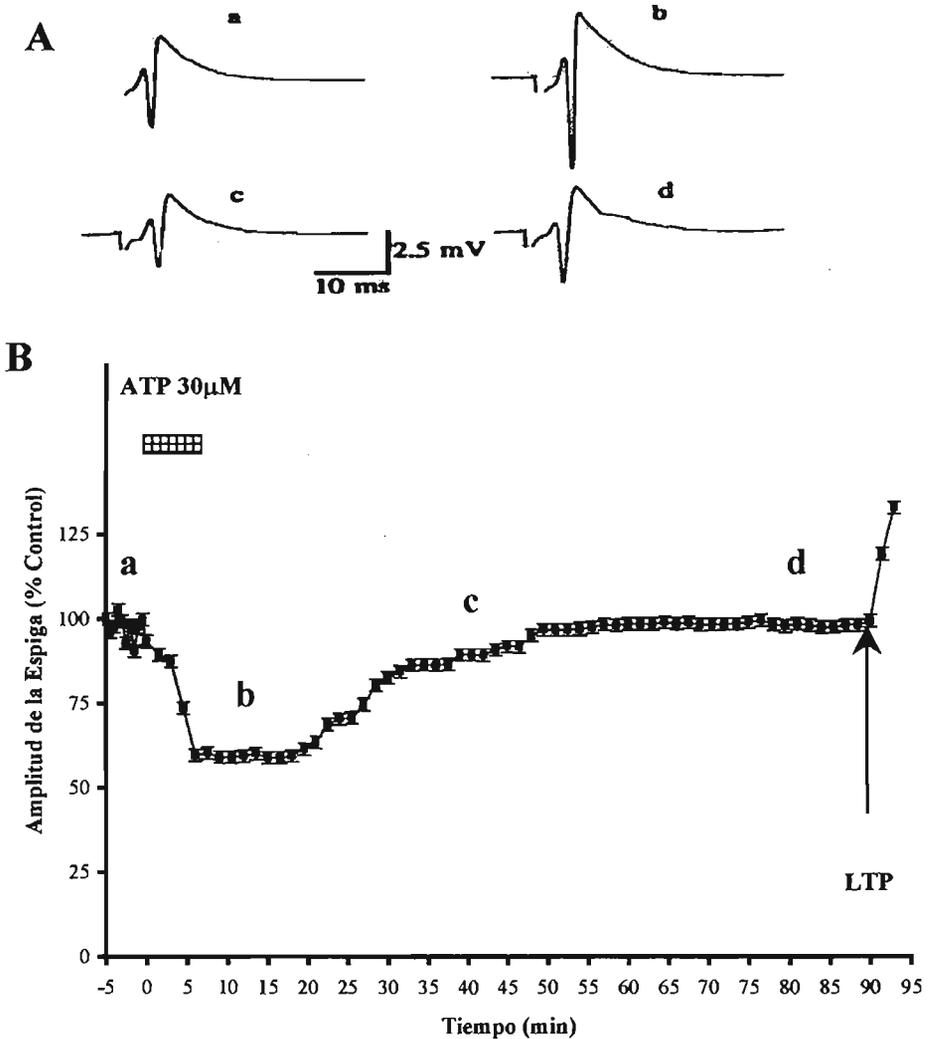


Fig. 23. Curso de las acciones inhibitorias del ATP 30 μ M, se observa un bloqueo reversible de la transmisión sináptica. En la parte superior se muestra la amplitud de la espiga (% control) en función del tiempo. El ATP aplicado esta indicado por la barra horizontal. El LTP provoca la aumento de la sinapsis. En la parte inferior los trazos de las espigas son representaciones de una rebanada hipocampal a los tiempos indicados por las letras. Los símbolos son el promedio \pm D. S (ϕ).

VI. DISCUSIÓN

Con los resultados obtenidos mostramos la influencia de MEL y ATP en registros de potenciales evocados en la región CA1 de rebanadas de hipocampo de rata. Se obtuvo una curva dosis respuesta a MEL a las concentraciones de 15, 30 y 45 μM . La MEL a bajas concentraciones (15 μM) en CA1 producen un efecto excitador de los EPSPs por mediación de glutamato, quien actúa en esta región por permitir la entrada del Ca^{2+} a través de sus receptores NMDA^{71, 72, 105}, de hecho esta respuesta es mayor comparada con el control, es decir facilita la transmisión sináptica glutamatérgica en la región CA1 hipocampal. La MEL a mayores concentraciones (30 y 45 μM) produce un efecto inhibitor de los potenciales evocados en la región CA1 hipocampal, porque la MEL a esta concentraciones impide la entrada del Ca^{2+} que probablemente lo hace por interactuar a través de los receptores a MEL MT2, pero hay que considerar que puede ser posible que otros mecanismos estén involucrados⁴⁹. Estos resultados nos hablan del efecto bifásico de MEL^{37,89,106}.

En base a los antecedentes presentados, nuestros resultados indican que la MEL inhibe a los receptores NMDA que son los mediadores del LTP (a través de LTD) en la región CA1 hipocampal. El LTP que es inducido por una estimulación tetánica de alta frecuencia esta mediado por los receptores NMDA, efecto que observamos en las respuestas, después de aplicar tal estímulo para visualizar la viabilidad de la espiga poblacional, por un lado.

Por otro lado el ATP, al ser aplicado (30 μM) produjo una inhibición directa de la liberación sináptica de glutamato en las terminales nerviosas de la región CA1 hipocampal, posiblemente por interactuar a través de sus receptores P2Y⁷⁹.

Se sabe que el ATP es liberado en la terminal sináptica y se une a su receptor presináptico P2Y, para inducir la activación de una proteína G_i que inhibe a la adenilato ciclasa (AC), o activando una proteína G_o la cual inhibe la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Otra posibilidad es modulando los canales de K^+ , permitiendo su apertura e induciendo una hiperpolarización, efectos que tienen acción directa sobre la $[Ca^{2+}]$ y con la subsiguiente liberación de glutamato para interactuar con sus receptores NMDA presentes en las células piramidales de CA1 del hipocampo.

Estos antecedentes sobre el mecanismo por el cual actúa el ATP, nos permiten plantear que la MEL podría actuar inhibiendo la liberación de Ca^{2+} vía proteínas G como lo hace el ATP: provocando los efectos descritos anteriormente a las concentraciones de 30 y 45 μ M.

En vista de que una de las líneas de investigación de nuestro laboratorio es el estudio de mecanismos de acción de MEL, con estos estudios preliminares planteamos una relación entre MEL y ATP, situación que hasta la fecha no se había reportado, por lo tanto estos resultados sugieren la MEL utiliza este mecanismo de acción además de los ya reportados dependiendo de su efecto.

VII. CONCLUSIONES

1. Se implementó la metodología de rebanadas de cerebro de rata para la obtención de registros extracelulares en la región CA1 hipocampal.
2. La MEL produce excitación de los potenciales evocados (espiga poblacional) en la región CA1 hipocampal de ratas a las concentraciones de 15 μM .
3. La MEL produce depresión de los potenciales evocados (espiga poblacional) en la región CA1 hipocampal a las concentraciones de 30 y 45 μM , con mayor duración que con ATP a 30 μM .
4. El ATP produce depresión de los potenciales evocados (espiga poblacional) en la región CA1 hipocampal a 30 μM .

VIII. PERSPECTIVAS

Con los resultados obtenidos y con lo reportado en la literatura nos permitimos plantear lo siguiente:

a) Estos estudios preliminares permitieron implementar satisfactoriamente la metodología de rebanadas de cerebro, para la obtención de registros extracelulares de la región CA1 hipocampal.

b) Esta metodología nos permitirá caracterizar los efectos de diversas sustancias, agonistas y antagonistas de MEL, con estas respuestas investigaremos el mecanismo de acción de diversas sustancias, que nos serán de utilidad, para estudios específicos electrofisiológicos relacionados con diversos trastornos como lo son el Alzheimer y la epilepsia.

c) El conocimiento de estos mecanismos, nos ayudarán a comprender la fisiología de la neuromodulación en sitios como el hipocampo, durante procesos fisiológicos y patológicos en el humano. Permittiéndonos también, una amplia gama de posibilidades terapéuticas en las cuales los efectos colaterales sean menores, o puedan ser controlados, a la par de la generación de efectos deseados para proteger la actividad del SNC.

IX. BIBLIOGRAFÍA GENERAL.

1. Acuña-Castrovicjo D., Coto-Montes A., Monti M. G., Ortiz G. G. and Reiter R. J. Melatonin is protective against MPTP-induced striatal and hippocampal lesions. *Life Sci* 1997; 60; 23-29.
2. Andersen P., Bliss T. V. and Skrede K. K. Unit analysis of hippocampal population spikes. *Exp Brain Res*. 1997; 13 : 208-221.
3. Anderson E. The anatomy of ovine pineals, lights and electron microscopic studies. *J Ultrastructure Res Suppl* 1965; 8:1-10.
4. Amaral D. G. and Witter M. P. The tree-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neurosci* 1989; 3: 571-591.
5. Anton-Tay F., Chou C., Anton S. and Wurtman R. J. Brain serotonin concentration: elevation following intraperitoneal administration of melatonin. *Science* 1968; 162: 277-278.
6. Anton-Tay F. and Wurtman R. J. regional uptake of ^3H -melatonin from blood or cerebrospinal fluid by rat brain. *Nature* 1969; 221: 474-475.
7. Arendt J. Mammalian pineal. *Pineal Res Rev* 1985; 3: 161-213.
8. A. U. Larkman and J. B. Jack. Synaptic plasticity: hippocampal LTP. *Current Op Neurobiolo* 1995; 5: 324-334.
9. Axelrod J. The pineal Gland: a neurochemical transducer. *Science* 1974; 184: 1341-1348.
10. Barajas-López C., Surprenant A. and North R. A. Adenosine A1 and A2 receptors mediate presynaptic inhibition and postsynaptic excitation in guinea pig submucosal neurons. *J Pharmacol Exp Therap* 1991; 2: 490-494.
11. Bargmann W. Handbuch der Mikroskopischen anatomic des Menschen. Mollendorff ed. (Springer, Berlin). 1943;6: 309.
12. Binkley S., MacBride S. E., Klein D. C. and Ralph C. L. Pineal enzymes: regulation of avian melatonin synthesis. *Science* 1973; 181: 273-275.
13. Blask D. E. Differential effects of the pineal gland on Lr-Rh and FSH- RH activity in the medial basal hypothalamus of the male golden Hamster. *Neuroendocrinology* 1979; 28: 36-40.
14. Bondarenko L. A. The Biochemical aspects of pincal gland functioning in the rat ontogeny. *Ontogenes* 1999;22:57.

15. Brown T. H. and Zador A. M. In the synaptic organization of the brain Molecular, (ed J.E. Chad y H- V. Whcal) Chapter 11. Hippocampus, IRL Press of Oxford University Press, (1991) pp 346-388.
16. Brown G. M. Chronopharmacological actions of the pineal gland. *Drug Metabol Interact.* 1990; 8: 189-193.
17. Brown G. M., Barr A., Grossi D., Kashur S., Johansson E. and Yie S. M. Urinary 6-sulphatoxymelatonin, an index of pineal function in the rat. *J Pineal Res.* 1991; 10: 141-146.
18. Brownstein M. J. The pineal gland (Minirev) *Life Sci* 1975; 16: 1363.
19. Bruyn G. W. The seat of the soul. En: Rose C., Bynium W. F. (Comps) *Historical aspects of the neurosciences.* Raven Press, New York. 1985:55-81.
20. Burnstock G. Purinergic neurotransmission. *Sem Neurosci* 1996; 8: 171-257.
21. Burnstock G. Cotransmission in the pharmacology of vascular smooth muscle, Eds. C.J Garland and J.A Angus. Oxford University press, Oxford. 1997: 210-232.
22. Calvo J. and Boya J. Postnatal development of cell types in the rat pineal gland. *J Anat* 1983; 137:185.
23. Cajal S. Ramón y *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébre.* Paris: Maloine.1911.
24. Cardinalli D. P. and Wurtman R. J. Hydroxyindole-O-methyl transferases in rat pineal, retina and Harderian gland. *Endocrinology* 1972; 9: 877-886.
25. Cardinalli D. P. Melatonin: a mammalian pineal hormone. *Endocrinol Rev* 1981; 2: 327-354.
26. Cardinalli P. *Neuroendocrinología; Glándula pineal.* (Schiaffini) Salvat Ed. 1985: 309.
27. Cardinalli D. P., Larin F. and Wurtman R. J. Action spectra for effects of light on hydroxyindole-methyltransferases in rat pineal, retina, and harderian gland. *Endocrinology.* 1971; 91: 886-887.
28. Cardinalli D. P. Lynch H. J. and Wurtman R. J. Binding of melatonin to human and rat plasma proteins. *Endocrinology.* 1972; 91: 1213-1218.
29. Cassone V. M., Warren W. S., Brooks D. S., and Lu Jun. Melatonin, the pineal gland, and circadian rhythms. *J Biol Rhyth* 8,Suppl. 1993: S73-S81.

30. Castilla S. L. y Cravioto J. Estadística Simplificada. Ed Trillas, México, 1991.
31. Cotman C. W., Monaghan D. T. and Ganong A. H. Excitatory Amino Acid Neurotransmission: NMDA Receptors and Hebb-Type Synaptic Plasticity. *Ann Rev Neurosci* 1988 ; 11 : 61-80
32. Czanorcki J. and Sastry P. S. The lipids of human pineal gland. London, Pergamon Press. 1969:49.
33. Descartes R. Les passions de l'âme. Amsterdam (in French) Reprinted in AT, Vol XI. English translation in CSM, vol I.
34. Descartes R. (1596-1650). L'homme et un traite de la formation du foetus. Ré Descartes. Reproduction : Num. BNF de l' éd. de Cambridge; Omisys [1990] (French books 1601-1700; 56:10). 1 microfilm Reprod. de l' éd de Paris: Chez Charles Angot, 1664. Publication 1995 : 448.
35. Dodt E. and Maissl H. The pineal and parietal organs of lower vertebrates. *Experientia* 33. Khauser Verlag Switzerland. 1982: 996.
36. Dudocovich M. L. Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol Sci* 1995; 16:2:50-56.
37. Ebert E., Wolfgang H., Wiedeman M., and Fernandes de Lima V. M. Biphasic effects of melatonin on the propagation of excitation waves in the chicken retina. *Neurosci Letters*. 199; 268: 37-40.
38. Edwards F. A., Gibb A. J. and Colquhoun D. ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature* 1992; 359: 144-147.
39. Feria- Velasco A., Meléndez C., and Jaramillo J. Sex differences in secretion pattern of neonatal rat Harderian gland under various environmental lighting conditions. *Comp Biochem Physiol* 1983; 74B: 799.
40. Feuer G. Biochemistry of the pineal gland as an endocrine organ. *Drug Metabol Drug Interact*. 1990; 8: 203-207.
41. Foley P. B., Cairncross K. D. and Foldes A. Pineal indoles: significance and measurement. *Neurosci Biobehav Rev*. 1986; 10: 273-293.
42. Gerdín M J, Masana M I and Dubocovich M L. Melatonin-mediated regulation of human MT1 melatonin receptors expressed in mammalian cells. *Bio Pharmacol*. 2004; 67: 2023-2030.
43. Goldman B. D. Parameters of the pineal melatonin secretion affecting

- reproductive responses in Siberian hamsters. *Steroides*. 1991; 56: 218-222.
44. Golombek D. A., Martini M. and Cardinali D. P. Melatonin as an anxiolity in rats: time dependence and interaction with the central GABAergic system. *Eur J Pharmacol* 1993; 237: 231-236.
 45. Golombek D. A., Pévet P. and Cardinali D. P. Melatonin effects on behavior: possible mediation by the central GABAergic system. *Neurosci Behav Rev* 1996; 20:3: 403-412.
 46. Hammond C. *Cellular and molecular Neurobiology*. Ed Academic Press, Chapter 19 pp 415-441.
 47. Henderson G. *Pharmacological analysis of synaptic transmission in brain slice. In electrophysiology. Part II: synaptic transmission* (Wallis D. I., ed), Cardiff, UK. pp89-107, (1992)
 48. Hoffman R. A., Reiter R. J. Pineal Gland: influence on gonads of melatonin and related indolamines. *Science*. 1965; 148: 1609-1611.
 49. Hogan M. V., El-sherif Y. and Wieraszko A. The modulation of neuronal activity by melatonin: in vitro studies on mouse hippocampal slices. *J Pineal Res* 2001; 30(2): 87-96.
 50. Houssay Alberto B., Cingolani Horacio E, et al (2000). Fisiología de la glándula pineal. En: *Fisiología médica*. 9^a ed. Argentina. El Ateneo 633-637p
 51. Inoue K, Koizumi S. and Ueno S. Implications of ATP receptors in brain functions. *Prog Neurobiol* 1996; 50: 483-492.
 52. Inoue K., Nakazawa K., Fijimori and Takanaka A. Extracellular adenosine 5'-triphosphate evokes glutamate release in cultura rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 1992; 134: 215-218.
 53. Johnson L. Y. and Reiter R. J. The pineal gland and its effect an mammalian reproduction. *Prog Reprod Biol* 1978; 4:116-120.
 54. Kandel E. R., Schwartz J. H., Jessell T. M. *Principios de Neurociencia*, Editorial Mc Graw Hill-Interamericana. Cuarta Edición, 2001.
 55. Köppers J. A. The mammalian pineal organ. *J Neuro Relat Suppl* 1969; 9: 140-143
 56. Karasek M. Ultrastructural study of pineal adenohypophysial relationships in rats. *Progr Brain Res* 1979; 52: 195.

57. Kennedy G. Y. Harderoporphyrin: a new porphyrin from the Harderian gland of the rat. *Comp Biochem Physiol* 1970; 36: 21-25.
58. Klein D. C. Evidence for the placental transfer of 3H- acetyl-melatonin. *Nature New Biol.* 1972; 237: 117-121.
59. Klein O. C. and Moore R. Y. Pineal N-acetyltransferase and hidroxiindole-O-methyltransferase: control by retina hypothalamic tract and suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 1979; 174: 245-262.
60. Knight B. K. and Hayes M. M. The pineal Gland. *Anim Sci* 1973; 3: 143-147.
61. Kopp C., Vogel E., Rettori M. C., Delagrange P. and Misslin R. Anxiolytic-like properties of melatonin receptor agonists in mice: involvement of MT1 and/or MT2 receptors in the regulation of emotional responsiveness. *Neuropharmacology* 2000; 39: 1865-1871.
62. Krnjevic K. Amino acid transmitters: 30 years progress in research in fast and slow chemical signalling. (En L. L. Iversen and E. L. Goodman, eds). *The Nervous System*. Oxf. Univ. Press. USA. 1980
63. Larkman A. U. and Jack J. J. B. Synaptic plasticity: hippocampal LTP. *Curr Opin Neurobiol* 1995; 5: 324-334.
64. Lerner A. B., Case J. D., Takahashi Y., Lee T. H., and Mori W. Isolation of melatonin the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958; 80: 2387.
65. Lerner A. B. and Case J. D. Melatonin. *Fed Prod* 1960; 19: 590-593.
66. Lin H. S. and Hwang T. Fine structural changes in the Hamster pineal gland after blinding and superior cervical ganglionectomy. *Cell tissue Res.* 1975; 158: 285-290.
67. Lu K. S. and Lin H. Cotochemical studies on cytoplasmic granular elements in the hamster pineal gland. *Histochemistry.* 1979; 61: 177-187.
68. Madison D. V. Whole-cell voltage-clamp techniques applied to the study of synaptic function in hippocampal slices. In *cellular neurobiology. A practical approach: Part II Whole-cell recording and isolation of ionic currents* (Chad J and Wheal H., eds) Bassett Cres. UK pp 137-149. (1993)
69. Macstroni G. J. M., Corti A., Pierpaoli W. The pineal gland and the circadian, opiateergic, immunoregulatory role of melatonin. *Ann N Y Acad Sci* 1987; 496: 67-77.

70. Mahle C. D., Takaki K. S., and Watson A. J. Melatonin receptor ligands and their potential clinical applications. *Ann Rep Med Chem* 32, Robertson Ed. 1997; 31-40.
71. Malenka R. C. Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD, *Cell*. 1994; 78: 535-538
72. Malenka R. C. and Nicoll R. A. Long Term Potentiation- A Decade of Progress. *Science*. 1999; 285: 1870-1874
73. Masino S. A., Diao L., Illes P., Zahniser N. R., Gaynor A., Bertil B. B. J. and Dunwiddie T. V. Modulation of Hippocampal Glutamatergic transmission by ATP is dependent on adenosine A1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002; 303: 356-363.
74. McCord C. P. and Allen F. D. Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J Exp Zool* 1917 ; 23 : 217-224.
75. McNulty J. A., McReynolds H. D. and Bowman D. C. Pineal gland free amino acids and indoles during postnatal development of the rat: correlations in individual gland. *J Pineal Res* 1990; 9: 65.
76. Melchiorri D., Reiter R. J., Attia A. M. Mara M. and Nistico G. Potent protective effect of melatonin on in vivo paraquat induced oxidative damage. *Life Sci*. 1995 ; 56 : 83-87.
77. Melchiorri D., Reiter R. J., Sewerynek E., Ortiz G. G. and Nistico G. The pharmacology of melatonin in lipoperoxidation. In pineal Update PJD. Publications Limited, Westbury, NY. pp 389 (1997).
78. Meldrum B. and Garthwaite J. Excitatory amino acids neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci* 1989; 11: 379-387.
79. Mendoza-Fernandez V., Andrew R. D. And Barajas-López C. ATP inhibits the synaptic release by acting at P2Y receptors in pyramidal neurons of hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293: 172-179.
80. Moore R. Y. and Klein D. C. Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Brain Res* 1974; 71: 17-22.
81. Moore R. Y. Retinohypothalamic projection in mammals: a comparative study. *Brain Res* 1973; 49: 403-409.
82. Moore R. Y. and Lenw N. J. A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurobiol* 1972; 146: 1-14.

83. Musshoff U., Riewenherm D., Berger E., Fautsch J. D. and Speckman. Melatonin receptors in rat hippocampus: molecular and functional investigations. *Hippocampus* 2002; 12(2): 165-173.
84. Nagle C. A. and Cardinali D. P. Uptake and effect of 17-beta-estradiol on pineal hydroxyindole-O-methyl transferase (HIOMT) activity. *Life Sci* 1972; 2: 1109-1112.
85. Naranjo-R. E. B., Ortiz O. A., Hernández A. E., Mendoza F. V. and Escobar A. Anxiolytic-like actions of melatonin, 5-metoxytryptophol, 5-hidroxytryptophol and benzodiazepines on a conflict procedure. *Neurobiol Psychopharmacol Biol Psychiat* 2000; 24: 117-129
86. North R. A. P2X receptors: a third major class ligand-gated ion channels. *Ciba Foundation Symposis* 1996; 198: 91-105.
87. Nosedá R., Hernández A., Valladares L., Mondaca M., Laurido C. and Sofo M. R. Melatonin-induced inhibition of spinal cord synaptic potentiation in rats is MT2 receptor-dependent. *Neurosci Lett* 2004; 360: 41-44.
88. O'Callaghan D., Karsch F. J., Boland M. P. and Roche J. F. Role of short days in the on set and duration of reproductive activity in ewes under artificial photoperiods. 1991; 44 (1): 23-28.
89. Pazo J. H. Effects of melatonin on spontaneous and evoked neuronal activity in the mesencephalic reticular formation. *Brain Res Bull* 1979; 4(6): 725-30.
90. Quay W. B. Pineal chemistry in cellular and physiological mechanisms. Charles C. Thomas, Springfield. 1974; III: 430.
91. Reiter R. J. and Klein D. C. Observations on the pineal gland, the Harderian glands, the retina and the reproductive organs of adults female rats exposed to continuous light. *J Endocrinol* 1971; 51: 117-119
92. Reiter R. J. Evidence for an endocrine function of the human pineal gland. *J Neural Trans Suppl* 1978; 13-247.
93. Reiter R. J. The pineal gland and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr Rev* 1980; 1: 109-112.
94. Reiter R. J. Anatomy of the pineal gland of mammals. In the pineal. Vol 6 Reiter R. J. (Ed) Eden Press, Montreal. 1981:14-46.
95. Reiter R. J. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Moll Cell Endocrinol*. 1991; 79: C153-C158.

96. Reiter R. J. Photoperiod, pineal and reproduction: En Reiter R. J. (Ed). The pineal. Eden Press, Montreal. 1997, 71.
97. Reppert S. M. and Klein D. C. Transport of maternal [3H] melatonin in the neonatal rat. *Endocrinology*. 1978; 102: 582-587.
98. Sandy K. R. Possible role of pineal melatonin in the mechanisms of ageing. *Int J Neurosci*. 1990; 52: 85-89.
99. Sandy R. Anastasiadis P. G. Anninos P. A. and Tragas N. Is the pineal gland involved in the pathogenesis of endometrial carcinoma. *Intern J Neurosci* 1992; 62: 89-96.
100. Seabrook G. R., Easter A., Dawson G. R. and Bowery B. J. Modulation of long-term potentiation in CA1 region of mouse hippocampal brain slices by GABA receptor benzodiazepine site ligands. *Neuropharmacology* 1997; 36(6):823-30.
101. Shen K. Z. and North R. A. Excitation of rat locus coeruleus neurons by adenosine-5'-triphosphate: ionic mechanism and receptor characterization. *J Neurosci* 1993; 13: 894-899.
102. Shepherd G. M. *Neurobiology*, Second edition, New York Oxford University Press, pp 145-176, (1988).
103. Siegel G. L., Agranoff B. W., Albers R. W. and Molinoff P. B. *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects. Quinta Edición.* Raven Press, USA. 1994
104. Smulders A. P. and Wright E. M. Role of choroids plexus in transport of melatonin between blood and brain. *Brain Res* 1980; 191: 555-558.
105. Stevens C. F. Quantal Release of neurotransmitter and long-term potentiation. *Cell* 72 Suppl. 10. 1993; 55-66.
106. Storr M., Koppitz P., Sibaev A., Saur D., Kurjak M., Franck H., Schusdziarra V and Allescher H. D. Melatonin reduces non-adrenergic, non-cholinergic relaxant neurotransmission by inhibition of nitric oxide synthase activity in the gastrointestinal tract of rodents in vitro. *J Pineal Res* 2002; 33(2):101-108.
107. Synder S. H. Control of the circadian rhythm in serotonin content of rat pineal gland. *Proc Nat Acad Sci* 1965; 53: 301.
108. Tamarkin L., Baird C. J. and Almeida O. F. Melatonin: a coordinating signal for mammalian reproduction? *Science*. 1985; 227: 714.

109. Vaughan G. M., Allen J. P., Tullis W., Siler-Khodr T. M., De la Peña A. and Sackman J. W. Overnight plasma profiles of melatonin and certain adenohipophysal hormones in men. *J Clin Endocri Metab* 1978; 47: 566-571.
110. Von Bartheld F. and Moll J. The vascular system of the mouse epiphysis with remarks on the comparative anatomy of the venous trunks in the epiphysis seal area. *Acta Anat* 1954; 22: 227.
111. Wong P. Y. and Fritze I. Determination by neuron activated of cooper, manganeses and zinc in the pineal body and others areas of brain tissue. *J Neurochem* 1969; 16: 1231-1235.
112. Wieraszko A., Goldsmith G., Seyfried T. N. Stimulatio-dependent release of adenosine triphosphate from hippocampal slices. *Brain Res* 1989; 485: 244-250.
113. Witt-Enderby P. A., Bennett J., Jarzynka M. J., Firestine S., and Melan M. A. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci* 2003; 72: 2183-2198.
114. El-Sherif Y., Hogan M. V., Tesoriero J. and Wieraszko A. Factors regulating the influence of melatonin on hippocampal evoked potentials: comparative studies on different strains of mice. *Brain Res* 2002; 945: 191-201.
115. Ziganshin A. U., Ziganshin L. E., Bodin P., Bailey D. and Burnstock G. effects of P2- prinoreceptor antagonists on ecto-nucleotidase activity of guinea-pig vas deferens cultured smooth muscle cells. *Bioch Mol Biol Int* 1995; 36: 863-869.
116. Zimmermann. H., *Synaptic Transmission, Cellular and Molecular Basis*. Frankfurt am Main Germany: Gulde Druck GmbH. 1993



ANEXO I

OFICIO: CP/153/05
ASUNTO: Cátedra
Fernando Orozco Díaz

Dra. Elia Brosla Naranjo Rodríguez
Departamento de Farmacia
UNAM
Presente

Nos es grato informarle a usted que el jurado integrado para elegir el ganador de la cátedra "Fernando Orozco Díaz", ha decidido designarlo ganador de la misma por su proyecto: *"Efecto de la melatonina sobre la transmisión sináptica glutaminérgica en la región CA1 de rebanadas del hipocampo de rata"*; que constituye el tema de tesis del alumno: Adriana Martínez Martínez.

Por éste motivo, externamos a usted nuestra cordial felicitación.

A i e n t a m e n t e

Ciudad Universitaria, D.F., a 24 de febrero de 2005.
Consejo Coordinador Colegiado 2003-2005

Dra. Antonia Dosal Gómez
Presidenta

Q. F. B. Magdalena Acosta Segura
Secretaría

M. en I. Teresita Robert Nuñez
Tesorera

ANEXO II

CERTIFICADO DE SALUD

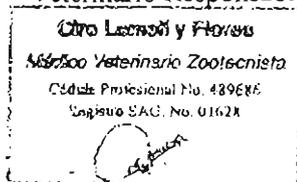
En cumplimiento de la normatividad vigente, por este conducto certifico que los animales aquí descritos se encontraron sanos, libres de enfermedades infectocontagiosas y de ectoparásitos.

Estos animales fueron producidos y mantenidos en el Centro UNAM-Harlan de Producción de Animales de Laboratorio, un Sistema de Barrera que brinda las condiciones técnica y científicamente óptimas, para la crianza de animales de laboratorio Libres de Patógenos Específicos (SPF). Los animales de cada una de las Barreras Harlan, se evalúan periódicamente en la Missouri University y los resultados son publicados periódicamente. Se anexa Reporte de Constatación del Estado de Salud.

Especie	Cantidad	Cepa	Edad/Peso	Sexo
Rata	18	HsdBrlHan:WIST	180-230g	Machos

Veterinario Responsable:

Fecha: 13 de septiembre del 2005



Dr. Ciró Lomeli y Flores
Director General

Ubicación: Harlan México, Barrera 655
 Fecha de las pruebas más recientes: Marzo, 2005.

Especie: Rata
 Cepas: Hsd/BrlHan:WIST;
 Hsd/Sprague Dawley

Referencia No.	Frecuencia de la prueba	Prueba más reciente		Diagnóstico		Resultado últimos 18 meses
		Fecha	Resultado ^(a)	Laboratorio	Método	
SEROLOGÍA						
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	Bimestral	mar-05	0/11	MURADIL	ELISA	0/99
Virus Sendai	Bimestral	mar-05	0/11	MURADIL	ELISA	0/99
Virus de la Sialodacrioadenitis (SDAV/RCV)	Bimestral	mar-05	0/11	MURADIL	ELISA	0/99
Parvovirus de la Rata (RPV)	Bimestral	mar-05	0/11	MURADIL	ELISA	0/99
KRV	Bimestral	mar-05	0/11	MURADIL	ELISA	0/99
H-1	Bimestral	mar-05	0/11	MURADIL	ELISA	0/99
Virus de la Neumonía del Ratón (PVM)	Bimestral	mar-05	0/11	MURADIL	ELISA	0/99
Reovirus 3 (REO-3)	Bimestral	mar-05	0/11	MURADIL	ELISA	0/99
Virus Hantaan	Bimestral	mar-05	0/11	MURADIL	ELISA	0/99
Virus de la Encefalomielitis de Theiler (TMEV)	Bimestral	mar-05	0/11	MURADIL	ELISA	0/99
Adenovirus Murino (MAd)	Bimestral	mar-05	0/11	MURADIL	ELISA	0/99
Clostridium piliforme (Tyzzer's)	Bimestral	mar-05	0/11	MURADIL	ELISA	0/99
Virus de la Coriomeningitis Linfocítica (LCM)	Bimestral	mar-03	0/11	MURADIL	ELISA	0/99
Encephalitozoon cuniculi	Semestral	mar-05	0/11	MURADIL	ELISA	0/33
Bacilo Asociado a los Cilios Respiratorios (CARB)	Semestral	mar-05	0/11	MURADIL	ELISA	0/33
PCR						
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	Semestral	mar-05	0/11	MURADIL	PCR	0/33
<i>Helicobacter spp</i> ^(b)	Bimestral	mar-05	0/11	MURADIL	PCR	0/99
MICROBIOLOGÍA						
<i>Salmonella</i>	Bimestral	mar-05	0/11	MURADIL	Cult Aer y 7% CO ₂	0/99
<i>Cornibacterium kutscheri</i>	Bimestral	mar-05	0/11	MURADIL	Cult Aer y 7% CO ₂	0/99
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Bimestral	mar-05	0/11	MURADIL	Cult Aer y 7% CO ₂	0/99
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	Bimestral	mar-05	0/11	MURADIL	Cult Aer y 7% CO ₂	0/99
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	Bimestral	mar-05	0/11	MURADIL	Cult Aer y 7% CO ₂	0/99
Grupo B Beta Streptococcus	Bimestral	mar-05	0/11	MURADIL	Cult Aer y 7% CO ₂	0/99
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Bimestral	mar-05	0/11	MURADIL	Cult Aer y 7% CO ₂	0/99
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	Bimestral	mar-05	0/11	MURADIL	Cult Aer y 7% CO ₂	0/99
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bimestral	mar-05	0/11	MURADIL	Cult Aer y 7% CO ₂	0/99
PARASITOLOGÍA						
Ectoparásitos	Bimestral	mar-05	0/11	MURADIL	Micros	0/99
Endoparásitos	Bimestral	mar-05	0/11	MURADIL	Micros	0/99
HISTOPATOLOGÍA						
Glandulas de Harder	Bimestral	mar-05	0/11	MURADIL	Patología	0/99
Riñones	Bimestral	mar-05	0/11	MURADIL	Patología	0/99
Pulmones	Bimestral	mar-05	0/11	MURADIL	Patología	0/99
Glandulas Salivales	Bimestral	mar-05	0/11	MURADIL	Patología	0/99
Lesiones	Bimestral	mar-05	0/11	MURADIL	Patología	0/99

(a) Incluye animales adultos y recién destetados

(b) Incluyendo: *H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. rodentium*, *H. typhlonius*, *H.sp*

MURADIL = Missouri University Research Animal Diagnostic Laboratory, Saint Louis MO.

ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Assay

PCR = Polymerase Chain Reaction

Microscopia = Examen del pelaje; de los contenidos duodenal y cecal; impresiones perianales en cinta de celofán.