

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE MELATONINA, GABA Y DIAZEPAM
EN REBANADAS DE HIPOCAMPO DE RATA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

JENNY REYES FLORES



MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Profra. Elia Brosla Naranjo Rodríguez.

VOCAL: Profr. Andrés Navarrete Castro

SECRETARIO: Profra. Ruth Bustamante García

1er. SUPLENTE: Profra. Ma. Elena Sánchez Mendoza

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. FACULTAD DE QUÍMICA.

ASESOR DEL TEMA



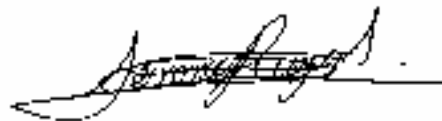
DRA. ELIA BROS LA NARANJO RODRÍGUEZ

SUPERVISOR TÉCNICO



DRA. OFELIA ESPEJO GONZÁLEZ

SUSTENTANTE



JENNY REYES FLORES

Al Programa de proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (UNAM-PAPIIT-DGAPA) con clave de proyecto **IN205905**.

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

A La **Universidad** que me dio la oportunidad de formar parte de ella y en la cual viví muchas experiencias que me hicieron crecer como persona.

A la **Dra Elia B. Naranjo Rodríguez**, quien me acepto en su laboratorio y desde el momento en que llegué me brindo su apoyo incondicionalmente dedicando el tiempo que fuese necesario para la realización y termino de este trabajo.

Al MVZ **Atonatiu Edmundo Gómez Martínez, Jefe del Bioterio de la UNAM Facultad de Química**; por el apoyo otorgado con las ratas que utilicé para realizar los estudios piloto de este proyecto.

Al **Ing. Jorge Zamorano Velasco** por la ayuda técnica para la elaboración de este proyecto.

Al Lic. **Efraín Mora** por la ayuda brindada para la toma de las fotografías que se muestran en este trabajo.



A mis padres:

Quienes desde el momento en que llegue a formar parte de sus vidas me dieron su amor, cariño, comprensión y buenos principios. Además por todos los sacrificios que han hecho por mí para que pudiera llegar hasta donde ahora me encuentro y a quienes les estaré agradecida toda la vida.

A mis hermanos: Javier, Ivette y Jesús:

Con quienes he compartido toda mi vida y a los cuales respeto y quiero mucho. Además se que ustedes confiaron en mi y lo siguen haciendo.

A mis sobrinos:

A pesar de que en algunas ocasiones (sino es que en muchas) me hicieron desesperar, los quiero, porque me han dado muchas alegrías.

A Félix

Sabes las dificultades que pasa para realizar esté trabajo, pero cuando te necesite siempre estuviste ahí para brindarme tu apoyo y no dejar que me diera por vencida. Soportaste mis momentos de desesperación y aunque se que a veces te fastidiaba nunca me dejaste sola.

A mis amigos y compañeros de la Carrera:

Con los cuales compartí muchas experiencias, tanto buenas como malas e hicieron más placentera mi estancia en la Facultad y a quienes siempre llevare en mis recuerdos.



ÍNDICE

| | Página |
|--|--------|
| Lista de abreviaturas..... | iii |
| Lista de figuras y fotografías..... | iv |
| Lista de gráficas..... | vi |
| CAPÍTULO | |
| I.-INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| II.-GENERALIDADES | 3 |
| 1. Glándula Pineal | |
| 1.1 Antecedentes Históricos..... | 3 |
| 1.2 Anatomía..... | 4 |
| 1.3 Estructura y Composición Bioquímica..... | 6 |
| 1.4 Regulación Circadiana..... | 7 |
| 1.5 Fisiología..... | 10 |
| 2. Melatonina | |
| 2.1 Antecedentes Históricos..... | 12 |
| 2.2 Biosíntesis..... | 13 |
| 2.3 Metabolismo..... | 15 |
| 2.4 Receptores a Melatonina..... | 16 |
| 2.5 Funciones Fisiológicas..... | 17 |
| 3. Acido gamma-aminobutírico (GABA) | |
| 3.1 Antecedentes históricos..... | 20 |
| 3.2 Biosíntesis y Metabolismo..... | 20 |
| 3.3 Receptores a GABA..... | 22 |
| 4. Benzodicepinas | |
| 4.1 Antecedentes históricos..... | 24 |
| 4.2 Farmacocinética..... | 24 |
| 4.3. Mecanismo de Acción..... | 25 |
| 4.4 Efectos Farmacológicos y Aplicaciones..... | 26 |
| 5. Diazepam | |
| 5.1. Farmacología..... | 26 |
| 5.2. Usos Terapéuticos..... | 27 |
| 5.3. Reacciones Adversas y Colaterales..... | 28 |
| 6. Hipocampo | |
| 6.1 Antecedentes Históricos..... | 29 |
| 6.2 Anatomía..... | 30 |



| | |
|---|-----------|
| 6.3 Estructura y Sinapsis hipocampal..... | 31 |
| 6.3 Fisiología..... | 33 |
| 7. Transmisión Sináptica..... | 34 |
| | |
| III.-HIPÓTESIS..... | 38 |
| | |
| IV.-OBJETIVOS | |
| Objetivo General..... | 39 |
| Objetivos Particulares..... | 39 |
| | |
| V.- METODOLOGÍA | |
| 8.0 Material..... | 40 |
| 8.1 Preparación de las rebanadas del hipocampo de rata..... | 41 |
| 8.2 Cámara de Registro..... | 43 |
| 8.3 Registro de la actividad eléctrica de las neuronas piramidales..... | 45 |
| 8.4 Análisis estadístico..... | 49 |
| | |
| VI.-RESULTADOS..... | 50 |
| 9.0 Efecto de MEL en la Transmisión Sináptica del Hipocampo..... | 50 |
| 9.1 Efecto de GABA en la Transmisión Sináptica del Hipocampo..... | 59 |
| 9.2 Efecto de DIAZL en la Transmisión Sináptica del Hipocampo..... | 61 |
| | |
| VII-DISCUSIÓN..... | 67 |
| | |
| VIII. CONCLUSIONES..... | 71 |
| | |
| IX.-BIBLIOGRAFÍA GENERAL..... | 72 |
| | |
| X.- ANEXOS..... | 80 |



LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| ADN | = Ácido Desoxirribonucleico |
| AMPc | = Adenosin -Monofosfato - cíclico. |
| ASS | = Ácido Succínico Semialdehído |
| AA | = Ámino ácido |
| AVT | = Arginina-vasotocina |
| BH | = Barrera Hematoencefálica |
| BZP | = Benzodiazepina |
| Ca ²⁺ | = Calcio |
| Cl ⁻ | = Cloro |
| CDP | = Clordiazepóxido |
| DMSO | = Dimetil sulfóxido |
| DS | = Desviación estándar |
| ESM | = Error estándar de la media |
| DIAZ | = Diazepam |
| *GABA | = Ácido Gamma Amino-Butírico |
| GAD | = Glutamato Descarboxilasa |
| GABA-T | = GABA- Transaminasa |
| *GHS | = Glutatión |
| GIS | = Sustancia Inhibidora de Gonadotropinas |
| GSCS | = Ganglio Simpático Cervical Superior |
| GP | = Glándula Pineal |
| GTP | = Guanosín Trifosfato |
| HIOMT | = Hidroxiindol-O-Metiltransferasa |
| *5-HT | = Serotonina (5 -hidroxitriptamina) |
| K ⁺ | = Potasio |
| LCR | = Líquido Cefalorraquídeo |
| LCRA | = Líquido Cefalorraquídeo Artificial |
| *LTP | = Potenciación a Largo Plazo |
| *LTD | = Depresión a Largo Plazo |
| MAO | = Monoaminoxidasa |
| MEL | = Melatonina |
| NMDA | = N-Metil D-Aspartato |
| NAT | = N-Acetil -Transferasa |
| NPV | = Núcleo Paraventricular |
| NSQ | = Núcleo Supraquiasmático |
| *PKA | = Protein Kinasa A |
| Px | = Pinealectomía |
| PPSE | = Potencial Postsináptico Excitador |
| PPS I | = Potencial Postsináptico inhibitor |
| *ROS | = Especies Reactivas de Oxígeno |
| SNA | = Sistema Nervioso Autónomo |
| SNC | = Sistema Nervioso Central |
| SSDH | = Succinil-Semialdehído Deshidrogenada |
| V | = Volt |

* Por sus siglas en inglés



LISTA DE FIGURAS Y FOTOGRAFÍAS

➤ Figuras

| | |
|---|----|
| 1. Esquema de la GP realizada en el siglo XVII por el filósofo René Descartes..... | 3 |
| 2. Localización de la G.P en el humano y la rata..... | 5 |
| 3. Representación esquemática del pinealocito..... | 7 |
| 4. Diagrama de las vías neurales que conectan a la GP con la entrada de luz al organismo..... | 8 |
| 5. Variación de la concentración de las enzimas de la GP por el ciclo luz-oscuridad..... | 9 |
| 6. Estructura química de la MEL (N-acetil-5-metoxitriptamina)..... | 12 |
| 7. Secuencia de reacciones involucradas en la biosíntesis de MEL..... | 14 |
| 8. Metabolismo de la MEL..... | 15 |
| 9. Estructura química del ácido gamma-aminobutírico (GABA)..... | 20 |
| 10. Síntesis y Metabolismo del GABA..... | 21 |
| 11. Estructura del receptor GABA..... | 23 |
| 12. Estructura general de las benzodiazepinas..... | 24 |
| 13. Estructura química del DIAZ..... | 27 |
| 14. Elementos neuronales de la formación hipocampal..... | 31 |
| 15. Sinapsis interneuronal en el hipocampo..... | 37 |
| 16. Registros del potencial de campo típicos en el Estrato Piramidal de la región hipocampal CA1..... | 47 |
| 17. Potencial de campo típico en el registro del estrato piramidal del área hipocampal CA1..... | 48 |



➤ Fotografías

| | |
|--|----|
| 1. Secuencia que muestra la extracción del cerebro..... | 42 |
| 2. Obtención de las rebanadas de hipocampo de ratas 400-500 μ | 43 |
| 3. Equipo de perfusión y visualización de las rebanadas hipocampales | 44 |



LISTA DE GRÁFICAS

| | |
|--|----|
| 1. Efecto de MEL a 15.0 μ M sobre la transmisión sináptica del hipocampo..... | 51 |
| 2. Efecto de MEL a 30.0 μ M sobre la transmisión sináptica del hipocampo..... | 53 |
| 3. Efecto de MEL a 45.0 μ M sobre la transmisión sináptica del hipocampo..... | 55 |
| 4. Efecto de MEL a 90.0 μ M sobre la transmisión sináptica del hipocampo..... | 57 |
| 5. Comparación del efecto de MEL a las concentraciones aplicadas (15.0, 45.0, 30.0 y 90.0 μ M)..... | 58 |
| 6. Promedio de la amplitud de la espiga (%) \pm ESM de las concentraciones de MEL aplicadas (15.0, 30.0, 45.0 y 90.0 μ M)..... | 58 |
| 7. Efecto de GABA a 10.0 mM sobre la transmisión sináptica del hipocampo..... | 60 |
| 8. Efecto de DIAZ a 1.6 nM sobre la transmisión sináptica del hipocampo..... | 62 |
| 9. Efecto de DIAZ a 5.0 nM sobre la transmisión sináptica del hipocampo..... | 64 |
| 10. Efecto de DIAZ a 10.0 nM sobre la transmisión sináptica del hipocampo..... | 65 |
| 11. Comparación del efecto DIAZ a las concentraciones aplicadas (1.6, 5.0, y 10.0 nM)..... | 66 |
| 12. Promedio de la amplitud de la espiga (%) \pm ESM de las concentraciones de DIAZ aplicadas (1.6, 5.0, y 10.0 nM)..... | 66 |



I.-INTRODUCCIÓN

La melatonina (MEL) es una hormona producida y secretada principalmente durante la noche (escotofase) por la glándula pineal¹⁰, los conocimientos que se tienen de esta hormona hasta la fecha han dado pauta a numerosas investigaciones, de ahí que radiquen tanto su importancia como su estudio.

Actualmente, se sabe que la MEL tiene una acción importante sobre los diferentes sistemas, Nerviosos Central (SNC) y Periférico, por ejemplo en el sistema cardiovascular, puede prevenir el infarto al miocardio (producido por el estrés) y reducir la presión arterial⁷³. En el ser humano en el SNC actúa como un sincronizador de la temperatura corporal⁷³, reduce el efecto del ritmo circadiano (jet-lag)²⁵ y puede ser útil para personas con turnos rotatorios de trabajo, así como ser un buen ansiolítico como se ha reportado en animales⁷⁸. Una de las funciones descubierta recientemente de la MEL, es la de comportarse como un potente antioxidante natural, por tener una capacidad antioxidante cinco veces más potente que el glutatión, y más efectiva en la eliminación de los radicales libres que la vitamina E^{15, 83}. En años recientes, la posible relevancia terapéutica de la MEL está orientada a diversas enfermedades neurodegenerativas tales como Alzheimer⁶⁵, Parkinson y Epilepsia⁷⁶, donde ha sido indicada por estudios realizados tanto “In Vitro” (rebanadas de hipocampo) como “In Vivo” (estudios en humanos y modelos animales), sin embargo, se desconoce el mecanismo de acción por el cual pudiera actuar en este tipo de enfermedades y producir los efectos antes mencionados.

Con respecto al mecanismo de acción de la MEL, inicialmente, se planteó que ésta actuaba a través del receptor gamma amino butírico (GABA)¹⁰⁵, conocido como el principal neurotransmisor inhibitor del Sistema Nervioso Central⁴⁰ su acción se potencia por la administración de benzodiazepinas (BZPs)¹⁴, como el diazepam (DIAZ) cuyo mecanismo de acción está bien establecido.



Por otro lado, en mamíferos se ha planteado describir el mecanismo por el cual la MEL ejerce sus diversos efectos a través de la identificación de tres tipos de receptores los MT1, MT2, y MT3¹⁰⁸ a MEL, por lo que éste continua siendo sujeto de estudio, para lo cual se utilizan diferentes modelos experimentales con la aplicación de diferentes tipos de sustancias que pudieran estar relacionadas con el mecanismo de acción de la MEL como lo son el GABA y el DIAZ^{3, 66}.

Con base a la información planteada anteriormente, a través de nuestro estudio buscamos aportar nuevos datos con el objetivo de aumentar el conocimiento para establecer el mecanismo de acción de la MEL, por lo tanto, se plantea la utilización de un sistema “In Vitro” a través de registros extracelulares electrofisiológicos en la región CA1 de hipocampo de rebanadas, para ello, se determinó el efecto producido por la aplicación de MEL, GABA y DIAZ de forma independiente sobre los potenciales evocados en la espiga poblacional, con la finalidad de que los resultados obtenidos sean considerados en estudios posteriores que involucren la interacción farmacológica entre estas sustancias y con ello se pueda establecer un posible mecanismo de acción de la MEL en el modelo de rebanadas de hipocampo de rata.



II.- GENERALIDADES

1. GLÁNDULA PINEAL

1.1 Antecedentes Históricos

En el siglo III a.C. Herófilo consideró a la glándula pineal (GP) como una válvula reguladora del “flujo” de la memoria, concepto que persistió hasta el siglo XIX, en el que Magendie la describió como un regulador del flujo del líquido cefalorraquídeo (LCR); en tanto que en el siglo II a.C. Galeno consignó su anatomía en detalle y la llamo *Konarium* (en griego, piña) y propuso que su función era la de proporcionar sostén a la masa de venas cerebrales que recorren la capa posterior y dorsal del diencéfalo; sin embargo, el nombre actual de la GP fue acuñado en 1682 por el anatomista inglés Thomas Gibson y en el siglo XVII d. C., el filósofo francés René Descartes consideró que la GP participaba en la convención del “espíritu” desde la sangre hacia los ventrículos cerebrales (**Fig. 1**)³².

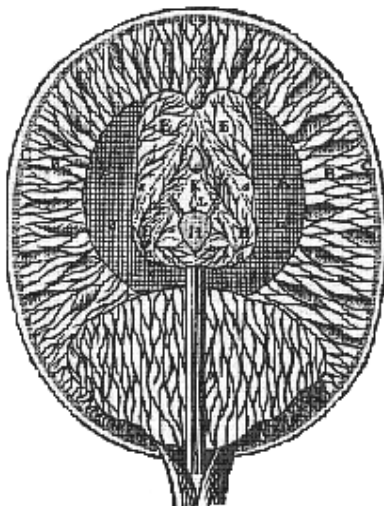


Fig. 1. Esquema de la GP realizada en el siglo XVII por el filósofo René Descartes

Los conocimientos actuales de la función de la GP datan de 1954, año en el que Kitay y Altschule⁵⁷ concluyeron que podrían atribuírsele tres propiedades: 1) control de la función



gonadal en ambos sexos, 2) respuesta cromatodérmica a los cambios de luz ambiental en los vertebrados inferiores y 3) vinculación con la conducta. En 1965 Hoffman y Reiter⁴⁷ demostraron que la oscuridad y los periodos cortos de estimulación con luz inducen cambios marcados en la función gonadal de hámster y que pueden ser del todo suprimidos por la pinealectomía (Px). Axelrod y Wurtman³² denominaron a la GP en términos de transductor neuroendocrino, para describirla como un órgano que convierte el estímulo neural proveniente de la retina y originado por la luz ambiental, en una respuesta del tipo endocrina o neuroendocrina: la **producción de melatonina (MEL)**¹⁰⁷.

1.2 Anatomía

La GP pertenece al grupo de órganos circunventriculares, los cuales son estructuras encefálicas secretoras que se ubican en la línea media y se originan de células endimarias del sistema ventricular⁴¹. De esta manera la GP, también llamada *epífisis cerebri*, recibe su nombre por la forma de cono truncado (piña) especialmente en el hombre. Es un órgano transductor neuroendocrino, situado entre el tálamo y mesencéfalo, en el borde posterior del tercer ventrículo. Su peso oscila entre 50-150 mg y sus diámetros entre 7-8 mm de largo y 4-6 mm de ancho en humanos^{33,52}.

En relación a los peces, anfibios y reptiles la GP presenta estructuras fotorreceptoras semejantes a la de la retina, en tanto que en la de los mamíferos tiene estructura típicamente endógena; además de no presentar elementos fotorreceptores⁴⁹.

Embriológicamente, la GP es una evaginación de la parte posterodorsal del techo del tercer ventrículo y esta unida por un pedículo (tallo pineal) a las comisuras habenular y posterior. Se trata de un cuerpo pequeño y alargado, bañado por el LCR y situado por debajo



de la parte posterior del cuerpo caloso, encapsulado por la piamadre desde la cual le llegan vasos sanguíneos, fibras nerviosas amielínicas y estroma de tejido conjuntivo (Fig. 2)^{32, 33}.

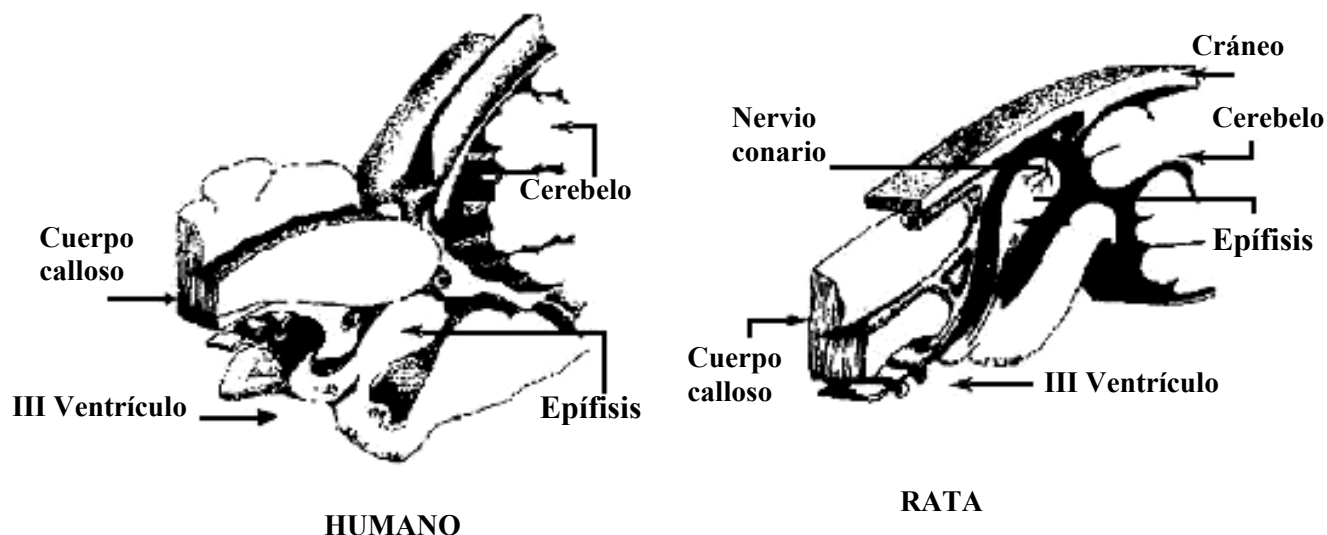


Fig. 2. Localización de la GP en el humano y la rata³².

La irrigación de la GP es abundante; el flujo sanguíneo por gramo de tejido es similar a la de la neurohipófisis, de tal manera que la velocidad es de 4mL/min/g y solo es superado por el del riñón. Sus capilares fenestrados que están situados fuera de la barrera hematoencefálica (BH) permiten el intercambio entre la sangre y el LCR^{26, 72}.

Por otro lado, la innervación esta dada por el sistema nervioso autónomo (SNA), recibe fibras posganglionares del ganglio simpático cervical superior (GSCS) a través de dos nervios simétricos, los nervios conarios que se encuentran en la tienda del cerebelo, también recibe fibras que acompañan a los vasos sanguíneos. En el humano la GP está innervada por fibras preganglionares parasimpáticas, originadas en el núcleo salival superior, que a través de los nervios petrosos mayores alcanzan el plexo pericarotideo y hacen sinapsis con las neuronas ganglionares parasimpáticas intrapineales⁷³.

1.3 Estructura y Composición Bioquímica

La GP esta dividida en lóbulos por ser un tejido conectivo vascular, esta constituida por células parenquimatosas o **pinealocitos (Fig. 3)** agrupados en folículos, los cuales son células polimorfas que contienen el cuerpo celular y un número variable de procesos celulares, dispuestos en torno a los espacios perivascuales. El citoplasma contiene gotas de grasa, vacuolas y vesículas con gránulos secretores⁵².

Filogenéticamente, los pinealocitos proceden de células primitivas fotorreceptoras y representan el 85 % de los componentes celulares de la GP, mientras que el 15 % restante son células gliales en su mayoría astrocitos fibrosos y terminaciones nerviosas^{27,73}.

Por otro lado, en los mamíferos la GP contiene altas concentraciones Cu^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+} en comparación con otras regiones del cerebro, esto se debe, a su relación con las enzimas contenidas en la GP y a su asociación con pigmentos y concentraciones conocidas como depósitos calcáreos¹⁰⁹.

Alrededor del 3-10% del peso de la GP esta constituida por lípidos y más del 50% de estos son fosfolípidos³⁰. En animales expuestos a la luz continua disminuye notablemente la cantidad de lípidos, efecto que es bloqueado al seccionar los nervios ópticos, lo que demuestra la regulación circadiana del funcionamiento de la GP¹².

También, se ha observado la presencia de algunos carbohidratos como el ácido neuramínico y el ácido siálico, los cuales forman parte de lípidos, polisacáridos y mucoproteínas localizadas en el glucocalix de la membrana celular⁷⁵.

Con relación a los aminoácidos (aa), su importancia radica en las concentraciones, sobretodo de aquellos aa susceptibles de donar un grupo metilo requerido en la biosíntesis de



la MEL y principalmente la presencia de una gran cantidad de triptófano que es captado por el pinealocito^{20,75}.

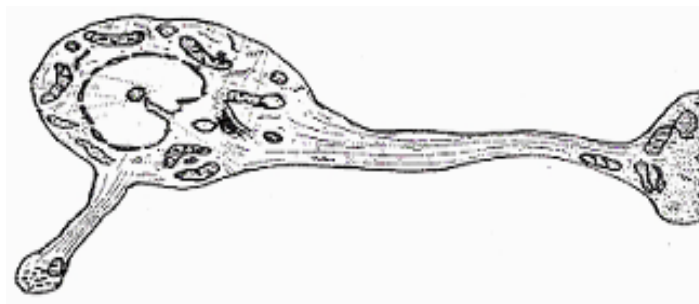


Fig. 3. Representación esquemática del pinealocito. En este tipo de células se lleva a cabo la síntesis de la MEL a partir del aminoácido triptófano²⁶.

Dentro de este pinealocito se lleva a cabo la síntesis de MEL y de otras sustancias biológicamente activas presentes en la GP, tales como los indoles; dentro de estos tenemos a los metoxi-indoles como el 5-ácido hidroxindol-3-acético, 5-hidroxitriptofol o 5-metoxitriptofol y la serotonina (5-HT); en donde la MEL es la hormona más estudiada³⁵. Así mismo, en la GP se ha observado la presencia de péptidos tales como adrenalina, histamina, dopamina, octopamina y somatostatina, así como péptidos de bajo peso molecular como la arginina vasotocina (AVT) y proteínas del tipo de la sustancia inhibidora de las gonadotropinas (GIS)^{32,49}.

1.4 Regulación circadiana

La síntesis de las sustancias biológicamente activas y en general la función metabólica de la GP, se ajustan a un ritmo circadiano, por medio de este mecanismo, la GP proporciona el sistema neuroendócrino, es por ello que la GP de mamíferos y de muchas aves muestran una variación rítmica en la producción de serotonina y MEL, dependiendo de la variación diurna y de la oscuridad nocturna; a estas fluctuaciones se le denominan *ritmos circadianos pineales*⁷².



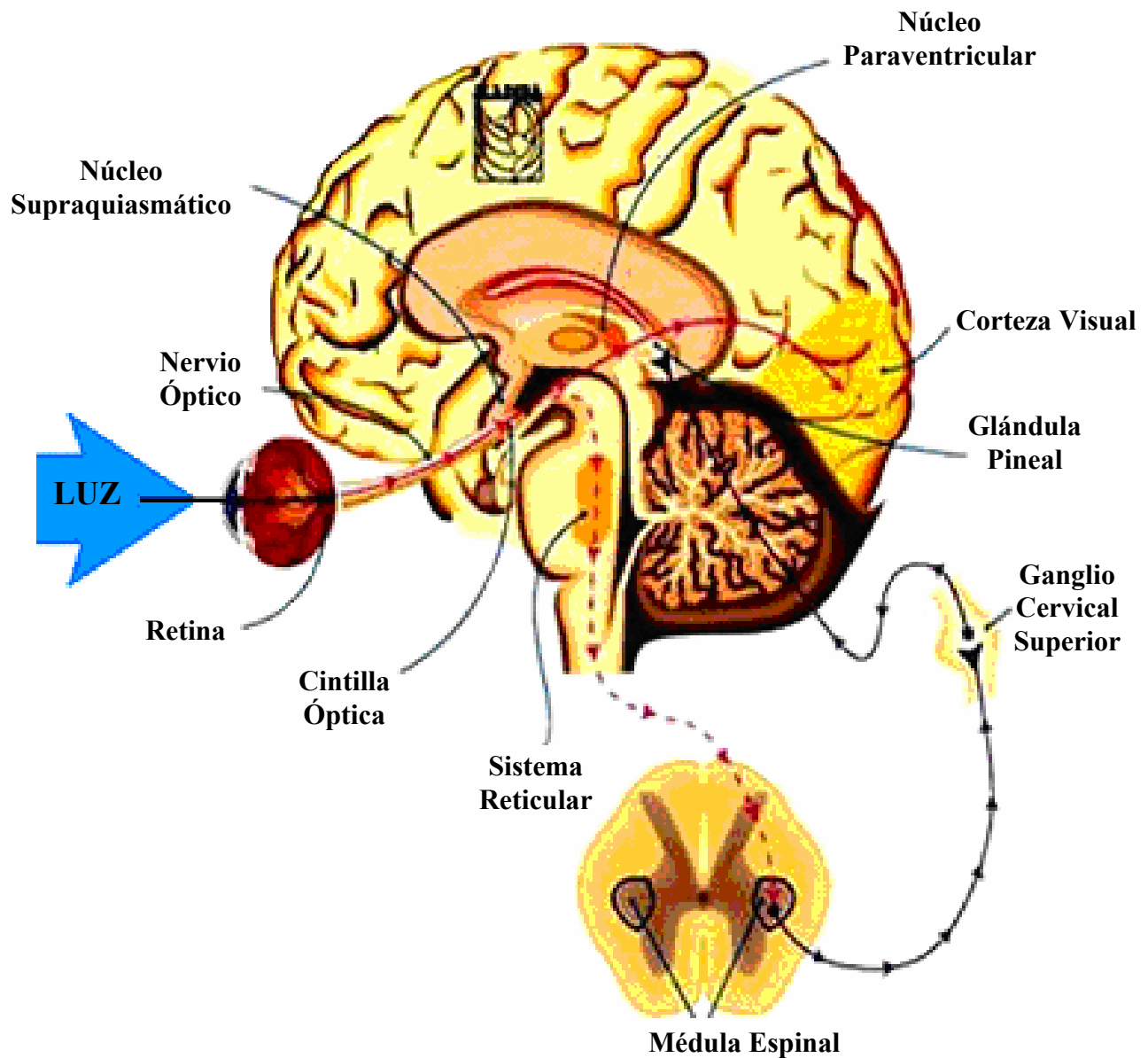


Fig. 4. Diagrama de las vías neurales que conectan la GP con la entrada de luz al organismo. Es una vía polisináptica que se inicia en la retina, pasa por el núcleo supraquiasmático (NSQ), núcleo paraventricular (NPV) y al ganglio simpático cervical superior (GSCS) antes de llevar la información a la GP¹⁰⁷.

Con base a lo anterior, se planteó que la función de la luz sobre los ritmos *circadianos pineales*, se ejerce a través de su innervación simpática, que proviene de los GSCS. La resección bilateral de este ganglio o la sección de sus fibras preganglionares del cordón

simpático provoca la desaparición de estos ritmos biológicos^{92, 106}. La vía nerviosa por la cual el efecto de la luz sobre la retina se trasmite al ganglio esta dado a través del haz retinohipotalámico, el cual lleva la señal luminosa al núcleo supraquiasmático⁶³, al hipotálamo lateral, a la formación reticular y a células de asta intermediolateral de la parte superior de la médula dorsal, donde se encuentran neuronas preganglionares que llegan GSCS (Fig. 4)^{22,33,107}.

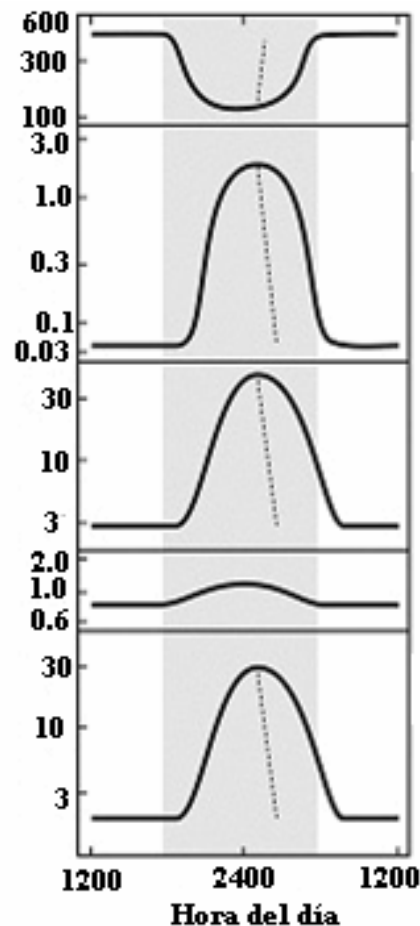
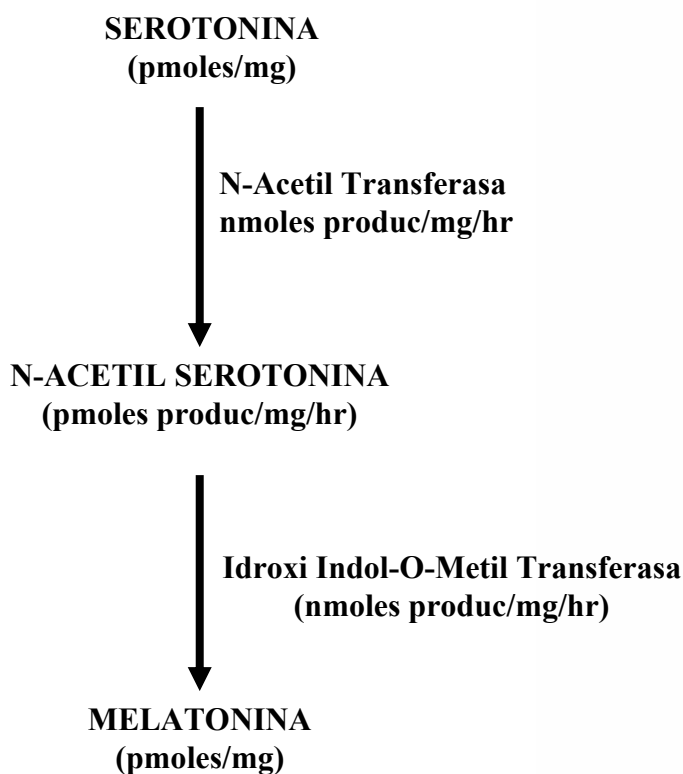


Fig. 5. Variación de la concentración de las enzimas de la GP por el ciclo luz-oscuridad⁵⁸

Tomando en cuenta el papel de la luz en la regulación de la GP, se observó, en animales de mayor actividad nocturna como en aquellos de mayor actividad diurna, que la concentración máxima de serotonina en la GP se presenta al mediodía y es mínima a media noche, además existe un ritmo inverso en cuanto a la producción de la MEL. Estos ritmos



circadianos están relacionados con las variaciones de la actividad de la enzima N-Acetiltransferasa (NAT) en la GP. Al disminuir la actividad de esta enzima, aumenta la concentración glandular de serotonina y disminuye la producción de MEL, mientras que al aumentar la actividad de la NAT la producción de MEL también aumenta (**Fig. 5**)^{1,58}.

1.4 Fisiología

En peces anfibios y reptiles, la GP posee terminaciones fotorreceptoras semejantes a los conos de la retina excitados por la luz y capaces de discriminar longitudes de onda, que dan así origen al estímulo nervioso. Por lo tanto, se ha considerado importante el papel de la GP en las respuestas fotoadaptativas de peces y anfibios. La piel de renacuajos de muchas especies de anfibios se “aclara” cuando se expone a la oscuridad a causa de la retracción del pigmento en los melanóforos, fenómeno que desaparece si se destruye por completo la región pineal. Los extractos pineales y la MEL en dosis muy bajas provocan en los renacuajos una reacción semejante; por estas razones, se piensa que esta “reacción de blanqueamiento” se debe al efecto producido por la MEL^{10,49}.

También se ha observado que la GP interviene en la regulación de los folículos pilosos en ratones y ratas, en estos animales el pelo crece en ondas que van cubriendo la piel, después de que tuvo lugar una onda, los folículos pilosos quedan en reposo hasta que se establece una nueva onda. En ratones pinealectomizados la onda pilosa se acelera, sin embargo, la administración de la MEL la retarda⁴⁹.

Por otro lado, existe una conexión importante entre la GP y la reproducción, en el hámster dorado se presenta un efecto antigonadotrópico marcado; en ratas y ratones pinealectomizados hay un incremento en el tamaño de ovarios y testículos, esto puede observarse con la realización de un frotis vaginal donde se observa un incremento en la



frecuencia de la fase del estro en las hembras y en los machos se presenta hipertrofia de próstata y vesículas seminales. De dos a tres semanas posPx el peso y tamaño de las gónadas se normaliza y pueden atrofiarse posteriormente. La Px no solo afecta el peso de las gónadas, sino también el de la tiroides, las suprarrenales y el timo ^{49,61, 88}.

La actividad reproductiva de muchas especies de mamíferos está relacionada con el fotoperiodo por lo que la cantidad de luz de acuerdo a las estaciones del año han permitido clasificar a los mamíferos en reproductores de días largos (como el hámster y hurón) y reproductores de días cortos (como el ciervo o la oveja), según sus gónadas sean activadas por el aumento o por la disminución de la duración del fotoperiodo²⁷.

En relación a la participación de la GP en la reproducción humana, los efectos son contradictorios, sin embargo, desde hace más de sesenta años se sabe que ciertos tumores de la pineal producen pubertad precoz; sin embargo, en algunos casos ocurre el efecto contrario, es decir, retraso puberal o efecto antigonadotrópico. Kitay y Altsschule⁵⁷ aclararon este fenómeno; así comprobaron que los tumores de tejidos de sostén (gliomas) o de tejidos extraños (teratomas) que inhiben a la pineal por compresión ocasionan pubertad precoz, mientras que los pinealomas parenquimatosos producen pubertad retardada por incremento de la función pineal⁴⁹.

La GP también puede ser el sitio de tumores de células pineales (penealomas) o tumores de células germinales (germinomas)⁴¹. Los signos y síntomas neurológicos son las manifestaciones clínicas predominantes como hipertensión intracraneal, anomalías visuales ataxia y síndrome de Parinaud, el cual consiste en parálisis conjugada de la mirada hacia arriba ³².



2.0 MELATONINA

2.1. Antecedentes Históricos

La melatonina (MEL) fue descubierta por McCord y Allen en 1917⁷⁴, pero hasta 1958 Lerner y cols., la identificaron como tal a través de los extractos pineales obtenidos de bovinos y estructuralmente la denominaron N-acetil-5-metoxitriptamina (**Fig. 6**)⁶⁰; el nombre que se le asigna a esta hormona se le atribuye por provocar una aclaración en la piel de renacuajos, es decir, promueve la agregación de gránulos de melanina en las células de melanóforos cutáneas en estos anfibios^{10,27}.

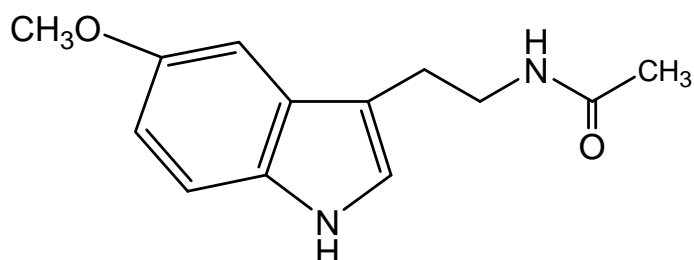


Fig. 6. Estructura química de la MEL (N-acetil-5-metoxitriptamina)⁴⁴.

La MEL es una neurohormona altamente lipofílica producida por los pinealocitos de la GP, regula cambios estacionales en varios aspectos de la fisiología de especies fotoperiódicas y actúa sobre receptores específicos en el núcleo supraquiasmático (NSQ)⁶⁴ del hipotálamo¹⁰. En vertebrados la MEL además de producirse en la GP, también se sintetiza en retina⁵¹, medula espinal²⁸, tracto gastrointestinal y bilis⁶. Además se ha observado la presencia de esta en bacterias, protozoarios, plantas e invertebrados⁴⁴.

Actualmente, el estudio de esta hormona es de gran interés, debido a que se ha encontrado en varias investigaciones científicas que tiene diversas funciones fisiológicas, sin embargo, aún no se encuentra bien dilucidado su mecanismo de acción, por lo que éste sigue siendo sujeto de estudio.



2.2 Biosíntesis

La producción de MEL endógena a través del aa triptófano es principalmente nocturna (escotofase), y es controlada por la exposición a los ciclos de luz-oscuridad. Por lo tanto, la síntesis de MEL es inhibida por la exposición a la luz (fotofase); mientras que su producción es estimulada durante los periodos de oscuridad a través de las conexiones multisinápticas neurales del la GP con el ambiente externo vía retinal¹⁰.

De esta manera, la MEL se sintetiza en las células parenquimatosas pineales que captan el triptófano de la circulación; en donde es oxidado a 5-hidoxitriptófano por acción de la enzima triptófano-hidroxilasa, reacción que requiere la presencia de oxígeno, hierro y pteridina reducida. En seguida el 5-hidoxitriptófano es descarboxilado a 5-HT por acción de la enzima 5-hidoxitriptófano descarboxilasa ^{73, 98}.

Posteriormente, la 5-HT es convertida en MEL mediante dos reacciones enzimáticas. En primer lugar, es acetilada a N-Acetil-serotonina por acción de la N-acetil-transferasa (NAT) reacción que constituye el paso limitante en la síntesis de la MEL¹; a continuación, la N-acetil-serotonina es metilada en la posición 5-hidroxi por la acción catalítica de la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) para formar a la N-acetil-5-metoxitriptamina o MEL⁹⁸. La primera enzima se encuentra en varios tejidos y órganos, en tanto que la segunda solo se ha detectado en retina, glándula de Harder y GP¹. Más del 90% de la 5-HT producida fuera de la GP se metaboliza mediante desaminación oxidativa por acción de la monoaminoxidasa (MAO), que la convierte en 5-hidroxitriptofol y ácido 5-hidroxi-indol-acético (**Fig. 7**) ^{10, 27, 32}.

La síntesis y la secreción de la MEL por la GP dependen de la estimulación adrenérgica que llega a la glándula mediante el nervio conari⁷³. La noradrenalina actúa uniéndose a receptores β adrenérgicos situados en la membrana plasmática de los pinealocitos, lo que da



como resultado la activación de una proteína cinasa A (PKA) dependiente de AMPc, que desencadena una cascada de fosforilación de proteínas específicas que incrementan la síntesis de la enzima NAT^{27,45}.

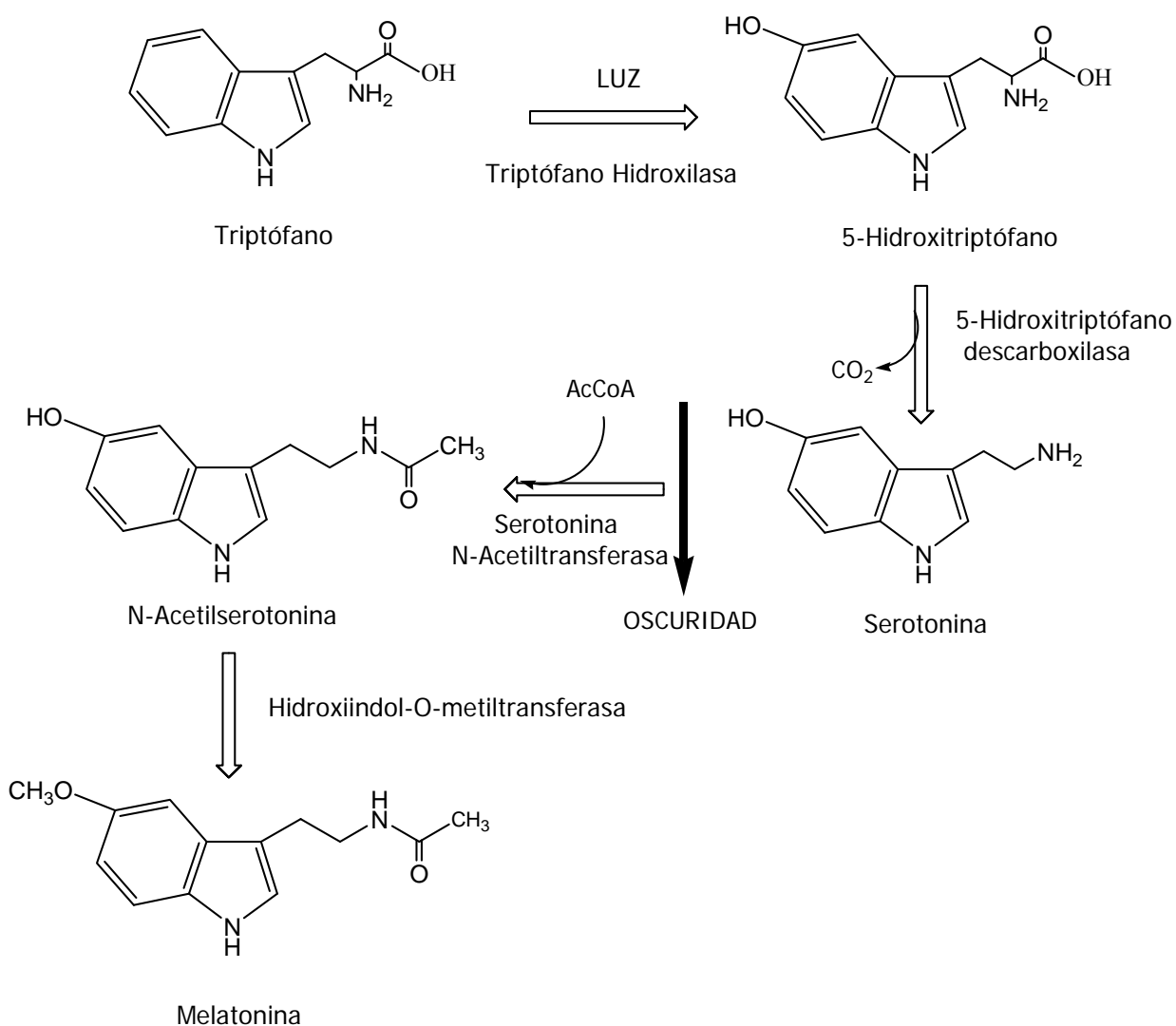


Fig. 7. Secuencia de reacciones involucradas en la biosíntesis de MEL⁷².

La MEL producida por la GP ingresa a plasma por un mecanismo de difusión simple¹⁰⁴, cerca del 75% de esta hormona se encuentra ligada a proteínas plasmáticas tales como la albúmina⁸² y la alfa-glicoproteína⁷⁷, mientras que el 25% restante representa la fracción libre. Las concentraciones de la MEL varían de 50 ng por la mañana a 400ng/g por la noche y en



plasma oscilan entre 10-70 pg/mL^{4, 31}, su tiempo de vida media después de una administración oral es de 30 minutos⁷³

2.3. Metabolismo

La MEL es principalmente metabolizada en hígado; en humanos y roedores es inactivada por una hidroxilación en la posición 6 a 6-hidroximelatonina, la cual carece de actividad biológica⁴⁶ posteriormente es conjugada con ácido glucurónico y sulfato para ser excretada en orina y heces (Fig. 8)²⁴.

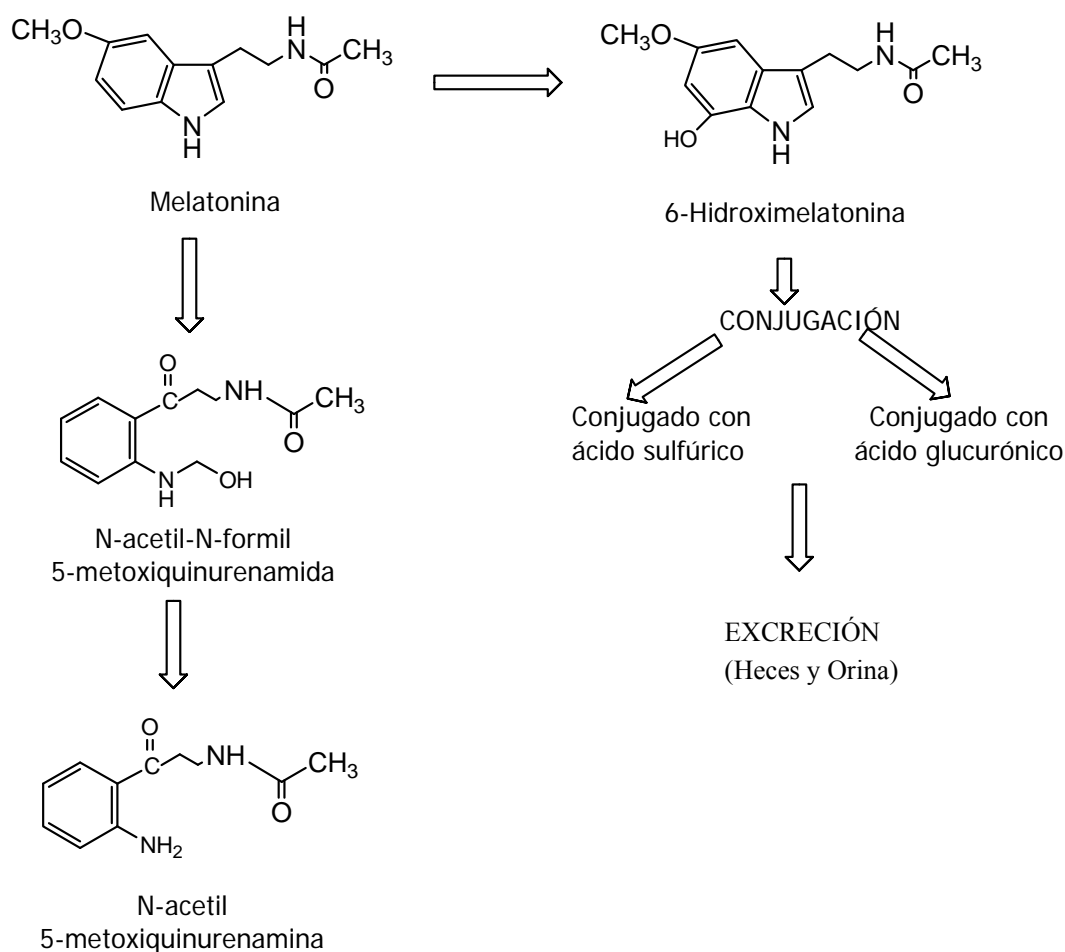


Fig.8. Metabolismo de la MEL. El hígado es el principal órgano que metaboliza a la MEL en sustancias que son fácilmente excretadas por las heces y la orina⁴³.



Del 70 al 80% de la MEL se encuentran como sulfatos en orina, mientras el 5% se encuentra como glucurónidos, 15% como N-acetil-5 metoxiquinurenamida, 0.5% como ácido 5-metoxi-indol-acético y menos del 1% inalterado²¹.

2.4. Receptores a Melatonina

La MEL actúa a través de receptores, que involucran numerosos procesos fisiológicos tales como: el ritmo circadiano, regulación de la presión arterial, oncogénesis, fisiología retinal, reproducción estacional y más recientemente en inducir la diferenciación de osteoblastos¹⁰⁸

En base a lo anterior, en mamíferos se han descrito la presencia de dos tipos diferentes de receptores a MEL, los MT1 y MT2 que fueron identificados a través del uso de radioligandos [³H]-melatonina y 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina, lo que condujo a su localización y caracterización de los sitios de unión en las membranas celulares principalmente el NSQ, el par tuberalis de la glándula pituitaria, la retina y el cerebro^{34 53,72}. Recientemente, se ha identificado un tercer tipo de receptores a MEL, los MT3 que parecen pertenecer a la familia de quinonas reductasas¹⁰⁸

Para el caso de los dos primeros tipos de receptores se han propuestos mecanismos de acción diferentes; el receptor MT1 se caracteriza por ser un receptor de alta afinidad a MEL⁶ y pertenecer a la familia de receptores acoplados a proteína G⁸⁶, su activación resulta en la inhibición de la adenilato ciclasa y en consecuencia en la disminución de los niveles de AMPc. Este tipo de receptores a MEL han sido relacionados con las funciones renales, inducción del sueño, ritmos circadianos, en la reproducción y la contracción cardiovascular^{90, 100, 26}.

En cambio, los receptores MT2 se caracterizan por una baja afinidad a MEL y pertenecen a los receptores que activan la hidrólisis de fosfoinositol vía proteína G, su



localización presenta dificultades y por tanto es difícil de predecir sus funciones biológicas, sin embargo, han sido asociados con la fisiología retinal, modulación del ritmo circadiano, la dilatación cardiovascular y en las respuestas inflamatorias de la microcirculación. Ambos tipos de receptores (MT1 y MT2) son dependientes de GTP^{34, 108}.

La diversidad de respuestas de la MEL en el organismo se le atribuye a la expresión de receptores en una variedad de tejidos. En humanos los receptores MT1 y MT2, han sido principalmente estudiados a nivel de cerebro, se expresan en los núcleos supraquiasmáticos, cerebelo, corteza, hipocampo, hipotálamo y en las arterias cerebrales. MT1 se expresa en retina, tejido adiposo y riñón, mientras que MT2 solo se expresa en tejido adiposo y riñón^{10, 45}.

En relación al receptor MT3, se ha observado que presenta un 95% de homología a la quinona reductasa humana, enzima que esta involucrada en la detoxificación. La actividad de este receptor se estudió a través de unión a radioligandos y ensayos enzimáticos, observándose su expresión en hígado, riñón, cerebro, corazón, tejido adiposo, músculo esquelético, pulmón, intestino y bazo de hámster, ratón, perro y mono. Recientemente se le ha asociado a la regulación de la presión intraocular en cobayos y en las respuestas inflamatorias en la microvasculatura⁸⁰.

2.5. Funciones Fisiológicas

En la actualidad la MEL está relacionada con varias funciones fisiológicas, sin embargo, aún no se ha definido totalmente el mecanismo por el cual los lleva a cabo.

En humanos los primeros efectos reportados corresponden a efectos sedativos e hipnóticos, pues se ha observado que con la administración de MEL a una dosis única de 0.3-5 mg se pueden presentar efectos sedante e hipnótico, esto puede deberse a través de la potenciación del ácido gamma-aminobutírico (GABA) vía interacción directa con los



receptores GABA¹⁰⁵. Investigaciones recientes indican que la MEL ejerce la acción de la promoción del sueño por la aceleración del sueño inicial, mejorando el mantenimiento del sueño y la sincronización del reloj circadiano, es por ello, que la MEL puede ser usada como tratamiento para el insomnio^{35, 38}. También se ha observado que la MEL puede disminuir el “jet-lag”, en personas que realizan viajes transatlánticos y se exponen a un cambio de fase rápido en su ciclo ambiental y en consecuencia pueden padecer diversos trastornos conocidos en conjunto como “jet lag”²⁵.

Por otro lado, existen muchas investigaciones que relacionan a la MEL con la modulación del sistema inmune, observándose que presenta varios efectos inmunomoduladores. Se ha encontrado que vía los receptores a MEL es posible estimular la producción de citocinas por los linfocitos T helper 1 (T_{h1}), interleucina 2 (IL2) e interferón gamma. La MEL también puede potenciar las propiedades inmunoestimuladora de la IL-2 por aumento de los linfocitos T, células natural killer y eosinófilos^{62, 63, 69}.

Así mismo, la MEL se ha relacionado con propiedades antioxidantes; sabemos que los radicales libres del oxígeno son agentes altamente reactivos que se producen durante el metabolismo normal de las células y pueden interactuar con el ácido desoxirribonucleico (ADN), las proteínas y lípidos, induciendo reacciones de peroxidación que pueden dañar algunos componentes celulares. Las células poseen enzimas que actúan como mecanismos de defensa contra los radicales libres, así como algunos componentes de la dieta (ácido ascórbico y la vitamina E) pueden actuar como antioxidantes. En varias investigaciones se ha observado que la MEL es un buen antioxidante, debido que puede inactivar las especies reactivas de oxígeno (ROS), incluyendo radicales hidroxilo, peroxilo y óxido nítrico⁸⁴. También, estimula a las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa.



Además, comparado con otros antioxidantes como el glutatión (GHS), la vitamina E y el ácido ascórbico, la MEL parece tener mayor eficacia protegiendo a las células frente al estrés oxidativo^{15, 43, 83, 95}.

Las investigaciones también indican, que la MEL presenta propiedades anti-inflamatorias a través de la regulación de las citocinas proinflamatorias y la inhibición del óxido nítrico⁸⁹, además la MEL puede proteger a la mucosa gástrica contra ulceraciones por el consumo de etanol¹⁸. Posee propiedades anticonvulsivas las cuales se han estudiado en mandriles, ratones, gerbil de Mongolia y humanos, se piensa que esta propiedad se debe a la alteración de la neurotransmisión de GABA. Recientemente, se le ha adjudicado a la MEL un efecto ansiolítico a dosis de 1.0 y 2.0 mg/Kg en ratas, lo que permite sugerir que ésta aumenta la actividad ansiolítica de las BZPs⁷⁸.

Otro de los efectos estudiados sobre la MEL es el de antiproliferativo, debido a que se ha observado, que inhibe el crecimiento de células cancerosas “In Vitro” en la línea celular MCF-7²⁹ de cáncer de mama humano y en modelos animales (por ejemplo, en hematoma de rata 7288CTC). Se sugiere que la MEL inhibe la división celular mitótica durante la metafase⁸, la diferenciación de células cancerígenas y la disminución de la actividad metastásica de cierto tipo de células cancerígenas a través cambios en la adhesión de la superficie y la comunicación intracelular. La MEL también induce directamente apoptosis en algunas células cancerígenas¹¹.

Por otro lado, en estudios electrofisiológicos se ha reportado que la MEL puede regular la actividad eléctrica de neuronas hipocampales al alterar la transmisión sináptica entre neuronas de esta región, por lo que ha sido implicada en la plasticidad sináptica neuronal¹⁰⁶.



3. ACIDO GAMMA AMINOBUTÍRICO (GABA)

3.1 Antecedentes históricos

El ácido gamma-aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitor del Sistema Nervioso Central (SNC) de mamíferos y desempeña un papel fundamental en la modulación de la actividad neuronal; se identificó como componente químico único del encéfalo en 1950 (Fig. 9), pero no se reconoció de inmediato su potencia como depresor del SNC⁴⁰.

Se cuenta con un gran número de datos que el GABA media las acciones inhibitoras de las interneuronas locales en el encéfalo y que puede mediar también la inhibición presináptica dentro de la médula espinal. Se han demostrado sinapsis inhibitoras GABAérgicas presuncionales con mayor claridad entre las neuronas cerebelosas de Purkinge y sus blancos en el núcleo de Deiter; también entre las neuronas pequeñas y las células mayores emisoras de impulsos de la corteza cerebelosa, el bulbo olfatorio, el hipocampo y el núcleo del tabiqué lateral¹⁰².

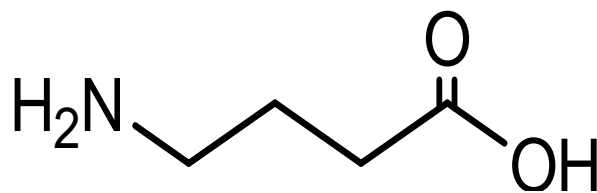


Fig. 9 Estructura química del ácido gamma-aminobutírico (GABA)⁴⁰

3.2. Biosíntesis y Metabolismo

El GABA se sintetiza en la terminación axonal utilizando una vía alternativa del ciclo del ácido cítrico o Krebs. La glucosa es captada por el axón y en el proceso glucolítico se produce ácido pirúvico. EL piruvato es sustrato de la acetilcoenzima A mitocondrial, iniciando



así el ciclo de Krebs. Reacciones enzimáticas encadenadas van produciendo ácido oxalacético y alfa-cetoglutarato que por transaminación produce ácido glutámico que sale del ciclo por una vía colateral alternativa. El ácido glutámico se descarboxila por acción de la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD) y forma al GABA, en tanto que el ciclo de Krebs continua en la mitocondria. Una vez formado el GABA se almacena en vesículas sinápticas de forma semejante a los neurotransmisores amínicos de donde se libera al espacio interplasmático por un proceso de exocitosis^{102, 112}.

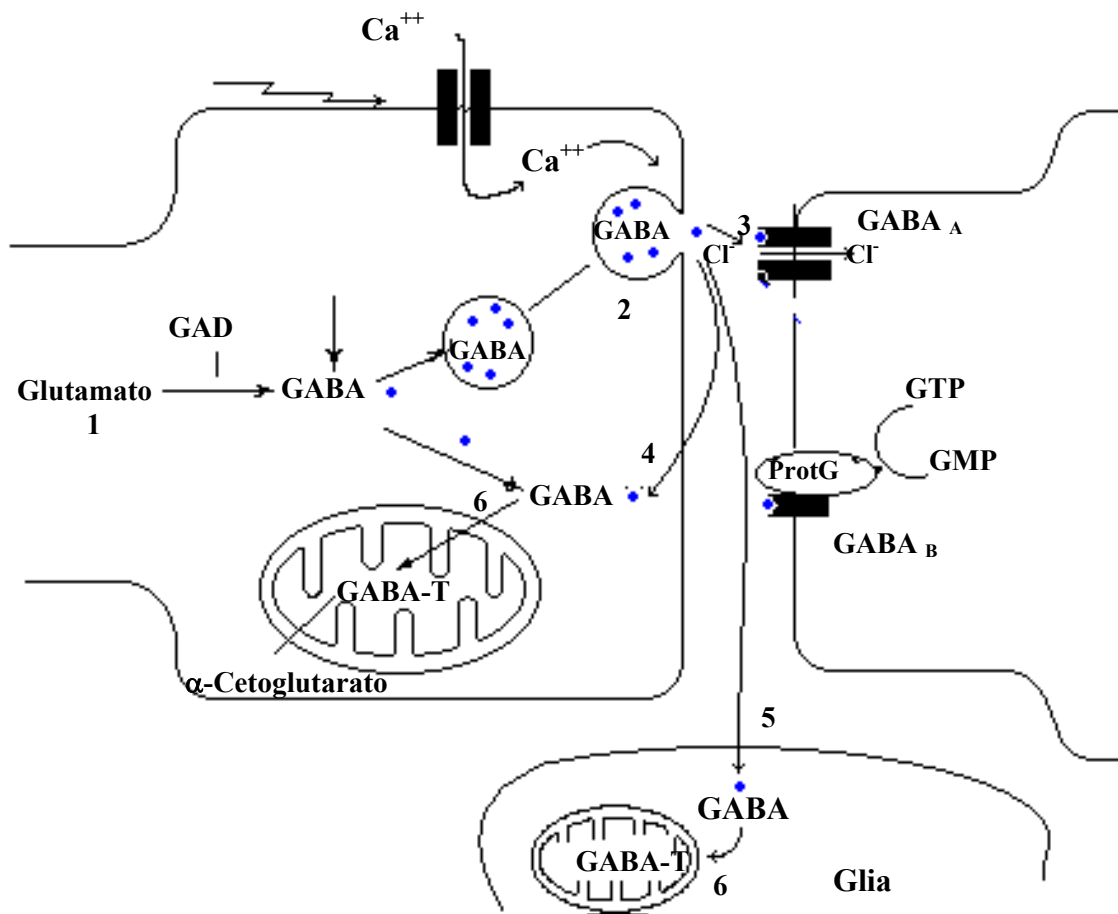


Fig.10. Síntesis y Metabolismo del GABA¹¹². 1) Descarboxilación del glutamato por la enzima GAD para formar el GABA; 2) Liberación del GABA a la neurona postsináptica, 3) Interacción del GABA con su receptor, 4) Recaptura del GABA por células presinápticas, 5) Recaptura del GABA por células gliales. 6) Metabolismo del GABA por la enzima GABA-T.

EL GABA liberado al espacio interplasmático interacciona con receptores específicos de la membrana neuronal postsináptica. Luego de interaccionar con el receptor, la mayor parte de las moléculas de GABA sufre un proceso de recaptación activa en las terminales GABAérgicas y gliales (recaptación axonal y glial). EL GABA que es recaptado por las terminaciones nerviosas puede ser reutilizado incorporándose a las vesículas sinápticas o ser metabolizado por la enzima GABA transaminasa (GABA-T) este mecanismo lo transforma en ácido succínico semialdehído (ASS), el cual sufre una oxidación por medio de la enzima succinilsemialdehído deshidrogenasa (SSDH) y se transforma en ácido succínico que en la mitocondria reingresa al ciclo de Krebs, contribuyendo a la síntesis del nuevo neurotransmisor (Fig. 10)⁸⁷.

3.3 Receptores a GABA

En la actualidad se han identificado por lo menos tres tipos de receptores diferentes a GABA: el receptor GABA_A (ionotrópico), que esta asociado directamente con un canal de cloro y predomina a nivel cerebral, cuando se activa este receptor se desencadena efectos inhibidores por hiperpolarización a través de la apertura de canales de cloro (Cl⁻) y aumento de la conductancia a este ion, lo que provoca una inhibición de la sensibilidad de la neurona a la excitación (Fig. 11)⁵⁴.

El receptor GABA_B (metabotrópico)⁸¹ es un miembro de la familia de receptores acoplados a proteína G, también es inhibidor pero predomina a nivel espinal y es preferentemente presináptico; puede modificar los niveles de 3'-5'AMPcíclico y aumentar la permeabilidad al potasio (K⁺) o disminuir la permeabilidad al calcio (Ca²⁺)⁵⁶. Recientemente, se ha propuesto un tercer tipo de receptor denominado GABA_C (ionotrópico) que esta también asociados a un canal de Cl⁻ y se relacionan estructuralmente con los receptores GABA_A, sin



embargo, es insensible al efecto de la bicuculina y al efecto modulador de benzodiazepinas (BZP), barbitúricos y alcoholes^{13,23}.

Por su parte, el receptor GABA_A postsináptico es el más importante por su amplia distribución, tiene una estructura pentamérica⁶⁷ análoga al receptor nicotínico, que puede estar formada por algunas de las seis subunidades caracterizadas hasta el momento (α , β , γ , ϵ y ρ). Posee un sitio receptor específico para el GABA (subunidad α y β), un sitio receptor o aceptor para BZP (α) y un ionóforo de cloro (canal de Cl⁻); además contiene otros lugares de unión para una gran variedad de ligandos como barbitúricos, esteroides, alcoholes y diversos agentes relacionados con las convulsiones⁸⁷.

BENZODIAZEPINAS

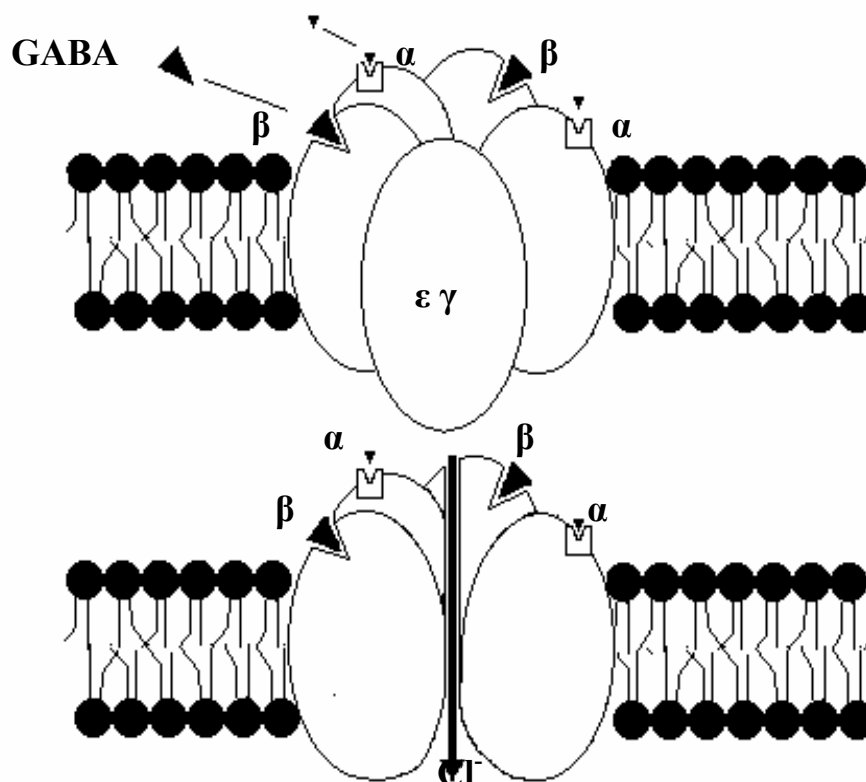


Fig. 11. Estructura del receptor GABA_A¹¹².



4. BENZODIAZEPINAS

4.1. Antecedentes Históricos

Las benzodiazepinas (BZP) fueron sintetizadas en 1957 por el químico polaco Sternbach en los laboratorios Hoffman-La-Roche y su perfil farmacodinámico fue establecido por Randall. En el año de 1961 se introdujeron en el mercado farmacéutico el clordiazepóxido (CDP) y en 1963, el diazepam (DIAZ). A partir de entonces se han sintetizado más de 3000 compuestos^{102, 103}.

La estructura básica de las BZPs consiste en un anillo de siete miembros (núcleo benzodiazepínico), unido a un anillo aromático con cuatro grupos fundamentales, en las que pueden hacerse sustituciones sin pérdida de la actividad. Desde el punto de vista clínico, las diferencias de comportamiento farmacocinética de las distintas BZPs son más importantes que las relacionadas con su perfil de actividad (Fig. 12)⁸⁷.

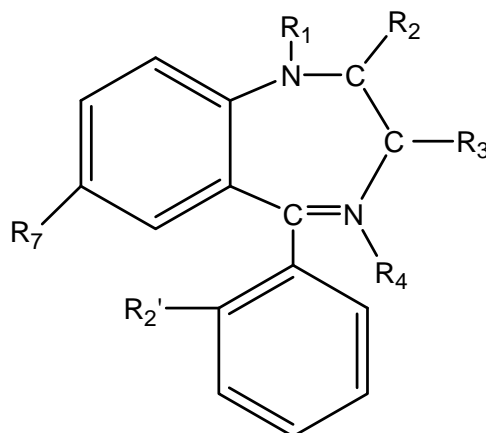


Fig. 12 Estructura general de las benzodiazepinas⁴⁰

4.2 Farmacocinética

Las BZPs son sustancias liposolubles, atraviesan BH (alcanzan el tejido cerebral) y se acumulan en tejido adiposo. Se absorben por completo y con rapidez tras la administración



oral distribuyéndose en todo el organismo, el tiempo que tardan en alcanzar las concentraciones máximas oscila entre 30 minutos y 6 horas¹⁰³.

La vida media de las BZPs tiene gran importancia, debido a que la duración de su acción puede determinar su utilidad clínica, de esta manera, una forma general de clasificarlas es en: grupos de acción ultracorta, corta, intermedia y prolongada¹⁰². Las BZPs son principalmente metabolizadas por el sistema microsomal hepático, en donde pueden ser varias las reacciones de biotransformación que tiene lugar como: oxidación, N-desmetilación, desalquilación, hidroxilación y posterior conjugación con ácido glucurónico para ser eliminadas por el riñón. Una de las particularidades de la biotransformación de las BZPs es que la mayoría de ellas originan metabolitos activos^{40, 87, 102}.

4.3 Mecanismo de Acción

Las BZPs son agentes depresores del SNC con efecto selectivo sobre algunas estructuras del sistema límbico, como el hipocampo, en donde se han encontrado a partir de estudios electrofisiológicos sitios de unión a BZPs en la región CA1 del hipocampo¹¹⁰. Actúan de manera selectiva sobre el receptor del ácido gamma aminobutírico (GABA_A) que interviene en la transmisión sináptica de todo el SNC. Las BZPs potencian la respuesta al GABA, facilitando la apertura de los canales de Cl⁻. Se une de manera específica al lugar regulador del receptor, que es distinto al lugar de unión del GABA; y actúa de forma alostérica, produciendo un aumento de la facilidad del GABA por su receptor. Se sabe que en muchos tejidos existen lugares periféricos de unión a benzodiazepinas que no se relacionan con los receptores a GABA, sin embargo, se desconocen sus funciones y significado farmacológico^{14, 19, 79}.



4.4. Efectos Farmacológicos y Aplicaciones

Los principales efectos Farmacológicos que actualmente se conocen acerca de las BZPs están relacionados con la reducción de la ansiedad, en dosis bajas presentan propiedades ansiolíticas al inhibir en forma selectiva ciertos circuitos del sistema límbico en el cerebro⁴⁰

Por otro lado, las BZPs presentan propiedades sedante-hipnóticas, este efecto se relaciona con la reducción de la actividad psicomotora y cognoscitiva; así mismo, tienen acción relajante sobre el músculo esquelético (relajación muscular) debido a que facilitan la acción de las interneuronas inhibitoras en el tronco encefálico y la médula espinal interfiriendo los reflejos mono y polisinápticos. Otros de los efectos de las BPZs, es comportarse como anticonvulsivo y se utilizan para tratar la epilepsia^{102, 103}.

También se sabe que las BZPs eliminan el recuerdo de los acontecimientos que tienen lugar mientras dura su acción, efecto que no se ha observado con otros depresores del SNC. Esto permite practicar intervenciones quirúrgicas, es decir, pueden ser utilizadas como preanestésicos⁸⁷.

Dentro de las BZPs más utilizadas tenemos al Diazepam.

5 DIAZEPAM

5.1. Farmacología

El diazepam (DIAZ, Fig. 13) es una BZP, genera el mismo metabolito activo que el clordiazepóxido y clorazepam. En animales el DIAZ parece actuar en ciertas regiones del sistema límbico, del tálamo y del hipotálamo y su mecanismo de acción está relacionado con los receptores a BZPs⁸⁷.



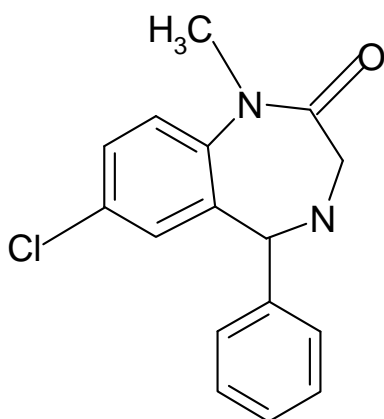


Fig. 13. Estructura química del DIAZ (7-Cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepina-2-ona. [C₁₆H₁₃ClN₂O]⁵⁰.

EL DIAZ y sus metabolitos se unen en un 98 % a proteínas plasmáticas. Atraviesan la BH y placentaria además de encontrarse en la leche materna. La vida media de distribución llega hasta tres horas. Se metaboliza principalmente por el hígado vía el sistema de enzimas del citocromo P₄₅₀ a metabolitos activos como N-desmetildiazepam, temazepam y oxazepam; se secretan principalmente en la orina, predominando sus formas conjugadas. La depuración del DIAZ es de 20-30 ml/min^{101,117}.

5.2. Usos Terapéuticos

El DIAZ se utiliza en el tratamiento de trastornos severos de ansiedad, como hipnótico de corta duración y para el tratamiento del insomnio. También, presenta propiedades como sedante, preanestésico, relajante muscular, anticonvulsivo, tranquilizante, y para el manejo del síndrome de abstinencia por el alcohol, al igual que la mayoría de las BZPs¹¹⁷.

Generalmente el DIAZ se utiliza en combinación con otros fármacos como por ejemplo antipsicóticos, hipnóticos, ansiolíticos/sedantes, antidepresivos, analgésicos narcóticos, antiepilépticos, anestésicos, sedantes y antihistamínicos; pero como todos estos grupos de



fármacos son depresores del SNC se corre el riesgo de incrementar el efecto depresor de ellas en estas interacciones⁸⁷

5.3 Reacciones Adversas y Colaterales

A pesar de que el DIAZ presente diferentes efectos terapéuticos, su administración inicial puede producir reacciones adversas como somnolencia, bloqueo de las emociones, reducción de la agudeza, confusión, fatiga, cefalea, vértigo, debilidad muscular, ataxia y diplopía; las cuales suelen presentarse generalmente al comienzo de la terapia y desaparecen frecuentemente con la administración prolongada. Otros efectos colaterales, tales como trastornos gastrointestinales, disminución de la libido, hipersalivación, dificultades en el lenguaje, hipotensión incontinencia o reacciones cutáneas se presentan en forma ocasional. Todo esto lleva a contraindicar al DIAZ sobretodo en situaciones de hipersensibilidad a BZPs, y a cualquiera de sus excipientes, en insuficiencia respiratoria severa e insuficiencia hepática grave y síndrome de apnea del sueño. Posterior a la administración reiterada durante un periodo prolongado, puede manifestarse una disminución de la respuesta a la acción de las BPZs. Su consumo puede originar dependencia física y psíquica. Este riesgo aumenta en relación directa con la dosis y la duración del tratamiento y el riesgo es mayor en pacientes con antecedentes de alcoholismo o drogadicción^{48 102}.

Por otro lado, cuando hay una sobredosis con DIAZ está se manifiesta con síntomas que van desde somnolencia hasta coma, lo que implica una toxicidad al DIAZ; como tratamiento a ésta, se debe inducir el vómito (dentro de la siguientes hora) si el paciente está consiente, o bien llevar a cabo un lavado gástrico con las vías aéreas protegidas si el paciente está inconsciente. Si no existe alguna ventaja en vaciamiento gástrico deberá administrarse carbón activado para reducir la adsorción^{101,102}.



Como se observa, se ha estudiado el efecto de las sustancias descritas anteriormente con diversas metodologías y con diferentes fines, por lo tanto, en este trabajo se decidió estudiar al hipocampo como modelo de estudio.

6. HIPOCAMPO

6.1 Antecedentes históricos

El concepto de sistema límbico deriva de lóbulo límbico. Este último establecido por Broca en 1978, se refiere a las diversas estructuras de las superficies medial y basal de los hemisferios cerebrales que forman un limbo (límite o anillo) alrededor del tallo cerebral. El lóbulo límbico y todas las estructuras conectadas con él constituyen el sistema límbico, el cual desempeña un papel importante en las funciones viscerales, conducta emocional y memoria. Las estructuras que conforman el sistema límbico incluyen los giros subcallosos, del cíngulo y del parahipocampo, la formación **del hipocampo**, el núcleo amigdalino, los cuerpos mamilares y el núcleo talámico anterior².

En nuestro estudio la estructura que nos interesa del sistema límbico es el hipocampo, el cual fue descrito a fines del siglo XVI por el anatomista Arantino, quien lo caracterizó como una estructura plegada en el piso del cuerno temporal del ventrículo lateral y le asignó el nombre de hipocampo por su similitud con los caballos de mar (del griego *hippo* = caballo, *kamos* = monstruo de mar). Un siglo después se usó el término “*pes hippocampus*” para describir la misma región y dos siglos después los anatomistas la compararon con un cuerno de carnero o los cuernos de la antigua deidad egipcia Ammon, quien tenía la cabeza de carnero, de allí el término cuerno de Ammon. La terminología a través de los años se volvió abundante y a menudo confusa, sin embargo, en la actualidad se maneja en términos generales como hipocampo²



La organización del hipocampo es ideal para el desarrollo de estudios en investigación electrofisiológica y anatómica. Se conoce bastante sobre su organización sináptica y sobre 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 organismos⁴².

6.2 Anatomía

La formación hipocámpica es una invaginación del giro parahipocampal en el cuerno inferior (temporal) del ventrículo lateral y consta de cuatro regiones: el giro dentado, **el propio hipocampo**, complejo subicular (que se divide en subiculum, presubiculum y parasubiculum) y corteza entorrinal. De los cuatro componentes de la formación hipocámpica, el hipocampo es el más grande y el mejor estudiado en los seres humanos. Aparece como una estructura en forma de “C” en cortes coronales, protruye en el cuerno inferior del ventrículo lateral. Además, está muy relacionado con el giro dentado adyacente y juntos determinan una estructura en forma de “S”(Fig. 14)^{2,5,36}.

El hipocampo se divide en cuatro áreas basadas en su arquitectura citológica y conexiones sinápticas denominadas: CA1, CA2, CA3 y CA4 que en conjunto reciben el nombre de asta de Ammon (*Cornu Ammonis*). En la rata, básicamente el hipocampo está constituido por las regiones CA1 y CA3, en tanto que la región CA2 es muy pequeña e indistinguible en varias especies. El área entre el giro dentado y el estrato granuloso de la región CA3 es llamado hilus, las células de estas áreas tiene extensas proyecciones partiendo de CA3 hacia CA1 y posteriormente al giro dentado formando una circunferencia reverberante, es decir, la información recircula a través de esta vía^{5, 42, 114, 115}.



El Asta de Ammon y el giro dentado presentan una corteza trilaminar, así el Asta de Ammon se divide a partir de la superficie ventricular en las siguientes áreas: el estrato molecular (estrato radiado y lacunoso-molecular); el estrato de células piramidales y el estrato oriens. En tanto que el giro dentado está constituido por la capa molecular o superficial, granular intermedia y polimórfica profunda³⁹

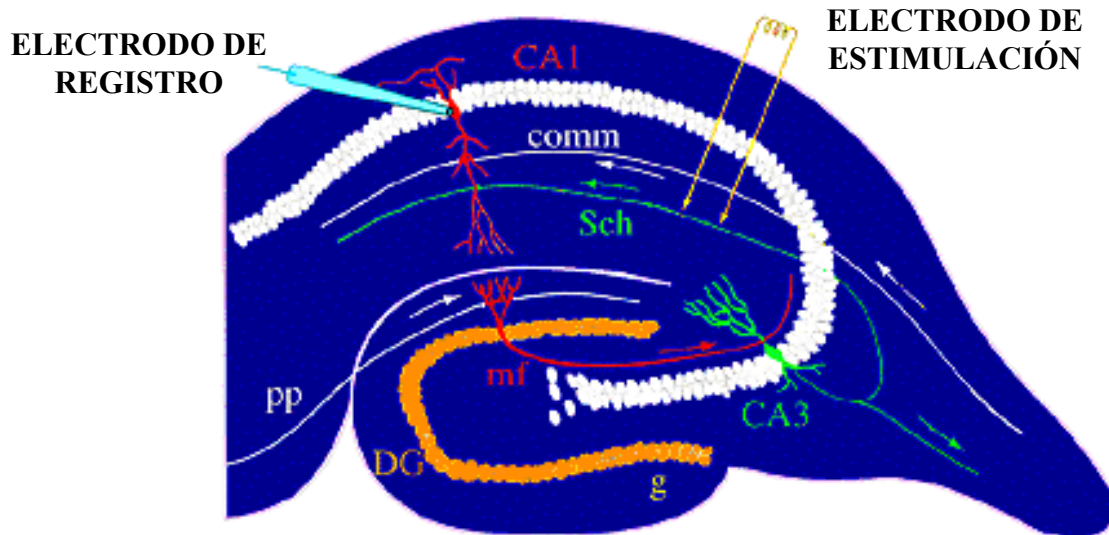


Fig. 14. Elementos neuronales de la formación hipocámpica. Las áreas marcadas incluyen el subiculum, parte de la corteza entorrinal, el giro dentado y las regiones CA1 a CA4. El hipocampo se divide en (1) estrato molecular (estrato radiado y lacunoso-molecular 2) estrato piramidal y 3) estrato *oriens*. Se esquematizan también la forma más comúnmente usada para inducir un potencial sináptico que es aplicando un estímulo en las fibras colaterales de Schaffer a través de un electrodo de estimulación y registrar la actividad eléctrica de una neurona o conjunto de neuronas en la región CA1 a través de un electrodo de registro^{42,9}

6.3 Estructura y Sinapsis Hipocapal.

Las principales células del hipocampo son las neuronas piramidales, sus cuerpos celulares son cónicos (piramidales) de 20-40 μ de base y 40-60 μ de alto, cada una tiene una dendrita apical gruesa de 5-10 μ de diámetro que pasa a través del estrato radiado al estrato lacunoso-molecular, poseen varias dendritas basales con un diámetro de 3-6 μ , las cuales tienen espinas dendríticas¹⁷.



La morfología de las células piramidales varía gradualmente, procediendo desde la región CA3 a la región CA1, el cuerpo de las células se vuelve más pequeño y las dendritas apicales más largas, más delgadas y más regulares en el patrón de sus ramificaciones. Las principales neuronas del giro dentado son las células granulares, sus cuerpos son considerablemente más pequeños que las piramidales, sus dendritas se extienden perpendicularmente desde la capa granular a la capa molecular^{5, 94, 114}.

Por otro lado, las conexiones sinápticas en el hipocampo son generalmente axoespinosas, axodendríticas y en menor proporción axoaxónicas. Los axones de las colaterales de Schaffer de las neuronas piramidales de la región CA3 están parcialmente mielinizadas, de cada nodo emergen de uno a tres axones desmielinizados y se desvían para alinearse paralelos a las fibras de origen, las cuales hacen contacto con espinas dendríticas. Las sinapsis de las colaterales de Schaffer se caracterizan por su membrana asimétrica gruesa y su contenido de vesículas redondas y son generalmente sobre espinas dendríticas^{39, 94}.

Las sinapsis que forman las fibras colaterales de Schaffer sobre las neuronas piramidales de la región CA1 son las más estudiadas en el cerebro de mamíferos, debido a que representa un modelo experimental 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 extracelulares e intracelulares de la plasticidad sináptica^{17, 94}.

La organización funcional de la sinapsis en el hipocampo que forman los axones de las colaterales de Shaffer 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 Shaffer en la región CA1 forman sinapsis con las neuronas piramidales^{5,96}.

En las neuronas piramidales de la región 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 0.5 ms. 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 nerviosa⁶⁸.

6.3 Fisiología

Las complejas relaciones anatómicas del hipocampo sugieren que interviene en varias funciones en las que participan diferentes niveles neurales. Ha sido implicado en funciones sensoriales, en la conducta emocional, en la regulación visceral y endócrina, en los procesos de condicionamiento y aprendizaje, así como en la organización de la memoria¹¹². Se ha observado que participa en los procesos de atención y alerta; la estimulación del hipocampo en animales produce desviación de la mirada y movimientos de búsqueda que se relacionan con confusión y ansiedad².

En relación a la memoria, se ha observado que la ablación bilateral del hipocampo en los seres humanos (por lo general con afección de las regiones adyacentes) produce pérdida de la memoria reciente e incapacidad para almacenar nuevos hechos (amnesia anterógrada), sin embargo, la memoria antigua permanece intacta. La ablación unilateral del hipocampo no



afecta la memoria en grado significativo. Los estudios en seres humanos con lesiones cerebrales indican que el hipocampo es importante para la memoria de acontecimientos, objetos y palabras (memoria declarativa o asociativa)².

7. TRANSMISIÓN SINÁPTICA

En el siglo XIX Cajal y Golgi⁸⁵ fueron los primeros autores en demostrar que las neuronas son la unidad funcional del SNC. 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. Otra extensión nerviosa es el axón el cual es particularmente largo y mantiene su diámetro constante. Considerando la funcionalidad de las neuronas, se han clasificado en sensoriales, interneuronas y motoras^{85,97}.

El conocimiento de la existencia de las neuronas, conllevó a establecer el término sinapsis, el cual fue introducido a partir de este siglo por Charles Sherrington, para describir la zona de contacto especializada en la que una neurona se comunica con otra. Existen diferentes tipos de sinapsis y se dividen en dos clases generales: las sinapsis eléctricas y las sinapsis químicas⁹⁷.

En primer tipo de sinapsis (sinapsis eléctrica) se caracteriza por presentar puentes de intercomunicación desde el citoplasma de las células presinápticas a las postsinápticas; estas sinapsis se denominan uniones en puente o en hendidura y funciona permitiendo que la corriente eléctrica fluya pasivamente a través de los poros de la unión en hendidura desde una neurona hasta otra. La fuente común de corriente es la diferencia de potencial generada



localmente por el potencial de acción. La transmisión puede ser bidireccional; es decir; la corriente puede fluir en cualquier dirección a través de la unión en hendidura. Otra característica importante de la sinapsis eléctrica es que la transmisión es rápida, dado que el flujo pasivo de corriente a través de la unión en hendidura es casi instantáneo^{55,97}.

En cambio, la sinapsis química está formada por neuronas presinápticas y postsinápticas completamente separadas por una hendidura sináptica especializada, permiten la comunicación a través de la secreción del neurotransmisor, en este caso, los agentes químicos liberados por las neuronas presinápticas producen flujo secundario de corriente en las neuronas postsinápticas al activar moléculas receptoras específicas. La secreción de los neurotransmisores es disparada por canales de Ca^{2+} regulados por voltaje, los cuales elevan el Ca^{2+} en el interior de la terminación sináptica, esta elevación en la concentración hace que las vesículas sinápticas se fusionen con la membrana plasmática y liberen su contenido entre las células presinápticas y postsinápticas⁸⁵.

Por otro lado, la comunicación neuronal y su modulación no solo afectan las funciones fisiológicas básicas como son los sistemas vegetativos, sino también funciones psicológicas superiores como el aprendizaje y la memoria. Esto es debido a que el sistema nervioso puede modificar continuamente su estructura y su dinámica para adaptarse a las necesidades del medio natural. Las conexiones sinápticas no son estructuras rígidas sino que pueden crearse, modificarse o destruirse a causa de los patrones de actividad del organismo. En muchas sinapsis una actividad repetida puede conducir no solo a una alteración, a corto plazo, sino a modificaciones que pueden durar horas, días e incluso volverse permanentes. Los dos fenómenos asociados a estos cambios son conocidos como potenciación a largo plazo (LTP) y depresión a largo plazo (LTD)^{87,116}.



Al parecer el LTP es debido a un incremento en la concentración de Ca^{2+} en la célula postsináptica, este incremento conlleva una modificación en el sistema de segundos mensajeros lo cual genera receptores adicionales en la membrana dendrítica con el consecuente incremento de sensibilidad al neurotransmisor que cruza la hendidura sináptica. Por su parte, el LTD parece presentarse en respuesta a un incremento más pequeño de Ca^{2+} en la célula postsináptica lo cual es acompañado por una sensibilidad menor en los receptores de la membrana^{42,70, 71}.

En particular el LTP ha sido estudiado en tejidos del hipocampo con técnicas “In Vitro”, es por ello que, 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” 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) (**Fig. 15**)⁹⁹.

En base a lo planteado anteriormente, en este estudio se pretenden realizar registros extracelulares a través de la estimulación de la región CA1 del hipocampo. Para ello es necesario diferenciar un potencial postsináptico excitador (PPSE) de un potencial postsináptico inhibitorio (PPSI). La estimulación de una neurona presináptica evoca un PPSE en la neurona postsináptica, el cual es una despolarización pequeña no prolongada. En tanto que la estimulación eléctrica presináptica e inhibitoria única que se encuentra en contacto con



una neurona postsináptica única produce PPSI, el cual consiste en la hiperpolarización transitoria de la membrana postsináptica⁹⁷.

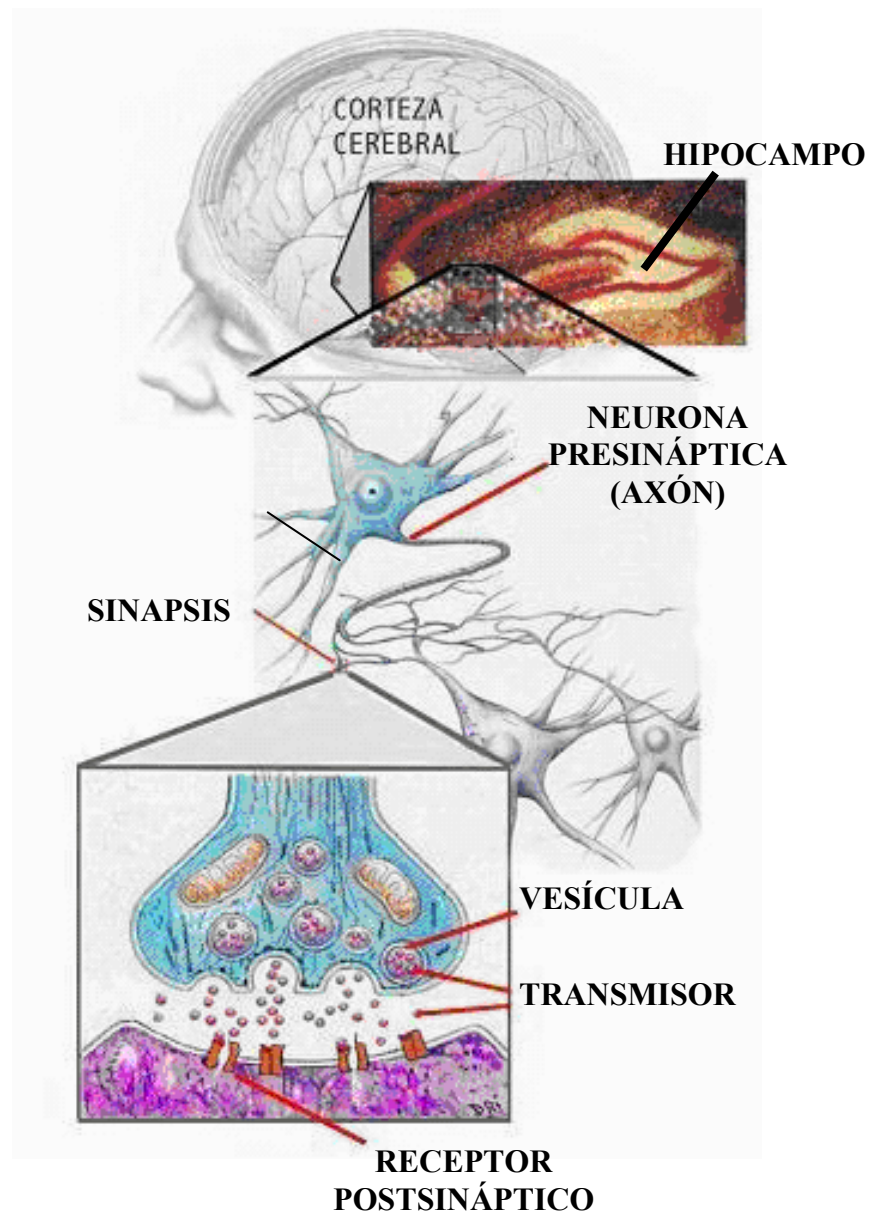


Fig. 15. Sinapsis interneuronal en el hipocampo. Se ilustra una sinapsis interneuronal hipocámpica. En el recuadro mas amplificado se observa que el neurotransmisor se libera desde vesículas presinápticas al espacio sináptico y se une a receptores de la membrana postsináptica, ocasionando la apertura de poros selectivos para ciertos iones¹¹⁸.

Todos estos antecedentes nos llevan a plantear las siguientes hipótesis y objetivos



III.- HIPÓTESIS

- Si la MEL en otros tejidos, como músculo liso produce un efecto bifásico y gradual, entonces se espera que presente este mismo comportamiento sobre la respuesta electrofisiológica en el potencial de campo evocado en la región CA1 del hipocampo.

- EL GABA en músculo liso (duodeno, yeyuno, íleo) produce un efecto bifásico entonces, esperamos que en rebanadas de cerebro (CA1 Hipocampal) produzca el mismo efecto.

- El DIAZ, produce una inhibición de la respuesta electrofisiológica a nivel intracelular, entonces esperamos que a nivel extracelular produzca el mismo efecto.



IV.- OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto producido por MEL, GABA y DIAZ sobre la actividad electrofisiológica de los potenciales evocados (potencial de campo) en neuronas piramidales de la región CA1 de hipocampo de rata.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el efecto de la MEL sobre la transmisión sináptica del hipocampo a las concentraciones de 15.0, 30.0, 45.0 y 90.0 μM .

- Determinar el efecto de GABA a una concentración de 10.0 mM sobre la transmisión sináptica de las neuronas de la región CA1 de hipocampo.

- Determinar el efecto producido por la aplicación de DIAZ a las concentraciones de 1.6, 5.0, y 10.0 nM sobre la transmisión sináptica de neuronas de la región CA1 de hipocampo.



V.-METODOLOGÍA

8.0 Material

a) *Material Biológico*

Ratas Wistar hembra o macho (Laboratorio Harlan, México, S. A. De C.V.) de 21 a 22 días de edad, con un peso promedio de 40 ± 2 g, mantenidas en condiciones constantes de temperatura, agua y alimento (Rat Chow) “ad Libitum”

b) *Material quirúrgico*

- Pinzas tipo gubias (*Marca Miltex*)
- Tijeras para corte fino (*Marca Miltex*)
- Tijeras Mayo (*Marca Miltex*)
- Pinzas con dientes de ratón (*Marca Miltex*)

c) *Material diverso*

- Cianoacrilato (*Quick Tite*)
- Gas Carbógeno (Mezcla 95% O₂ y 5% CO₂, *INFRA S.A de C.V*)
- Espátula
- Navaja (*Marca Gillette*)

d) *Equipo*

- Balanza analítica. (*Melter Toledo AG204*)
- Vibratome 1000 Plus-Pelco, Ted Pella, Inc. Mountain Lakes Blvd. Redding, CA
- Micro –Forge (*MF-830 NARISHIGE*)
- Puller (*NARISHIGE*)
- Camara de Registro
- Guillotina para ratas (*World Precision Instruments, Inc. Sarasota, Fl. USA*)
- Preamplificador Axopatch (*Axon Instruments Inc., USA*)
- Osciloscopio (*Tektronix, TDS 3032*)
- Digidata 1320 (*Axon Instruments Inc., USA*)



e) Sustancias y Reactivos.

➤ LCRA

Contiene las siguientes concentraciones de sales: NaCl [120.0 mM], MgSO₄ [1.3 mM], CaCl₂ [1.8 mM], NaHCO₃ [26.0 mM], KCl [3.3mM], NaH₂PO₄ [1.23mM] y Glucosa [11.0 mM]; todas estas sustancias de Sigma- Aldrich, Inc. St. Louis MO, USA.

➤ DMSO (0.03%) (*JT Baker*)➤ Melatonina [15.0, 30.0, 45.0 y 90.0 μM] (*Merck*)➤ GABA [10 mM] (*Lab Merck*)➤ Diazepam [1.6, 5.0 y 10.0 nM] (*Valium, Lab Roche*)**8.1. Preparación de las rebanadas de hipocampo (Región CA1)**

Para la obtención de las rebanadas hipocampales (400 μm) primeramente se realizó extracción del cerebro, el cual se obtuvo a partir de la decapitación de los animales con ayuda de la guillotina (en un tiempo máximo de 30 segundos). El cráneo se cortó con pinzas tipo gubias, a lo largo de la línea media de este, la piamadre, duramadre y el aracnoides se eliminaron con tijeras para corte fino, con una espátula pequeña se levantó suavemente el cerebro de la cavidad craneal, cortando cuidadosamente los nervios craneales.

Una vez extraído el cerebro se colocó en una caja Petri con LCRA a 5 °C para disminuir la actividad enzimática y dar al cerebro la suficiente firmeza para cortarlo en rebanadas; además se oxigenó con gas carbógeno (mezcla de O₂ y CO₂ al 95% y 5% respectivamente) con el objetivo de satisfacer la demanda de oxígeno por parte de las células. 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 para formar un bloque (**Foto 1**).



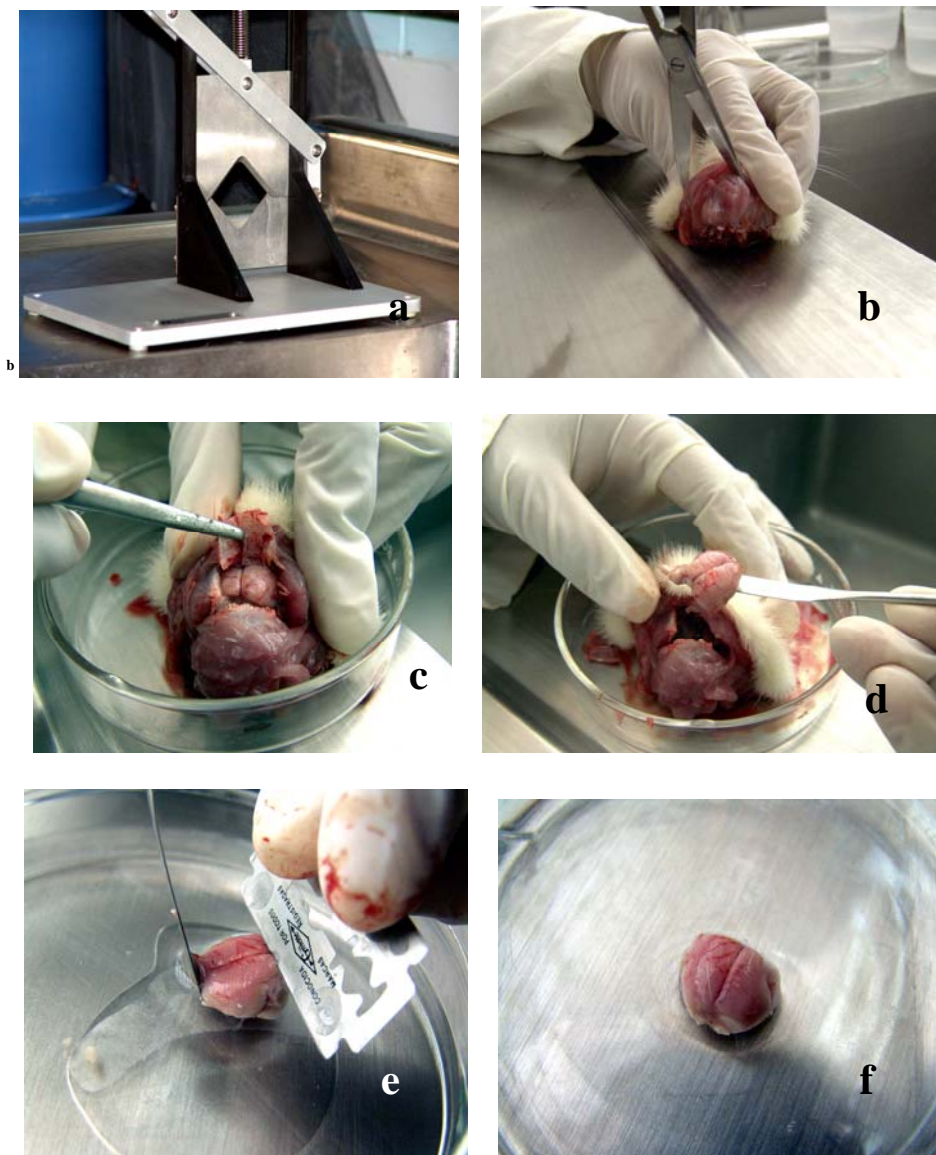


Foto 1. Secuencia que muestra la extracción del cerebro: a) Guillotina para decapitación de la rata, b) Corte del cráneo, c) Eliminación del capa craneal, d) Extracción del cerebro de la cavidad craneal, e) Corte del cerebro por la parte posterior a la altura del cerebelo y f) Bloque de cerebro.

El bloque obtenido, se fijó con una capa delgada de cianoacrilato (QuickTite) a la base de la cámara del “Vibro Slice” o “Vibrotomo”. Las rebanadas se obtuvieron por cortes coronales del cerebro, generalmente las dos primeras rebanadas del hipocampo se desecharon, para asegurar que contengan 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 5 min. Las rebanadas se sumergieron en la solución de

LCRA a temperatura ambiente (22 ± 3 °C) con burbujeo constante de gas carbónico, mientras eran utilizadas para los registros, en esta solución se consideraron 30 minutos 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 (Foto 2)

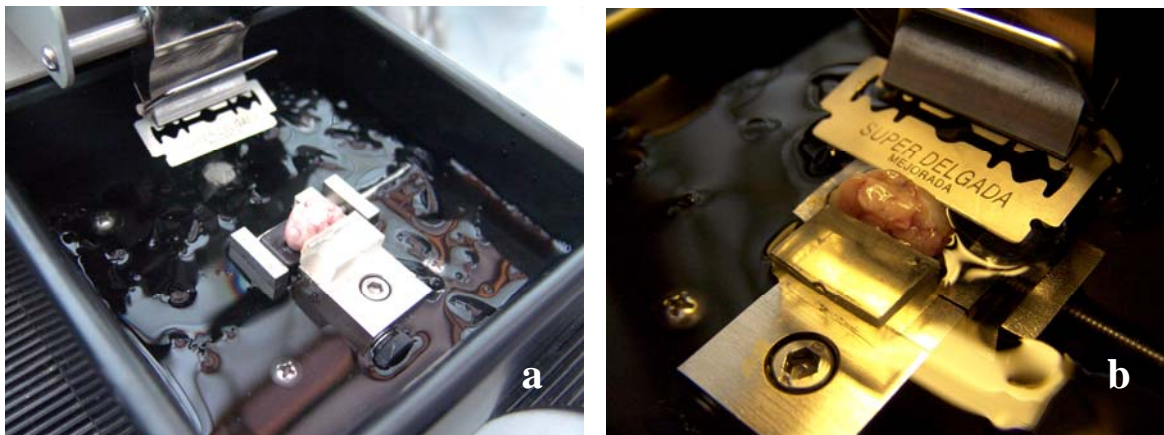


Foto 2. Obtención de las rebanadas de hipocampo de rata 400-500 μ : a) Fijación del bloque de cerebro en la cámara del “Vibrotomo” y b) Cortes coronales del hipocampo

8.2 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 un “pozo” de 1.3 cm², con una profundidad de 0.4 cm y una capacidad de 1 cm³. Posteriormente, se transfirió una rebanada a la cámara de registro y continuamente se perfundió con una solución de LCRA (36 ± 3 °C) a una velocidad de perfusión, 1.5-2 mL/min y oxigenado con gas carbónico.

Para mantener el volumen constante de la perfusión, la cámara está conectada a una aguja de succión la cual a su vez está conectada al sistema de vacío. EL LCRA que perfundió a la rebanada llega 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 carbónico, 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 $36 \pm 1^\circ\text{C}$, la cual se monitoreo durante todo el registro. Para evitar efectos indeseables debido al goteo de las soluciones contenidas en la pipeta, esta fue siempre colocada aproximadamente a $500\ \mu\text{m}$ del lugar de la expulsión.

Una vez trasladada la rebanada en la cámara se 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 mantener fija la rebanada (Foto 3).

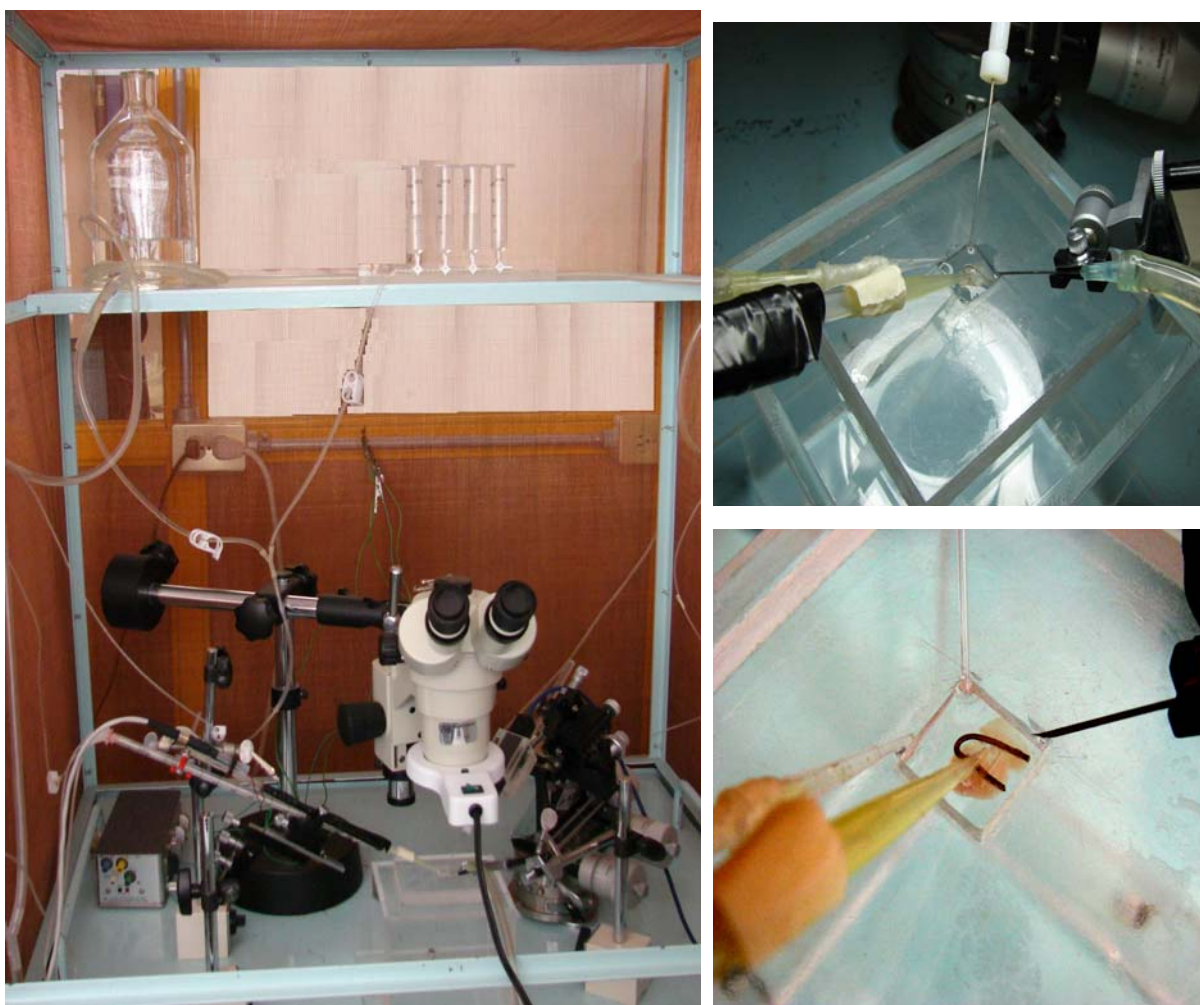


Foto 3. Equipo para perfundir y visualizar las rebanadas hipocampales. Las rebanadas hipocampales fueron colocadas para registrar su actividad en una cámara de acrílico y perfusión constante con LCRA a una temperatura de $34\text{-}36^\circ\text{C}$. Este líquido fue colocado en un frasco reservorio y aplicado por gravedad. El nivel de líquido en la cámara de registro se mantuvo constante por la succión aplicada con una conexión de acero a la bomba de vacío.

Después de haber realizado este procedimiento, a la rebanada se le colocaron los electrodos de registro y de estimulación, posteriormente, se buscó la espiga poblacional (la espiga poblacional o potencial de campo poblacional es el reflejo del número de neuronas piramidales activadas) y se registró..

8.3. 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 MΩ. El potencial de membrana de un conjunto de neuronas se midió con un preamplificador Axopatch. La salida de este preamplificador se conectó a un osciloscopio, 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). 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 mayor o igual 60mV.

Se realizaron estudios piloto para determinar las concentraciones a utilizar de las diferentes sustancias (MEL, GABA y DIAZ). La MEL se disolvió previamente en DMSO al 0.03% antes de mezclarse en LCRA. Las concentraciones de MEL con las que se trabajó fueron 15.0, 30.0 y 45.0 μM, GABA 10.0 mM y Diazepam 1.6, 5.0y 10.0nM. Las soluciones de MEL, GABA, DIAZ y DMSO se prepararon 15 min antes de los experimentos. Todas las soluciones incluyendo al LCRA se mantuvieron a -4 °C antes de administrarlas.

Por otro lado, se realizó un registro control-vehículo DMSO para el registro de MEL y un registro control en el cual no se administró ninguna sustancia para comparar los registros obtenidos con GABA y DIAZ con la finalidad de realizar una mejor comparación de los efectos en el potencial de campo evocado por la aplicación de trenes de estimulación



en las neuronas piramidales de la región CA1. Cabe mencionar que todos los registros electrofisiológicos se realizaron entre las 11:00 y 12:00 después de una estabilización de 45-60 minutos.

El protocolo a seguir en cada experimento se muestra en la tabla 1.

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

| Protocolo Experimental | Procedimiento |
|--------------------------------|---|
| Registro Control | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Control (preadministración) Se registra la actividad del campo de neuronas (5 min), con perfusión constante de LCRA durante todo el registro. ➤ Control vehículo-DMSO (0.03%) Se aplica DMSO por un intervalo de 5 min y se observó la respuesta por 90 min. ➤ Control (sin administración) Se registra la actividad del campo de neuronas por un periodo de 90 min <p>Se aplican pulsos eléctricos de 20-100 μs, con una frecuencia de 1Hz</p> |
| Administración de la sustancia | Se aplica MEL, GABA o DIAZ por un intervalo de 5 min y se observó la respuesta por 90 min. |
| Aplicación 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. |

Inicialmente, realizamos una curva estímulo-respuesta con aplicación de diferentes voltajes (V), para conocer la amplitud de la espiga, como se muestra en la **Fig. 16**



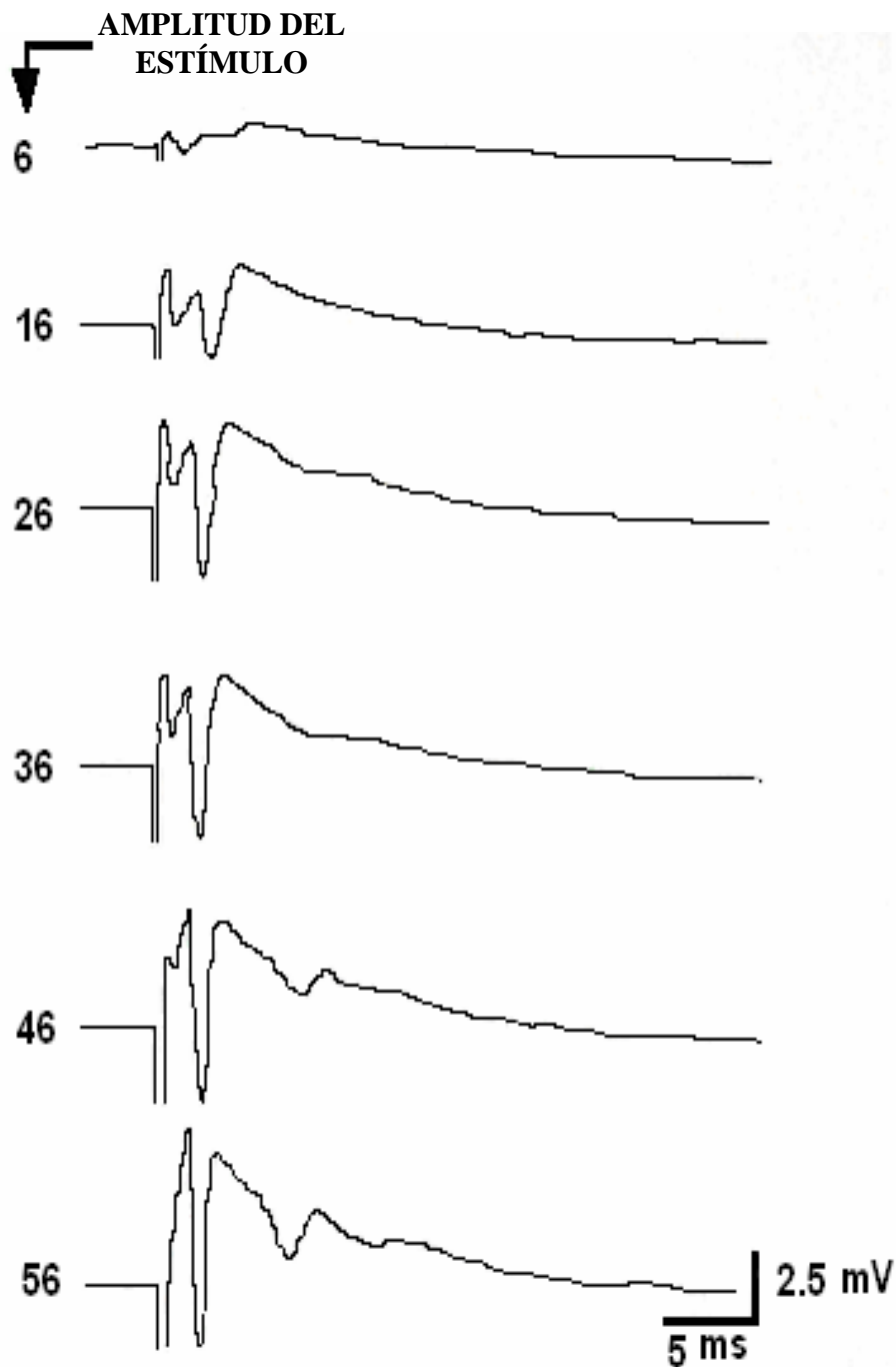


Fig. 16. Se muestran los registros del potencial de campo típicos en el Estrato Piramidal de la región hipocampal CA1. Se observan repuestas dependientes del estímulo. También se muestra 5 potenciales provocados por la aplicación de un solo pulso de 200 msec de duración, 0.05 Hz y las intensidades (voltaje). 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 aumentó el voltaje de estimulación, las estimulaciones generaron espigas secundarias. En este ejemplo la máxima amplitud se obtuvo con 36 V.

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. Los registros de cada conjunto de neuronas se analizaron como se muestra en la **Fig. 17**. En esta figura se describe, como se calcula la amplitud de la espiga utilizando el programa ClampFit (pClamp, Axon Instruments)

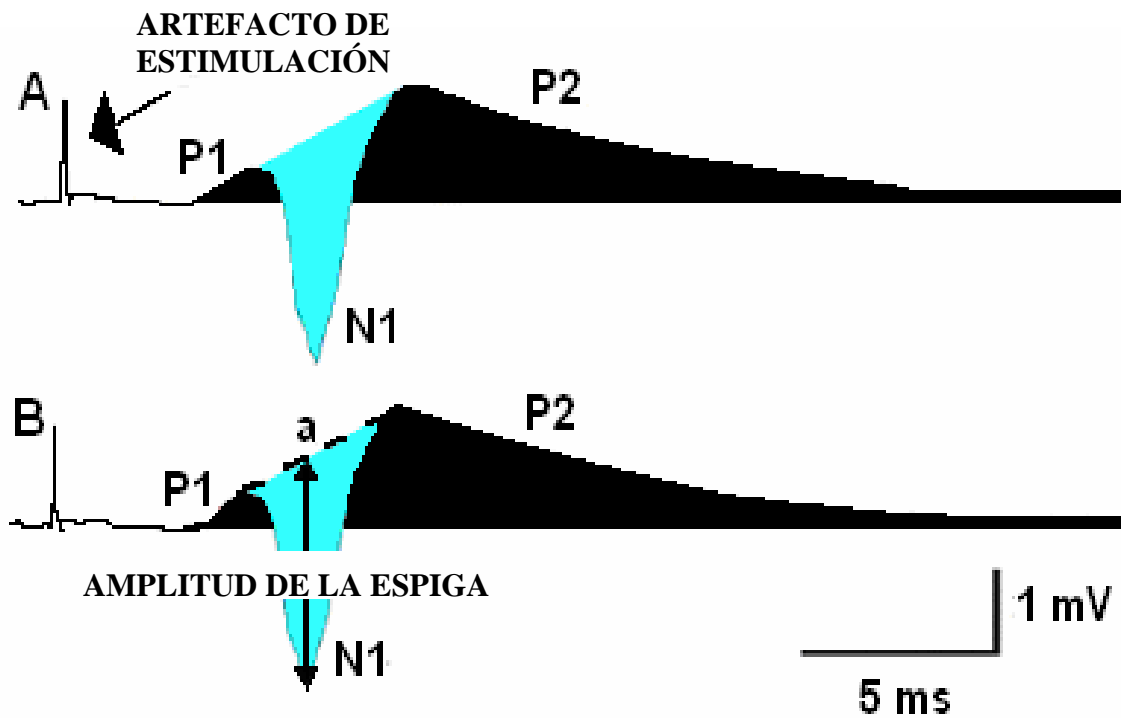


Fig. 17. Potencial de campo típico en el registro del estrato *piramidale* del área hipocámpal CA1. A) Usualmente se observan 3 ondas P1, N1 y P2. P1 y P2 corresponden al potencial postsináptico y N1 corresponde a la población de espigas. B). La amplitud de esta espiga se calculó usando el ClampFit (pClamp, 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 C)⁹.

8.4. Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos son de 3 rebanadas para MEL, GABA y DIAZ se presentan como el promedio \pm D. S., y el número de rebanadas se indicó como n. Se registró una rebanada por rata. Los datos obtenidos se analizaron aplicando las pruebas de t de Student pareada, para cuantificar las diferencias entre los valores promedio obtenidos en la misma espiga poblacional y la prueba de t de Student no pareada para analizar las diferencias entre los grupos de la espiga poblacional. Las diferencias estadísticamente significativas, se consideraron con una $p < 0.05$. El análisis estadístico y la graficación se llevó a cabo con el software Excel (Microsoft, CA, USA).



VI.- RESULTADOS

Con 60 minutos de estabilización de la respuesta electrofisiológica, y con los datos obtenidos de los registros, se determinó la amplitud de la espiga del potencial de campo con respecto al control (preadministración), éste, se consideró con una duración de 5 minutos antes de la administración de las sustancias en estudio (MEL, GABA y DIAZ), la aplicación de las sustancias se llevó a cabo durante un periodo de 5 min; posteriormente el registro duro 90 min. Los datos se graficaron y a través de la realización de curvas se cuantifico el efecto de MEL, GABA y DIAZ en la transmisión sináptica hipocampal.

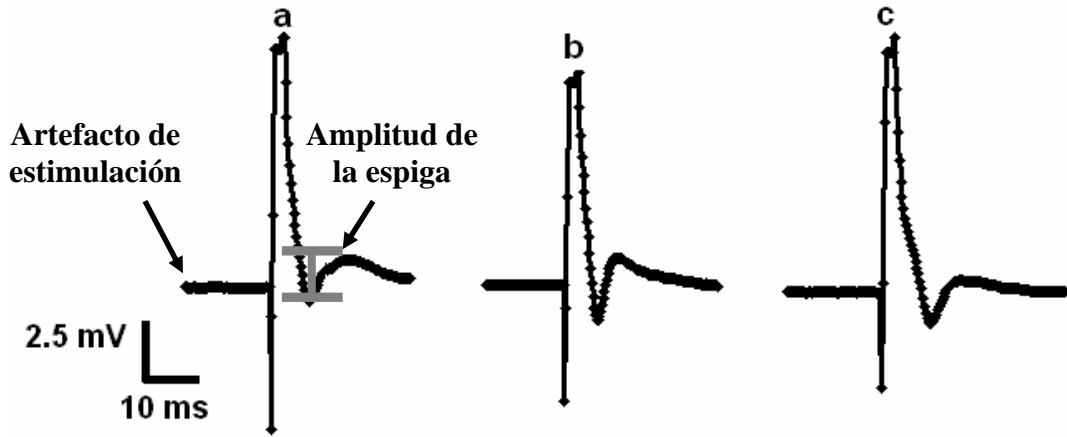
9.0 EFECTO DE MELATONINA EN LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA DEL HIPOCAMPO

En las tablas 2 y 3, así como en las gráficas 1, 2, 3, 4, se muestra el efecto producido por la administración de MEL a las concentraciones de 15.0, 30.0, 45.0, 90.0, μM respectivamente. En estas gráficas se observan en **I** registros del potencial de campo, representados por la espiga poblacional donde se ilustra en “**a**” el registro preadministración de MEL, en “**b**” el registro postadministración de MEL y en “**c**” el registro postaplicación del LTP. En **II** se muestran los datos graficados tanto para MEL (15.0, 30.0, 45.0 y 90.0 μM) como para el vehículo DMSO (0.03%).

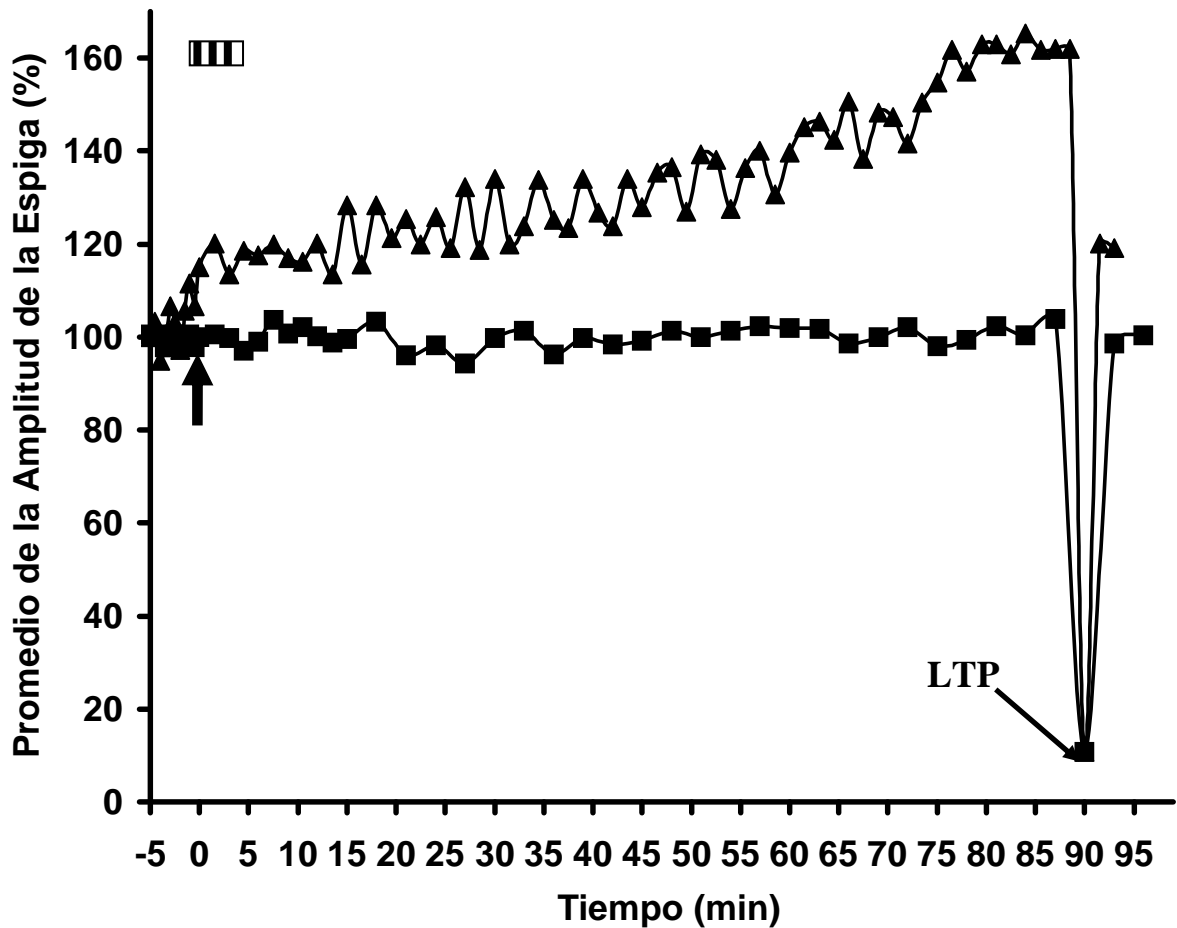
En el caso de la concentración de 15.0 μM (**Gráfica 1**) se observa un aumento en el tamaño de la espiga poblacional respecto al control (preadministración); además, después de la aplicación del LTP la espiga recupera su tamaño inicial, lo que indica la viabilidad de la rebanada. En los datos graficados a los 15 min postadministración se tiene un aumento de la respuesta respecto al control y está se mantiene por 75 min, se incrementa nuevamente y se mantiene por 15 min sin cambios que es justo cuando se finaliza el tiempo de registro y se aplica el LTP.



I)



II)



Gráfica 1. Efecto de MEL a 15.0 μ M sobre la transmisión sináptica del hipocampo. I) Se muestra la espiga correspondiente al potencial de campo de una rebanada en donde: a) registro control (preadministración), b) registro postadministración de MEL y c) registro postaplicación del LTP. El trazo (└) indica la calibración. II) Se muestra la morfología de los datos obtenidos con DMSO (■) y MEL(▲) en donde la respuesta a MEL tiende a aumentar comparada con el control (preadministración) y el control-vehículo DMSO. ■■■ = Tiempo de duración de la aplicación. La ↑ indica el momento de la administración.



De esta manera, en el registro obtenido con la aplicación del control-vehículo DMSO (0.03%), se observa que éste se mantiene constante y el análisis estadístico con ambos grupos de datos (DMSO y MEL [15 μ]) muestra una diferencia de * $p < 0.05$

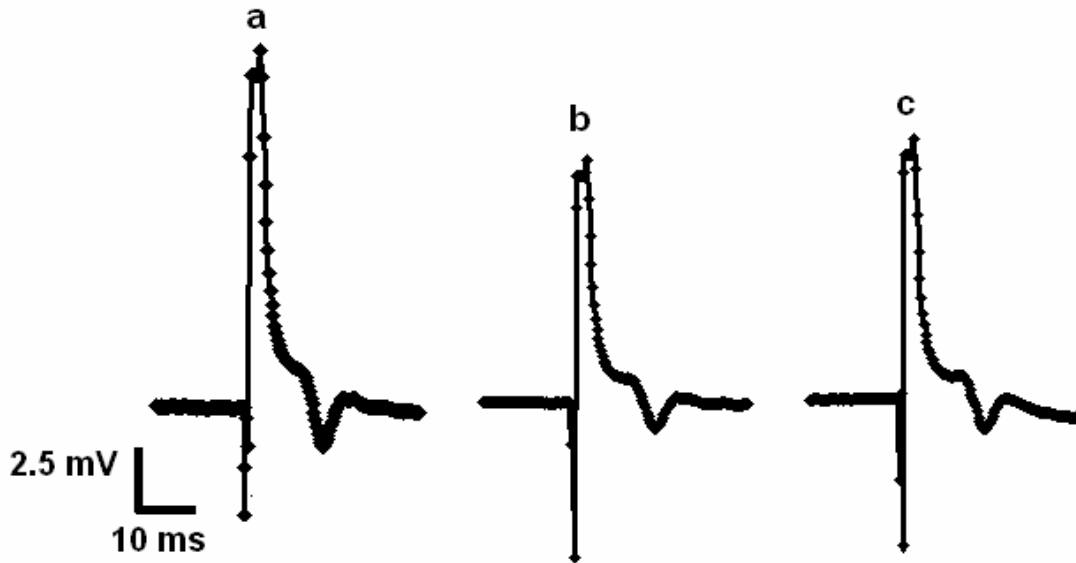
| Tiempo (min) | Promedio de la amplitud de la espiga (%) con respecto al control (preadministración) |
|--------------|--|
| -5 | - |
| 15 | 118* |
| 30 | 124* |
| 45 | 127* |
| 60 | 135* |
| 75 | 146* |
| 90 | 162* |

Tabla 2. En esta tabla se muestra un incremento en el promedio de la amplitud de la respuesta con MEL a 15 μ M. El análisis estadístico (t student pareada) muestra una diferencia significativa con relación al registro control (*) Nota= El tiempo marcado como -5 indica el tiempo preadministración, el cual corresponde al periodo de registro del control preadministración.

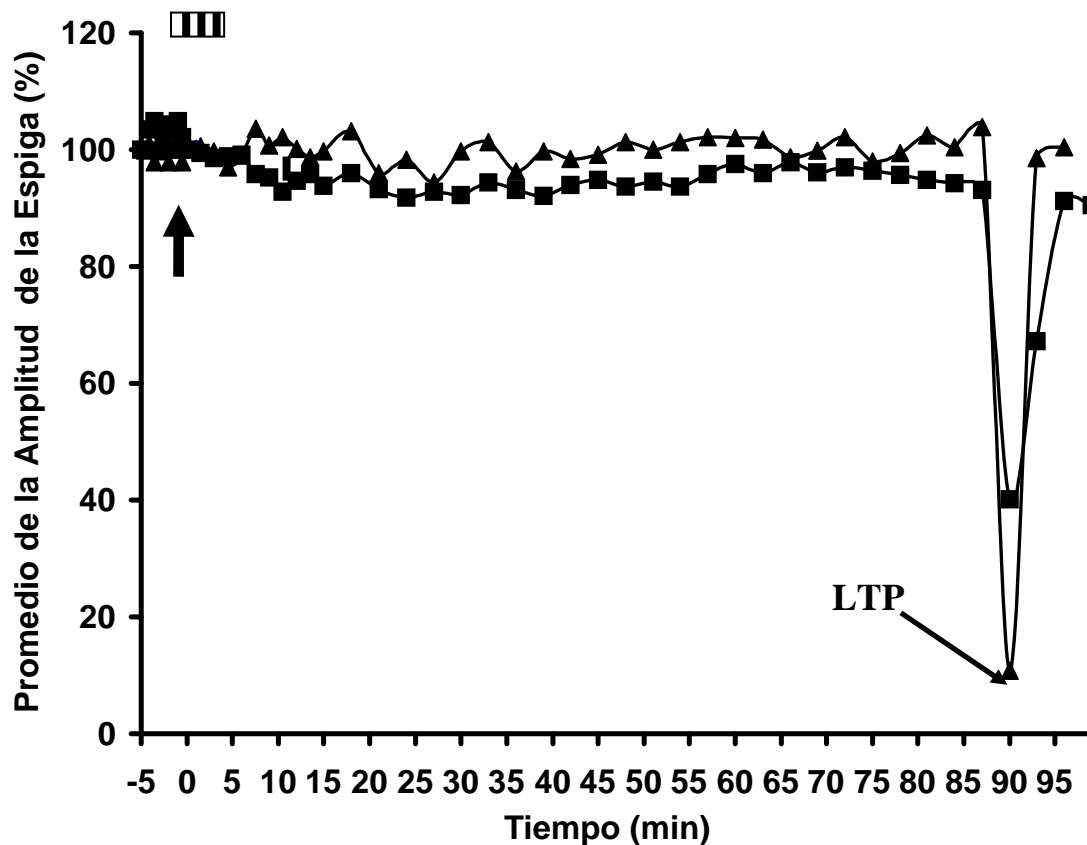
A diferencia de los resultados obtenidos con 15 μ M, la administración de MEL a 30.0 μ M (**Gráfica 2**) produce una disminución de la amplitud de la espiga poblacional con respecto al control (preadministración), la cual se muestra en los registros del potencial de campo (**I**). Esta disminución comienza a observarse a partir de los 5 min postadministración y se mantiene hasta la finalización del registro cuando se aplicó el LTP para determinar la viabilidad de la rebanada. El efecto de MEL comparado con el vehículo DMSO (0.03%) es una disminución de la respuesta, sin embargo, los registros de ambos grupos de datos fue similar (**II**).



I)



II)



Gráfica 2. Efecto de MEL a $30.0\mu\text{M}$ sobre la transmisión sináptica del hipocampo. I) Se muestra la espiga correspondiente al potencial de campo de una rebanada en donde: **a)** registro control (preadministración), **b)** registro postadministración de MEL y **c)** registro postaplicación del LTP. El trazo (└) indica la calibración. II) Se muestra la morfología de los datos obtenidos con DMSO (■) y MEL (▲), en donde la respuesta de ambos grupos de datos presentan un comportamiento similar. ■■■■ = Tiempo de duración de la aplicación. La ↑ indica el momento de la administración.



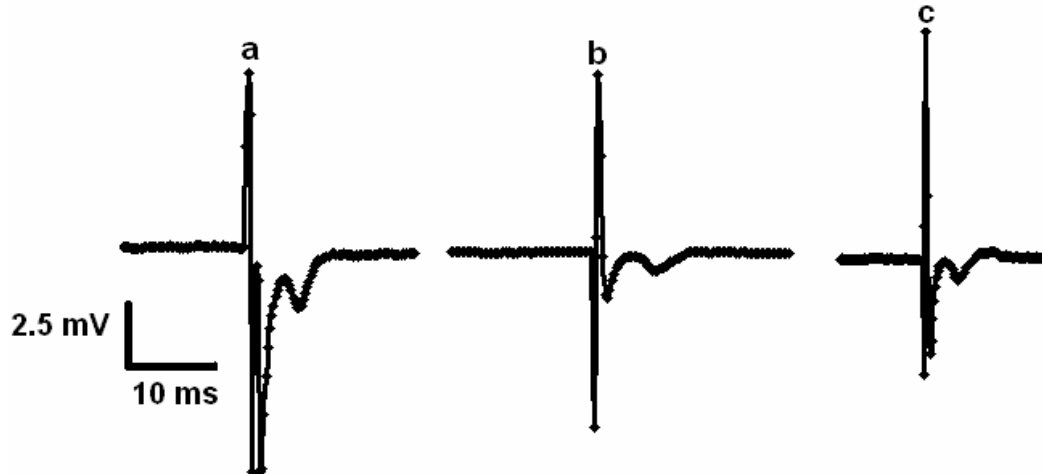
| Tiempo (min) | Promedio de la amplitud de la espiga (%) con respecto al control. | | |
|--------------|---|--------------|--------------|
| | 30.0 μ M | 45.0 μ M | 90.0 μ M |
| -5 | - | - | - |
| 15 | 96* | 84* | 52* |
| 30 | 93* | 77* | 71* |
| 45 | 93* | 82* | 69* |
| 60 | 95* | 10* | 67* |
| 75 | 96* | 9* | 69* |
| 87 | 94* | 1* | 68* |

Tabla 3. En esta tabla se muestra una disminución en el promedio de la amplitud de la respuesta con la aplicación de MEL a 30.0, 45.0, y 90.0 μ M. El análisis estadístico (t student pareada) muestra una diferencia significativa con relación al registro control de * $p < 0.05$.

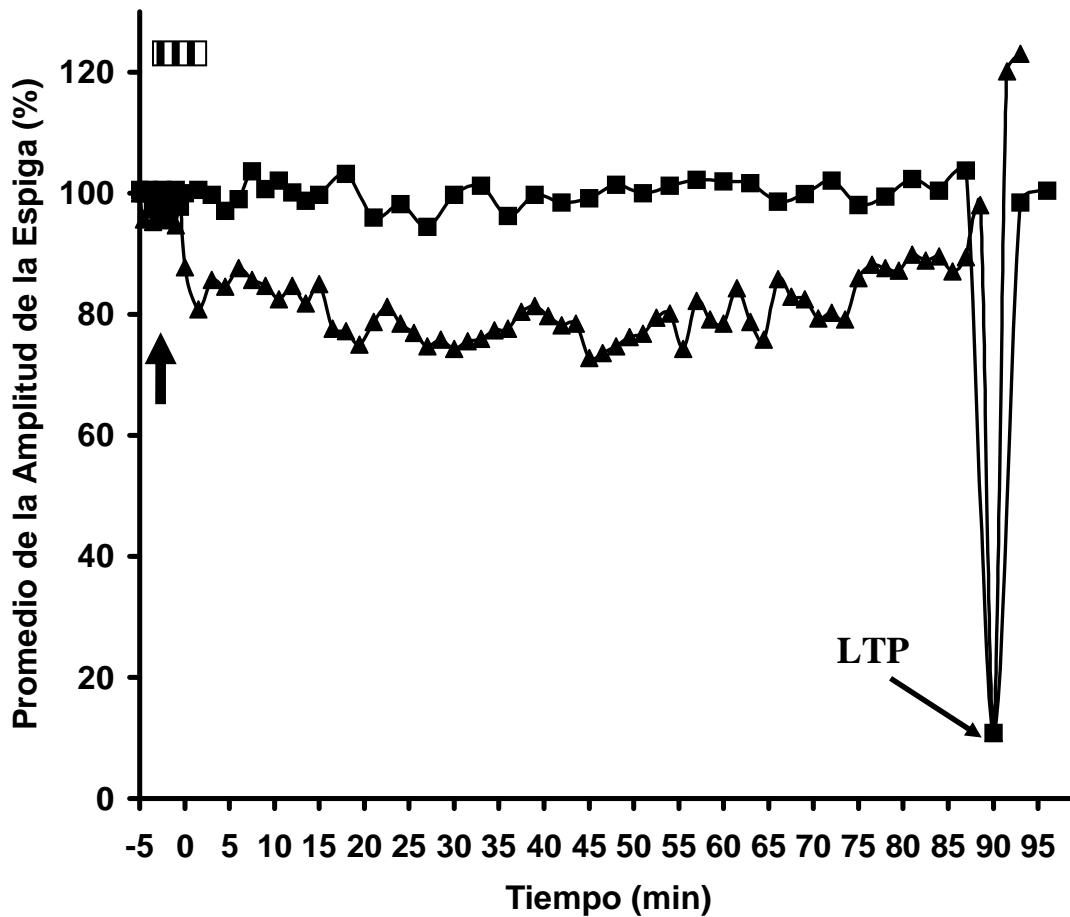
En la gráfica 3, se muestra que al administrar MEL a 45.0 μ M se presenta una disminución importante de la amplitud de la espiga respecto al control (preadministración), este efecto se ilustra en los registros del potencial de campo (I). En II la disminución de la respuesta se observa que comienza a partir de los 5 min postadministración, la cual se mantiene hasta los 15 min postadministración, enseguida tiende a disminuir nuevamente manteniéndose hasta los 45 min postadministración, posteriormente, la respuesta se incrementa hasta la finalización del registro y finalmente se aplica el LTP. Esta respuesta comparada con el registro del control-vehículo DMSO (0.03%), presenta una disminución significativa de * $p < 0.05$.



I)



II)



Gráfica 3. Efecto de MEL a 45.0 μ M sobre la transmisión sináptica del hipocampo. I) Se muestra la espiga correspondiente al potencial de campo de una rebanada en donde: **a)** registro control (preadministración), **b)** registro postadministración de MEL y **c)** registro postaplicación del LTP. El trazo (└) indica la calibración. **II)** Se muestra la morfología de los datos obtenidos con DMSO (■) y MEL (▲), en donde la respuesta a esta última se ve disminuida en comparación con el control (preadministración) y del control-vehículo DMSO. ■■■ = Tiempo de duración de la aplicación. La ↑ indica el momento de la administración.



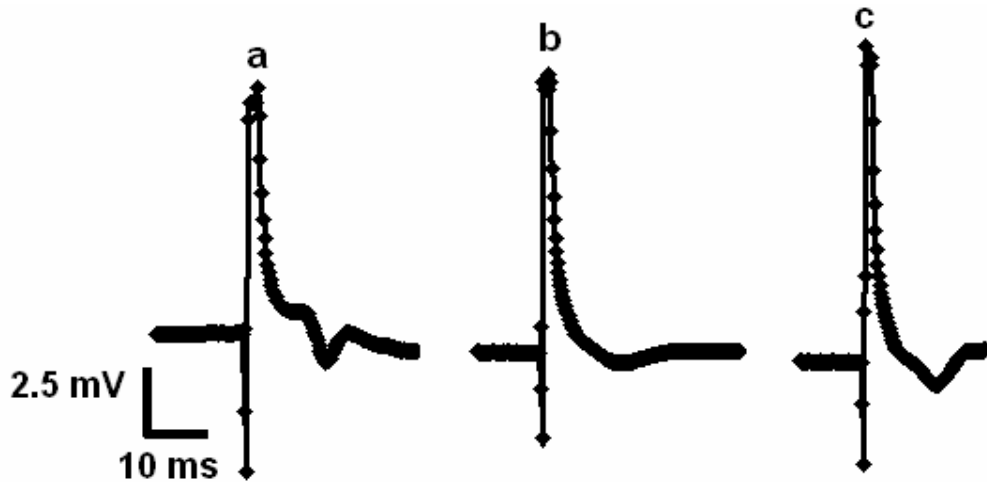
En los resultados obtenidos con MEL a 90.0 μM (**Gráfica 4**), se observa en los registros del potencial de campo una disminución de la amplitud de la espiga respecto al control (preadministración) y con la aplicación del LTP la espiga poblacional obtenida es similar a la representada por el control (**I**). De esta manera la amplitud de la espiga (**II**) se establece a partir de los 5 min postadministración, la cual se mantiene por 25 min, enseguida disminuye hasta los 35 min, posteriormente, tiende a aumentar manteniéndose constante hasta la finalización del registro y finalmente se tiene la aplicación del LTP. Comparado con el control-vehículo DMSO (0.03%); se presenta una disminución significativa $*p < 0.05$ de la respuesta durante el tiempo que dura el registro.

Con base a los resultados de MEL descritos anteriormente, se realizó una gráfica concentración-respuesta a MEL (**Gráfica 5**); donde se muestran todas las concentraciones aplicadas de MEL. En esta gráfica se observa que a concentraciones bajas (15.0 μM) de MEL hay un incremento de la respuesta (promedio de la amplitud de la espiga) y conforme se aumenta la concentración de MEL disminuye la amplitud de la respuesta dependiente de la concentración, lo que nos habla de un efecto bifásico por parte de la MEL. Este efecto es similar al obtenido con la aplicación de MEL en otros tejidos como músculo liso (intestino y útero)⁶⁵.

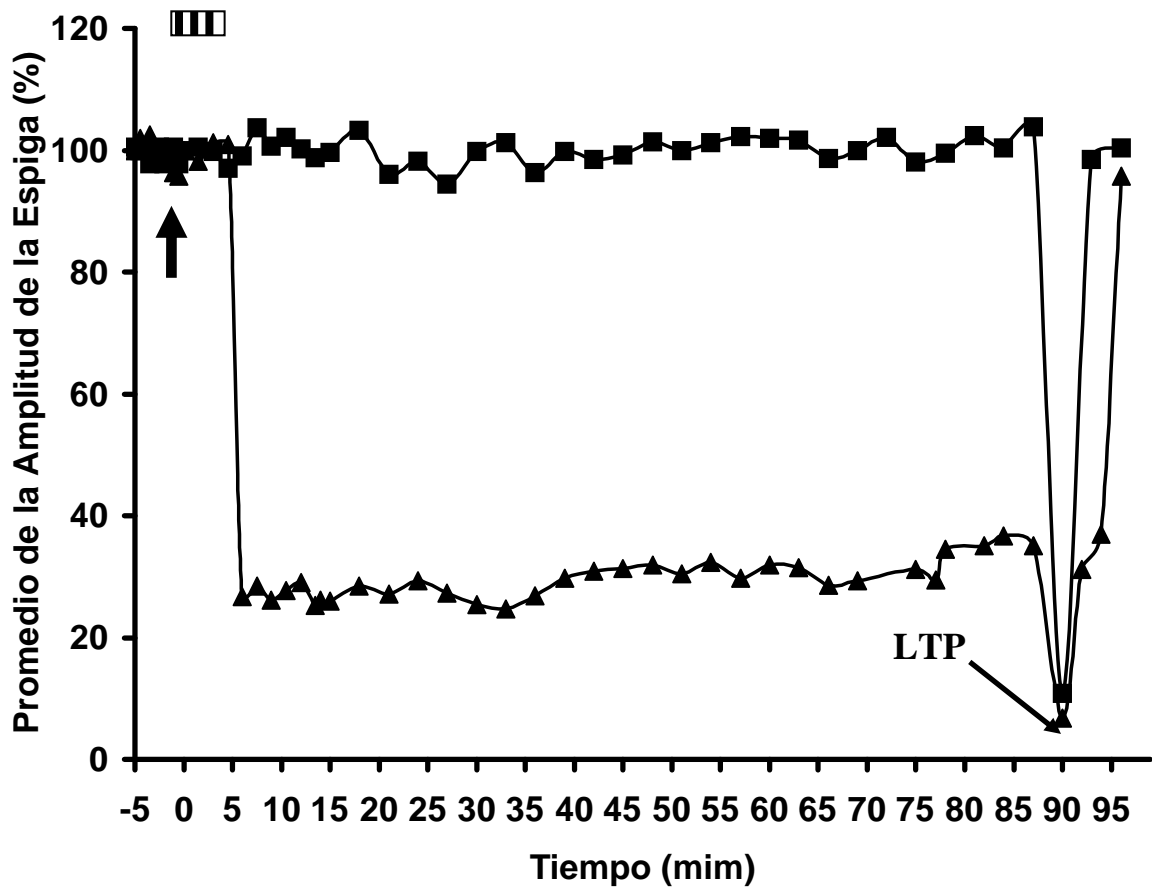
Por otro lado, en la gráfica 6 se presenta una comparación del promedio de la amplitud de la espiga \pm ESM de las diferentes concentraciones de MEL aplicadas (15.0 , 30.0, 45.0 y 90.0 μM), así como una comparación de estas con el control (preadministración) y el control-vehículo DMSO (0.03%). El análisis estadístico muestra una diferencia de $**p < 0.05$



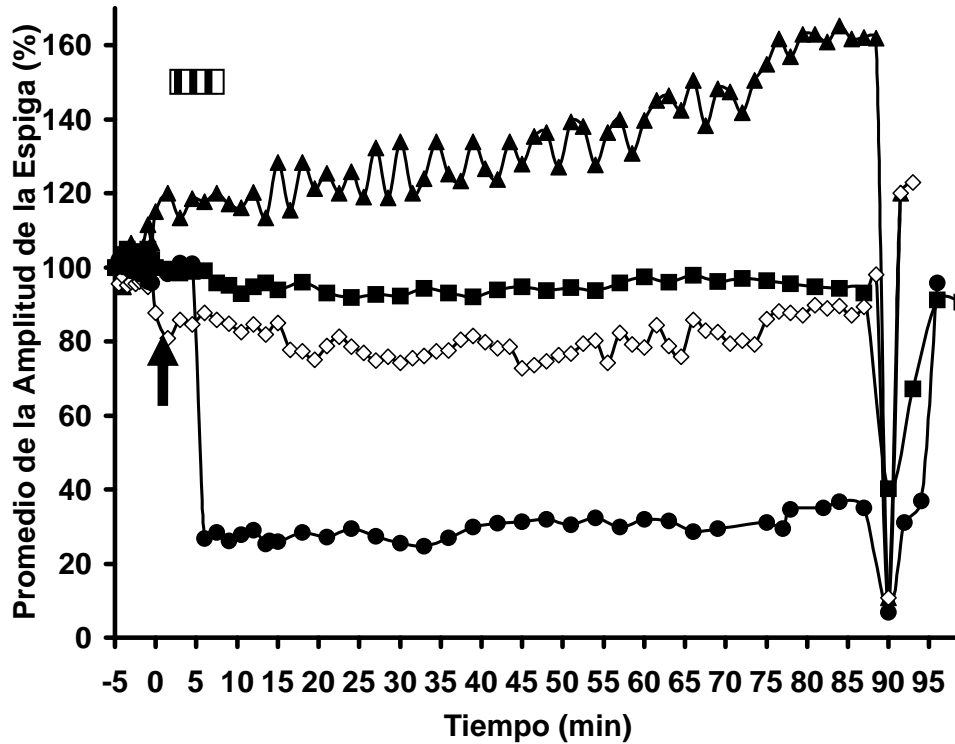
I)



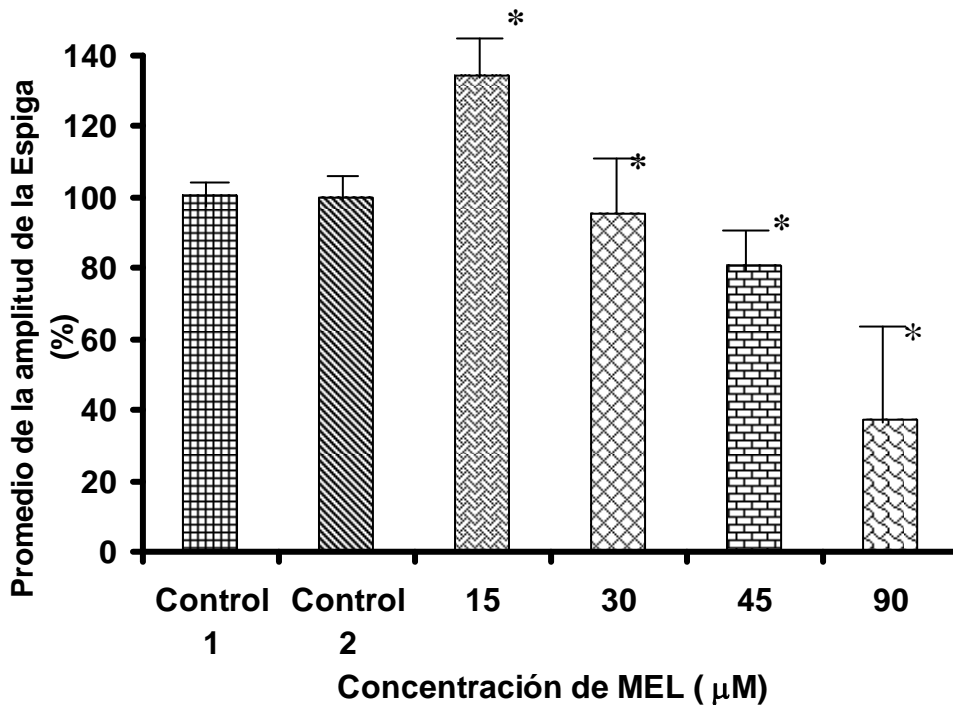
II)



Gráfica 4. Efecto de MEL a 90.0 μ M sobre la transmisión sináptica del hipocampo. I) Se muestra la espiga correspondiente al potencial de campo de una rebanada en donde: **a)** registro control (preadministración), **b)** registro postadministración de MEL y **c)** registro postaplicación del LTP. El trazo (\perp) indica la calibración. II) Morfología de los datos obtenidos con DMSO (■) y MEL (▲), en donde se observa que la respuesta a MEL disminuye en comparación al control (preadministración) y control-vehículo DMSO. \blacksquare = Tiempo de duración de la aplicación. La \uparrow indica el momento de la administración



Gráfica 5. Comparación del efecto de MEL a las concentraciones aplicadas (15.0 (▲), 30.0 (■), 45.0 (◇) y 90.0 (●) μM Se muestra la amplitud de la espiga (%) en función del tiempo. ■■■ = Tiempo de duración de la aplicación. La \uparrow indica el momento de la administración



Gráfica 6. Promedio de la amplitud de la espiga (%) \pm ESM de las concentraciones de MEL aplicadas (15.0, 30.0, 45.0, y 90.0 μM) con una diferencia significativa de $*p < 0.05$. Control 1=control preadministración; Control 2= control-vehículo DMSO (0.03%).



9.1 EFECTO DE GABA EN LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA DEL HIPOCAMPO

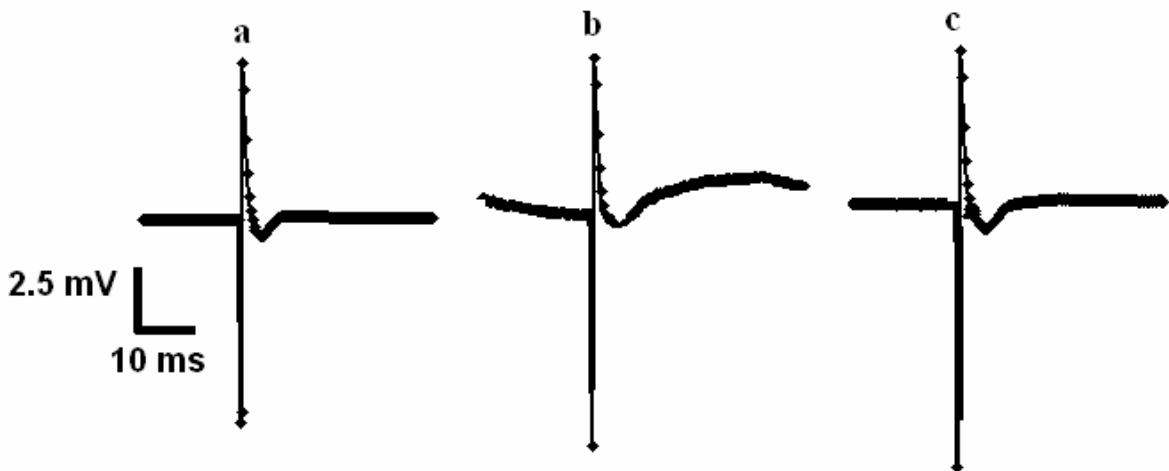
En la tabla 4, así como en la gráfica 7 se muestra el resultado obtenido con la administración del GABA a 10.0 mM en la región CA1 del hipocampo de rata. En los registros del potencial de campo (I) se observa una disminución de la amplitud de la espiga respecto al control (preadministración), también, se ilustra la recuperación de la espiga después de la aplicación del LTP lo que indica la viabilidad de la rebanada. La disminución de la respuesta (II) se observa inmediatamente después de la aplicación del GABA y está continúa por 10 min, después se mantiene constante hasta los 30 min postadministración, posteriormente la respuesta tiende a aumentar significativamente respecto al control (preadministración) con una $p < 0.05$ disminuyendo nuevamente a los 65 min y manteniéndose constante hasta la aplicación del LTP.

| Tiempo (min) | Promedio de la amplitud de la espiga (%) con respecto al control (preadministración) |
|--------------|--|
| -5 | - |
| 15 | 83* |
| 30 | 74* |
| 45 | 88* |
| 60 | 107* |
| 75 | 85* |
| 87 | 91 |

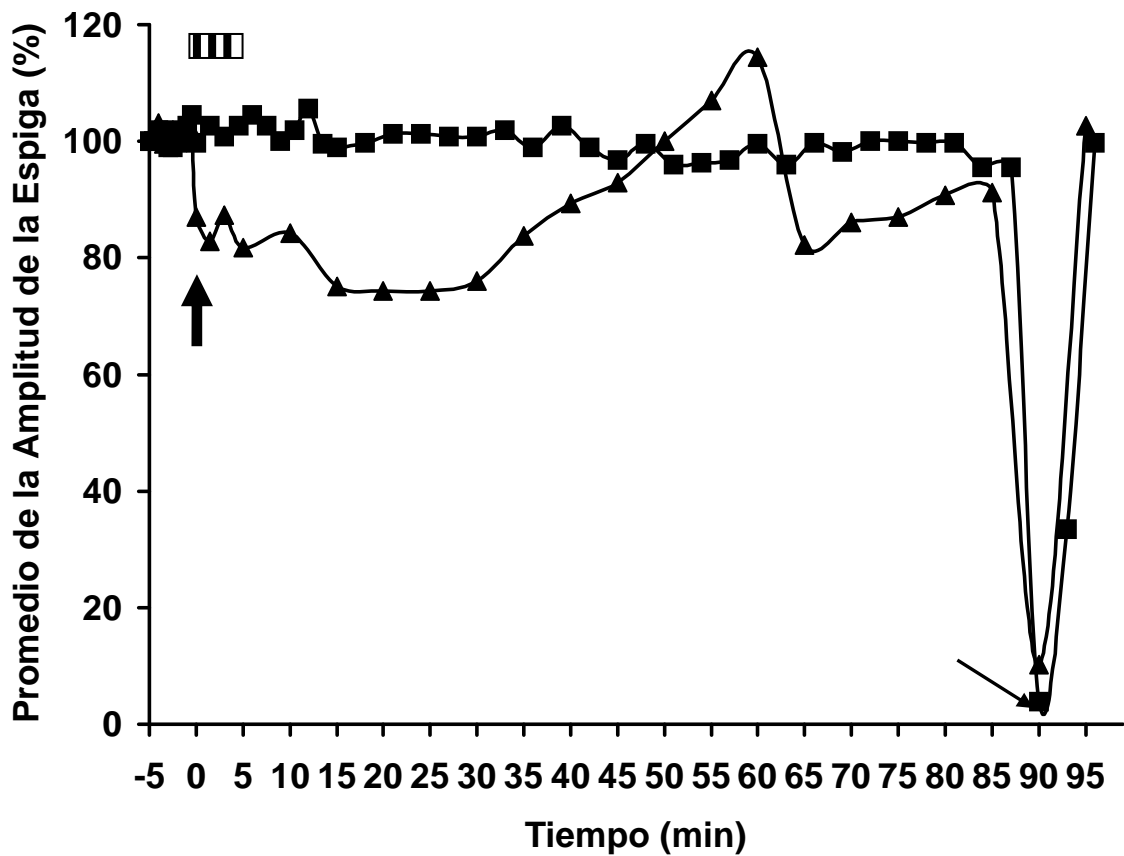
Tabla 4. En esta tabla se muestra el promedio de la amplitud de la espiga con la administración de GABA a 10.0 mM. El análisis estadístico (t student pareada) muestra una diferencia significativa con relación al control (preadministración).



I)



II)



Gráfica 7. Efecto de GABA a 10.0 mM sobre la transmisión sináptica del hipocampo. I) Se muestran las espigas correspondientes al potencial de campo de una rebanada en donde: **a)** registro control (preadministración), **b)** registro postadministración de GABA y **c)** registro postaplicación del LTP. El trazo (L) indica la calibración. II) Morfología de los datos obtenidos con el control sin administración (■) y GABA (▲) representados como el promedio de la amplitud de la espiga en función del tiempo. ■■■ = Tiempo de duración de la aplicación. La ↑ indica el momento de la administración.

9.2 EFECTO DEL DIAZ EN LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA DEL HIPOCAMPO.

En la tabla 5 y gráficas 8, 9 y 10 se muestran los resultados obtenidos con la administración de DIAZ a las concentraciones de 1.6, 5.0 y 10.0 nM respectivamente. En estas gráficas se presentan en **I** registros del potencial de campo, representados por la espiga poblacional donde se ilustra en “a” el registro preadministración de DIAZ, en “b” el registro postadministración de DIAZ y en “c” el registro postaplicación del LTP. En **II** se muestran los datos graficados tanto para DIAZ (1.6, 5.0 y 10.0 nM) como para el registro control (sin administración de sustancia).

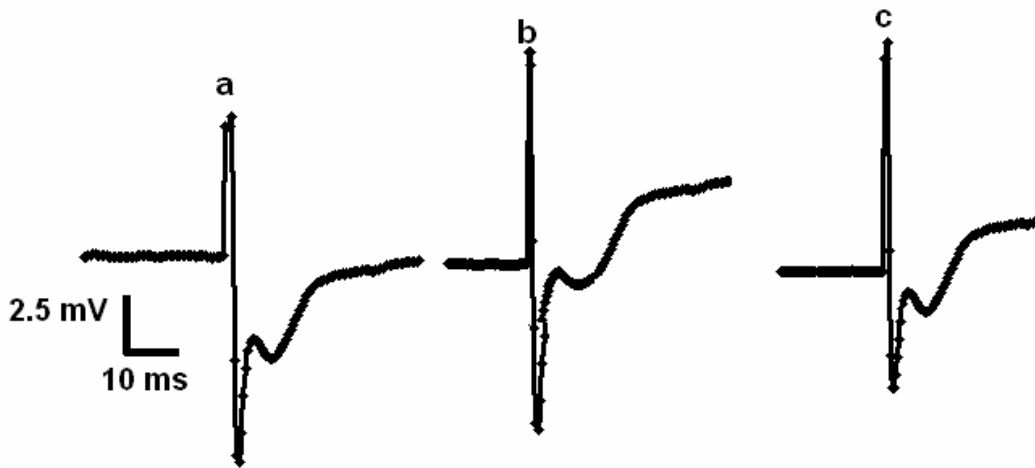
Para el caso de la concentración de 1.6 nM (**Grafica 8**), la amplitud de la espiga disminuye a los 5 min, posteriormente tiende a aumentar, disminuyendo nuevamente a los 18 min y manteniéndose constante hasta la administración del LTP, enseguida la espiga se recupera, lo que indica la viabilidad de la rebanada.

| Tiempo (min) | Promedio de la amplitud de la espiga (%) respecto al control | | |
|--------------|--|--------|---------|
| | 1.6 nM | 5.0 nM | 10.0 nM |
| -5 | - | - | - |
| 15 | 98* | 81* | 72* |
| 30 | 88* | 80* | 59* |
| 45 | 80* | 79* | 61* |
| 60 | 78* | 74* | 63* |
| 75 | 76* | 74* | 75* |
| 87 | 77* | 74* | 71* |

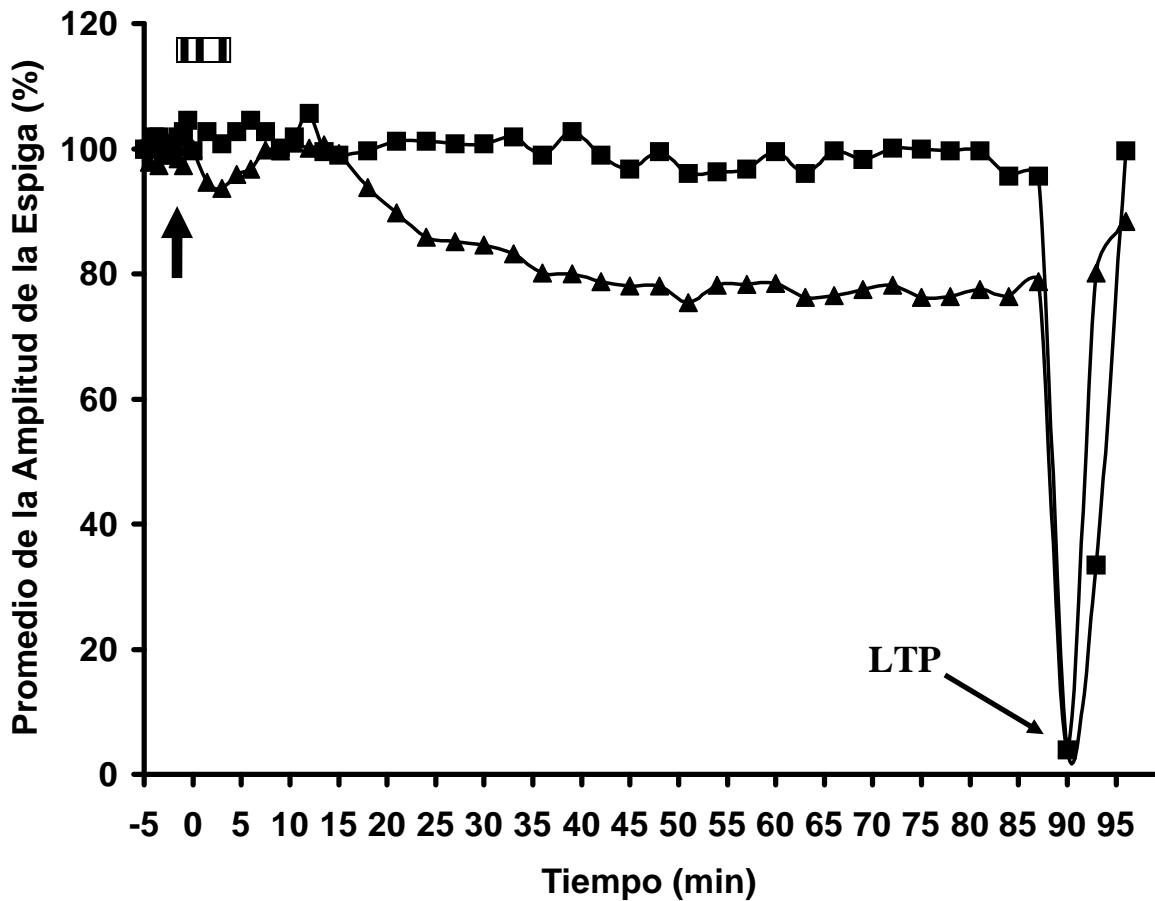
Tabla 5. En esta tabla se muestra el promedio de la amplitud de la espiga con la aplicación de DIAZ a 1.6, 5.0 y 10.0 nM. El análisis estadístico muestra una diferencia significativa con relación al registro control de * $p < 0.05$.



I)



II)



Grafica 8. Efecto de DIAZ a 1.6 nM sobre la transmisión sináptica del hipocampo. I) Se muestran las espigas correspondientes al potencial de campo de una rebanada en donde: a) registro control, b) registro postadministración de DIAZ y c) registro postaplicación del LTP. El trazo (└) indica la calibración. II) Morfología de los datos obtenidos con el control (sin administración, ■) y DIAZ (▲), representados como la amplitud de la espiga (%) en función del tiempo, en donde la respuesta a DIAZ disminuye a comparación del control (preadministración) y el registro control (sin administración). ■■■ = Tiempo de duración de la aplicación. La ↑ indica el momento de la administración



De esta manera en la gráfica 9 con la administración de DIAZ a 5 nM, se observa que el promedio de amplitud de la espiga disminuye en comparación con el control (preadministración) hasta los 5 min, posteriormente, aumenta por un periodo de 5 min y nuevamente tiende a disminuir manteniéndose constante hasta la finalización del registro.

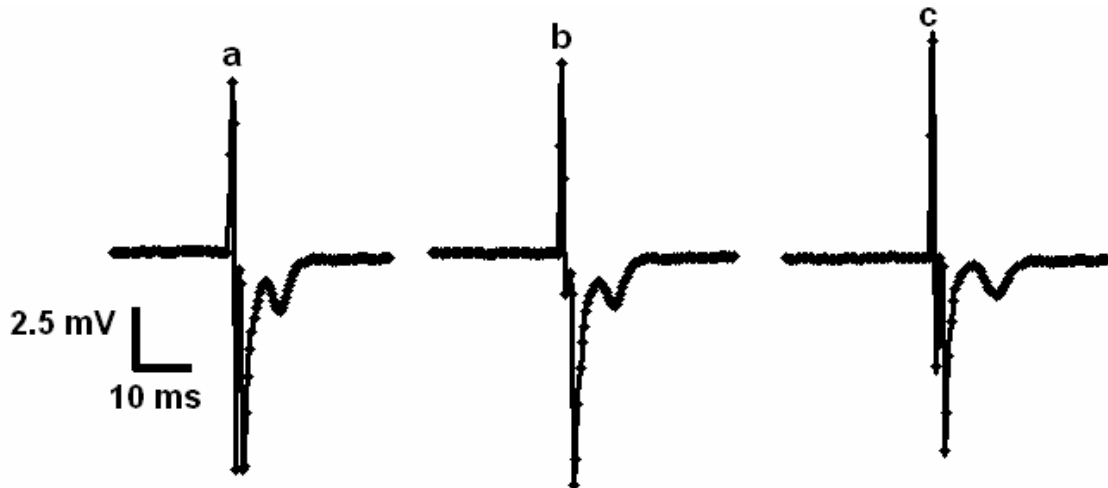
En el caso de la aplicación de DIAZ a 10.0 nM (**Gráfica 10**) se observa de igual forma una disminución del promedio de la amplitud de la espiga comparada con el control (preadministración); sin embargo, en esta última la disminución de la espiga es aún mayor en comparación a cuando se aplican las otras concentraciones (1.6 y 5.0 nM); la disminución de la respuesta se observa a partir de los 5 min, en donde se mantiene constante hasta 45 min, posteriormente, tiende a aumentar hasta la administración del LTP. Todos los grupos de datos presentan una diferencia significativa con relación al control (preadministración) y el registro control (sin administración).

Tomando en cuenta los resultados obtenidos con DIAZ, en la gráfica 11 se muestra una comparación de las respuestas obtenidas con la aplicación de las diferentes concentraciones de DIAZ (1.6, 5.0 y 10.0 nM), en donde también, se aprecia que a la concentración de 10 nM se presenta una disminución importante del promedio de la amplitud de la espiga poblacional, además se muestra que todas las gráficas en un determinado tiempo tienden a estabilizarse en el mismo punto.

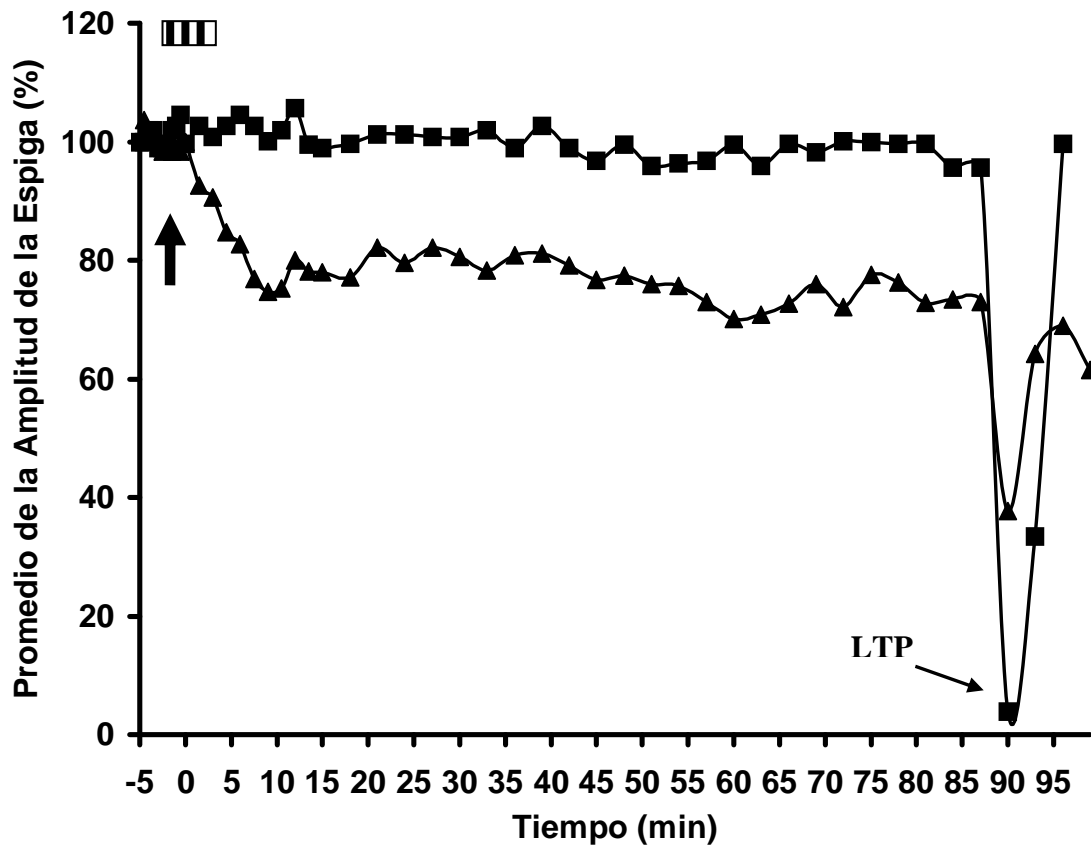
Por otro lado, en la gráfica 12 se presenta una comparación del promedio de la amplitud de la espiga \pm ESM a las concentraciones de DIAZ aplicadas, presentando una diferencia significativa de $*p < 0.05$.



I)



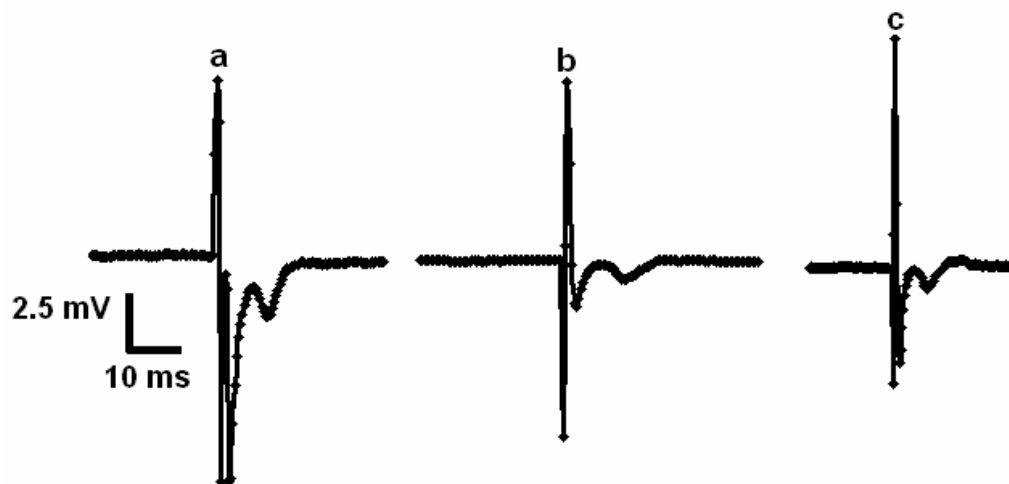
II)



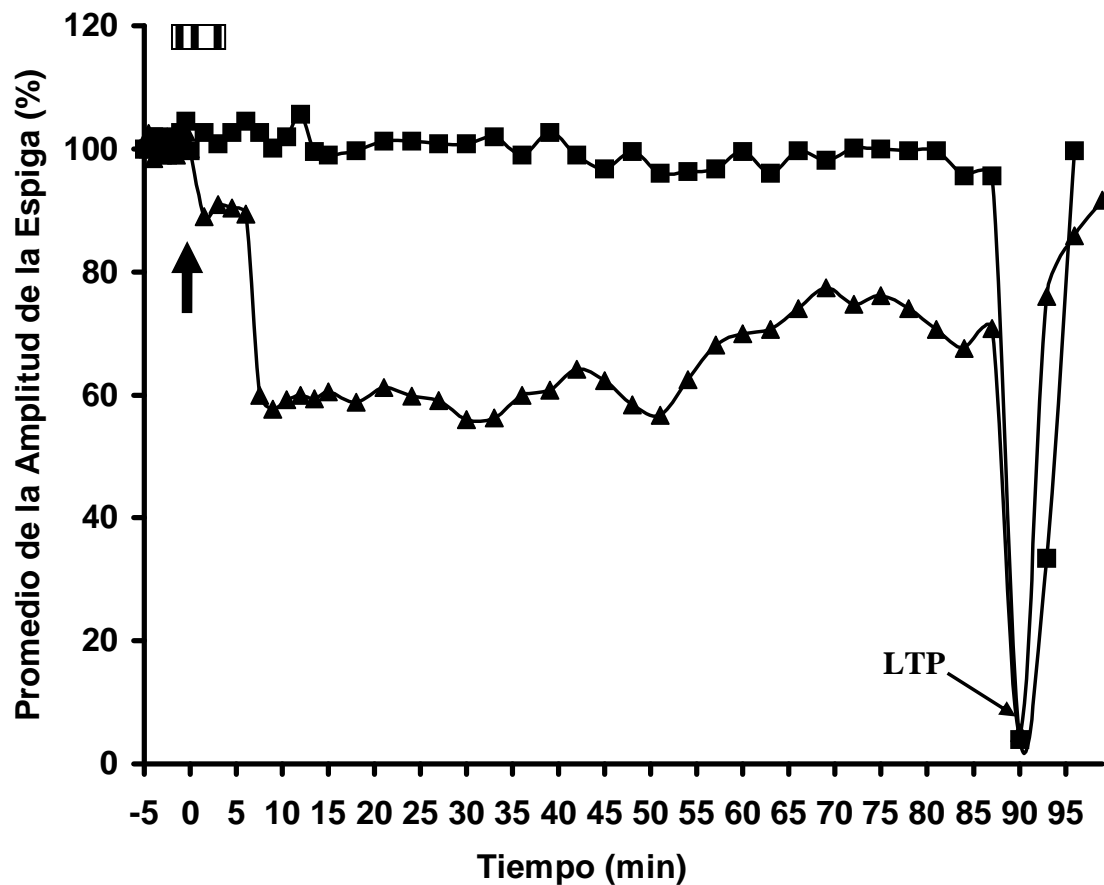
Gráfica 9. Efecto de DIAZ a 5.0 nM sobre la transmisión sináptica del hipocampo. I) Se muestran las espigas correspondientes al potencial de campo de una rebanada en donde: **a)** registro control (preadministración), **b)** registro postadministración de DIAZ y **c)** registro postaplicación del LTP. El trazo (└) indica la calibración. II) Morfología de los datos obtenidos con el control (sin administración, ■) y DIAZ (▲) representados como la amplitud de la espiga (%) en función del tiempo. Se observa que la respuesta a DIAZ disminuye comparado con el control (preadministración) y el registro control (sin administración).▨▨▨ = Tiempo de duración de la aplicación. La ↑ indica el momento de la administración



I)

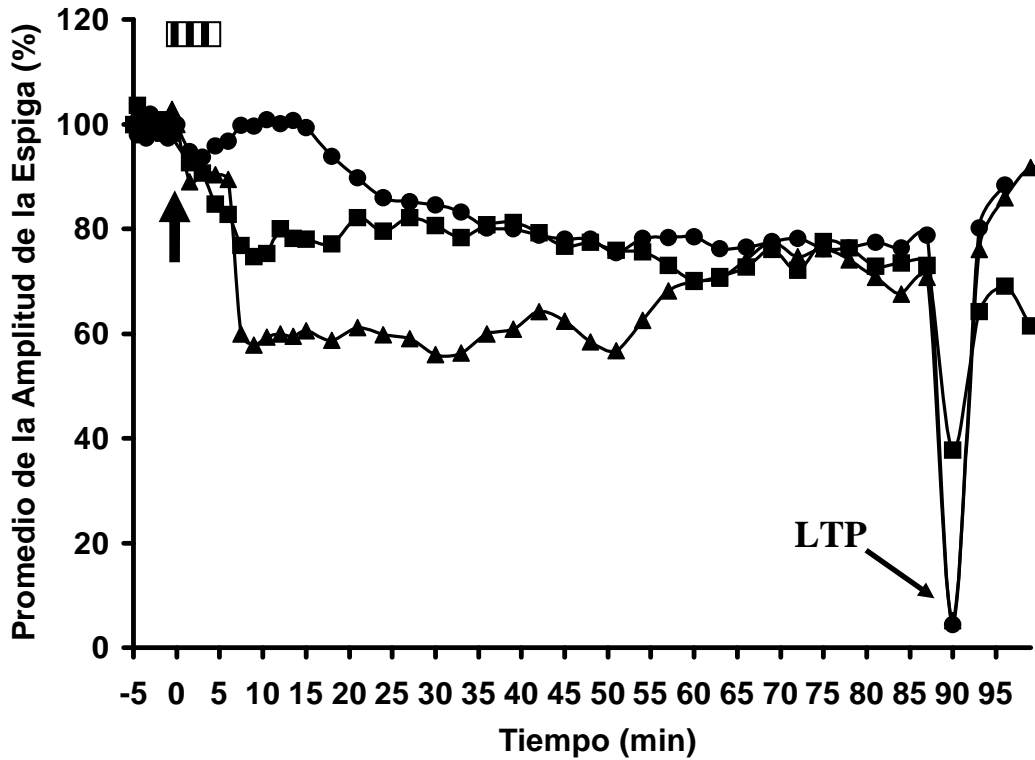


II)

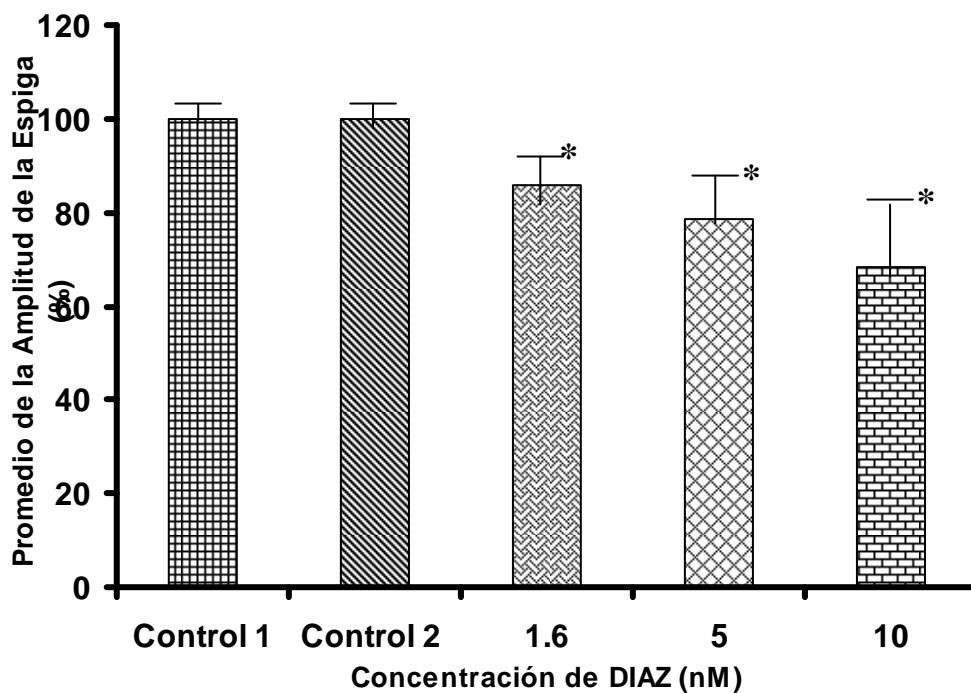


Gráfica 10. Efecto de DIAZ a 10.0 nM sobre la transmisión sináptica del hipocampo. I) Se muestran las espigas correspondientes al potencial de campo de una rebanada en donde: **a)** registro control, **b)** registro postadministración de DIAZ y **c)** registro postadministración del LTP. El trazo (┌) indica la calibración. II) Morfología de los datos obtenidos con el control (sin administración, ■) y DIAZ (▲) representados como la amplitud de la espiga (%) en función del tiempo, en donde la respuesta a DIAZ disminuye comparado con el control (preadministración) y el registro control (sin administración)





Gráfica 11. Comparación del efecto del DIAZ a las concentraciones aplicadas (1.6 (●), 5.0 (■), y 10.0 (▲), nM). Se muestra la amplitud de la espiga (%) en función del tiempo, en donde se observa que la disminución de la amplitud de la espiga está en función de la concentración de DIAZ. ■■■ = Tiempo de duración de la aplicación. La ↑ indica el momento de la administración de DIAZ.



Gráfica 12. Promedio de la amplitud de la espiga (%) \pm ESM de las concentraciones de DIAZ aplicadas (1.6, 5.0, y 10.0 nM) con una diferencia significativa de $*p < 0.05$. Control 1=control preadministración; Control 2= registro control sin administración.



VII.-DISCUSIÓN

Todos los registros electrofisiológicos de las rebanadas de cerebro se realizaron (u obtuvieron) entre las 11:00 y 12 horas, después de una estabilización de la respuesta de 45-60 min.

Al término de cada registro obtenido con MEL, GABA y DIAZ se aplico el LTP, para determinar la viabilidad de la rebanada y asegurar que los resultados obtenidos se presentaron por la aplicación de las sustancias. En todas las gráficas de los registros del potencial de campo, se observa que después de la aplicación del LTP el promedio de la amplitud de la espiga aumenta alcanzando un valor similar al del registro control (preadministración). El efecto que se establece al aplicar el LTP es un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular a través de los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) activados por glutamato como se ha reportado⁴²; entonces el cambio de la concentración de Ca^{2+} puede actuar como segundo mensajero para activar cascadas de señalamiento intracelular^{70, 71}.

Por otro lado, la acción de la MEL sobre la transmisión sináptica ha sido sujeto de estudio por diversos investigadores desde hace varios años; por ejemplo, Ayar y cols.,⁷ en 2001 reportaron en preparaciones de neuronas de raíz de ganglio dorsal de rata, que el efecto de MEL es predominantemente inhibitorio; sin embargo, otros autores reportan un efecto excitador por parte de MEL^{16, 59}. Con base a esto, se planteó que posiblemente la MEL puede interactuar con ambos sistemas de neurotransmisión excitación e inhibición regulando el potencial de los procesos que contribuyen a la formación de la memoria en el hipocampo y otras regiones del cerebro⁹².

Estudios posteriores plantearon que la situación que se observa en el hipocampo puede ser compleja y esto es evidente porque la MEL ejerce ambas acciones de excitación



e inhibición⁹²; Zeize y Semmen 1985¹¹¹, reportaron que la aplicación de bajas concentraciones de MEL (1.0 mM) en las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo de cobayo produce una excitabilidad; mientras que Hogan y cols., en 2001, reportaron que la aplicación de MEL produce una regulación bifásica (disminución seguida por un incremento) en los registros del potencial evocado en la región CA1 del hipocampo de ratón⁴⁸. Estos estudios electrofisiológicos, concuerdan con estudios relacionados en otros tejidos^{3,66,91}.

Lo anterior, nos permite explicar los resultados obtenidos en éste estudio donde el efecto producido por la aplicación de MEL a 15.0 μ M en las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo de rata produce un incremento de la respuesta electrofisiológica, mientras que a concentraciones de 30.0, 45.0, y 90.0 μ M, el efecto observado es una disminución de la misma respuesta, lo cual nos indica que la MEL presenta un efecto bifásico. Probablemente, la disminución de la respuesta electrofisiológica esté mediada a través del glutamato quien actúa en esta región por permitir la entrada del ion Ca^{2+} mediante los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato)⁷⁰. En tanto que la disminución pueda estar dada por la interacción de la MEL con los receptores MT1 y MT2 los cuales están acoplados a la proteína G_i , dando como posible resultado la inhibición de la adenilato ciclasa y por lo tanto la disminución de los niveles de AMPc, provocando con ello que la cascada de transducción de señales por parte del AMPc no se lleve a cabo¹⁰⁸. Otro posible mecanismo por el cual la MEL puede establecer este efecto de disminución, está dado a través del receptor GABA_A , tomando en cuenta que Wan y cols., en 1999 (citado por 106), reportaron que la aplicación de MEL disminuye la amplitud de la corriente en las neuronas de la región CA1 mediado por el receptor GABA_A , sin embargo, es posible que este efecto pueda estar dado por otro mecanismo a lo expuesto anteriormente.



En los resultados obtenidos con diferentes concentraciones de MEL (15.0, 30.0, 45.0 y 90.0 μM), que se muestran en la gráfica 5, el efecto bifásico observado es claro y similar si lo comparamos con los datos obtenidos por otros autores y en otros tejidos^{3,48, 66, 90}. Este efecto bifásico también se conoce como efecto bimodal y es similar al producido por algunos fármacos utilizados en la clínica (adrenalina)⁴⁰. En esta gráfica si comparamos la respuesta a 15.0 y 90.0 μM de MEL, el efecto bifásico es evidente (aumento y disminución de la respuesta electrofisiológica), situación que se aprecia mejor en la gráfica 6, donde se observa claramente el efecto gradual de la MEL a todas las concentraciones utilizadas y al compararlas con los controles son estadísticamente significativos.

Por otro lado; el efecto producido por la aplicación de GABA en la región CA1 de rebanadas de hipocampo aun no se han reportado, varios autores han realizado estudios en este tipo de células para identificar la presencia de receptores a GABA en el hipocampo utilizando para ello agonistas y antagonistas de GABA pero no GABA solo¹¹⁰. Nosotros realizamos un estudio extracelular de potencial de campo con la administración de GABA a 10.0 mM encontrando que produce una disminución inicial de la respuesta electrofisiológica en un determinado tiempo, sin embargo, a lo largo del periodo en que dura el registro, también se observa un incremento de la respuesta; por lo que podríamos decir que probablemente presente un efecto bifásico similar al producido por MEL estos resultados concuerdan con los obtenidos con la aplicación de GABA en otros tejidos⁶⁶, aún así, es necesario realizar más estudios que involucren diferentes concentraciones de GABA para establecer éste efecto en rebanadas de hipocampo de rata.

Con respecto a DIAZ, Xu y Sastry en 2005¹¹⁰, reportaron el efecto de DIAZ en neuronas piramidales de la región CA1 de hipocampo de rata; en registros intracelulares cuantificando la amplitud del potencial postsináptico inhibitor (PPSI) encontrando que el DIAZ aumenta este PPSI. En nuestro estudio se realizó un registro extracelular sobre el



potencial sináptico excitador y los resultados indican que la respuesta disminuye con la aplicación de DIAZ (1.6, 5.0 y 10.0 nM), por lo que podemos decir que nuestros resultados se corroboran con lo planteado por estos autores, a pesar de ser diferentes tipos de estudios (intracelular-extracelular), el resultado es similar

De esta manera en la gráfica 11 se muestra una CDRG a DIAZ, en donde se observa que la respuesta electrofisiológica disminuye con la aplicación de las diferentes concentraciones de DIAZ (1.6 5.0 y 10.0 nM), lo que indica que este tipo de respuesta es concentración-dependiente. EL mecanismo por el cual el DIAZ ejerce este efecto es a través de la interacción con el receptor GABA_A presente en el hipocampo; el DIAZ actúa de forma alostérica potenciado la acción del GABA, al producir un efecto inhibitor por hiperpolarización a través de la apertura de canales de Cl⁻ lo que provoca una inhibición de la sensibilidad de la neurona a la excitación^{87, 40, 110}. En la gráfica 12 se observa con mayor claridad la disminución de la respuesta por parte de DIAZ, y comparadas con los resultados de los controles, todas las concentraciones aplicadas (1.6, 5.0 y 10.0 nM) presentan una diferencia significativa de $p < 0.05$.

Estos datos muestran claramente el efecto bifásico de las sustancias utilizadas sobre la respuesta electrofisiológica de las neuronas piramidales de la región CA 1 de hipocampo de rata.



VIII.-CONCLUSIONES

- La MEL produce un incremento de la respuesta electrofisiológica de los potenciales evocados a la concentración de 15.0 μ M.
- La MEL produce una disminución de la respuesta electrofisiológica de los potenciales evocados a las concentraciones de 30.0, 45.0 y 90.0 μ M.
- EL efecto de la MEL sobre la actividad electrofisiológica en el hipocampo provoca un efecto bifásico de aumento-disminución del parámetro de medición utilizado (potencial de campo). Siendo este un efecto dependiente de la concentración.
- El GABA a una concentración de 10.0 mM produce un aumento de la respuesta electrofisiológica, así como una disminución de la misma, presentando un efecto bifásico sobre la actividad registrada.
- EL efecto producido por DIAZ a diversas concentraciones, es una disminución de la respuesta dependiente de la concentración.

De esta manera, las conclusiones obtenidas anteriormente, se correlacionan con las hipótesis planteadas para el estudio realizado con la aplicación de MEL, GABA y DIAZ en los registros electrofisiológicos (extracelulares) del hipocampo de rata.



IX.- BIBLIOGRAFÍA

1. **Ackermann K, Stehle J.H.** Melatonin synthesis in the human pineal gland: advantage implications, and difficulties. *Chronobiol Int*, 2006; 23 (1-2): 369-79.
2. **Affi Adel K, Bergman RA.** Neuroanatomia funcional. Cap 21: Sistema Límbico. Ed Mac Graw-Hill Interamericana. México 1999 428-436.
3. **Aguilar Mauleón, M.** Efectos GABAérgicos del los 5-Metoxindoles de la glándula pineal sobre la contracción del músculo liso intestinal. Tesis Licenciatura. Escuela de Ciencias Químicas. BUAP. 1992.
4. **Aldhous M, Franey C, Wright J, Arendt J.** Plasma concentrations of melatonin in man following oral absorption of different preparations. *Br J Clin Pharmacol* 1985;19 (4) :517-521.
5. **Amaral DG, Witter MP.** The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neurosci*, 1989; 31(3): 571-591.
6. **Aust S, Thalhammer T, Humpeler S, Jäger W, Klimpfinger M, Tucek G, Obrist P, Markt W, Penner E and Ekmekcioglu C.** The melatonin receptor subtype MT1 is expressed in human gallbladder epithelia. *J Pineal Res*, 2004; 36:43-48.
7. **Ayar A, Martin DJ, Ozcan M, Kelestimur H.** Melatonin inhibits high voltage activated calcium currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones. *Neurosci Lett*, 2001;313(1-2):73-77.
8. **Banerje S, Margulis L.** Mitotic arrest by melatonin. *Exp Cell Res* 1973; 78 (2):314-318.
9. **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. *The J. of Pharmacol and Exp Therap.* 1991; 2:258: 490-494
10. **Barrenetxe J; Delagrangre P; and Martínez JA.** Physiological and metabolic functions of melatonin. *J Physiol Biochem*, 2004; 60(1):61-72.
11. **Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT.** Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Curr Top Med Chem*, 2002; 2:113-132.
12. **Bondarenko LA.** The Biochemical aspects of pineal gland functioning in the rat in ontogeny. *Ontogenes*, 1991; 22(1): 57-62.
13. **Bormann J.** The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2000; 21(1):16-9.
14. **Braestrup C, Squires RF.** Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3H)diazepam binding, *Proc Natl Acad Sci, U. S. A.* 1977; 74 (9): 3805-3809.
15. **Bromme HJ, Morke W, Peschke D, Ebelt H, Peschke D.** Scavenging effect of melatonin on hydroxy radicals generated by alloxan. *J Pineal Res*, 2000; 29(4):201-208.



16. **Brotto LA, Gorzalka BB.** Melatonin enhances sexual behavior in the male rat. *Physiol Behav*, 2000; 68(4):483-6.
17. **Brown T. H. and Zador A. M.** In the synaptic organization of the brain *Molecular*, Chapter 11, Hippocampus, IRL Press of Oxford University Press. 1991 pp 346-388.
18. **Cabeza J, Alarcon-de-la-Lastra C, Jimenez D, Martin MJ, Jimenez D, Motilva V.** Melatonin modulates the effects of gastric injury in rats: role of prostaglandins and nitric oxide. *Neurosignals*, 2003; 12 (2):71-77.
19. **Campo-Soria C, Chang Y, Weiss DS;** Mechanism of action of benzodiazepines on GABA (A) receptors. *Br J Pharmacol*, 2006; 148(7):984-90.
20. **Cardinali P.** Neuroendocrinología; Glándula pineal. (Schiaffini) Salvat Editores. 1985: 309.
21. **Cardinali D.P.** Melatonin: a mammalian pineal hormone. *Endocrinol Rev.* 1981; 2: 327-354-
22. **Cardinali DP, Nagle CA, Rosner JM.** Effects of environmental lighting on the function of the pineal gland. *Acta Physiol Lat Am*, 1975; 25(3):153-64
23. **Chebib M.** GABAC receptor ion channels. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004; 31(11): 800– 804.
24. **Claustrat B, Brun J, Garry P, Roussel B, Sassolas G.** A once-repeated study of nocturnal plasma melatonin patterns and sleep recordings in six normal young men. *J Pineal Res*, 1986; 3 (4):301-310.
25. **Claustrat B, Brun J, David M, Sassolas G, Chazot G.** Melatonin and jet lag: confirmatory result using a simplified protocol. *Biol Psychiatry*, 1992; 32 (8):705-711.
26. **Clemens JW, Jarzynka MJ, Witt-Enderby PA.** Down-regulation of mt1 melatonin receptors in rat ovary following estrogen exposure. *Life Sciences*, 2001; 69(1):27–35.
27. **Conn Michael P; Freeman Marc E.** Neuroendocrinology in Physiology and Medicine. Cap 23: Influence of Light and Pineal Gland on Biological Rhythms. Humana Press EUA. 2000 pp 405-420.
28. **Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni JM.** Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res* 2000; 28 (4) :193-202
29. **Cos S, Sanchez-Barcelo EJ.** Differences between pulsatile or continuous exposure to melatonin on MCF-7 human breast cancer cell proliferation. *Cancer Lett*, 1994; 85:105-109.
30. **Czanorcki J. and Sastry P. S.** The lipids of human pineal gland. London, Pergamon Press. 1969, pp 49.



31. **Demuro RL, Nafziger AN, Blask DE, Menhinick AM, Bertino JS Jr.** The absolute bioavailability of oral melatonin. *J Clin Pharmacol*, 2000; 40(7): 781-784.
32. **Dorantes Y; Martínez C; Guzmán A.** *Endocrinología Clínica* 2ª ed. Cap 10: Glándula pineal. *El Manual Moderno*, México D.F. 2005 pp 93-1001.
33. **Drucker CR.** *Fisiología Médica*. Cap 46: Ritmos biológicos endocrinos y glándula pineal. *El Manual Moderno México*. 2005 pp511-516.
34. **Dubocovich ML, Yun K, Al-Ghoul WM, Benloucif S, Masana MI.** Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *FASEB Journal*, 1998; 12(12):1211–20.
35. **Ferini-Strambi L, Zucconi M, Biella G,** et al. Effect of melatonin on sleep microstructure: preliminary results in healthy subjects. *Sleep*, 1993; 16 (8):744-747.
36. **Fernández –Espejo E.** Basic neurobiology of hippocampal formation. *Rev Neurol*, 1996; 24(131): 779-784.
37. **Feuer G.** Biochemistry of the pineal gland as an endocrine organ. *Drug Metabol. Drug Interact.* 1990; 8 (3-4): 203-207.
38. **Garfinkel D, Laudon M, Nof D, Zisapel N. Nof D.** Improvement of sleep quality in elderly people by controlled-release melatonin. *Lancet*, 1995; 346 (8974): 541-544.
39. **Giap BT, Jong CN, Ricker JH, Cullen NK, Zafonte RD.** The Hippocampus: Anatomy, Pathophysiology, and Regenerative capacity. *J Head Trauma Rehabil*, 2000; 15(3): 875-894.
40. **Goodman LS and Gilman A.** The pharmacological basis of therapeutics. Chapter: Hipnotics and Sedatives and Chapter Neurotransmission and the central Nervous System. 11th ed. Volume 1 México City: McGraw-Hill. 2006
41. **Greenspan F, Gardner D.** *Endocrinología Básica y Clínica*. 5ª ed. Cap 5: Glándula pineal y órganos circunventriculares. *El Manual Moderno*, México, 2005 pp 128-129
42. **Hammond C.** *Cellular and molecular Neurobiology*. Ed Academic Press. Cap 19: Synaptic Plasticity. 1996 pp 415-441.
43. **Hardeland, R.** Antioxidative protection by melatonin—Multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine*, 2005; 27(2):119–130.
44. **Hardeland, RJ.** New actions of melatonin and their relevance to biometeorology. *Int J Biometeorol*, 1997; 41(2):47-57.
45. **Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali. DP.** Melatonin. *The Int J Biochemi Cell Biol*, 2006; 38: 313–316.
46. **Hirata, F, Hayaishi, O, Tokuyama, T, & Senoh S.** (1974). In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J Biol Chem*, 1974; 249(4): 1311–1313



47. **Hoffman R. A, Reiter R. J.** Pineal Gland: influence on gonads of melatonin and related indolamines. *Science*, 1965; 148: 1609-1611.
48. **Hogan MV, El-Sherif Y, Wieraszko A.** The modulation of neuronal activity by melatonin: in vitro studies on mouse hippocampal slices. *J Pineal Res*, 2001; 30(2):87-96.
49. **Houssay Alberto B, Cingolani Horacio E.** Fisiología médica. Cap 49: Fisiología de la glándula pineal. 9ª ed. Argentina, El Ateneo. 2000 pp 633-637.
50. **Index Merck** (2005)
51. **Iuvone PM, Brown AD, Haque R, Weller J, Zawilska JB, Chaurasia SS, Ma M, Klein DC.** Retinal melatonin production: role of proteasomal proteolysis in circadian and photic control of arylalkylamine N-acetyltransferase. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002; 43 (2):564-572.
52. **Jara Albarrán A.** Endocrinología. Cap 5: Neuroendocrinología hipotálamo y glándula pineal. ED. Médica panamericana. España Madrid. 2003pp 30-35.
53. **Jin X, Von Gall C, Pieschl R. L, Gribkoff VK, Stehle JH, Reppert SM, Weaver DR.** Targeted disruption of the mouse Mel1b melatonin receptor. *Mol Cell Biol*. 2003; 23(3), 1054–1060.
54. **Johnston GA.** GABA A receptor channel pharmacology. *Curr Pharm Des*. 2005; 11(15):1867-85.
55. **Kandel Eric.** Principios de Neurociencia. 4ta ED. Cap 10: Aspectos generales de la Transmisión Sináptica. Ed McGraw-Hill Interamericana. España. 2001 pp 115-210
56. **Kerr DI, Ong J.** GABAB receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995; 67:187–246.
57. **Kitay JL. and Altschule MD.** The Pineal Gland. A review of the Physiologic. *Literatur Harvard University Press, Boston.* 1954.
58. **Klein OC. and Moore RY.** Pineal N-acetyltransferase and hidroxindole-O-methyltransferase: control by retina hypothalamic tract and suprachiasmatic nucleus. *Brain Res*, 1979; 174(2): 245-262.
59. **Leon J, Vives F, Gomez I, Camacho E, Gallo MA, Espinosa A, Escames G, Acuna-Castroviejo D.** Modulation of rat striatal glutamatergic response in search for new neuroprotective agents: evaluation of melatonin and some kynurenine derivatives. *Brain Res Bull*, 1998; 45(5):525-30.
60. **Lerner, AB, Case JD, Takahashi Y.** Isolation of melatonin, a pineal factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc*, 1958 80, 2057–2058.
61. **Lima LM, Reis, LC. AND Lima MA.** Influence of the pineal gland on the physiology, morphometry and morphology of pancreatic islets in rats. *Rev Brasil Biol*, 2001; 61(2): 333-340.



62. **Lissoni P, Ardizzioia A, Tisi E, Rossini F, Barni S, Tancini G, Conti A, Maestroni GJ.** Amplification of eosinophilia by melatonin during the immunotherapy of cancer with interleukin-2. *J Biol Regul Homeost Agents* 1993; 7 (1):34-36.
63. **Lissoni P, Barni S, Tancini G, Rovelli F, Ardizzioia A, Conti A, Maestroni GJ.** A study of the mechanisms involved in the immunostimulatory action of the pineal hormone in cancer patients. *Oncology*, 1993;50(6) :399-40
64. **Liu C, Weaver DR, Jin X, Shearman LP, et al.** Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron*, 1997; 19(1):91-102.
65. **López PM, Águeda MC, López FM et al.** Comparison of melatonin versus vitamin C on oxidative stress and antioxidant enzyme activity in Alzheimer disease induced by okadaic acid in neuroblastoma cells. *European journal of Pharmacology*. 2002 451: 237-243
66. **Lozano-BernaL, G.** Interacción Farmacológica entre MEL, GABA y Flumazenil. Tesis Licenciatura QFB. Facultad de Química UNAM. 2007
67. **Macdonald RL, Olsen RW.** GABAA receptor channels, *Annu. Rev Neurosci*, 1994 17:569- 602.
68. **Madison D. V.** Whole-cell voltaje-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. 1993 pp 137-149.
69. **Maestroni GJ.** The immunotherapeutic potencial of melatonin. *Expert Opin Investig Drugs*, 2001; 10 (3):467-476.
70. **Malenka RC. and Nicoll R. A.** Long Term Potentiation- A Decade of Progress. *Sci*, 1999; 285: 1870-1874.
71. **Malinow R, Mainen Z F and Hay Y.** LTP mechanisms: from silence to four-lane traffic. *Neurobiol*, 2000, 10:352-357.
72. **Masson-Pevet M, Gauer F, Schuster C, Guerrero Y.** Photic regulation of mt(1) melatonin receptors and 2-iodomelatonin binding in the rat and Siberian hamster. *Biol Signals Recept*, 2000; 9(3-4):188-196.
73. **Macchi Mila M, Bruce N. Jeffrey.** Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol*, 2004; 25: 177-195.
74. **Mccord C. P. and Allen F.D.** Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *Exp*. 2001; 1917; 23: 217-224.
75. **Mcnulty JA, Mcreynolds HD. and Bowman DC.** Pineal gland free amino acids and indoles during postnatal development of the rat: correlations in individual gland. *J Pineal Res*, 1990; 9(1): 65-73.



76. **Molina-Carballo A, Munoz-Hoyos A, Reiter RJ, Sanchez-Forte M, Moreno-Madrid F, Rufo-Campos M, Molina-Font JA, Acuna-Castroviejo D.** Utility of high doses of melatonin as adjunctive anticonvulsant therapy in a child with severe myoclonic epilepsy: two years' experience. *J Pineal Res*, 1997; 23(2):97-105.
77. **Morin D, Simon N, Depres-Brummer P, Levi F, Tillement JP, Urien S.** Melatonin high-affinity binding to alpha-1-acid glycoprotein in human serum. *Pharmacol*, 1997; 54 (5):271-275.
78. **Naranjo-Rodríguez EB, Osornio AO, Hernández-Avita E, Mendoza-Fernández V and Escobar A.** Anxiolytic-like actions of melatonin, 5-metoxytryptophol, 5-hydroxytryptophol and benzodiazepines on a conflict procedure. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2000, 24(1):117-29.
79. **Narimatsu E, Niiya T, Kawamata M, Namiki A** The mechanisms of depression by benzodiazepines, barbiturates and propofol of excitatory synaptic transmissions mediated by adenosineneuromodulation. *Masui*. 2006; 55(6):684-691.
80. **Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrang P, Canet E, Boutin JA.** Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem*, 2000; 275 (40):31311–31317.
81. **Oka M, Wada M, Wu Q, Yamamoto A, Fujita T.** Functional expression of metabotropic GABA_B receptors in primary cultures of astrocytes from rat cerebral cortex. *Biochem Biophys Res Comm*, 2006; 341 (3): 874-881..
82. **Pardridge WM, Mietus LJ.** Transport of albumin bound melatonin through the blood-brain barrier. *J Neurochem*, 1980; 34(6):1761-1763.
83. **Pieri C, Marra M, Moroni F, et al.** Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci*, 1994; 55 (15):PL271-276.
84. **Poeggeler B, Thuermann S, Dose A, Schoenke M, Burkhardt S, Hardeland R.** Melatonin's unique radical scavenging properties—Roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs. *J. Pineal Res*, 2002; 33(1) :20-30.
85. **Purves D, Augustine JG.** Invitación a la Neurociencia. Cap 5: Transmisión sináptica Ed. Panamericana. Buenos Aires Argentina. 2001 pp 93-107.
86. **Ram PT, Dai J, Yuan L, et al.** Involvement of the mt1 melatonin receptor in human breast cancer. *Cancer Letters*, 2002; 179(2):141–150.
87. **Rang** Farmacología. Cap 32: Aminoácidos transmisores y Cap 32: Sedante e Hipnóticos .5ta ed. El sevier 2004. pp 467-468, 517-522
88. **Reis LC, Sousa JC, Borges LS, et al.** Metabolic changes and plasmatic biochemistry after pinealectomy in rats. *Rev Méd Minas Gerais*, 1996, 6(3): 101-103.
89. **Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX.** Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci*, 2000; 917:376- 386.



90. **Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella JF.** Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(19):8734–8738.
91. **Rodríguez Vega ML.** Acciones antiadrenérgicas de la melatonina sobre la contracción inducida eléctricamente del conducto deferente de rata. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química UNAM. 1990.
92. **Saenz DA, Goldin AP, Mince L, Chianelli M, Sarmiento MI, Rosenstein RE** Effect of melatonin on the retinal glutamate/glutamine cycle in the golden hamster retina. *FASEB J.* 2004; 18(15):1912-3.
93. **Schuster C, Gauer F, Malan A, Recio J, Pevet P, Malan A, Masson-Pevet M.** The circadian clock, light/dark cycle and melatonin are differentially involved in the expression of daily and photoperiodic variations in mt(1) melatonin receptors in the Siberian and Syrian hamsters. *Neuroendocrinol*, 2001; 74(1):55–68.
94. **Scremin O.** Cerebral vascular system. In: *The rat nervous system. Second Edition.* Edited by George Paxinos. Academia Press. 1995 pp 3-35.
95. **Sewerynek E, Reiter RJ, Melchiorri D, Ortiz GG, Lewinski A.** Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: protection by melatonin. *Hepatogastroenterol*, 1996; 43(10):898-905.
96. **Shepherd GM.** *Neurobiology*, Second edition, New York Oxford University Press. 1988 pp 145-176.
97. **Sid Gilman, Sarah Winans.** *Neuroanatomía y Neurofisiología Clínica de Manter Y Gatz.* Cap 2: Fisiología de la célula nerviosa. Ed. El Manual Moderno. México. 2003, pp17-23.
98. **Sprenger J., Hardeland R., Fuhrberg B., et al.** Melatonin and other 5-methoxylated indoles in yeast: Presence in high concentrations and dependence on tryptophan availability. *Cytologia*, 1999, 64:209-213.
99. **Teyler Timothy J.** Brain Slice Preparation: Hippocampus. *Research Bulletin*. 1980 5(4): 391-403.
100. **Ting KN, Blaylock NA, Sugden D, Delagrange P, Scalbert E, Wilson VG.** Molecular and pharmacological evidence for MT1 melatonin receptor subtype in the tail artery of juvenile Wistar rats. *Br J Pharmacol*, 1999; 127 (4):987–995.
101. **Vademécum Farmacéutico.** 9ª ed, Editores Rezza. 2000.
102. **Velasco A.** *Farmacología Fundamental.* Cap: 19 Introducción a la Farmacología del Sistema Nervioso Central y Cap 21: Fármacos Sedante-Hipnótico Interamericana-Mc Graw-Hill. España. 2003 pp 247-248, 268-274
103. **Velázquez A.** *Farmacología Básica y Clínica.* 17ª. Edición. Editorial Panamericana. España. 2005. pp. 59-73.



104. **Waldhauser F, Waldhauser M, Lieberman HR, Deng MH, Lynch HJ, Wurtman RJ.** Bioavailability of oral melatonin in humans. *Neuroendocrinol.* 1984;39 (4):307-3.
105. **Wang F, Li J, Wu C, Yang J, Xu F, Zhao Q.** The GABA (A) receptor mediates the hypnotic activity of melatonin in rats. *Pharmacol Biochem Beba,* 2003; 74 (3):573-578.
106. **Wang LM, Suthana NA, Chaudhury D, Weaver DR, Colwell.** Melatonin inhibits hippocampal long-term potentiation. *CS. Eur J Neurosci,* 2005; 22(9):2231-2237.
107. **Williams R. H.** Tratado de endocrinología. 6^{ta} ed. Cap 10: La glándula pineal y órganos periventriculares. Interamericana. 1985 pp 673-677.
108. **Witt-Enderby PA, Bennett J, Jarzynka M J., Firestine Steven, Melan MA.** Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci,* 2003; 72: 2183–2198.
109. **Wong PY and Fritze I.** Determination by neuron activated of cooper, manganese and zinc in the pineal body and others areas of brain tissue. *J Neurochem,* 1969; 16: 1231-1235.
110. **Xu J-Y, Sastry BR.** Benzodiazepine involvement in LTP of the GABA-ergicalIPSC in rat hippocampal CA1 neurons. *Brain Research,* 2005; 1062:134-143
111. **Zeise ML, Semm P.** Melatonin lowers excitability of guinea pig hippocampal neurons in vitro. *J Comp Physiol,* 1985; 157(1):23-9.

Páginas electrónicas consultadas:

112. <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/neurobioquimica/GABA.htm>
113. <http://en.wikipedia.org/wiki/Hippocampus>
114. <http://www.neuroscience.bham.ac.uk/.../hippocampus.htm>
115. <http://www.bris.ac.uk/.../info/pathway/hippocampal.htm>
116. http://en.wikipedia.org/wiki/Long-term_potentiation
117. <http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/drugbank/>
118. <http://www.iibce.edu.uy/neuromol/index.htm>



X. ANEXOS





EFECTO DE MELATONINA, GABA, DIAZEPAM EN REBANADAS DE CEREBRO DE RATA

Jenny Reyes-Flores, Xóchitl P. Vega-Acevedo, Ofelia Espejo-González, Elia B. Naranjo-Rodríguez.

Departamento de Farmacia. Facultad de Química. UNAM. Ciudad Universitaria. México, D.F.
04510

jer_flores21@yahoo.com.mx

La melatonina (MEL) es una hormona secretada por la glándula pineal. Hasta la fecha, no es claro su mecanismo de acción. La MEL tiene efectos en tejidos aislados, por lo que se estudiará su efecto en rebanadas de cerebro. Utilizamos rebanadas de hipocampo de rata hembras o machos (Wistar, 40g Harlan, México, S.A. de C.V.), con perfusión constante en líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA), específicamente de la región CA1 (fibras colaterales de Schaffer). Las rebanadas de los cerebros se colocaron en un sistema convencional "In Vitro" para rebanadas de cerebro. Los registros obtenidos serán extracelulares y se basarán en los siguientes efectos: respuesta repetitiva, con trenes de estimulación de frecuencias bajas (1Hz), valores de la espiga (amplitud y frecuencia), y serán comparados con el control positivo (ATP, GABA o Diazepam). Los datos se capturan en una PC, y se analizarán con una t de Student. Con estos estudios demostraremos, como la MEL tiene la habilidad de modular específicas formas de plasticidad, en neuronas piramidales del hipocampo.

Proyecto apoyado por **PAPIIT-DGAPA-UNAM. Clave No. IN205905**



Su trabajo para la presentación en póster en el Tercer Encuentro “Participación de la Mujer en la Ciencia” titulado:

“EFECTO DE MELATONINA, GABA, DIAZEPAM EN REBANADAS DE CEREBRO DE RATA”

Ha sido registrado con la clave S2- MCS-16 para presentarse el día JUEVES 18 de Mayo del presente año de 17:45-19:15hrs (SESIÓN II) en el salón de usos múltiples del Centro de Investigaciones en Óptica.