



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANSIOLÍTICO DE
MELATONINA, SUS ANÁLOGOS (M1A,M2C,M3A) Y
BUSPIRONA POR MEDIO DE INTERACCIONES
FARMACOLÓGICAS CON SUS ANTAGONISTAS”.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

NALLELY ALCOCER CORNEJO



MÉXICO, D. F.,

2009



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.

A la Dra. Elia Brosla Naranjo Rodríguez, por su confianza, apoyo y paciencia. Gracias por darme la oportunidad de hacer este trabajo, por transmitirme sus conocimientos y por la calidad de ser humano que es.

Al Dr. Alfonso S. Lira Rocha, por su ayuda y apoyo.

A el MVZ. Atonatiu E. Gómez Martínez, por su ayuda, apoyo e instalaciones prestadas.

A la Dra. María Eva González Trujano, por su apoyo y consejos.

A Lilia Cornejo Barrera y José Luis Alcocer de León, por darme la vida, el cuidado y el amor de Padres. Por ustedes soy quien soy. Mamá: aunque hace tiempo no te veo se que siempre estas conmigo (en mi corazón) gracias por enseñarme el camino de la vida a luchar por lo que quiero a ser perseverante. Papá gracias por estar ahí siempre que lo necesito, por apoyarme en las buenas y malas, por impulsarme cuando siento que no puedo más, por creer siempre en mi.

Tía Lucy, sabes que eres parte fundamental de lo que soy. Gracias por tu apoyo, cariño y dedicación. Te quiero mucho.

Jesús, gracias por amarme y darme un motivo para vivir, por apoyarme, ayudarme, escucharme cuando lo necesito, por enseñarme a ver la vida diferente TE AMO.

Tere, contigo descubrí que la vida es maravillosa, que vale la pena vivir, me ha dado la oportunidad de ser mamá, de enseñarte a vivir, de aprender y comprender muchas cosas TE AMO MI CHIQUINININA.

Liliana y Galo, siempre están cuando los necesito, me apoyan, cuidan, guían y jalan las orejas cuando lo necesito. Sin ustedes la vida sería muy complicada, gracias por ser mis hermanos los quiero mucho.

Emilio y Maryfer, los quiero mucho chaparros, de ustedes he aprendido tantas cosas, gracias por preocuparse siempre por mi, por ser mis cómplices y hacerme la vida más agradable.

Parame y Armando, vivir con ustedes fue toda una experiencia, pasamos tantas cosas juntos los quiero mucho.

Tíos: Julia, Miguel Ángel, Judith y Mario, gracias por su apoyo, cariño y ejemplo.

Abuelito Galo, siempre nos cuidaste, apoyaste e inculcaste valores, principios y respeto. Te quiero y extraño.

Abuelita Esther nunca comprendí el ángel que eras, a pesar de todo vivías siempre alegre. Te quiero y extraño.

“EL AYER ES HISTORIA, EL MAÑANA ES UN MISTERIO PERO EL HOY ES UN OBSEQUIO, POR ESO SE LLAMA PRESENTE”

Este proyecto se realizó con el apoyo parcial otorgado por el proyecto PAPIIT-DGAPA-UNAM., con clave IN 205905.

Este proyecto se realizó con el apoyo parcial otorgado por el PAIP-Facultad de Química, UNAM con clave: 6390-21.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	I
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. ANSIEDAD	2
2.2. SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN.....	3
2.3. GLÁNDULA PINEAL	10
2.4. MELATONINA Y ANÁLOGOS	12
2.5. TRATAMIENTO TERAPEÚTICO DE ANSIEDAD.....	16
2.6. INTERACCIONES FARMACODINÁMICAS Y FARMACOCINÉTICAS.....	20
2.7. MODELOS DE ANSIEDAD	23
2.8. PLUS-MAZE.....	26
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. OBJETIVOS	30
4.1.OBJETIVO GENERAL.....	30
4.2.OBJETIVOS PARTICULARES.....	30
5. HIPÓTESIS	31
6. METODOLOGÍA	32
7. RESULTADOS	38
8. ANÁLISIS DE RESULTADOS	50
9. CONCLUSIONES	53
10. BIBLIOGRAFÍA	54
11. ANEXO I	59

ABREVIATURAS

aa=Aminoácidos
A= Adrenalina
BUS=Buspirona
BZP=Benzodiacepina
BZPs=Benzodiacepinas
Ca²⁺=Calcio
CCK=Colecistokinina
CDP=Clordiazepóxido
Cl=iones cloruro
CMRGABA=Complejo macromolecular del receptor del ácido gamma-amino butírico
DA=Dopamina
DAérgico=Dopaminérgico
DIAZ= Diacepam
DMS-IV= Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder [por sus siglas en inglés]
DL₅₀=Dosis letal 50
Ejem=Ejemplo
EEM= Error estándar de la media
Etc=Etcétera
GABA=(GAMMA Amino Butyric Acid.) [Por sus siglas en inglés]
GP=Glándula Pineal
5-HT= 5-Hidroxitriptamina = Serotonina
HIOMT=Hidroxiindol-O-metil transferasa
ÍNT=Íntegras
i. m.=Intramuscular
i. v.=Intravenosa
i.p.=Intraperitoneal
IFB= Factor inhibidor de las BZP [Por sus siglas en inglés]
IMAO Inhibidor de la monoaminoxidasa
IUPHAR=International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [por sus siglas en inglés]
LC=Locus coreleus
LUZ=Luzindol
MEL=Melatonina
NA=Noradrenalina
NAérgico =Noradrenérgico
NAT=N-acetiltransferasa
NMDA=N-metil-D-Aspartato
NPY=Neuropéptido Y
NSQ=Núcleo suprasquiasmático
OMS=Organización Mundial de la Salud
PCPA=Paraclorofenilalanina
PEG=Propilenglicol
pg=picogramos
rpm=Revoluciones por minuto
RMN=Resonancia Magnética Nuclear
t_{1/2} = Tiempo de vida media
SL=Sistema Límbico
SN=Sistema Nervioso

SNA=Sistema Nervioso Autónomo
SNC=Sistema Nervioso Central
SNP=Sistema Nervioso Parasimpático
SNS=Sistema Nervioso Simpático
SSA=Secretaria de Salud
TA=Trastorno de Ansiedad
TAG=Trastorno de Ansiedad Generalizada
TOC=Trastorno Obsesivo Compulsivo
TPET=Trastorno por Estrés Postraumático
VEHIC = Vehículo

INTRODUCCIÓN

La ansiedad es el tipo más frecuente de alteración psiquiátrica; causada por factores fisiológicos o psicológicos, ésta puede aparecer repetida, gradual y a menudo desapercibidamente. Actualmente el tratamiento prototipo utilizado para disminuir, atenuar o erradicar los síntomas de ansiedad son las benzodiazepinas (BZPs) que poseen efecto sedante hipnótico y relajante muscular pero producen efectos adversos como la dependencia y tolerancia; por lo tanto, en la búsqueda de fármacos ansiolíticos con menores efectos adversos encontramos que la MEL es una sustancia ansiolítica. La MEL es una hormona secretada en la glándula pineal (GP) provoca efectos similares al Diacepam (DIAZ) pero su vida media es muy corta (30 min.) por lo tanto, en la Facultad de Química se sintetizaron sustancias análogas a MEL. Por otro lado, la Buspirona (BUS) es un compuesto no BZP que disminuye los síntomas de ansiedad sin producir los efectos adversos de las BZPs, es un agonista de los sistemas de serotonina específicamente de los receptores de serotonina (5-HT_{1A}). Se denomina interacción farmacológica a la modificación del efecto de un fármaco causado por la administración conjunta de otro(s) fármaco(s), ^(B) y cuyo efecto puede ser agonista o antagonista. En este trabajo planteamos proporcionar información que ayude a dilucidar el mecanismo de acción de la Melatonina (MEL), para lo cual realizamos estudios “*in vivo*” sobre el proceso de ansiedad. Para evaluar la participación administramos los antagonistas paraclorofenilalanina (PCPA) y Luzindol (LUZ). Con base a estos antecedentes el objetivo de este trabajo es evaluar el efecto ansiolítico de la MEL, análogos y BUS, utilizando el modelo PLUS-MAZE en el cual se evaluará el comportamiento conductual de las ratas en el proceso de ansiedad.

ANTECEDENTES

2.1. ANSIEDAD

La ansiedad es un miedo vago y general, cuyas manifestaciones en el aspecto físico son: temblores, tensión, insomnio, transpiración y micción frecuente, es debida a la sobre actividad de los sistemas adrenérgicos o a la desregulación de los sistemas serotoninérgicos en el Sistema Nervioso Central (SNC).^(8,10,47) Relacionada con una amenaza potencial real o imaginada de peligro a nuestra integridad física o psíquica; se presenta como una reacción de adaptación y de hiperalerta. Puede presentarse ante diferentes circunstancias como estrés (provocado por el medio en el que se desenvuelve el individuo), factores de origen físico (intervenciones medico-quirúrgicas), patológicos (infarto al miocardio, angina de pecho, etc.) y emocionales (sensaciones de miedo, situaciones únicas o reiterativas, etc.).^(8,10,47)

The Internacional Statistical Classification of Diseases tenth revision (*ICD-10 OMS, 1992*), Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (*DMS-IV*) y American Psychiatric Association (*APA, 1994*), las nosologías psiquiátricas más recientes e influyentes, clasifican a la ansiedad con base a la agrupación de cuadros clínicos en torno a la presencia de síntomas comunes, de la siguiente forma: (Cuadro 1).⁽¹⁹⁾

Las manifestaciones fisiológicas, que se presentan cuando la ansiedad deja de ser un mecanismo de defensa y se convierte en una situación patológica, se trata de explicar mediante una hipótesis, en la cual se cree que la ansiedad es capaz de estimular al sistema nervioso autónomo (SNA) produciendo descargas adrenérgicas, las cuales son responsables de las manifestaciones fisiológicas presentadas por la ansiedad (pulso acelerado, aumento de presión sanguínea,

sudoración excesiva, dificultad para respirar, sensación de asfixia, diarrea, vértigo, micción frecuente, transpiración, dolores musculares, insomnio, y temores irrazonables). (8,10,47)

Cuadro1. Clasificación de la ansiedad con base a cuadros clínicos basado en la presencia de síntomas comunes.

ICD-10	DSM-IV
<p>1) <i>Trastornos fóbicos</i></p> <p>1.1) Agarofobia</p> <p>1.2) Fobia Social</p> <p>1.3) Fobia específica</p> <p>2) <i>Otros trastornos de ansiedad</i></p> <p>2.1) Trastornos de pánico</p> <p>2.2) Trastornos de ansiedad generalizada</p> <p>2.3) Trastorno mixto de ansiedad y depresión</p> <p>3) <i>Trastorno obsesivo compulsivo</i></p> <p>4) <i>Trastorno de estrés intenso y trastornos de adaptación</i></p> <p>4.1) Reacción de estrés aguda</p> <p>4.2) Trastorno de estrés postraumático</p> <p>5) <i>Trastorno de personalidad ansiosa (por evitación)</i></p>	<p>1) <i>Trastornos de pánico con agarofobia</i></p> <p>2) <i>Agarofobia sin historia de trastorno de pánico</i></p> <p>3) <i>Fobia social</i></p> <p>4) <i>Fobia específica</i></p> <p>5) <i>Trastorno de pánico sin ansiedad</i></p> <p>6) <i>Trastorno de ansiedad generalizada</i></p> <p>7) <i>Trastorno obsesivo-compulsivo</i></p> <p>8) <i>Trastorno de estrés postraumático</i></p> <p>9) <i>Trastorno de personalidad por evitación</i></p> <p>10) <i>Trastorno adaptativo con estado de animo ansioso</i></p>

En neuroquímica la ansiedad se puede explicar en relación con diferentes sistemas de neurotransmisión. (8,10,47)

2.2. SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN

2.2.1. NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA

El GABA es el principal neurotransmisor inhibitor del SNC del mamífero, sus receptores principales son: el receptor GABA_A, que es un canal de iones Cl⁻ de compuerta de ligando que se abre después de la descarga de GABA a partir de las neuronas presinápticas, el receptor GABA_B, el cual es un receptor acoplado a proteína G que actúa en vías bioquímicas como en la regulación de los canales de iones y el GABA_C. (23)

El receptor GABA incluye dentro de su estructura molecular, además del canal del cloro, sitios de reconocimiento para barbitúricos y Benzodiazepinas (BZPs) (fármacos prototipos para el tratamiento de la ansiedad), entre otros. ⁽²³⁾ Las BZPs actúan en el Sistema nervioso (SN) facilitando la neurotransmisión mediada por el GABA, en particular, en los receptores GABA_A. Las BZPs aumentan la frecuencia de apertura de los canales iónicos sensibles al cloro y activados por el GABA; es decir, potencian la acción del GABA. Los barbitúricos también favorecen la neurotransmisión GABAérgica, pero aumentando la duración de la apertura de los canales de Cl (Figura 1).^(5,23)

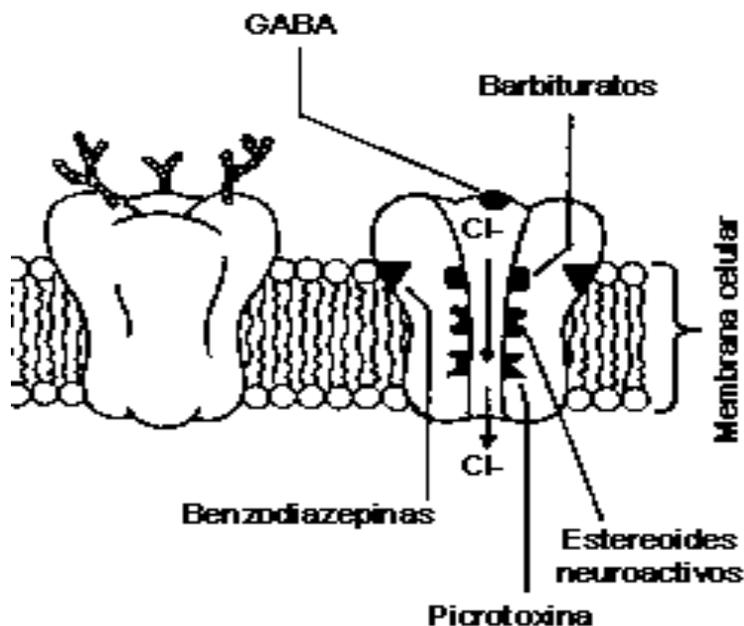


FIGURA 1. Sitios de acción de las BZP y los barbitúricos. Se esquematiza uno de los tipos de receptor del GABA. La ocupación de estos sitios puede conducir a aumentar (agonistas) o disminuir (antagonistas) la actividad del receptor y el canal iónico asociado. Por ejemplo, los barbitúricos y las BZPs favorecen los efectos del neurotransmisor, es decir, potencian la inhibición. A la inversa, si se bloquean estos sitios, se produce una desinhibición que puede provocar convulsiones. ⁽⁵⁾

Se ha demostrado experimentalmente que en situaciones de ansiedad se modifica la actividad de los ligandos a los sitios de unión, como lo hacen las BZPs, por lo que han surgido tres hipótesis para explicar los mecanismos

neurobiológicos involucrados en el comportamiento y reacciones fisiológicas como respuesta a un estímulo externo: ⁽⁸⁾

1. La ansiedad se produce ante la presencia de agonistas inversos endógenos en receptores GABA_A, disminuyendo el tono GABAérgico y de esta forma disminuyendo su función inhibitoria. ⁽⁸⁾
2. Los pacientes con trastorno de ansiedad pueden tener diferencias en la constitución del sistema BZPs-GABA_A por lo que son mas vulnerables. ⁽⁸⁾
3. El efecto de un agonista exógeno como el diazepam(DIAZ) puede observarse en personas normales a pesar de que no se ha logrado identificar claramente este efecto. ⁽⁸⁾

El término “receptor GABA_c” fue utilizado por primera vez por Jonhston para describir un nuevo sitio de unión de GABA en las membranas neuronales. Aunque estudios recientes indican una amplia distribución de receptores GABA_c en muchas partes del SNC. En las neuronas de retina de perca blanca fue el primer lugar donde se caracterizaron los receptores GABA_c ⁽¹⁾.

El receptor GABA_c es un pentamero es decir cinco subunidades p(rho) constituyen el canal funcional, tiene un dominio extracelular largo que contiene sitios de unión del ligando y varios sitios de modulación. En el centro del receptor GABA hay puertas de un canal iónico. La unión de GABA al receptor induce un cambio conformacional en la estructura del receptor que conduce a la apertura del canal ⁽¹⁾.

Los receptores GABA_c participan en el procesamiento de la información de la retina, la activación de estos produce más luz transitoria en las células ganglionares, el retraso en la inhibición mediada por receptores GABA_c mejora los campos receptivos de las células ganglionares⁽¹⁾.

Aunque el término “receptor GABA_c” se utiliza con frecuencia, GABA_c puede considerarse como una variante dentro de la familia del receptor GABA_A, ya que los receptores GABA_c están estrechamente relacionados en secuencia, estructura y función a las receptores GABA_A. El Comité de Nomenclatura de la International Union of Basic and Clinical Pharmacology (IUPHAR) recomienda que el término GABA_c ya no puede utilizarse y de estos receptores p debe ser designada como la subfamilia p de los receptores GABA (GABA_{A-p})^(H)

2.2.2. NEUROTRANSMISIÓN SEROTONINÉRGICA.

La 5-Hidroxitriptamina (5HT) o serotonina (Figura 2) es una amina aromática, pertenece a la familia de las indolaminas y está compuesta de un anillo indol hidroxilado en la posición 5 y una cadena lateral etilamínica. Es un neurotransmisor presente en el SNC que está implicado en la neuroquímica de la ansiedad con mayor frecuencia en los últimos años. Esto se basa en la efectividad de los fármacos serotoninérgicos en el cerebro, núcleo del raphe medio y dorsal.

(9,28)

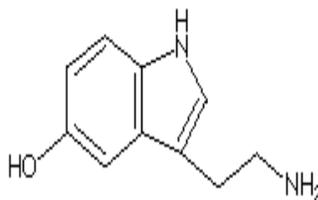


Figura 2. Estructura química de la 5-Hidroxitriptamina (5-HT). ⁽⁴⁾

La ansiedad está relacionada a un incremento endógeno del receptor a 5-HT. Se ha sugerido la existencia de más de 14 subtipos de receptores 5-HT por progresos farmacológicos y en biología molecular.⁽³⁰⁾ El desequilibrio indolamínico y su recuperación sobre los receptores específicos parece hallarse involucrado en todos los cuadros patológicos cuyo sustrato es la ansiedad.⁽³⁰⁾

Actualmente, se sugiere que la potencia ansiolítica puede estar asociada a receptores presinápticos (el receptor 5-HT_{1A} que se localiza en neocorteza, septum, hipocampo y amígdala.⁽⁸⁾ Los subtipos 5-HT_{2A} (se encuentran en hipocampo, cuerpo estriado, bulbo olfatorio, corteza y cordón espinal) y el bloqueo del receptor 5-HT_{2/1c} añade a su efecto ansiolítico acciones antidepressivas; ⁽⁸⁾ 5-HT_{2c} y 5-HT₃ al ser activados producen ansiedad tanto en animales de experimentación como en el humano. ⁽⁸⁾ Mientras, que el bloqueo selectivo del receptor 5-HT₃ añade a su efecto ansiolítico, acciones antipsicóticas y antieméticas. ^(8,D)

2.2.3. NEUROTRANSMISIÓN NORADRENÉRGICA

La noradrenalina (NA) es una catecolamina, su nombre químico es (R)-4-(2-Amino-1-hidroxietil)-1,2benzenediol, regula la transmisión de impulsos nerviosos postganglionares simpáticos, sus principales receptores son: α_2 , α_1 y β_1 y β_2 . (Figura 3).⁽³⁰⁾

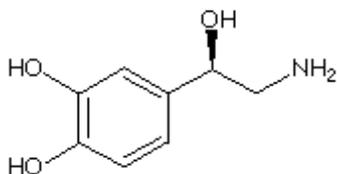


Figura 3. Estructura química de la Noradrenalina.

La NA incrementa la ansiedad, convirtiéndola en “excesiva”. Dicha teoría se sostiene en base a lo siguiente:

- ❖ El Locus coreleus (LC) tiene un papel importante en el control de la ansiedad. ^(13,47)
- ❖ Los efectos ansiogénicos de los fármacos que incrementan NA (anfetamina y cocaína),⁽³⁷⁾ y sus antagonistas α_2 –adrenoceptores como la yohimbina incrementan a la ansiedad y la frecuencia del pánico en humanos.^(8,13)
- ❖ Los agonistas α_2 al ser administrados en animales sometidos al Plus Maze producen ansiólisis. ⁽⁸⁾

La evidencia del incremento de actividad simpáticomimética se relaciona con los niveles de ansiedad en animales expuestos a paradigmas. ⁽⁸⁾

Existen dos conductos mayores de la NA que sugieren una relación en las influencias emocionales sobre el tono muscular en la ansiedad:

- ⊗ Vía central, que se relaciona con las conductas afectivas, como euforia y depresión.
- ⊗ Vía dorsal a la corteza, asociada con las acciones de alerta de estas neuronas.

2.2.4. NEUROTRANSMISIÓN ADENOSINÉRGICA

La adenosina (Figura 4) es un neurotransmisor y neuromodulador en diversas funciones metabólicas. La adenosina es un nucleósido que consiste de un azúcar

(d-ribose) y una base de purina (adenina). ⁽⁴³⁾ La adenosina tiene distintos receptores, a saber A_1 que inhibe la adenilato ciclasa y A_2 que estimulan la adenilato ciclasa. Los receptores A_{2A} tienen alta afinidad por la adenosina y los A_{2B} presentan baja afinidad por la misma. ⁽⁴³⁾

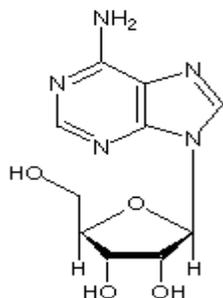


Figura 4. Estructura química de la Adenosina. ⁽⁴³⁾

Se ha propuesto que los antagonistas de los receptores de adenosina A_{2A} reducen la ansiedad, y análogos de la cafeína y teofilina (xantinas) han sido evaluados farmacológicamente por su actividad bloqueadora de los receptores de adenosina. ⁽⁴³⁾

2.2.5. NEUROTRANSMISIÓN DOPAMINÉRGICA

La dopamina (DA) (Figura 5) es una catecolamina endógena, se han identificado los receptores de la dopamina D_1 y D_2 . ⁽³⁰⁾ involucrados en los desórdenes de la ansiedad.

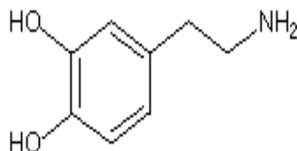


Figura 5. Estructura química de la dopamina. ⁽³⁰⁾

2.3. GLÁNDULA PINEAL (GP)

La GP o Epífisis cerebri recibe este nombre por su forma de cono truncado (Figura 6).^(23,27)

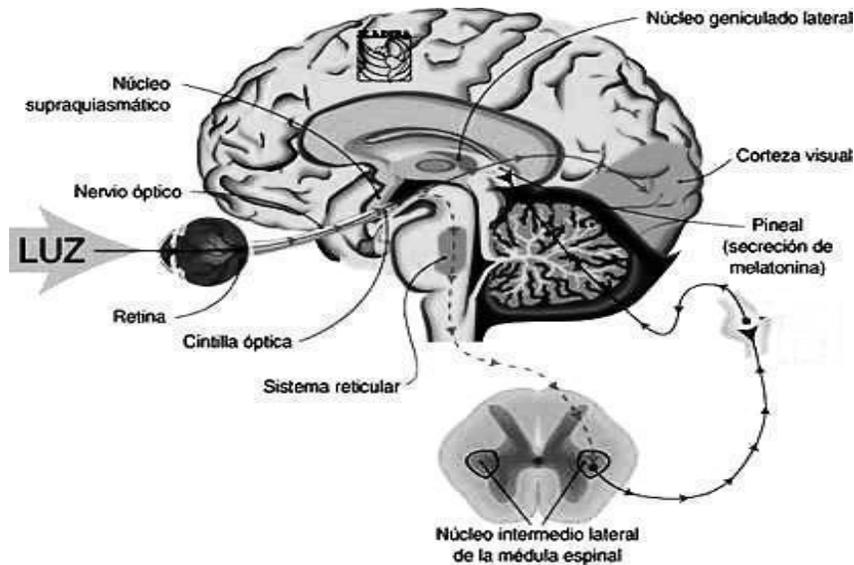


Figura6. Acción de la iluminación de la Glándula Pineal.⁽²⁷⁾ Axelrod y Wurtman encontraron que la GP de los mamíferos sintetizaban MEL en función de la iluminación ambiental (conversión de 5-HT en MEL por la retina) dándole la propiedad de transductor neuroendocrino.^(6,16,38,53)

En el ser humano es una evaginación de la parte posterodorsal del techo del tercer ventrículo y está unida por un tallo pineal a las comisuras habenular y posterior. Es un cuerpo pequeño y alargado, de 100-200 mg de peso, cubierto de líquido cefalorraquídeo y situado bajo la parte posterior del cuerpo calloso⁽²⁷⁾ (Figura6). Esta constituida por pinealocitos en un 85% y células gliales en un 15%. Inervada por el SNA, recibe fibras posganglionares del ganglio simpático cervical superior, a través de los nervios coronarios, que se encuentran en el cerebelo, pero también, a través de fibras que acompañan los vasos sanguíneos.⁽²⁷⁾ La GP humana se calcifica progresivamente con la edad, pero esto no significa que sus funciones disminuyan.⁽²⁷⁾ La relación existente entre el fotoperiodo y la GP

constituye una ventaja evolutiva que permite a los individuos adaptarse en una forma eficiente a su entorno ambiental, en los animales polares la GP participa en la termorregulación, en la entrada y salida del estado letárgico del sueño y también en hibernación. La función más estudiada de la GP es su participación en la reproducción.⁽²⁷⁾

La característica fundamental en las funciones de la GP, es su variabilidad funcional, es decir, sus acciones dependen de la especie animal, de la época del año y de la hora del día. En el hombre, está vinculada con procesos de conducta, consecuencia de algunos cambios en la actividad eléctrica del SNC que son provocados por hormonas. ⁽³¹⁾

En la GP se sintetizan y liberan péptidos e indoles de los cuales la MEL es la principal hormona (Figura 7). ⁽²³⁾

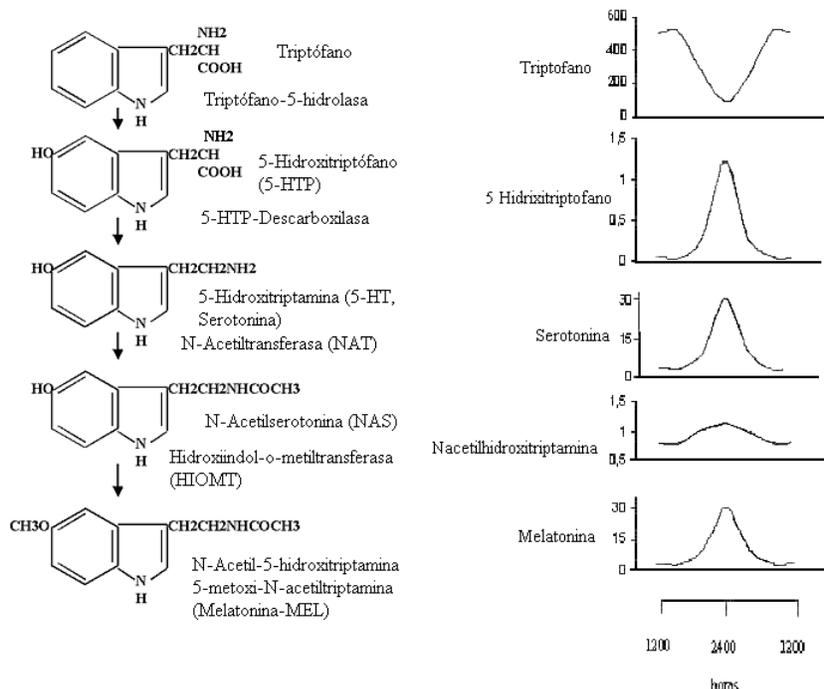


Figura 7. Biosíntesis de la melatonina y las variaciones de concentración de varios componentes de la vía biosintética a lo largo del día. ⁽²⁷⁾

2.4. MELATONINA Y ANÁLOGOS

2.4.1. MELATONINA

La MEL (Figura 8), fue aislada de la GP de bovinos en 1958 por Lerner y Cols, su nombre se debe a su semejanza funcional con la melanina, ya que es capaz de producir la aclaración de la piel de los renacuajos producto de una acumulación de melanina alrededor de los melanoforos. (27,16,31,32,38,40)

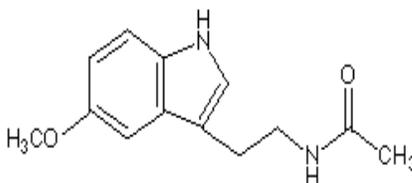


Figura 8. Estructura química de la MEL N-[2-(5-Metoxi-1H-indol-3-il)etil]acetamida; N-acetil-5-metoxitriptamina: [C₁₃H₁₆N₂O₂].⁽²⁹⁾ Es un compuesto metoxiindólico de naturaleza lipofílica y no ionizada, es la principal hormona producida por la GP. ⁽⁶⁾

Ahora se sabe que los efectos de la MEL dependen de la fase del ciclo circadiano en que se administre, siendo mayor la respuesta alrededor de la transición del ciclo luz-oscuridad. ⁽²²⁾ El efecto ansiolítico de la MEL presenta una variación durante el día y se ha visto que conforme se va acercando la fase de oscuridad, el efecto ansiolítico incrementa llegando a un máximo en la noche alrededor de las 12 a las 2 a.m. ⁽²²⁾

La MEL^(14,27,30,44) Es un inductor del sueño en humanos ⁽⁴⁵⁾ se utiliza para corregir los ciclos circadianos de sueño y vigilia ⁽⁵⁰⁾ en pacientes que sufren cambios de horario por viajes o por actividad laboral (“jet lag”, ciclo vigilia-sueño) ^(14,27,30,44) estimula las defensas inmunitarias, antioxidante, ansiolítico, anticonvulsivo, sedante, reductor de la insulina basal, relajante de músculo liso, protege de enfermedades cardiovasculares, como tratamiento de insomnio y

estrés, en cambios del metabolismo y en procesos neurológicos degenerativos.^(6, 16, 23,30, 44)

La MEL es una hormona que ejerce acción al activar receptores específicos situados principalmente en los núcleos supraquiasmáticos; MT₁ y MT₂ son receptores acoplados a proteínas G con 7 dominios transmembrana los cuales activan proteínas fijadoras y enzimas como el trifosfato de guanosina, adenilatociclasa y fosfodiesterasas a nivel intracelular mediando el efecto inhibitorio de la MEL sobre la síntesis de AMPc ^(K). Administrada por la tarde o al anochecer logra una adecuada inducción del sueño, disminuye el periodo de latencia, incrementa la duración y la calidad del sueño, y facilita un despertar reconfortante.⁽⁶⁾

La MEL por vía oral se absorbe rápidamente, alcanzando su pico máximo entre los 30 min. y 2 h después de su administración. Se distribuye ampliamente a líquidos y tejidos corporales. Posteriormente sufre un metabolismo de primer paso; se metaboliza a nivel hepático a 6-hidroximelatonina y N-acetilserotonina, las cuales son excretadas como conjugados de glucurónido, sulfato, vía urinaria como 6-hidroximelatonina y sólo mínimas cantidades de la hormona se elimina sin cambios. Su eliminación es de 30 a 50 min. Las concentraciones plasmáticas máximas, después de la administración de 2 mg de MEL se elevan hasta 3,000 pg/ml para declinar, 3 a 4 horas después, a los niveles fisiológicos entre 80 y 100 pg/ml. ^(6,23, 22, 38,44)

No se han reportado interacciones farmacológicas entre MEL y otros fármacos pero la administración de MEL con los alimentos genera concentraciones plasmáticas mayores a las que se generan cuando se administra sola. ^(38,51)

La dosis promedio de MEL utilizada es de 1.5 a 5 mg diariamente, por la tarde o al anochecer. Sin embargo, se han llegado a usar dosis hasta de 20 a 30 mg diarios para corregir el sueño. En el insomnio crónico hasta 75 mg/día. La dosis ansiolítica de la MEL es de 1-5 mg/Kg.^(22,38) No se han reportado casos de sobredosis, su ingesta excesiva puede generar relativa somnolencia y una hipotermia clínicamente no significativa. ^(22,38)

La MEL se encuentra en productos naturales como: la hierba de San Juan, menta, hierba Luisa, tomillo, sábila, maíz, avena, cebollas, plátanos y algunas plantas aromáticas.⁽⁴⁴⁾

2.4.2. SÍNTESIS DE LA MELATONINA

La MEL se sintetiza en los pinealocitos estos captan al aminoácido (aa) triptofano el cual es modificado por varias enzimas. El primer paso es la conversión del triptofano a 5-hidroxitriptofano, por medio de la enzima triptofano hidroxilasa, una posterior descarboxilación por una enzima que participa en la biosíntesis de las catecolaminas, actúa sobre esta última molécula obteniéndose de esta forma la 5-hidroxitriptamina (5-HT). ^(6,9)

La 5-HT con la participación de dos enzimas es convertida a MEL. La primera de ellas es una acetilación, la cual es llevada a cabo por la serotonina-N-acetiltransferasa (NAT), el acetilo es donado por la acetilcoenzima A y se obtiene la N-acetilserotonina. La segunda se lleva a cabo por la enzima hidroxindol-O-metil transferasa (HIOMT), la cual transfiere un grupo metilo de la S-adenosil-metionina al grupo 5-hidroxi de la N-acetilserotonina.⁽⁶⁾

2.4.3. METABOLISMO DE LA MELATONINA

La serotonina (5-hidroxitriptamina) alcanza sus mayores concentraciones en la glándula pineal. Los mayores picos se originan en la oscuridad y los menores en las horas luz. Eso es porque el paso limitante de la síntesis de MEL es la enzima

NAT (N-acetil transferasa), esta enzima tiene menores niveles de actividad por el día y mayores por la noche, y es la encargada de pasar la serotonina a N-acetil serotonina. La HOMT (hidroxil-indol metil transferasa) acaba el ciclo con la síntesis de melatonina. Una vez que se estimula, el pinealocito segrega melatonina a la sangre, unida a albúmina (65% de las ocasiones) o libre (35%). El $t_{1/2}$ de la serotonina es de 10-15 min. Se metaboliza por la sangre, hígado o cerebro, entre las 23:00 y las 7:00 del día siguiente de la producción. En el hígado la 6-OH-melatonina pasa a sulfato y glucuronato y va a la orina. En el cerebro pasa a compuestos derivados de la quinoneimina. Las señales hormonales acompañan a las señales nerviosas que llegan a las terminaciones nerviosas del ganglio cervical superior^(J).

Sin embargo, la principal desventaja de la MEL es que tiene una vida media muy corta (30 min.), por lo tanto se han sintetizado sustancias análogas a MEL que con estudios posteriores permitirán incrementar el $t_{1/2}$.

2.4.4. ANÁLOGOS

En la Facultad de Química de la UNAM se sintetizaron distintos análogos de MEL con p-H, p-NO₂, P-MeO, p-F, p-Me, Benzal, benzoil y fenil sustituidos en la posición 1 de la estructura química de la MEL. ⁽³³⁾

Respecto a la estructura química de los análogos de melatonina, p-metoxibenzoilo y p-metoxifeno, son los que tienen mayor actividad, al parecer el grupo electrodonador tiene un efecto en la capacidad de producir efecto ansiolítico, como es el caso de M3B y M3C a la dosis de 2mg/Kg. Cuando se administra el análogo que presenta el grupo sustituyente nitro (-NO₂), tal como en p-nitrobenzoilo y p-nitrofenilo, la actividad disminuye, inclusive en el caso de M2C, presenta un efecto menor. Probablemente el efecto electrónico de los sustituyentes, específicamente en la posición 4 del anillo bencénico, tenga una

relación directa con la actividad biológica, según los resultados obtenidos en el trabajo realizado por Lira y colaboradores,⁽³³⁾ en el que se realiza una investigación con los análogos 1-N-sustituidos de MEL relacionándolos con la unión al receptor en membrana de cerebro de pollo y se determino que el p-metoxifenilo presento una mayor afinidad, y p-nitrofenilo la mas baja.⁽³³⁾ En este trabajo experimental utilizaremos tres análogos: M1A, M3A y M2C. ⁽³³⁾

2.5. TRATAMIENTO TERAPEÚTICO DE LA ANSIEDAD

2.5.1. BENZODIACEPINAS

Las BZPs son bases orgánicas. Todas comparten una estructura química compuesta por un anillo bencénico aromático con seis carbonos, el cual esta unido a un anillo diazepínico y un anillo 5-arílico. ⁽¹⁵⁾ Cada BZPs especifica, se formará por la sustitución de diversos radicales, en diferentes posiciones.⁽³⁹⁾ Ejercen su acción al actuar sobre unos receptores específicos localizados a nivel del SNC, los cuales forman parte del complejo macromolecular del receptor del ácido gamma-amino butírico (CMRGABA).⁽³⁰⁾ La unión del GABA más una BZP produce una serie de cambios alostéricos en la estructura del receptor, que activa al complejo CMRGABA produciendo una alteración en la permeabilidad de los canales de cloro (Cl⁻), produciéndose un incremento del flujo de Cl⁻ y la hiperpolarización de la célula.⁽³⁰⁾ El GABA es un neurotransmisor con acción inhibitoria, y sus receptores forman parte de un sistema bidireccional inhibitor conectado entre diversas áreas del SNC. La activación del CMRGABA por una BZP potencia la acción inhibitoria de la sinapsis mediada por el GABA. Los receptores de las BZPs se encuentran distribuidos por todo el cerebro la médula espinal y en otros órganos como las glándulas adrenales, riñones, y plaquetas.⁽³⁰⁾ En los roedores como la rata y el ratón, ejercen acción tranquilizante, inhibitoria de la actividad motora y del castigo.⁽³⁵⁾

En una post-administración por vía oral, las BZPs se distribuyen en el organismo, pero debido a su estructura química que tiene grupos hidrofóbicos, tienen preferencia por tejidos ricos en lípidos como el cerebro y son metabolizados principalmente en el hígado por oxidación microsomal y excretados por el riñón después de ser conjugados como glucoronidos.⁽⁵²⁾ Los principales efectos de las BZPs en el hombre son: sedación, hipnosis, anestesia, anticonvulsivos, relajante muscular, ansiolítico.^(15,35,52) Sin embargo las BZP tienen muchos efectos adversos como: ataxia, cefalea, fiebre, somnolencia, náuseas, vómitos y diarrea. Sus principales desventajas es que causan tolerancia, dependencia psicológica y física. ^(25,30,52) Los fármacos representativos de esta familia y utilizados en el tratamiento de la ansiedad son el Clordiazepóxido (CDP), ^(23,39,52) y diazepam (DIAZ) (Figura 9) ⁽⁵²⁾

2.5.2. DIACEPAM

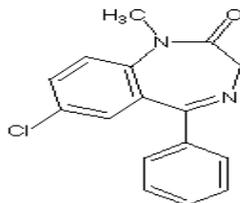


FIGURA 9. Estructura química del DIAZ: 7-Cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepina-2-ona. [C₁₆H₁₃ClN₂O] ⁽²⁹⁾

El DIAZ es una BZPs que tiene propiedades ansiolíticas, psicosedativas, antiagresivas, sedantes, miorelajantes, anticonvulsivantes, anestésicas y analgésicas. Se sabe que esto es resultado de facilitar la acción del GABA.⁽²⁸⁾

El DIAZ se utiliza en animales vía inyectable y oral. El preparado inyectable contiene 5 mg/ml de DIAZ en propilenglicol (PEG) al 40%, alcohol etílico 10%

(disolvente) y alcohol bencílico al 1.5% (conservador).⁽¹⁾ La dosis ansiolítica en ratas es de 2.0-5.0 mg/Kg vía intramuscular (i. m) o intraperitoneal (i. p.).⁽¹²⁾

En la inyección i. p. la absorción es completa. El DIAZ y sus metabolitos se unen en un 98% a proteínas plasmáticas. Atraviesan las barreras sangre-encéfalo y placentaria y se encuentran también en la leche materna. La $t_{1/2}$ de distribución es de 3 horas. Se metaboliza principalmente como N-desmetil-diazepam, temazepam y oxazepam; se excretan en la orina, predominando sus formas conjugadas. La depuración del DIAZ es de 20-30 ml/min.⁽¹²⁾ El DIAZ está contraindicado en hipersensibilidad a las BZPs, en insuficiencia respiratoria severa e insuficiencia hepática grave y síndrome de apnea del sueño.⁽¹²⁾ Las BZPs no deben utilizarse solas para tratar la depresión o ansiedad asociada con depresión, ya que podría sobrevenir un suicidio en dichos pacientes. Después de la administración reiterada durante un período prolongado, puede manifestarse una disminución de la respuesta a la acción de las BZPs. Este riesgo aumenta en relación directa con la dosis y la duración del tratamiento. En pacientes con antecedentes de alcoholismo o drogadicción el riesgo es mayor.^(14,29,54)

Cuando el DIAZ es utilizado asociado con antipsicóticos, hipnótico, ansiolíticos/sedantes, antidepresivos, analgésicos narcóticos, antiepilépticos, anestésicos y sedantes antihistamínicos, puede manifestarse una intensificación del efecto depresor central.^(14,29,54)

La sobredosis con DIAZ se manifiesta con síntomas que van de somnolencia hasta coma. Después de una sobredosis deberá inducirse el vómito (dentro de la siguiente hora) si el paciente está consciente, o bien llevar a cabo un lavado gástrico con las vías aéreas protegidas si el paciente está inconsciente. Si no existe ninguna ventaja en vaciar el estómago, deberá administrarse carbón

activado para reducir la absorción. EL Flumazenil (FLU) puede ser utilizado como eficaz antagonista. (14,29,54)

2.5.3. BUSPIRONA

La BUS es un fármaco que se utiliza como ansiolítico pertenece al grupo de los serotoninérgicos por el mecanismo de acción que utiliza (Figura 10). (23,25,27,42,50)

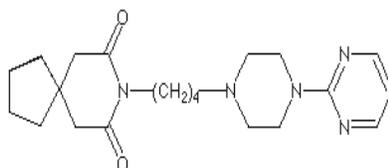


Figura 10. Buspirona 8-[4-[4-(2-Pirimidinil)-1-piperazinil]butil]-8-azaspiro[4.5]decano-7,9-diona. [C₂₁H₃₁N₅O₂]. LD₅₀ i.p. en ratas: 136 mg/Kg. (50).

Se introdujo en 1986 por Glasser y Traver como ansiolítico (23,25,27,42,50) es la única azapirona comercializada, actúa sobre los receptores 5-HT_{1A} (21,23) presinápticos inhibiendo las descargas serotoninérgicas ansiógenas de los núcleos mesoencefálicos del rafé medio, a la vez que estimula la actividad noradrenérgica del LC. (21,23)

Tiene actividad ansiolítica pura, es decir no produce sedación, (21,27) ni efectos hipnóticos, relajantes musculares ni anticonvulsionantes, tiene un período de latencia efectivo de unas dos o tres semanas, imposibilita la automedicación por no ser percibida la asociación del efecto con el medicamento, y no tiene potencial de abuso. (21,27,42)

Es la primera elección como ansiolítico sobre todo si en el paciente están contraindicadas las BZPs. Se absorbe rápidamente por el tubo digestivo y se distribuye bien, sufriendo metabolismo de primer paso a nivel hepático principalmente por las reacciones de hidroxilación y N-desalquilación,

produciendo metabolitos con actividad farmacológica.^(21,27) Como efectos secundarios se presenta cefalea, inquietud motora, náuseas y vómitos, erupción cutánea, temblor, euforia, agitación e insomnio, rara vez taquicardia, palpitaciones y sequedad de boca. ^(18,23,27,50)

Se utiliza generalmente en dosis, de 30mg 2 o 3 veces al día, ^(10,51) tiene un $t_{1/2}$ de 2 a 4 horas y al parecer no hay problema por acumulación del fármaco en el organismo. ⁽²⁷⁾ La principal interacción farmacológica la presenta con los inhibidores de la monoamino oxidasa (IMAO), esta contraindicada en casos de hepatopatía y neuropatía graves, durante el embarazo y la lactancia. Las dosis ansiolítica de BUS en ratas es de 1.25, 2.5 y 5 mg/Kg. ⁽²⁶⁾

2.6. INTERACCIONES FARMACODINÁMICAS Y FARMACOCINÉTICAS

Los efectos terapéuticos y tóxicos de los fármacos se deben a sus interacciones con otras moléculas en el paciente. En la mayoría de los casos, los fármacos actúan asociándose con macromoléculas específicas (receptores) de manera que modifican la actividad bioquímica o biofisiológica de estas.^(A) Se denomina interacción farmacológica a la modificación del efecto de un fármaco causado por la administración conjunta de otros fármacos. ^(B) Hay dos tipos de interacciones:

A. Favorables para el paciente

B. Desfavorables para el paciente

Al fármaco que lleva a cabo la interacción le pueden pasar dos cosas: I. Que aumente su concentración plasmática y por lo tanto el riesgo de toxicidad, o II. Que

disminuya su concentración plasmática y por lo tanto sus efectos farmacológicos.^(B)

Es importante conocer el mecanismo por el cual se producen las interacciones:

2.6.1. INTERACCIONES FARMACODINÁMICAS

Las interacciones farmacodinámicas tienen que ver con el aumento o disminución de la acción farmacológica y, por lo tanto, de la respuesta y efecto farmacológico, tienen su origen en la competición por receptores de un mismo tipo o diferentes, dependiendo de la naturaleza de los fármacos implicados. ^(A,23)

Esta información permite establecer diversas interacciones como son el sinergismo y el antagonismo.

2.6.1.1. SINERGISMO ^(A,23,30)

El sinergismo se lleva a cabo cuando la presencia conjunta de dos o más fármacos en el organismo permite observar un incremento de los efectos. De los que se distinguen: ^(A,23,30)

- SUMA O ADICIÓN
- POTENCIACIÓN

El sinergismo de *suma o adición* ocurre cuando el efecto de la asociación es aproximadamente igual a la suma de los efectos individuales de cada uno de los fármacos. Es decir ocurre cuando el efecto resultante de la presencia de dos fármacos es la suma de los efectos parciales. ^(A,23)

El sinergismo de *potenciación* ocurre cuando el efecto de la combinación es superior a la suma de los efectos individuales de cada uno de los fármacos. ⁽¹⁸⁾

2.6.1.2. ANTAGONISMO (A,23)

El antagonismo es la interferencia de una sustancia química con la acción de otra. El antagonismo puede darse de varias formas: (A,23)

-Antagonismo *no competitivo*. El fármaco inhibidor o antagonista no actúa en el mismo receptor (R), sino en una zona próxima (R') íntimamente relacionada con él, aumentando la concentración de agonista, no se puede corregir el efecto y nunca se obtiene la respuesta máxima. La presencia del inhibidor disminuye la actividad intrínseca del agonista. (A,23)

-Antagonismo *sin competencia*. En este caso el fármaco inhibidor no se une al receptor sino al complejo sustrato-receptor. (23)

-Antagonismo *químico o inactivación*. Es una reacción entre dos sustancias químicas que se neutralizan en sus efectos. Por ejemplo, el dimercaprol muestra quelación con varios metales, y así disminuye su toxicidad. Cuando los dos fármacos reaccionan entre sí originando un compuesto inactivo o menos tóxico, actúan por quelación (plomo-EDTA), adsorción (carbón animal o vegetal), neutralización (ácidos-bases), oxidación (permanganato de potasio-alcaloides) o inactivación (glucosa-cianuros con formación de cianhidrinas). (23)

-Antagonismo *fisiológico o funcional* se produce cuando dos productos químicos generan efectos contrarios en la misma función fisiológica. Por ejemplo, la dopamina en goteo intravenoso se aplica para conservar el riego de órganos vitales durante intoxicaciones graves que se caracterizan por hipotensión profunda. (23)

-Antagonismo por *eliminación* es la alteración en la eliminación de una sustancia (que incluiría su absorción, distribución, biotransformación o excreción), de tal manera que una cantidad del agente llega al órgano blanco o disminuye en él su persistencia. (A,23)

-Antagonismo a nivel del *receptor* de la sustancia química comprende el bloqueo del efecto de un agonista con un antagonismo apropiado que compite por el mismo sitio de acción. Por ejemplo, el antagonista naloxona se utiliza para tratar la depresión de la función respiratoria producida por opioides. (A,23)

2.6.2. INTERACCIONES FARMACOCINÉTICAS

Las interacciones farmacocinéticas están relacionadas con un aumento o disminución de la concentración del fármaco en el organismo [en el sitio de acción]. El efecto de un medicamento puede alterar la frecuencia o cantidad de la absorción, la distribución, el metabolismo o la excreción de otro. Este tipo de interacción se comporta como un cambio en los parámetros farmacocinéticos de un fármaco, usualmente la concentración sanguínea, pero también la vida media, tasa de eliminación, curva tiempo-concentración, volumen de distribución y a veces algún otro parámetro relacionado. (A,C,23)

2.7. MODELOS DE ANSIEDAD

Actualmente se han desarrollado modelos animales para entender la neurobiología de la ansiedad en los cuales se pretende reproducir algunos síntomas que se observan en los seres humanos. (8) El mejor modelo para el estudio de la ansiedad deberá contar por lo menos con las características siguientes:(26,46)

- ❖ No dar falsos positivos, donde la actividad se presenta en el modelo pero no en casos clínicos. (24)
- ❖ No dar falsos negativos, debidos a que el fármaco no es detectado por el modelo y que este si tenga una actividad en casos clínicos. (24)

-
- ❖ Tener una fuerte correlación entre la eficacia clínica y la actividad mostrada en el modelo. ⁽²⁴⁾

Actualmente los modelos para evaluar el perfil ansiolítico del compuesto (sintetizado en algunos casos) se recurre a estímulos nocivos como choques eléctricos, situaciones estresantes, privación de agua, y alimento que no tienen nada que ver con el caso clínico, por razones éticas y de procedimientos es necesario el estudio de mecanismos funcionales de los procesos de ansiedad en modelos de experimentación animal basados en situaciones homologables en su naturaleza a las condiciones del ser humano. Los modelos para evaluar el efecto ansiolítico se clasifican de la siguiente manera: ^(4,24,46)

2.7.1. PRUEBAS DE CASTIGO

Llamadas también pruebas de conflicto, se basa en presentar un estímulo adverso que se contrapone a un comportamiento normal del animal, pero la respuesta entre el estímulo y el comportamiento ha impedido establecer su sensibilidad ya que la respuesta depende de la intensidad del castigo. ^(4,24,48) Este castigo será mejor tolerado cuando se administren sustancias que pueden suprimir el miedo al castigo, la principal desventaja es que se presentan falsos positivos ⁽²⁴⁾ algunos ejemplos:

2.7.1.2. Prueba de los cuatro platos

2.7.1.2. Respuesta Privación de agua

2.7.1.3. Operante condicionada

2.7.1.4. Comportamiento pasivo

2.7.2. RESPUESTA CONDICIONANTE CON ESTÍMULO ADVERSO

Esta prueba se usa para el cernimiento y la evaluación de fármacos ansiolíticos, involucran la asociación del comportamiento animal con un estímulo adverso controlado por el mismo, si se deja de emitir la respuesta castigada es posible evadir el estímulo adverso pero se ha observado que no hay comportamiento particular cuando se utilizan estas pruebas, ^(24,48) su desventaja tienen poca validez como modelo de ansiedad clínica, las principales pruebas son: ⁽⁴⁸⁾

2.7.2.1 Supresión condicionada

2.7.2.2 Respuesta inicial potenciada

2.7.3. COMPORTAMIENTO EXPLORADOR

Son pruebas que evalúan la actividad motriz y la exploración, utilizadas para evaluar fármacos psicotrópicos, la mayoría son rápidas y no requieren equipos caros y complejos. Sin embargo, los cambios conductuales que se observan y cuantifican no son del todo claros. Es por eso que la interpretación de la acción del fármaco se ve complicada. Se basa en la hipótesis de que los roedores por naturaleza explorar nuevos lugares por consiguiente les produce ansiedad, la cual depende de lo novedoso de la situación. ^(24,26,46,48) Los fármacos que son capaces de reducir estos mecanismos aumentan los niveles exploradores y reducen la ansiedad, ⁽⁴⁸⁾ entre las pruebas más utilizadas se encuentran:

2.7.3.1. Prueba de la escalera

2.7.3.2. Laberintos elevados

2.7.3.3. Interacción social

2.7.3.4. Prueba de luz-oscuridad

2.7.4. INTERACCIÓN CON FÁRMACOS ANSIOGÉNICOS

En esta prueba se utiliza el compuesto pentilentetrazol (PTZ) se basa en la interacción de los compuestos ansiolíticos con este para revertir los efectos causados por el mismo. Este método presenta la desventaja de actuar sobre receptores tipo GABA por lo tanto aquellos compuestos que actúen mediante otro mecanismo no serán detectados, por otra parte presenta una correlación con una $r=0.89$ entre el efecto ansiolítico y las dosis clínicas del fármaco ansiolítico. ^(24,48)

Los modelos que toman en cuenta el comportamiento conductual natural y no el condicionado para evaluar fármacos ansiolíticos son mejor aceptados por los investigadores. ^(4,48)

2.7.5. MODELO “PLUS-MAZE”.

En los últimos años se han utilizado modelos que se basan en el comportamiento explorador de los roedores y están incluidos en el apartado de laberintos elevados, a este modelo corresponde el “Plus-Maze”, Imagen 1 ^(46,48) Este modelo se basa en estudios hechos por Montgomery en 1958, quien observó que en los laberintos elevados y abiertos se creaba un conflicto cuando los roedores se acercaban o alejaban de los bordes pero cuando se utilizaban laberintos elevados y cerrados el comportamiento explorador era mayor. ^(26,34,46) Con estas observaciones, en 1985 Pellow y Col, ^(26,34,46) desarrollaron y validaron un nuevo modelo para la evaluación del perfil ansiolítico en roedores como la rata y la cual denominaron “Plus-Maze”. ^(34,46) Se encontró que las ratas prefieren los brazos o zonas cerradas reflejado por el número de entradas y el tiempo de permanencia en los mismos que es mayor al de las zonas abiertas, estos últimos reflejan una aversión provocada por la ansiedad debida a lo novedoso de la

situación. La entrada y salida total de los brazos representa una correlación de la actividad motriz. (26,34,46)



Imagen 1: Modelo "Plus-Maze".

Este modelo es barato, sencillo, rápido se basa en cuantificar el comportamiento espontáneo de los roedores sin tener algún estímulo que pueda representar un condicionamiento, es capaz de diferenciar entre compuestos con efecto ansiolíticos y ansiogénicos. (26,34,46)

Los resultados que se obtienen cuando se administran compuestos que actúan sobre el sistema GABA, son reproducibles y consistentes debido a una variabilidad que es dependiente de la cepa utilizada, del sitio de administración y las condiciones experimentales utilizadas (variedad multifactorial). (11,24,26,34)

Un factor importante es la iluminación usada, cuando es muy brillante; se provoca una aversión por los brazos abiertos, (no siempre se ha observado), pero cuando la luz es tenue con respecto al lugar en que inicialmente se encuentra el animal, se hace más sensible la detección del efecto ansiolítico. (26,34)

El modelo “Plus-Maze” consiste en un laberinto elevado en forma de cruz, consta de dos zonas o brazos abiertos con dimensiones de 50 x 10 cm. Los cuales están encontrados, y dos brazos cerrados también encontrados con dimensiones de 50 x 10 x 40 cm., en la zona de intersección de los cuatro brazos se forma un cuadro central cuyas dimensiones son de 10 x 10 cm. El modelo se encuentra sostenido por una plataforma que lo mantiene a 50 cm., elevado del piso. ^(26,34,46,48) Las paredes, el piso, y la base son de madera, como se muestra en la (Imagen 1). ^(36,46)

JUSTIFICACIÓN

- La ansiedad es un trastorno que se presenta cada vez con mayor incidencia en la población.
- Las diferentes sustancias utilizadas para el tratamiento de la ansiedad que ya existen como las BZPs causan efectos no deseables como la tolerancia y la dependencia.
- Por lo anterior, en este proyecto se realizó la evaluación de la interacción farmacológica de la MEL, algunos análogos y como referencia a la BUS al administrarlas con antagonistas en el modelo “Plus-Maze”.
- Así como la búsqueda del posible mecanismo(s) de acción de la MEL, el cuál no está totalmente dilucidado.
- Además, debido a que se conoce poco acerca de la acción ansiolítica de algunos análogos de melatonina, éstos también se evaluarán.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto ansiolítico de melatonina algunos análogos(M1A, M2C, M3A) y bupirona en presencia de luzindol y paraclorofenilalanina utilizando el modelo Plus-Maze en ratas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto ansiolítico de melatonina, sus análogos y bupirona en el modelo Plus-Maze.
- Caracterizar el posible mecanismo de acción de la melatonina y sus análogos en presencia de luzindol y paraclorofenilalanina.

HIPOTESIS

- ♦ La melatonina produce efectos como ansiolítico en el modelo Plus-Maze entonces los análogos de esta también producirán un efecto ansiolítico.
- ♦ Si en presencia de Luzindol y/o paraclorofenilalanina el efecto ansiolítico de melatonina y sus análogos se revierte entonces la síntesis de 5-HT o el receptor MT₂ participan en el mecanismo de acción de su actividad como ansiolítico.

METODOLOGÍA**1. MATERIAL**

Jeringas de plástico, 1mL (marca 27x16 mm)

Pipetas graduadas de vidrio de: 1, 5 y 10 mL (marca PIREX)

Frascos viales de vidrio de 10 mL (sin marca)

Espátula plomo-níquel

2. MATERIAL BIOLÓGICO

106 ratas macho Wistar (Harlan, Méx.) de 180-230 g de peso.

3. EQUIPOS

Modelo Plus-Maze de madera

Balanzas granataría (ER-VA)

Balanza analítica (METTLER TOLEDO)

Cajas de acrílico con tapa de acero inoxidable

Aserrín

Arena

Cronómetro

Cámara de Video

Video cassette

Tripie

Marcadores indelebles

Franelas

4. REACTIVOS Y FÁRMACOS

Melatonina (laboratorios Sigma Chemical Co)

Lote: 73110986, M-5250.

Análogos de Melatonina M1A, M3A, M2C. (Sintetizados en la FQ. UNAM) ⁽⁴²⁾, estas claves se asignaron por las personas que los sintetizaron, con la finalidad de realizar estudios “ciego” y las claves M1A₁ y ₂ por ejemplo las asignamos de acuerdo a la dosis que utilizamos (M1A₁=1mg/kg y M2A₂=2 mg/kg).

Diazepam solución inyectable de 10 mg, ampolleta con 2 mL

(Roche) Lote: BJ0087

Buspirona Frasco con 1g (Laboratorio Sigma Chemical Co.)

Lote: 18F0430 B-7148.

4-cloro-L- fenil-alanina (Laboratorio Sigma Chemical Co.)

Lote: 044K1626. C8655-1604.

Luzindol 5mg (Laboratorio Sigma Chemical Co.) Lote:L-2407.

Alcohol Etílico Absoluto anhidro “Etanol” (J.T. BAKER)

Lote:M25C64.

Propilenglicol (PEG 200) al 25% (J.T. BAKER)

Agua destilada (FQ. UNAM)

NaCl al 0.9% en agua inyectable (BAXTER)

5. DOSIS

Con base en estudios piloto que se realizaron previamente, las dosis a utilizar para producir un efecto ansiolítico, son las siguientes:

Melatonina (2 mg/kg).

Análogo M1A (1 mg/Kg) y (2 mg/kg).

Análogo M2C (1 mg/kg) y (2 mg/kg).

Análogo M3A (1mg/kg) y (2 mg/kg).

Diazepam (2 mg/kg).

Buspirona (5 mg/Kg).

Luzindol (10 mg/kg), (2.5 mg/Kg), (0.625 mg/Kg), y (0.25 mg/Kg).

4-cloro-L-fenil-alanina (100 mg/kg).

6. SOLUCIONES

Melatonina y Análogos⇒ disolvente: (40% de PEG, 20% de Etanol y 40% de Agua destilada).

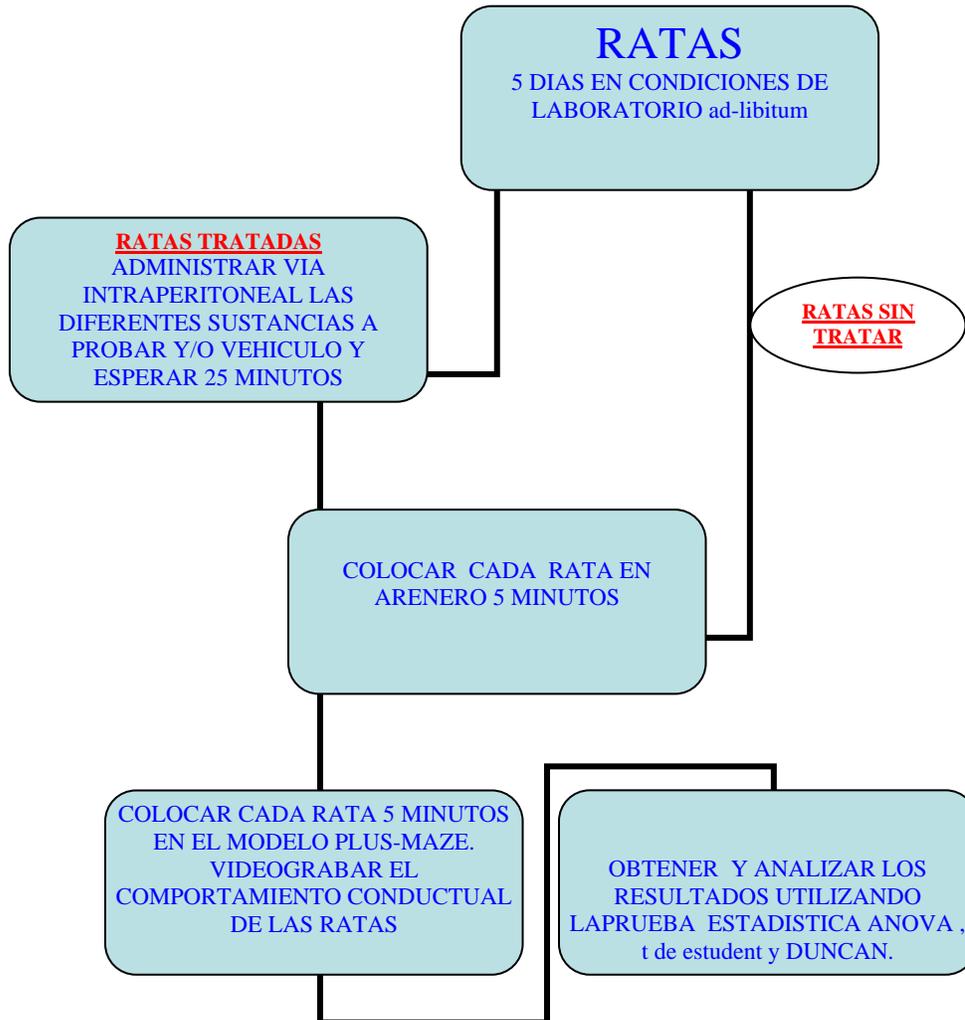
Buspirona⇒ disolvente: (Solución Salina Fisiológica).

PCPA⇒ disolvente: (25% de Tween 80 y 75% de NaCl al 0.9%).

Luzindol⇒ disolvente: (5% de Etanol y 95% de Agua destilada).

7. PROCEDIMIENTO ESQUEMATIZADO

Esquema No.1. Se muestra el protocolo de experimentación.



8. PROCEDIMIENTO DESCRIPTIVO

Este trabajo se realizó en dos etapas: En la primera etapa del estudio se utilizaron 60 ratas Wistar macho (Harlan, México S.A. de C.V.) entre 180-230 g de peso, distribuidas en 10 grupos de 6 ratas cada uno (n=6), con los siguientes tratamientos:

GRUPO	SUSTANCIA
1	VEHÍC
2	ÍNT
3	M1A ₁
4	M1A ₂
5	M3A
6	M2C ₁
7	M2C ₂
8	MEL
9	DIAZ
10	BUS

Se trabajó un grupo de 6 ratas por día. Primero se peso y marco cada rata, se administro vía i.p. la sustancia a probar. Durante de 25 minutos se colocaron en un contenedor de aserrín, para que se produjera el efecto farmacológico. Luego se colocó en un contenedor de arena durante 5 minutos para que la rata se adaptara al modelo "Plus-maze". (El modelo se limpió antes y después de utilizarse con solución de jabón neutro y agua para que no existieran olores que pudieran causar ansiedad en las ratas).

Se colocó a cada rata en el modelo "Plus-Maze" durante 5 minutos, se video grabó su comportamiento conductual y la presencia de piloerección, micción y el número de bolos fecales defecados (las respuestas positivas son indicativos de ansiedad) posteriormente se analizó cada video detenidamente, se recopilaron los datos en tablas y se hizo el análisis estadístico correspondiente

♣.

En esta primera etapa se determino si las sustancias utilizadas producen o no un efecto ansiolítico.

En la segunda etapa del estudio se administraron dos fármacos para determinar y cuantificar la interacción de los mismos, se utilizaron 48 ratas Wistar macho (Harlan México S.A. de C.V.) entre 180-230 g de peso, distribuidos en 8 grupos de 6 ratas cada uno (n=6), los grupos fueron tratados como se muestra a continuación:

GRUPO	PRIMER FÁRMACO	SEGUNDO FÁRMACO
1	ÍNT	-----
2	VEHÍC	-----
3	MEL	M1A ₁
4	MEL	LUZ
5	DIAZ	M1A
6	DIAZ	LUZ
7	MEL	PCPA
8	BUS	PCPA

El procedimiento fue el mismo que el de la primera parte pero después de pasar por el modelo "Plus-maze" se administró en la misma rata la segunda sustancia a probar y se repitió el mismo procedimiento.

♣ Los datos obtenidos fueron analizados mediante la prueba estadística ANOVA , "t de Student" para muestras independientes, con una probabilidad de $p < 0.05$ y el error estándar de la media (EEM), comparando entre el grupo de INT, VEHÍC y MEL c/u con respecto a los demás.^(7,46,49) También se utilizó y el programa UNISTAT V3 (Prueba de rangos múltiples) DUNCAN 95%.

LUZINDOL

La formula química : N-acetil-2-bencil-triptamina. [C₁₉H₂₀N₂O]. ⁽¹⁷⁾ Es un antagonista competitivo del receptor de melatonina MT₂ así como del receptor GABA_A, tiene un peso molecular de 292.37. ^(2,17)

PARACLOROFENILALANINA (PCPA).

Diversos compuestos de acción central afectan las concentraciones de serotonina libre en el cerebro, ⁽²⁰⁾ la biosíntesis de serotonina es bloqueada por la PCPA que inhibe la triptofano hidroxilasa, la enzima que limita la velocidad de la síntesis. ⁽²⁰⁾ La PCPA es el inhibidor selectivo de está enzima cuya acción es irreversible ya que disminuye intensamente y por mucho tiempo las concentraciones de 5-HT, sin cambios en las cifras de catecolaminas. ⁽²⁰⁾ Promueve la descarga de 5-HT desde las plaquetas y las neuronas. La descarga rápida de 5-HT va seguida de agotamiento prolongado y selectivo de ésta en el encéfalo. ⁽²⁰⁾

RESULTADOS

En este estudio el efecto “ansiolítico” se caracterizó evaluando diferentes parámetros.

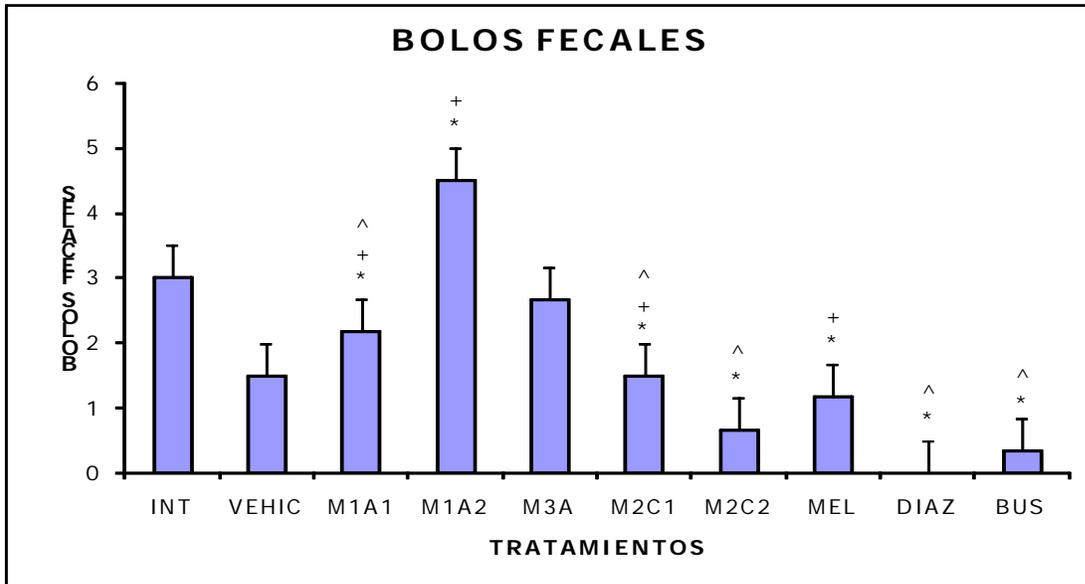
En el cuadro 2 y las gráficas 1, 2 y 3 se muestran los resultados de ($\bar{x} \pm EEM$) de los bolos excretados. Así como el promedio en porcentaje de micción y piloerección obtenidos de la post-administración, en la primera parte del estudio.

Cuadro 2. Resultados de los parámetros ansiolíticos evaluados.

TRATAMIENTOS	BOLOS \bar{x}	MICCIÓN $\% \bar{x}$	PILOERECCIÓN $\% \bar{x}$
INT	3±1.06	0	0
VEHIC	1.5±0.85	16.66	0
M1A₁	2.17±0.17	0	0
M1A₂	4.5±0.85	25	0
M3A	2.67±0.61	8.33	0
M2C₁	1.5±0.43	8.33	0
M2C₂	0.66±0.42	16.66	0
MEL	1.17±0.60	0	0
DIAZ	0±0	0	8.33
BUS	0.33±0.21	0	8.33

VEHIC= vehículo, M1A₁[2mg/mL], M1A₂[1mg/mL], M3A [2mg/2mL], M2C₁[2mg/mL], M2C₂[2mg/2mL]

MEL=melatonina [2mg/mL], DIAZ=diazepam[2mg/mL], BUS=buspirona [5mg/2mL], INT=Integras.



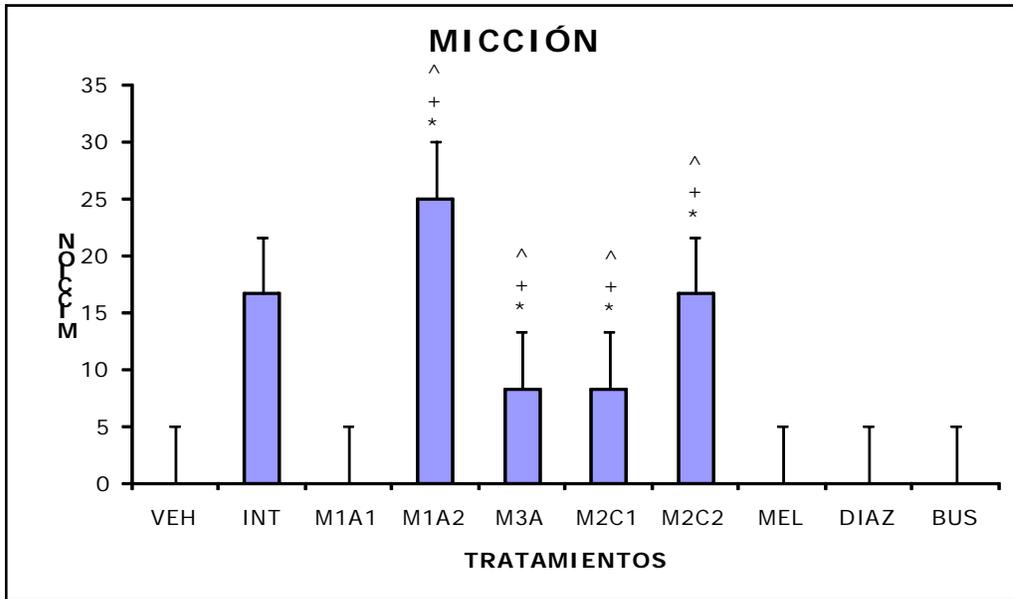
VEHIC= vehículo, M1A₁[2mg/mL], M1A₂[1mg/mL], M3A[2mg/2mL], M2C₁[2mg/mL], M2C₂[2mg/2mL] MEL=melatonina [2mg/mL], DIAZ=diazepam[2mg/mL], BUS=buspirona[5mg/2mL], INT=Integras,
 *p≤0.05 vs VEHIC, + p≤0.05 vs INT, ^ p≤0.05 vs MEL. Con “t student”

Gráfica 1. El promedio (x̄±EEM) de los bolos defecados obtenidos con las diferentes sustancias administradas.

Cuadro 3. Prueba ANOVA para el efecto de defecación (bolos).

FUENTE	g.l.	Suma de cuadrados(SC)	Varianza ó cuadrados medios	Fcalc.	Fteórica
TRATAMIENTOS	9	66.60	7.4	2.81	2.08
BLOQUES	5	41.9	8.38		
ERROR	45	118.4	2.63		
TOTAL	59	227	-----		

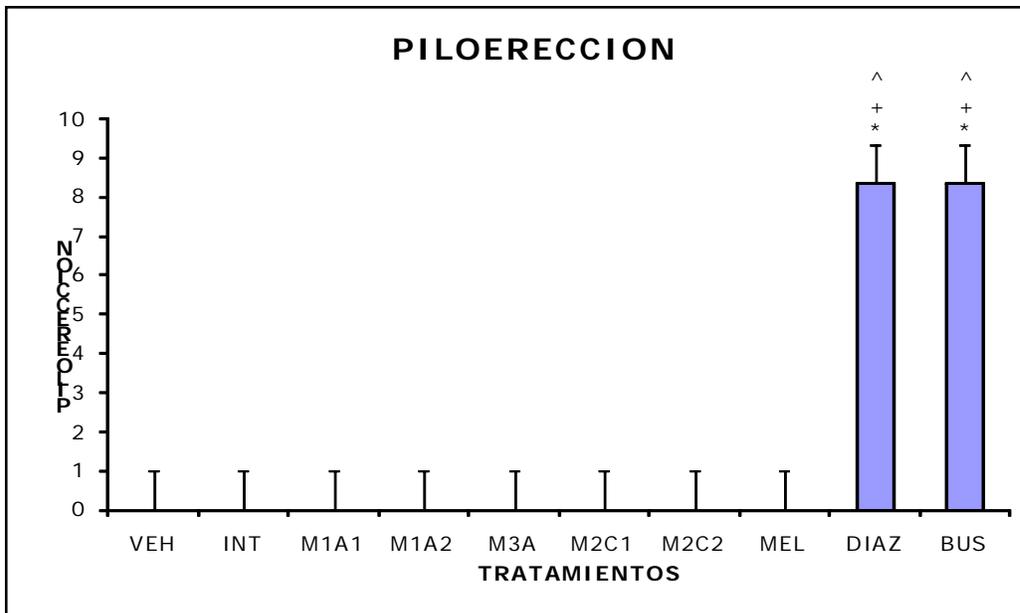
Existe diferencia significativa al 5% entre los tratamientos.



* $p \leq 0.05$ vs VEHIC, + $p \leq 0.05$ vs INT, ^ $p \leq 0.05$ vs MEL. Con "t student"

Gráfica 2. El promedio en porcentaje de micción para todas las sustancias administradas. Los grupos de INT, VEHIC, M1A₂, DIAZ y BUS no presentaron este efecto.

Con la prueba ANOVA para el efecto de micción. La $F_{calc.} = 1.88$ y la $F_{teórica} = 2.08$ No existe diferencia significativa al 5% entre los tratamientos.



* $p \leq 0.05$ vs VEHIC, + $p \leq 0.05$ vs INT, ^ $p \leq 0.05$ vs MEL. Con "t de student".

Gráfica 3. El promedio en porcentaje del efecto de piloerección observado con las sustancias administradas, los grupos control no presentaron este efecto. La BUS y el DIAZ presentaron el mismo efecto.

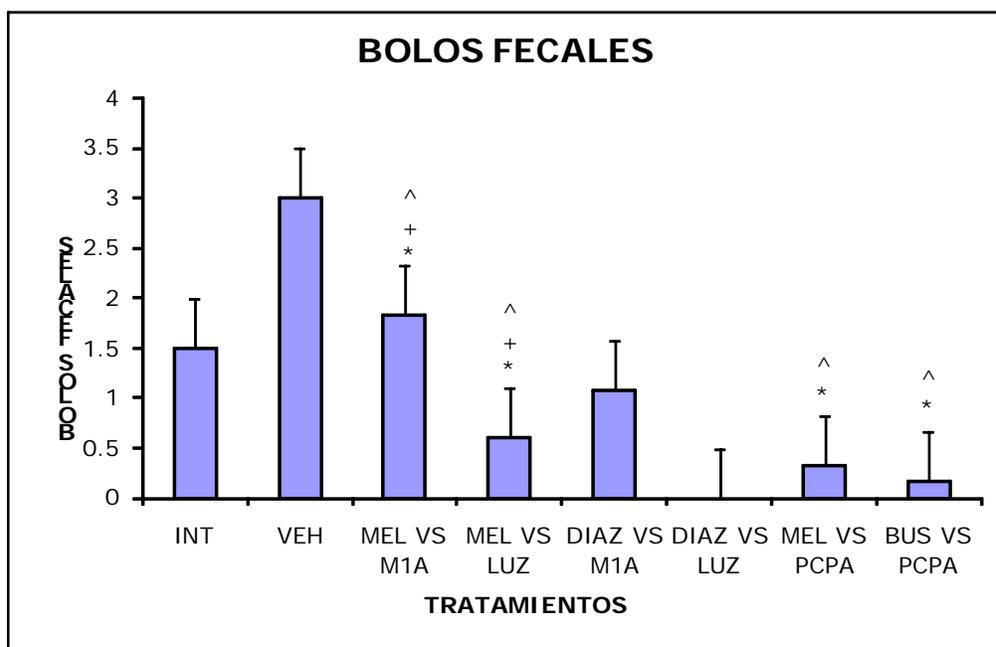
Con la Prueba ANOVA para el efecto de piloerección. La $F_{calc.}=0.81$ y la $F_{teórica}=2.08$ No existe diferencia significativa al 5% entre los tratamientos.

En la segunda etapa del estudio se evaluaron también los parámetros ansiolíticos anteriores. Se muestran los resultados obtenidos (Cuadro 4 y Gráficas 4, 5 y 6).

Cuadro 4. Resultados de los parámetros ansiolíticos evaluados.

TRATAMIENTOS	BOLOS \bar{x}	MICCIÓN $\% \bar{x}$	PILOERECCIÓN $\% \bar{x}$
INT	3±1.06	0	0
MEL/M1A ₁	1.83±0.88	8.33	16.66
MEL/LUZ	0.60±0.47	8.33	0
DIAZ/M1A ₁	1.08±0.82	25	0
DIAZ/LUZ	0±0	8.33	8.33
MEL/PCPA	0.33±0.27	0	8.33
BUS/PCPA	0.17±0.16	0	16.66

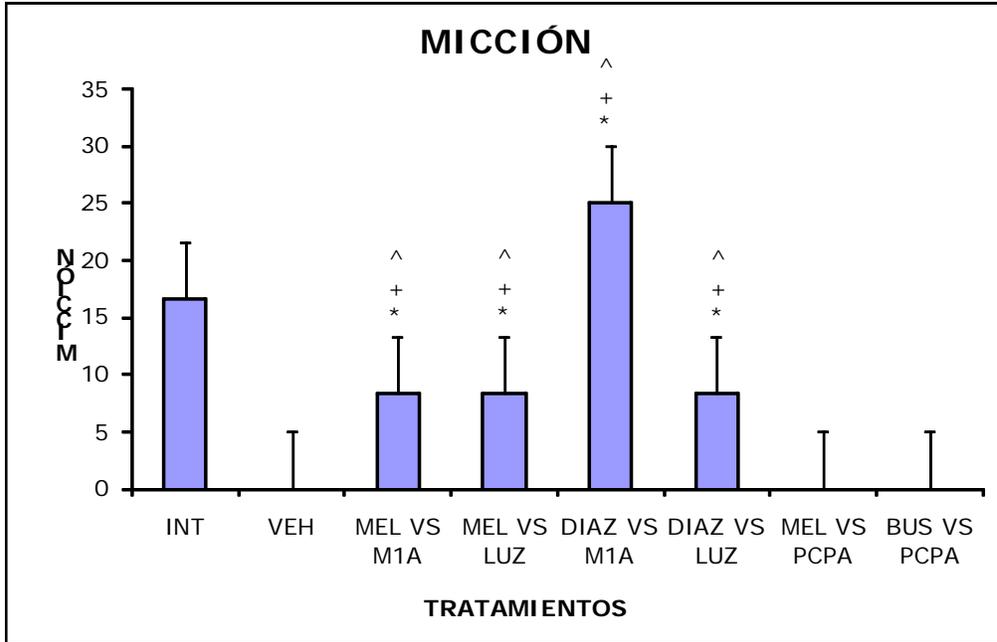
LUZ= luzindol, PCPA=paraclorofenilalanina, BUS=buspirona



* $p \leq 0.05$ vs VEHIC, + $p \leq 0.05$ vs INT, ^ $p \leq 0.05$ vs MEL. Con "t de student".

Gráfica 4. El promedio ($\bar{x} \pm EEM$) del número de bolos fecales. El grupo administrado con DIAZ vs. LUZ no presentaron este efecto.

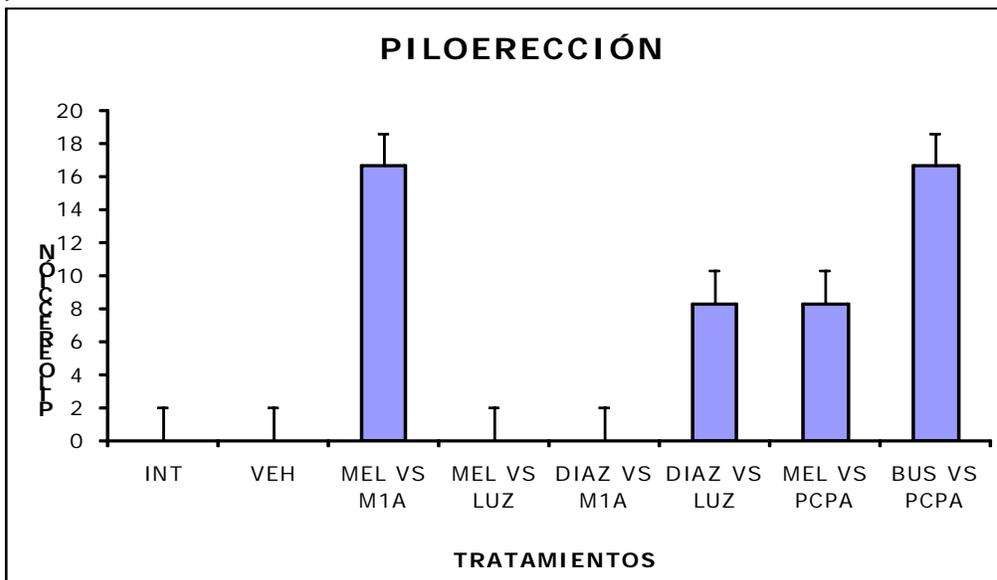
Con la prueba ANOVA para el efecto de defecación (bolos). La $F_{calc.}=3.45$ y la $F_{teórica}=2.29$ Existe diferencia significativa al 5% entre los tratamientos.



* $p \leq 0.05$ vs VEHIC, + $p \leq 0.05$ vs INT, ^ $p \leq 0.05$ vs MEL. Con "t de student".

Gráfica 5. El promedio en porcentaje de micción. Los grupos administrados con MEL vs. PCPA, BUS vs. PCPA y VEHIC no presentaron este efecto.

Con la prueba ANOVA para el efecto de micción. La $F_{calc.} = 1.41$ y la $F_{teórica} = 2.29$ No existe diferencia significativa al 5% entre los tratamientos.



* $p \leq 0.05$ vs VEHIC, + $p \leq 0.05$ vs INT, ^ $p \leq 0.05$ vs MEL. Con "t de student"

Gráfica 6. El promedio en porcentaje del efecto de piloerección. Los grupos control, MEL vs. LUZ y DIAZ vs. M1A, no presentaron este efecto.

Con la prueba ANOVA para el efecto de piloerección. La $F_{calc.}=0.95$ y la $F_{teórica}=2.29$ No existe diferencia significativa al 5% entre los tratamientos.

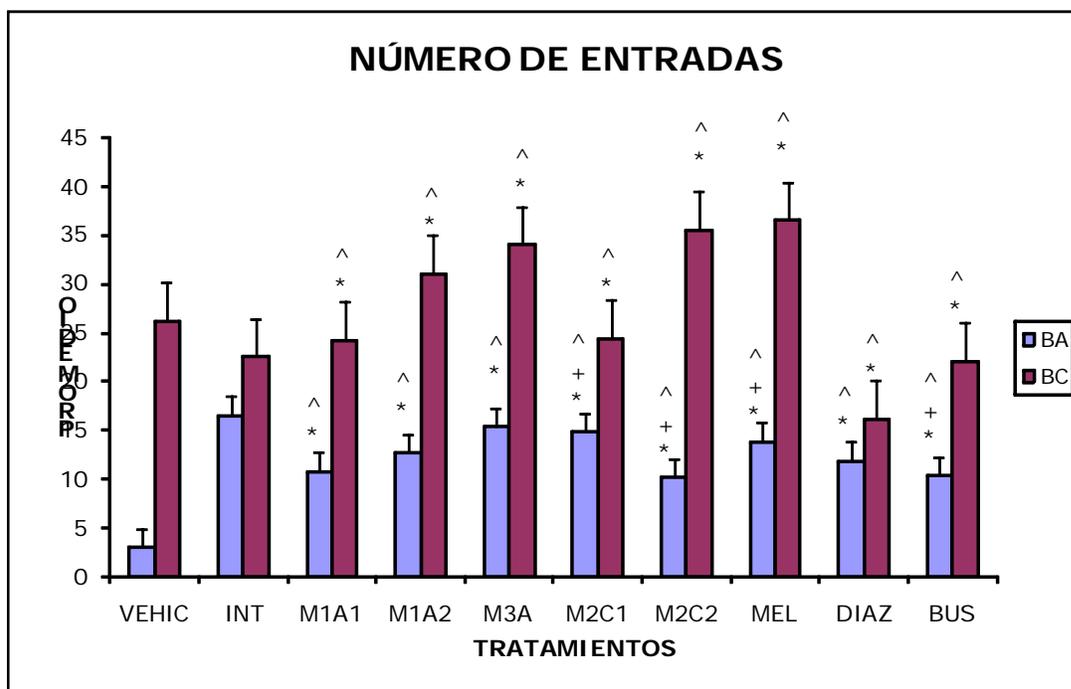
En el cuadro 5 (Primera parte experimental) se muestran los resultados en: promedio y porcentaje ($\bar{x} \pm EEM$) del número de entradas, así como del tiempo de permanencia en (s) en zona abierta y zona cerrada del modelo "Plus-maze". Cada grupo de ratas con una (n=6).

Cuadro 5. El promedio y porcentaje del número de entradas y del tiempo de permanencia en (s) de cada grupo de ratas en cada zona del modelo "Plus-Maze".

SUSTANCIAS	No. DE ENTRADAS				TIEMPO DE PERMANENCIA(s)			
	PROMEDIO		%		PROMEDIO		%	
	BA	BC	BA	BC	BA	BC	BA	BC
VEHIC	3±1.09	26.2±2.3	10.28	89.71	2.76±0.89	63.95±7.7	0.92	21.32
M1A₁	10.8±2.41	24.2±2.4	30.94	69.03	20.7±7.13	66.24±7.2	6.89	22.08
M1A₂	12.7±3.55	31±2.92	29	70.99	21.2±7.51	79.96±4.4	7.07	26.65
M3A	15.3±4.62	34±5.46	28.52	71.47	23.24±10	84.45±10	7.75	28.15
M2C₁	14.83±6.5	24±6.35	37.87	62.12	40.49±13	55.8±14	13.45	18.6
M2C₂	10.2±4.32	35±5.79	22.26	12.92	16.17±8.1	78.3±13	5.39	26.1
MEL	13.83±4.9	36±7.7	27.48	72.52	33.6±13.3	72.8±17.4	11.20	24.28
DIAZ	11.8±4.43	16.2±4.7	42.14	57.86	23.5±10.7	28.7±12	7.82	9.35
BUS	10.3±4.94	22±5.75	31.95	68.05	109±59	189.3±58	36.23	63.09
INT	9.8±6.75	22.5±4.2	36.94	50.37	15.38±12	56.53±9.7	10.66	18.84

VEHIC= vehículo, M1A₁[2mg/mL], M1A₂[1mg/mL], M3A [2mg/2mL], M2C₁[2mg/mL], M2C₂[2mg/2mL] MEL=melatonina [2mg/mL], DIAZ=diazepam[2mg/mL], BUS=bupiriona [5mg/2mL], INT=Integras BA=brazo abierto, BC=brazo cerrado.

Con los datos del cuadro 5. se elaboraron las gráficas 7, 8, 9, y 10 en las cuales se comparan los resultados y se evalúa el efecto ansiolítico de las diferentes sustancias utilizadas.



VEHIC= vehículo, M1A₁[2mg/mL], M1A₂[1mg/mL], M3A[2mg/2mL], M2C₁[2mg/mL], M2C₂[2mg/2mL] MEL=melatonina [2mg/mL], DIAZ=diazepam[2mg/mL], BUS=bupiriona[5mg/2mL], INT=Integras, BA=brazo abierto, BC=brazo cerrado.
 * p≤0.05 vs VEHIC, + p≤0.05 vs INT, ^ p≤0.05 vs MEL. Con “t de student”.

Gráfica 7. El promedio ($\bar{x} \pm EEM$) del número total de entradas, para cada sustancia administrada. Al comparar las barras de los grupos de INT, VEHIC y MEL vs. las de los grupos administrados, se observan diferencias significativas para todos los grupos.

Cuadro 6. Prueba ANOVA para el número de entradas en brazos abiertos.

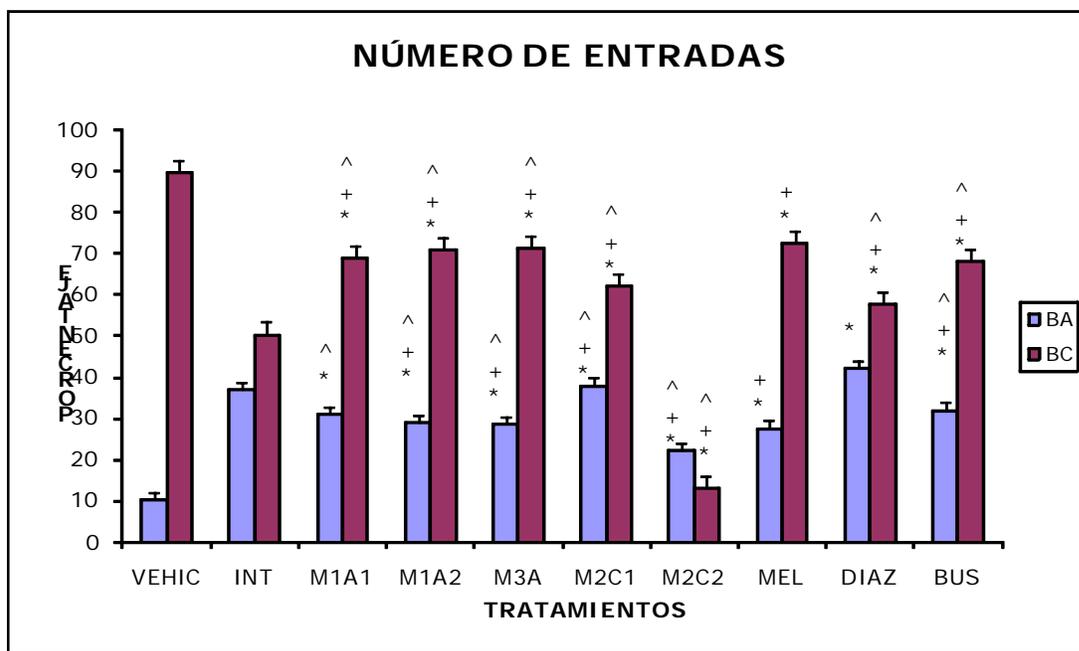
FUENTE	g.l.	Suma de cuadrados(SC)	Varianza ó cuadrados medios	Fcalc.	Fteórica
TRATAMIENTOS	9	814.18	90.46	0.84	2.08
BLOQUES	5	461.33	72.27		
ERROR	45	4860.22	108.00		
TOTAL	59	6135.73	-----		

No hay diferencias significativas al 5% entre los tratamientos.

Cuadro 7. Prueba ANOVA para el número de entradas en brazos cerrados.

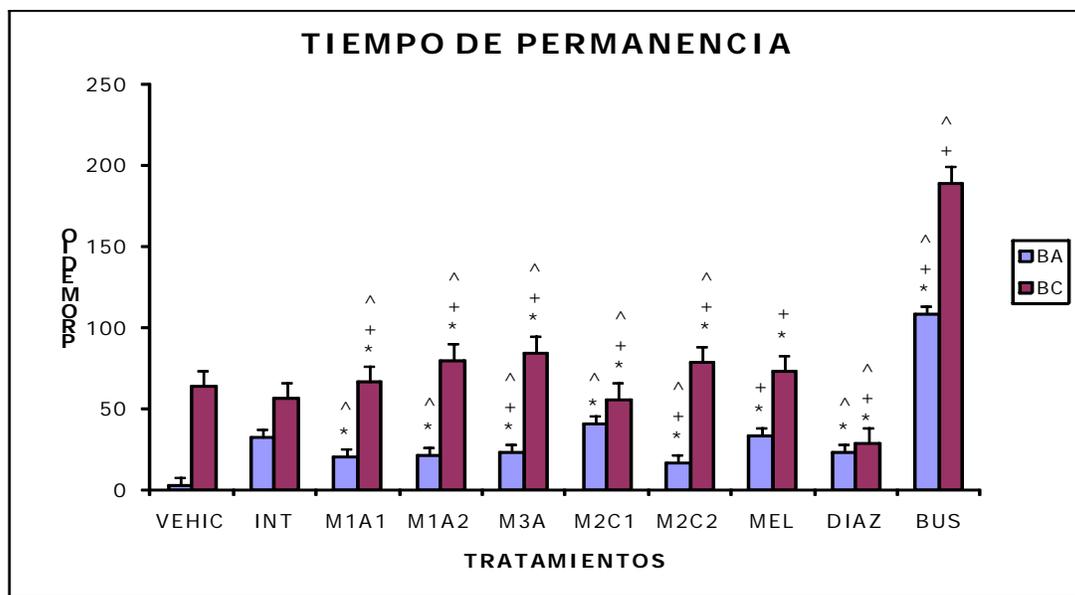
FUENTE	g.l.	Suma de cuadrados(SC)	Varianza ó cuadrados medios	Fcalc.	Fteórica
TRATAMIENTOS	9	2824.94	313.90	1.48	2.08
BLOQUES	5	-2345.07	-469.01		
ERROR	45	9550.06	212.22		
TOTAL	59	10029.93	-----		

No hay diferencia significativa al 5% entre los tratamientos.



* $p \leq 0.05$ vs VEHIC, + $p \leq 0.05$ vs INT, ^ $p \leq 0.05$ vs MEL. Con "t de student".

Gráfica 8. El porcentaje del número total de entradas, para cada sustancia administrada. Cuando comparamos los grupos de INT, VEHIC y MEL. vs. los grupos administrados existen diferencias significativas para todos los grupos. El grupo de INT y VEHIC presentan solo diferencias significativas al compararlos con MEL.

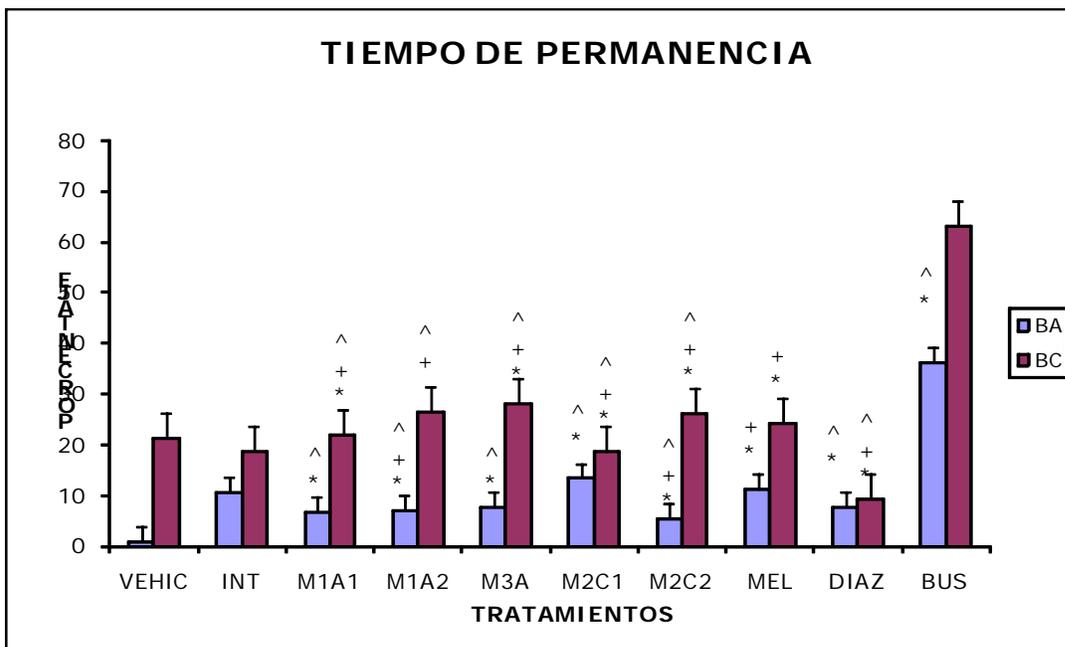


* $p \leq 0.05$ vs VEHIC, + $p \leq 0.05$ vs INT, ^ $p \leq 0.05$ vs MEL. Con "t de student".

Gráfica 9. El promedio ($\bar{x} \pm EEM$) del tiempo total de permanencia para cada sustancia administrada. Al comparar las barras de los grupos control con los grupos tratados observamos diferencias significativas para todos los grupos.

Con la prueba ANOVA para el tiempo de permanencia (s) en brazos abiertos. La $F_{calc.}=3.66$ y la $F_{teórica}=2.08$ Existe diferencia significativa al 5% entre los tratamientos.

Con la prueba ANOVA para el tiempo de permanencia (s) en brazos cerrados La $F_{calc.}=20.04$ y la $F_{teórica}=2.08$ Existe diferencia significativa al 5% entre los tratamientos.



* $p \leq 0.05$ vs VEHIC, + $p \leq 0.05$ vs INT, ^ $p \leq 0.05$ vs MEL. Con "t de student".

Gráfica 10. El porcentaje del tiempo de permanencia total para cada sustancia administrada. Al comparar las barras de los grupos control con los grupos tratados observamos diferencias significativas para todos los grupos excepto para la bupiriona.

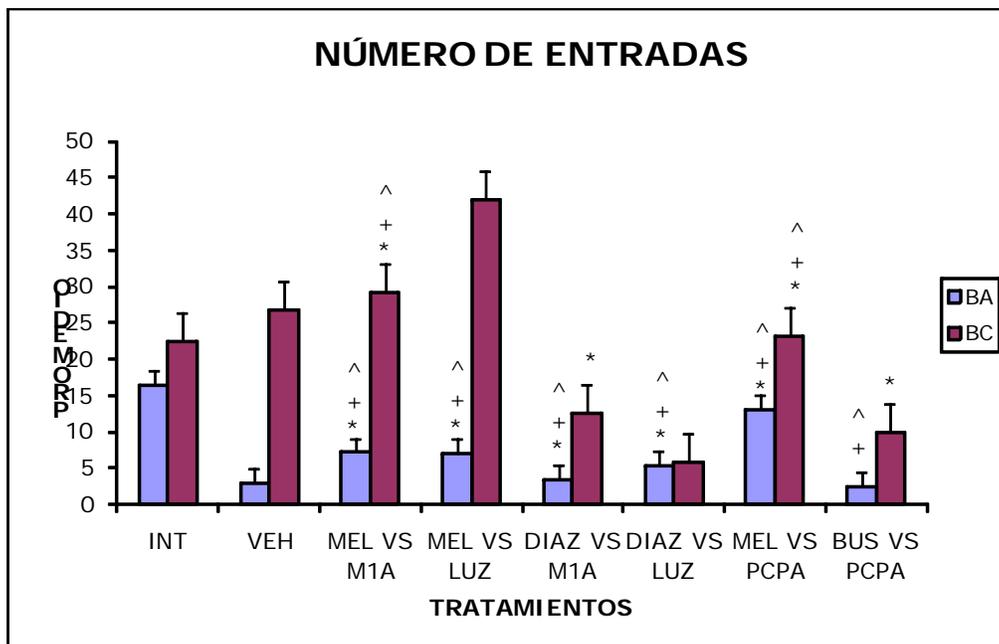
En la segunda etapa del estudio se administraron dos fármacos con el objetivo de evaluar la interacción farmacológica o efecto de los mismos.

En el cuadro 8 y gráficas 11, 12, 13 y 14, se encuentran los resultados promedio de los parámetros medidos. Cada grupo tratado tiene una (n=6).

Cuadro 8. El promedio ($\bar{x} \pm EEM$) y el porcentaje del número de entradas y del tiempo de permanencia en cada zona de "Plus-Maze".

SUSTANCIAS	No. DE ENTRADAS				TIEMPO DE PERMANENCIA(s)			
	PROMEDIO		%		PROMEDIO		%	
	BA	BC	BA	BC	BA	BC	BA	BC
INT	9.8±6.75	22.5±4.24	36.94	50.37	15.38±12	56.53±9.7	10.66	18.84
MEL/M1A ₁	7.17±5.02	29.2±8.54	19.74	80.32	12.45±11	120±42.9	4.15	40.09
MEL/LUZ	7.0±3.67	41.83±8.5	14.33	85.66	57±48.88	126±39.9	19.0	42.15
DIAZ/M1A ₁	3.50±3.30	12.50±3.4	21.87	78.12	5.54±5.3	28.1±8.82	1.85	9.36
DIAZ/LUZ	5.40±4.25	5.80±4.15	48.21	51.79	10.2±9.0	9.28±8.22	3.41	3.09
MEL/PCPA	13.2±10.5	23.17±7.04	36.25	63.78	49.3±47	213±61.18	16.46	70.99
BUS/PCPA	2.50±1.87	9.83±3.29	20.27	79.72	1.95±1.4	234±58.62	0.65	77.87

LUZ= luzindol, PCPA=paraclorofenilalanina, BUS=buspirona

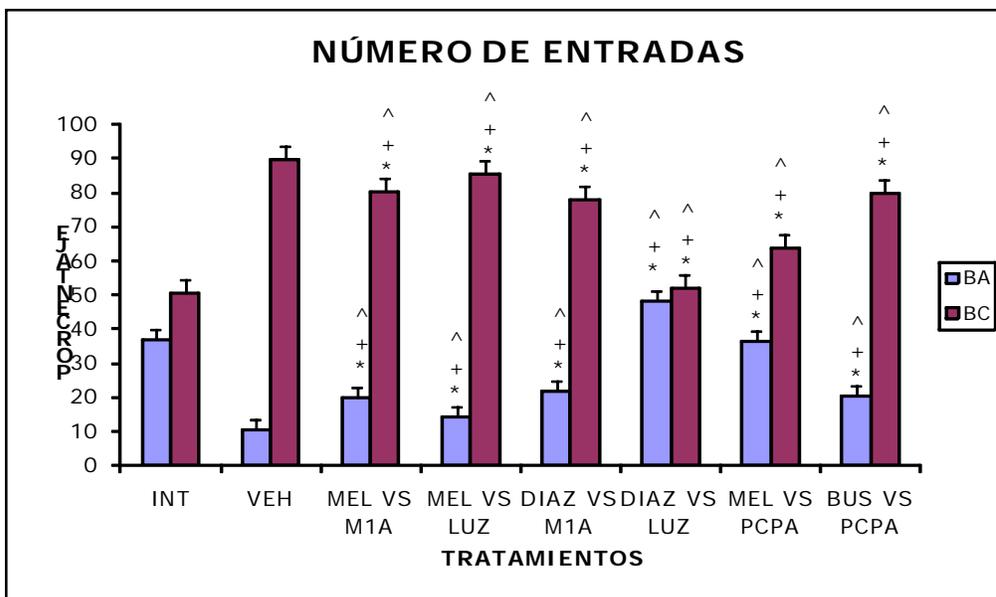


* $p \leq 0.05$ vs VEHIC, + $p \leq 0.05$ vs INT, ^ $p \leq 0.05$ vs MEL. Con "t de student".

Gráfica 11. El promedio ($\bar{x} \pm EEM$) del número total de entradas para cada tratamiento. Cuando comparamos las barras de los grupos control vs. las de los grupos tratados (n=6), hay diferencias significativas, excepto para DIAZ vs. LUZ y BUS vs. PCPA.

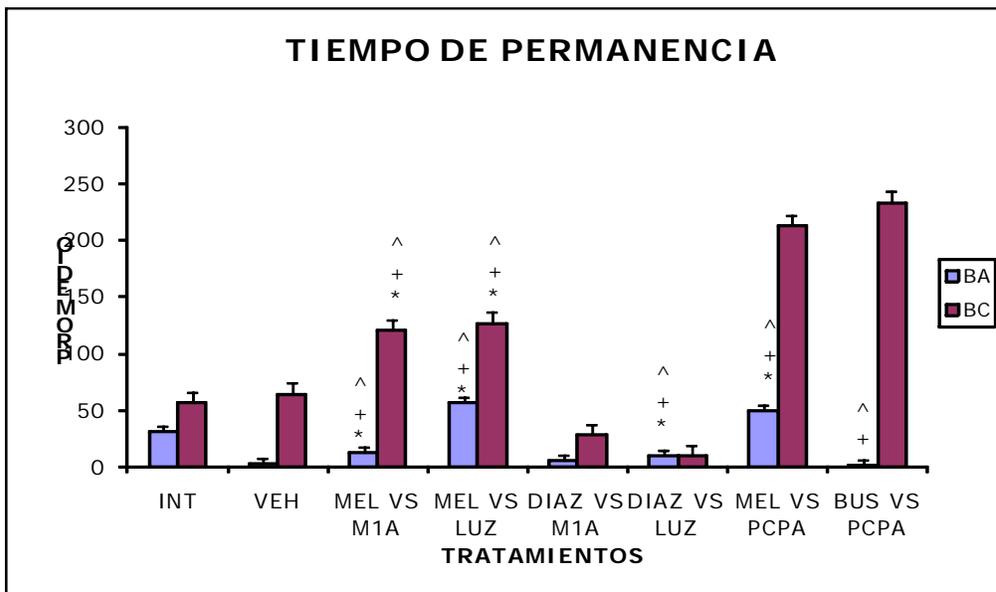
Con la prueba ANOVA para el número de entradas en brazos abiertos. La $F_{calc.} = 1.03$ y la $F_{teórica} = 2.29$ No existe diferencia significativa al 5% entre los tratamientos.

Con la prueba ANOVA para el número de entradas en brazos cerrados efecto de piloerección. La $F_{calc.} = 3.28$ y la $F_{teórica} = 2.29$ Existe diferencia significativa al 5% entre los tratamientos.



* $p \leq 0.05$ vs VEHIC, + $p \leq 0.05$ vs INT, ^ $p \leq 0.05$ vs MEL. Con "t de student".

Gráfica 12. El porcentaje del número total de entradas para cada tratamiento. Cuando comparamos los grupos control vs. los grupos tratados hay diferencias significativas entre todos los grupos.

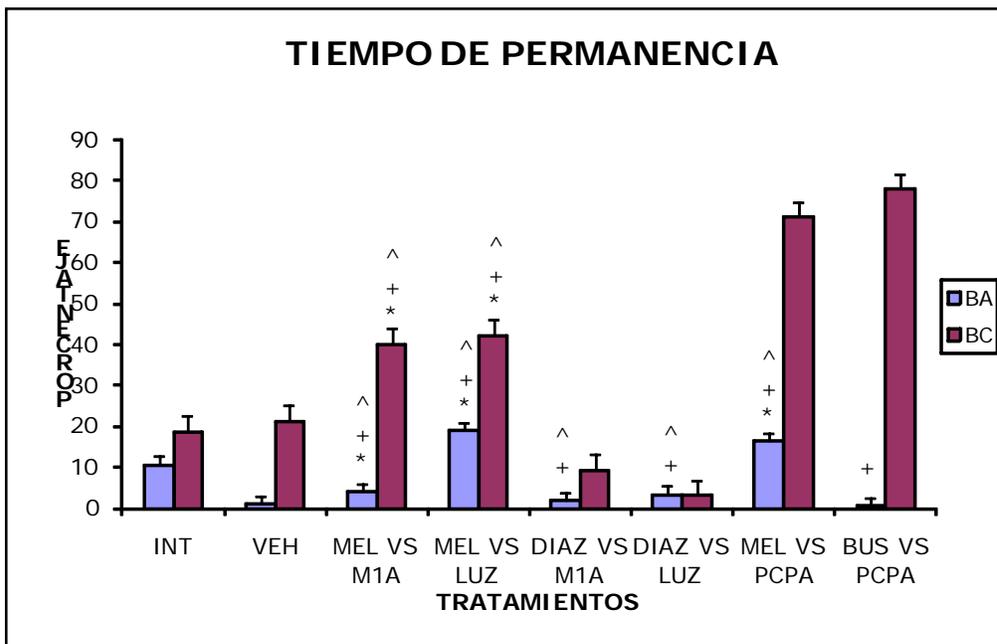


* $p \leq 0.05$ vs VEHIC, + $p \leq 0.05$ vs INT, ^ $p \leq 0.05$ vs MEL. Con "t de student".

Gráfica 13. El promedio ($\bar{x} \pm EEM$) del tiempo de permanencia total para cada sustancia administrada. Al comprar los grupos control con los tratados hay diferencias significativas entre MEL vs. M1A y MEL vs. LUZ.

Con la prueba ANOVA para el tiempo de permanencia (s) en brazos abiertos. La $F_{calc.}=0.79$ y la $F_{teórica}=2.29$ No existe diferencia significativa al 5% entre los tratamientos.

Con la prueba ANOVA para el número de entradas en brazos cerrados efecto de piloerección. La $F_{calc.}=-26.0$ y la $F_{teórica}=2.29$ Existe diferencia significativa al 5% entre los tratamientos.



* $p \leq 0.05$ vs VEHIC, + $p \leq 0.05$ vs INT, ^ $p \leq 0.05$ vs MEL. Con "t de student".

Gráfica 14. El porcentaje del tiempo de permanencia total para cada sustancia administrada. Al comparar los grupos control vs. los administrados hay diferencias significativas entre MEL vs. M1A₁ y MEL vs. LUZ.

NOTA. Los resultados de la prueba de Duncan se encuentran en el ANEXO 1.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

En la primera etapa en donde se evalúa el efecto ansiolítico de las diferentes sustancias utilizadas, observamos que las ratas a las que se les administró el vehículo al igual que las integras permanecieron más tiempo en los brazos cerrados ya que al estar sometidas al modelo manifiestan una conducta “ansiosa”^(26,34,46), por lo que corroboramos que el vehículo no interviene en la disminución de esta conducta.

La BUS (5 mg/Kg) al compararse con los grupos control (INT y VEHIC) es la que produce el mayor efecto ansiolítico por permanecer más tiempo en los brazos abiertos.

La MEL (2 mg/Kg) y el DIAZ (2 mg/Kg) también, producen un efecto ansiolítico por permanecer y entrar más a los brazos abiertos al compararlos con los grupos control. Esto concuerda con lo descrito por otros autores utilizando este modelo en ratas^(15,21,26,34,46) y con lo que se ha descrito utilizando modelos como Rota rod^(15,24,34) y escondrijo de esferas^(15,24,34). Cabe mencionar que el DIAZ produce menor efecto ansiolítico que la BUS y la MEL. a las dosis utilizadas.

Todos los análogos presentan un efecto ansiolítico al compararlos con los grupos control. Sin embargo observamos que el análogo M2C₁ es el que produce mejor efecto al registrarse el mayor tiempo de permanencia en los brazos abiertos, seguido por el análogo M3A que es el que presenta el mayor número de entradas en los brazos abiertos.

En este estudio el efecto ansiolítico se caracterizó también, considerando los siguientes parámetros: bolos fecales, micción y piloerección que son las reacciones que presentaron en común la mayoría de los grupos tratados. Sin embargo, no se encuentra un patrón definido (ver Cuadros 2 y 3 en resultados).

En la segunda etapa experimental para evaluar la interacción farmacológica observamos:

En la interacción de la MEL más el análogo M1A, comparada con MEL cuando se administra sola, se presenta un decremento en el tiempo de permanencia y el número de entradas en zona abierta, esto es debido a que el análogo M1A₁ podría ser un “antagonista competitivo” de la MEL porque impide la unión de esta a su receptor pero también no genera una respuesta, ^(A) esto lo comprobamos porque aumenta el número de entradas y el tiempo de permanencia en los brazos cerrados.

En la evaluación de DIAZ en presencia de LUZ al ser comparado con DIAZ cuando se administra solo, se observó que el LUZ ^(2,17) disminuye los efectos de DIAZ; sin embargo, sabemos que el DIAZ potencia o facilita la acción inhibitoria del GABA⁽¹¹⁾ y el LUZ es un antagonista del receptor MT₂ de MEL ^(12,17) Al menos en este estudio esperábamos que LUZ no interfiriera en el efecto ansiolítico de DIAZ. Sin embargo esto sucedió. Por lo cual pensaríamos que LUZ tiene alguna interacción con el sistema GABA/BZPs.

En la interacción de BUS más PCPA, comparado con BUS cuando se administra sola; observamos que PCPA esta alterando los efectos ansiolíticos de BUS, se sabe que la PCPA bloquea la biosíntesis de serotonina ya que inhibe a la triptofano hidroxilasa, ^(3,20) esta enzima limita entonces la velocidad de la síntesis agotando las concentraciones de la misma. ^(3,20)

Al evaluar los resultados obtenidos con las otras interacciones: MEL más LUZ, al comparar el comportamiento de las ratas al administrar MEL sola; hay un decremento importante en el número de entradas y tiempo de permanencia en zona abierta así como un aumento considerable en el número de entradas y tiempo de permanencia en la zona cerrada por lo que podríamos decir que el LUZ

esta antagonizando a la MEL lo que nos indica que MEL actúa por un mecanismo de acción a través de receptores MT_2 de MEL. ⁽³⁸⁾

Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos con la interacción de MEL más PCPA y MEL sola; no hay cambios en el número de entradas pero si en el tiempo de permanencia en la zona abierta, lo que sugiere que serotonina no esta implicada en el efecto ansiolítico de MEL, al menos en esta condición experimental.

Por otro lado, en la interacción DIAZ más $M1A_1$; observamos que el número de entradas y el tiempo de permanencia en zona abierta disminuye considerablemente lo que nos indica que el análogo $M1A_1$ esta alterando el efecto ansiolítico del DIAZ, posiblemente, el análogo $M1A_1$ tiene un mecanismo de acción a través de receptores GABA/BZP.

Por lo tanto, podemos decir que la MEL produce un efecto ansiolítico similar al del DIAZ, ^(4,12,36) se ha sugerido que actúa regulando las concentraciones de GABA o bien sobre receptores de este neurotransmisor al igual que las BZPs. ^(15,30,32,39,52) Sin embargo, quizá pueda actuar sobre vías serotoninérgicas ya que existen estudios que relacionan a la MEL con cambios en los niveles de serotonina, lo cual puede estar dado por su relación estructural similar a la serotonina o por vías reguladas a nivel de hipotálamo, ambos mecanismos se relacionan con la ansiedad. ⁽⁴⁷⁾ Lo cual no se observó en nuestras condiciones experimentales.

CONCLUSIONES

- Los análogos de MEL: (M1A, M3A y M2C) producen efecto ansiolítico similar al observado con MEL, DIAZ y BUS.
- El análogo M2C (2mg/kg) produjo el mejor efecto ansiolítico en comparación con los análogos M1A y M3A.
- El efecto ansiolítico de DIAZ o MEL, se revirtió en presencia de LUZ sugiriendo la participación del receptor MT_2 .
- Mientras que el efecto ansiolítico de PCPA se revirtió en presencia de BUS sugiriendo la inhibición de la síntesis de serotonina al inhibirse la enzima triptofano hidroxilasa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adams R. H. (2003). Farmacología y terapéutica veterinaria. 2ª ed. Arribia pp. 346.
2. A. L.S., J. Jawerek, J. Bonior, K. Nawrot, M. Kot, R. T. Zewska, J. Stachura, W.W. Pawlik, S. J. Konturek. (2002). Luzindole, melatonin MT2, Receptor Antagonist, increased Lipid Peroxidation and TNF alpha Production in Ischemia/ Reperfusion Induced Pancreatitis. Chair of Physiology,Inst. Pathology. Nursing Jagiellonian University CM, Cracow, Poland. Pancretol. 2Ñ 217-361.
3. Angrini. M. J., C. Leslie., A. Shephard. R. (1998). Effects of propranolol, buspirone, PCPA, reserpine, and chlordiazepoxide on Open. Field Behavior. Pharm. Biochem. Behavior, Vol. 59, No.2, 387-397.
4. Barret J. E and Vanover K. E (1993). 5-HT receptors as targets for the development of novel anxiolytic drugs: models, mechanism and future directions. Psychopharmacol. 112: 1-12.
5. Brailowsky S. (2004). Las sustancias de los sueños Neuropsicofarmacología. 1ª ed. México, Fondo de Cultura Económica.
6. Cardinalli. D. P. (1981) Melatonin: a mamalian pineal Hormone. Endocrine Rev. 2:327-343.
7. Castilla S.L., Cravioto J. (1991). Estadística simplificada para la investigación en ciencias de la salud. 1ª ed.Trillas. México. pp. 279-284.
8. Clement Y., Chapouthier. G. (1998). Biological bases of anxiety. Neurosci. Biobehav. Rev. 22:5 623-633.
9. Coplan J. D., Gorman J. M. & Kelin D. F. (1992). Serotonin-related funtion in panic disorder: a critical overview. Neuropsychopharmacol. 6, 189-200.
10. Cunningham L. A. (1997). Depression and anxiety in the primary care setting. Compr. Ther. 23(6): 400-406.
11. Chopin P. and Briley M. (1987). Animal models of anxiety: The effect of compounds that modify 5-HT neurotransmission. Trends in Pharmacol. Sci. 8: 383-383.
12. D. G. A., Pringle J. K., Smith D. A., Lippincott-Raven (1998). Handbook of veterinary drugs. 2nd. Nueva York. pp. 102.
13. Den Boer J. A., & Westenberg H. G. M (1993). Critical notes on the locus coeruleus hypothesis of panic disorder. Acta Neuropsychiat. 5: 48-54.
14. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas (2003) 49 ed.

15. Duch Campodarbe F. R., Ruiz de Porras Rossello L., Gimeno Ruiz D. Manejo clínico de los ansiolíticos. *Semergen* 24 (10): 826-836.
16. Dudocovich M.L. (1995). Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *TRENDS Pharmacol. Sci.* 16 (2): 50-56.
17. Dudocovich M.L. (1988). Luzindole (N-0774): un antagonista del receptor de melatonina. *J. Pharmacol. Exp. THER.* pp. 246, 902.
18. Duncan P., Taylor L.A., Stanton H. C., Eison A. S. And Temple D. L. (1982). Dopamine and antianxiety activity. *Pharmacol. Biochem. Behavior.* 17(1): 25-35.
19. Echebarúa E. (1996). Clasificación de los trastornos de ansiedad. *Avances en el tratamiento psicológico de los trastornos de ansiedad.* Madrid, Pirámide. pp. 19-32.
20. Gibson E.L., Barnfield A.M.C., Curzon G. (1994). Evidence that mCCP-induced Anxiety in the Plus-maze is Mediated by Postsynaptic 5-HT_{2c} Receptors but not by Sympathomimetic Effects. *Neuropharmacol.* 33 (3/4): 457-465.
21. Goldberg H. L. (1979) Buspirone: A new antianxiety agent not chemical related to any presently marketed drugs. *Psychopharmacol. Bull.* 15(2): 90-92.
22. Golombek D.A., Martini, M and Cardinalli D.P. (1993). Melatonin as an anxiolytic in rats: time dependence and interaction with the central GABAergic system. *Eur. J. Pharmacol.* 237: 231-236.
23. Goodman y Gilman (1996). *Las bases farmacológicas de la terapéutica* Vol. I. 8ª ed. México, Mc. Graw Hill Interamericana. pp. 74-75, 386-408 y 423-457.
24. Gyertyan I. (1992). Animals models of anxiety: A critical review. *Acta Physiol. Hung.* 79 (4): 369-379.
25. Handley S. L., McBlain J. W. (1993). 5-HT drugs in animal models of anxiety. *Psychopharmacol.* 112: 13-20.
26. Hogg, S. (1996). A Review of the validity and variability of the elevated Plus-Maze as an animal model of anxiety. *Psychopharmacol. Biochem.* 54(1): 21-30.
27. Houssay A. B., Cingolani Horacio E., Guyton Arthur C., Hall Jonh E. (2000). Fisiología de la glándula pineal. En: *Fisiología médica.* 9ª ed. Argentina, El Ateneo. pp. 633-637.
28. Houssay A. B., Cingolani Horacio E., Guyton Arthur C., Hall Jonh E. (2000). Excitación del músculo esquelético. En: *Fisiología médica.* 9ª ed. Argentina, El Ateneo. pp. 95-102.
29. Index Merck (2000).
30. Katzung G. Bertram, (2002). *Farmacología Básica y Clínica.* 8ª ed. México, D. F., El manual moderno. pp.67-69, 328-329, 388-389 y 461-472.

31. Lerner A.B. and Case J.D. (1960). Melatonin. *Fed. Proc.* 19: 590-593.
32. Lerner A.B., Case J.D., Takahashi Y., Lee T.H., Morri W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.* 80: 2387.
33. Lira Rocha S.A., Espejo Gonzalez O., Naranjo Rodríguez E.B. (2002). Receptor-binding studies of 1-N-sustituted melatonin analogues. *Eur. J. Med. Chem.* 37:945-951.
34. Lister G. R. (1990). Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol.* 46: 321-340.
35. Litter M. (1988). Compendio de farmacología. Capítulo 10. Los Tranquilizantes, y Capítulo 11. Drogas Anticonvulsivantes y Relajantes Musculares Centrales. 4^a. ed. El Ateneo, Argentina.
36. López-Rubalcava C., Saldivar, Fernández-Guasti A. (1992). Interaction of GABA and serotonin in the anxiolytic action of diazepam and serotonergic anxiolytics. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 43: 440-443.
37. Louie A. K., Lannon R. A., & Ketter. T. A., (1989). Treatment of cocaine induced panic disorder. *Am. J. Psychiat.* 146, 450-44.
38. Mahle C.D., Takaki K.S., Watson A.J. (1997). Melatonin receptor ligands and their potencias clinical applications. *Ann. Rep. Med. Chem.* 32, Robertson Ed., pp. 31-40.
39. Marks J. (1983). The benzodiazepines for good or evil. *Neuropsychobiol.* 10: 115-126.
40. Marqués de Cantú M. J. (1991). Probabilidad y estadística para ciencias químico-biológicas. Preedición, México, DF., Mc.Graw-Hill. pp. 195, 233, 361-371, 558 y 569-570.
41. McCord C.P., Allen F.P. (1917). Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J.Exp. Zool.* 23: 217-224.
42. McNaughton N., Panickar K.S., Logan B. (1996). The pituitary-adrenal axis and the different behavioral effects of buspirone and clordiazapoxide. *Pharm. Biochem. Behav.* 54(1): 51-56.
43. Müller C. E., Deters D., Dominik And Pawlowlki M. (1998). Synthesis of Paraxanthine and Isoparaxanthine Analogs (1,7-and 1,9-Substituted Xanthine Derivatives), *Pharmazastische Chemie*, vol 8, 1428-1436.
44. Naranjo Rodríguez E. B., Ortiz Osornio A., Hernández Avita E., Mendoza V., Escobar A. (2000). Anxiolytic-like actions of melatonin 5-metoxytryptophol, 5-hidroxytryptophol and Benzodiazepines on a conflict procedure. *Prog. Neuro-Psycharmacol. Biol.* 24: 117-129.

-
45. O'callaghan D., Karsch F. J., Boland M. P., Roche J. F. (1991). Role of short days in the onset and duration of reproductive activity in ewes under artificial photoperiods. *J. Anim. Sci.* 44(1): 23-28.
 46. Pellow S., Chopin P., File S. E., Briley M. (1985). Validation of open: close arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurol. Met.* (14): 149-167.
 47. Redmon D. E. (1985). Neurochemical bases for anxiety and anxiety disorders: evidence from drugs which decrease human fear or anxiety. En A Tums eds. *Anxiety and Anxiety Disorders*. Hillsdale: Lawrence Erlbaum. 530-555.
 48. Sanger D. J. (1991). Animals models of anxiety and the screening and development of novel anxiolytic drugs. *Neuromethods Vol. 19: Animal models in psychiatry, II*.
 49. Saunders B.D. (1993). Estimación y comparación de medias. *Bioestadística Médica*. 1ª. ed. El manual moderno. pp. 115-141.
 50. Schuckit M. A. (1984). Clinical studies of buspirone. *Psychopathol.* 17(3): 61-64.
 51. Schweizer E., Rickels K. (1997). Strategies for treatment of generalized anxiety in the primary care setting. *J. Clin. Psychiatry*. 58 Suppl 3: 27-31.
 52. Tallman, J. F. P., S. M., Skolnick, P. Gallagher, D. W. (1980). Receptors for the age anxiety: *Pharmacol. Sci.* 207(18): 274-281.
 53. Tang P.L., Pang S.F. (1988). Changes in melatonin levels in the pineal, serum, and brain in male rats following the removal of the retina and retina plus Harderian gland. *J. Am. Med. Ass. Neurosci. Lett.* 10 (suppl): 473.
 54. *Vademecum farmacéutico* (2000). 1ª. ed. Editores Rezza.
 55. Woodfill, C.J., Robinson J.E., Malpoux, B., Karsch, F.J. (1991). Synchronization of the circannual reproductive rhythm of the ewe by discrete photoperiodic signals. *Biol. Reprod.* 45(1): 110-121.

BIBLIOGRAFÍA ELECTRÓNICA

A. Canal-h.net/webs/.../INTERACCIONES.htm

B. Fai.unne.edu.ar/biología/.../clas2do%5interacción_03.pdf.

C. www.portalesmédicos.com/publicaciones/articulos/1210/interacciones-farmacocinéticas.

D. Departamento de Ciencias Fisiológicas (2000). Sesión 54. Clase de: Ansiolíticos e hipnosedantes. fisio@hermes.javeriana.edu.co

E. Jérez Magaña Álvaro Antonio (2004). Neurotransmisores. <http://www.drjerez.com/>

F. Porras Serna Ernesto Raúl. <http://www.pnlneyt.com>

G. Santaella Lola. (2001) Melatonina. Saludalia@saludalia.com

H. GABA_A-rho receptor-Wikipedia, the Free Encyclopedia. en.wikipedia.org/wiki/GABAA-rho-receptor.

I. Webvision:GABA_C Receptors. By Haohua Qian. [Webvision med.utah.edu/GABA_C.htm](http://Webvision.med.utah.edu/GABA_C.htm)

J. melatonina-Wikipedia, la enciclopedia libre. es.wikipedia.org/wiki/Melatonina.

K. Agonistas del receptor de la melatonina reduce la respuesta de..... www.psiquiatria.com/buscador/proxy.ats?.

ANEXO I

RESULTADOS PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES (PRUEBA DE DUNCAN) HECHA CON EL PROGRAMA UNISTAT V.3.

***** Multiple Range Tests

1. NÚMERO DE ENTRADAS EN BRAZOS ABIERTOS

Dependent variable: C2

Method:95% Duncan interval.

Table Ranges: 2.84 2.99 3.08 3.15 3.21 3.25 3.29 3.32 3.35

* denotes significantly different pairs. Vertical bars show homogeneous subsets.

group	cases	mean	vehic	DIAZ	M2C2	BUS	m1a1	M1A2	MEL
vehic	6	3							
DIAZ	6	9.833333333333							
M2C2	6	10.166666666667							
BUS	6	10.333333333333							
m1a1	6	10.833333333333							
M1A2	6	12.666666666667							
MEL	6	13.833333333333							
M2C1	6	14.833333333333							
INT	6	16.5							
M3A	6	23.666666666667	*						

Method:95% Duncan interval.

Table Ranges: 2.84 2.99 3.08 3.15 3.21 3.25 3.29 3.32 3.35

* denotes significantly different pairs. Vertical bars show homogeneous subsets.

group	cases	mean	M2C1	INT	M3A
vehic	6	3			*
DIAZ	6	9.833333333333			
M2C2	6	10.166666666667			
BUS	6	10.333333333333			
m1a1	6	10.833333333333			
M1A2	6	12.666666666667			
MEL	6	13.833333333333			
M2C1	6	14.833333333333			
INT	6	16.5			
M3A	6	23.666666666667			

***** Multiple Range Tests

2. NÚMERO DE ENTRADAS EN BRAZOS CERRADOS

Dependent variable: C5

Method:95% Duncan interval.

Table Ranges: 2.84 2.99 3.08 3.15 3.21 3.25 3.29 3.32 3.35

* denotes significantly different pairs. Vertical bars show homogeneous subsets.

group	cases	mean	DIAZ	BUS	INT	m1a1	M2C1	vehic	M1A2
DIAZ	6	13.5						*	
BUS	6	22							
INT	6	22.5							
m1a1	6	24.1666666667							
M2C1	6	24.3333333333							
vehic	6	26.1666666667							
M1A2	6	31	*						
M3A	6	34	*						
M2C2	6	35.5	*						
MEL	6	36.5	*						

Method:95% Duncan interval.

Table Ranges: 2.84 2.99 3.08 3.15 3.21 3.25 3.29 3.32 3.35

* denotes significantly different pairs. Vertical bars show homogeneous subsets.

group	cases	mean	M3A	M2C2	MEL
DIAZ	6	13.5	*	*	*
BUS	6	22			
INT	6	22.5			
m1a1	6	24.1666666667			
M2C1	6	24.3333333333			
vehic	6	26.1666666667			
M1A2	6	31			
M3A	6	34			
M2C2	6	35.5			
MEL	6	36.5			

***** Multiple Range Tests

3. TIEMPO PERMANENCIA EN BRAZOS ABIERTOS

Dependent variable: C8

Method:95% Duncan interval.

Table Ranges: 2.84 2.99 3.08 3.15 3.21 3.25 3.29 3.32 3.35

* denotes significantly different pairs. Vertical bars show homogeneous subsets.

group	cases	mean	vehic	M2C2	DIAZ	m1a1	M1A2	M3A	INT
vehic	6	2.92333333333							
M2C2	6	16.17							
DIAZ	6	19.5616666667							
m1a1	6	20.6633333333							
M1A2	6	21.205							
M3A	6	23.245							
INT	6	31.9716666667							
MEL	6	33.61							
M2C1	6	84.4666666667	*	*	*	*	*	*	
BUS	6	108.678333333	*	*	*	*	*	*	*

Method:95% Duncan interval.

Table Ranges: 2.84 2.99 3.08 3.15 3.21 3.25 3.29 3.32 3.35

* denotes significantly different pairs. Vertical bars show homogeneous subsets.

group	cases	mean	MEL	M2C1	BUS
vehic	6	2.92333333333		*	*
M2C2	6	16.17		*	*
DIAZ	6	19.5616666667		*	*
m1a1	6	20.6633333333		*	*
M1A2	6	21.205		*	*
M3A	6	23.245		*	*
INT	6	31.9716666667			*
MEL	6	33.61			*
M2C1	6	84.4666666667			
BUS	6	108.678333333	*		

***** Multiple Range Tests

4. TIEMPO PERMANENCIA EN BRAZOS CERRADOS

Dependent variable: C11

Method:95% Duncan interval.

Table Ranges: 2.84 2.99 3.08 3.15 3.21 3.25 3.29 3.32 3.35

* denotes significantly different pairs. Vertical bars show homogeneous subsets.

group	cases	mean	DIAZ	M3A	M2C1	INT	vehic	mla1	MEL
DIAZ	6	40.05							
M3A	6	40.49							
M2C1	6	55.7983333333							
INT	6	56.5766666667							
vehic	6	63.95							
mla1	6	66.24							
MEL	6	72.845							
M2C2	6	78.3033333333							
M1A2	6	79.96							
BUS	6	189.266666667	*	*	*	*	*	*	*

Method:95% Duncan interval.

Table Ranges: 2.84 2.99 3.08 3.15 3.21 3.25 3.29 3.32 3.35

* denotes significantly different pairs. Vertical bars show homogeneous subsets.

group	cases	mean	M2C2	M1A2	BUS
DIAZ	6	40.05			*
M3A	6	40.49			*
M2C1	6	55.7983333333			*
INT	6	56.5766666667			*
vehic	6	63.95			*
mla1	6	66.24			*
MEL	6	72.845			*
M2C2	6	78.3033333333			*
M1A2	6	79.96			*
BUS	6	189.266666667	*	*	

***** Multiple Range Tests

5. NÚMERO DE ENTRADAS EN BRAZOS ABIERTOS

Dependent variable: C2

Method:95% Duncan interval.

Table Ranges: 2.86 3 3.1 3.17 3.22 3.27 3.3

* denotes significantly different pairs. Vertical bars show homogeneous subsets.

group	cases	mean	BUS/P	vehic	DIAZ/	DIAZ/	MEL/L	MEL/M	MEL/P
BUS/PCPA	6	2.5							
vehic	6	3							
DIAZ/M1A	6	3.5							
DIAZ/LUZ	6	4.5							
MEL/LUZ	6	7							
MEL/M1A1	6	7.16666666667							
MEL/PCPA	6	13.16666666667							
INT	6	16.5							

Method:95% Duncan interval.

Table Ranges: 2.86 3 3.1 3.17 3.22 3.27 3.3

* denotes significantly different pairs. Vertical bars show homogeneous subsets.

group	cases	mean	INT
BUS/PCPA	6	2.5	
vehic	6	3	
DIAZ/M1A	6	3.5	
DIAZ/LUZ	6	4.5	
MEL/LUZ	6	7	
MEL/M1A1	6	7.16666666667	
MEL/PCPA	6	13.16666666667	
INT	6	16.5	

***** Multiple Range Tests

6. NÚMERO DE ENTRADAS EN BRAZOS CERRADOS

Dependent variable: C5

Method:95% Duncan interval.

Table Ranges: 2.86 3 3.1 3.17 3.22 3.27 3.3

* denotes significantly different pairs. Vertical bars show homogeneous subsets.

group	cases	mean	DIAZ/	BUS/P	DIAZ/	INT	MEL/P	vehic	MEL/M
DIAZ/LUZ	6	4.83333333333333				*	*	*	*
BUS/PCPA	6	9.83333333333333							*
DIAZ/M1A	6	12.5							
INT	6	22.5	*						
MEL/PCPA	6	23.166666666667	*						
vehic	6	26.166666666667	*						
MEL/M1A1	6	29.166666666667	*	*					
MEL/LUZ	6	41.8333333333333	*	*	*	*	*		

Method:95% Duncan interval.

Table Ranges: 2.86 3 3.1 3.17 3.22 3.27 3.3

* denotes significantly different pairs. Vertical bars show homogeneous subsets.

group	cases	mean	MEL/L
DIAZ/LUZ	6	4.83333333333333	*
BUS/PCPA	6	9.83333333333333	*
DIAZ/M1A	6	12.5	*
INT	6	22.5	*
MEL/PCPA	6	23.166666666667	*
vehic	6	26.166666666667	
MEL/M1A1	6	29.166666666667	
MEL/LUZ	6	41.8333333333333	

***** Multiple Range Tests

7. TIEMPO DE PERMANENCIA EN BRAZOS ABIERTOS
 Dependent variable: C8

Method:95% Duncan interval.

Table Ranges: 2.86 3 3.1 3.17 3.22 3.27 3.3

* denotes significantly different pairs. Vertical bars show homogeneous subsets.

group	cases	mean	BUS/P	vehic	DIAZ/	DIAZ/	MEL/M	INT	MEL/P
BUS/PCPA	6	1.95							
vehic	6	2.92333333333							
DIAZ/M1A	6	5.54166666667							
DIAZ/LUZ	6	8.50666666667							
MEL/M1A1	6	12.4533333333							
INT	6	31.9716666667							
MEL/PCPA	6	49.3783333333							
MEL/LUZ	6	56.9983333333							

Method:95% Duncan interval.

Table Ranges: 2.86 3 3.1 3.17 3.22 3.27 3.3

* denotes significantly different pairs. Vertical bars show homogeneous subsets.

group	cases	mean	MEL/L
BUS/PCPA	6	1.95	
vehic	6	2.92333333333	
DIAZ/M1A	6	5.54166666667	
DIAZ/LUZ	6	8.50666666667	
MEL/M1A1	6	12.4533333333	
INT	6	31.9716666667	
MEL/PCPA	6	49.3783333333	
MEL/LUZ	6	56.9983333333	

***** Multiple Range Tests

8. TIEMPO DE PERMANENCIA EN BRAZOS CERRADOS

Dependent variable: C11

Method:95% Duncan interval.

Table Ranges: 2.86 3 3.1 3.17 3.22 3.27 3.3

* denotes significantly different pairs. Vertical bars show homogeneous subsets.

group	cases	mean	DIAZ/	DIAZ/	INT	vehic	MEL/M	MEL/L	BUS/P
DIAZ/LUZ	6	7.735						*	*
DIAZ/M1A	6	28.09							*
INT	6	56.5766666667							*
vehic	6	63.95							*
MEL/M1A1	6	120.268333333							
MEL/LUZ	6	126.465	*						
BUS/PCPA	6	195.975	*	*	*	*			
MEL/PCPA	6	212.973333333	*	*	*	*			

Method:95% Duncan interval.

Table Ranges: 2.86 3 3.1 3.17 3.22 3.27 3.3

* denotes significantly different pairs. Vertical bars show homogeneous subsets.

group	cases	mean	MEL/P
DIAZ/LUZ	6	7.735	*
DIAZ/M1A	6	28.09	*
INT	6	56.5766666667	*
vehic	6	63.95	*
MEL/M1A1	6	120.268333333	
MEL/LUZ	6	126.465	
BUS/PCPA	6	195.975	
MEL/PCPA	6	212.973333333	

