



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO ANTIDEPRESIVO Y MECANISMO DE ACCIÓN
DE LA MELATONINA, SUS ANÁLOGOS M2B Y M5C EN
LA PRUEBA DE NADO FORZADO”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

EDGAR ARTURO DÍAZ HERNÁNDEZ



MÉXICO, D.F.

AÑO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: ELIA BROSLA NARANJO RODRÍGUEZ

VOCAL: Profesor: ANDRES NAVARRETE CASTRO

SECRETARIO: Profesor: JOSE FAUSTO RIVERO CRUZ

1er. SUPLENTE: Profesor: ALEJANDRO ORTIZ OSORNIO

2° SUPLENTE: Profesor: MARÍA EVA GONZÁLEZ TRUJANO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: UNAM. LABORATORIO DE NEUROFARMACOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE FARMACIA. FACULTAD DE QUÍMICA. EDIFICIO “A”, LAB. 1/E ANEXO.

ASESOR DEL TEMA: DRA. ELIA BROSLA NARANJO RODRÍGUEZ

SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. OFELIA ESPEJO GONZÁLEZ

SUSTENTANTE: EDGAR ARTURO DÍAZ HERNÁNDEZ

Agradecimientos.

Se agradece a el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Dirección de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT-DGAPA-UNAM) con clave: IT201112, el apoyo otorgado para la realización de este trabajo y la beca otorgada durante la realización del mismo.

Se agradece al Programa de Apoyo a Licenciatura (PAL), clave: 3000/3070 por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo.

Agradecimientos

Son muchas a las personas a las que debo agradecerle por su apoyo incondicional que me han brindado, en particular mi padre Julián Díaz García eres un ejemplo a seguir y no sabes cuánto te agradezco el que siempre hayas estado para mí para regañarme o pedir un consejo siempre me has apoyado en todo y eso es algo que no tiene precio, eres mi ídolo no hay otra palabra y este solo es un pequeño logro de los tantos que lograre y disfrutare a tu lado gracias papá. Mi hermana Nayelli Díaz Hernández por siempre apoyarme y siempre cuidarme como lo haces al igual que a mi papá siempre estaremos juntos disfrutando de nuestros logros espero que esto te ayude a seguir adelante con tu carrera y muy pronto yo vea tu tesis para tu titulo los quiero y siempre estaré para ustedes porque son mi familia y siempre luchare por que estemos juntos los quiero mucho.

María del Carmen Soto Luis a ti no puedo agradecerte porque este también es tu trabajo ya que tu contribuiste en todos los aspectos solo puedo decirte que sin ti nada de esto se hubiera podido llevar a cabo y sabes cuánto te agradezco tu apoyo siempre incondicional y el que siempre estuvieras para mí en todo momento en los buenos y malos siempre estás ahí te quiero muchísimo y solo es uno de los tantos logros que disfrutaremos juntos, solo me queda decirte que tienes mucho trabajo y muchas metas que debemos cumplir te quiero mucho.

A mi familia que siempre me ha apoyado y a la que no me apoyo también se lo agradezco porque si no me hubiesen pasado esas cosas creo que no hubiera podido hacer este trabajo. Gracias a mi abuelita Julia Hernández porque siempre creyó en mí y nunca me dejo y al igual que mi abuelo Ramón Díaz ya no están con nosotros pero sé que siempre me acompañaran. Mi abuelita Gudelia García que le puedo decir abuela la quiero mucho y sepa que su nieto ya termino y no sabe cuánto le agradezco por siempre apoyarme en todo momento y siempre motivarme a seguir al igual que mi tío Alfredo Díaz tío gracias por siempre apoyarme sin hacer preguntas y solo hacerlo no sabes cuánto te lo agradezco tío sabes que siempre contarás conmigo incondicionalmente. Mi tía Martha Hernández y mi prima Leticia Hernández saben que las quiero y se han convertido en personas muy importantes para mí les agradezco todo su apoyo y siempre contarán conmigo en todo momento siempre.

Doctora Elia Naranjo Rodríguez que le puedo decir solamente gracias por regañarme tanto y sobre todo por confiar en esta persona que toco a su puerta pidiéndole servicio social y que ahora no quiere irse por que quiere trabajar un largo tiempo a su lado, gracias es una persona admirable y solo me queda decirle que seguiremos adelante trabajando seguramente por muchos años mas así que me tendrá que aguantar mucho tiempo la quiero.

Índice	Página
Listado de abreviaturas	i
Índice de esquemas	iii
Índice de figuras	iv
Resumen	1
Introducción	3
Generalidades	4
Objetivo	18
Hipótesis	18
Materiales y métodos	20
-Animales	20
-Fármacos	20
-Prueba de nado forzado (FST)	21
--Prueba preliminar	21
--Prueba	22
-Prueba de campo abierto	22
-Análisis estadístico	22
Resultados	23
Discusión	30
Conclusión	36
Referencias	37

Listado de abreviaturas

4P-PDOT	<i>Cis</i> -4-fenil-2-propionamidotetralina
5HT	5 – hidroxitriptamina
AMPc	Adenosín monofosfato-3',5' cíclico
ANDEVA	Análisis de varianza
Ca ²⁺	Calcio
CaM	Calmodulina
CREB	Elementos de respuesta a AMPc
DAG	Diacilglicerol
FST	Prueba de nado forzado
GABA	Ácido Gamma Amino Butírico
GMP	Guanosín-5'-monofosfato
GMPc	Guanosín-5-3-monofosfato cíclico
GTP	Guanosín trifosfato
GP	Glándula pineal
hMT1	Receptor MT1 humano
i.p.	Intraperitoneal
IP3	Inositol 1, 4,5-trifosfato
INIA	Inhibidores de la recaptura de noradrenalina
IRSN	Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina y noradrenalina
ISRS	Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina
K ⁺	Potasio
MT	Melatonina
Mg ⁺⁺	Magnesio
NMDAr	Receptor N-metil-D-aspartato

NOS	Óxido Nítrico Sintasa
nNOS	Óxido Nítrico Sintasa Neural
NSQ	Núcleo supra-quiasmático
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PLC	Fosfolipasa C
SNC	Sistema Nervioso Central
SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido
SSI	Solución salina isotónica
TST	Prueba de suspensión en cola
Zn ²⁺	Zinc

Índice de esquemas

	Página
Esquema 1. Señalización de la activación del receptor MT1	9
Esquema 2. Señalización de la activación del receptor MT2	10
Esquema 3. Prueba de suspensión en cola	11
Esquema 4. Prueba de nado forzado	12
Esquema 5. Sitios de unión del NMDAr	14
Esquema 6. Vía de Señalización del Receptor 5HT-2C	15
Esquema 7. Vía de señalización del NMDAr	17

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Estructuras químicas de los análogos 1 N-sustituidos de MT	19
Figura 2. Efecto de MT y sus análogos en la FST y campo abierto	24
Figura 3. Combinación de MT con bloqueadores del NMDAr	26
Figura 4. Combinación de MT con el sustrato de la NOS	27
Figura 5. Combinación de MT con los antagonistas de MT1/MT2	29

Resumen.

Los antidepresivos clásicos producen efectos adversos severos, por lo que se han buscado tratamientos alternativos como la melatonina y sus análogos. En este estudio evaluamos el efecto antidepresivo de fluoxetina (8 mg/kg), dos análogos 1-N-sustituidos de melatonina "M2B" y "M5C" (10 mg/kg) por vía ip., en las pruebas de nado forzado y campo abierto. Se evaluó la interacción de melatonina (10 mg/kg) con las sustancias guanosín-5-monofosfato (250 mg/kg), ácido ascórbico (100 mg/kg), L-arginina (750 mg/kg), luzindol (5 mg/kg) y *cis*-4-fenil-2-propionamidotetralina (3 mg/kg). La melatonina, M2B y M5C disminuyeron significativamente el tiempo de inmovilidad ($p < 0.05$) con respecto al vehículo en la prueba de nado forzado. La co-administración de melatonina y guanosín-5-monofosfato redujo significativamente el tiempo de inmovilidad ($p < 0.001$) comparado con guanosín-5-monofosfato. Por su parte el ácido ascórbico no mostro diferencia comparado con los producidos por su interacción con melatonina, se obtuvieron resultados similares con L-arginina y cuando se co-administró con melatonina; sin embargo, los tratamientos con luzindol, *cis*-4-fenil-2-propionamidotetralina y la combinación entre luzindol y melatonina, mostraron disminuir el tiempo de inmovilidad de manera significativa ($p < 0.0001$) comparados con el vehículo. Ningún tratamiento modificó la actividad locomotriz en la prueba de campo abierto. El presente trabajo demostró que tanto los agonistas melatoninérgicos, como los antagonistas a los receptores MT1 y MT2 produjeron

un efecto antidepresivo en la prueba de nado forzado, y que el efecto de melatonina probablemente no solo se relacione con los receptores a melatonina.

Introducción.

La depresión es uno de los trastornos psiquiátricos más comunes que presenta como principal síntoma la incapacidad para experimentar placer, sin embargo, los antidepresivos clásicos producen efectos adversos severos, por lo que se han buscado tratamientos alternativos que no involucren al sistema de las monoaminas. Una de las sustancias alternativas propuestas es la melatonina (MT), ya que posee efectos a nivel de sistema nervioso central (SNC), además que resincroniza los ciclos circadianos, mejorando el sueño, situación que no se ve mejorada con los antidepresivos clásicos. La MT es una neurohormona que tiene un corto tiempo de vida media, es inestable a la luz y a la temperatura cuando se encuentra en solución, características que no le permiten tener un potencial farmacológico. Con base a esto, y al igual que nosotros, diversos grupos de investigación están en la búsqueda de nuevos análogos de MT para tratar la ansiedad y la depresión. Por esta razón, en este trabajo se evaluó a dos análogos de MT en un modelo animal para fármacos antidepresivos como lo es el nado forzado (FST). Por otro lado, hasta la fecha la MT, ha sido estudiada por diversos autores, sin embargo, no se ha podido dilucidar el o los mecanismos de acción por los cuales la MT produce diversos efectos, por lo tanto este trabajo está dirigido también a tratar de dilucidar este mecanismo.

Generalidades.

La depresión es un trastorno de elevada frecuencia en la población general y constituye uno de los trastornos psiquiátricos más comunes; un informe de la organización mundial de la salud consideró a la depresión como una de las condiciones médicas que provoca mayor agobio en el mundo (Arango et al., 1990). Diversas evidencias sugieren que la depresión tiene una etiología biológica, no obstante, a pesar de la enorme cantidad destinada a revelar sus bases orgánicas y de los notables progresos alcanzados (Duman et al., 1997). Se ha reportado que la depresión se presenta básicamente a la suma de factores biológicos como el estrés, con incapacidad del individuo para afrontarlo. Por lo tanto, se pueden considerar dos formas básicas de depresión, exógena y endógena. La depresión exógena obedece a una causa externa, generalmente bien definida (pérdida de un familiar o de un ser amado, pérdida monetaria o de posición social, enfermedad invalidante etc.) (Alguacil et al., 1996). La depresión endógena, en cambio, no tiene causa externa, lo que lleva a considerarla una alteración biológica, como ocurre en la psicosis bipolar (maniaco-depresiva) o unipolar (depresiva) (Alguacil et al., 1996).

Esto nos lleva a analizar situaciones de la vida diaria, en donde se nos presentan factores o estímulos que nos pueden inducir a la depresión. Tal es el caso de la ansiedad y/o el estrés, así como el valor afectivo, el cual juega un papel importante en este trastorno. En otras palabras, el estrés es un factor importante para que el estado depresivo se genere y no puede separarse de los cambios biológicos (genéticos, bioquímicos y moleculares) que determinan las alteraciones

en la homeostasis y por ende en la función cerebral. La fisiopatología de la depresión es una de las más complejas a estudiar debido a la relación de factores exógenos y endógenos que afectan directamente al organismo y presentan como principal síntoma, la incapacidad para experimentar placer de cualquier índole (Krishnan y Nestler 2008).

Las síntomas característicos para definir los trastornos depresivos son: energía reducida, pérdida del interés, baja concentración mental, reducida autoestima y pensamientos de culpabilidad, ideas de auto daño ó suicidio, trastornos del sueño y alteraciones del apetito (Krishnan y Nestler 2008).

Para tratar el trastorno de la depresión se emplean fármacos antidepresivos, estos tienen un verdadero valor en el tratamiento de este trastorno, sin embargo, toman varias semanas para ejercer plena eficacia por lo que muchos pacientes responden de forma inadecuada al tratamiento, donde algunos síntomas a menudo no están bien controlados; además de un tratamiento farmacológico existen otros tipos de tratamiento, como el electroshock o la asistencia con terapeutas especializados, en donde el paciente puede recibir tratamientos con medicamentos y/o combinados con los psicoterapéuticos. Sin embargo, la farmacoterapia se mantiene en el centro del tratamiento para un episodio establecido de depresión, por lo que hay una clara necesidad de nuevos y mejorados antidepresivos (Nestler et al., 2002).

Los primeros antidepresivos tricíclicos (amitriptilina), actúan suprimiendo la recaptura de monoaminas, e inhibiendo la monoamina oxidasa, que interfiere con

su catabolismo; estos antidepresivos se introdujeron en las décadas de 1960 y 1970, transformando el tratamiento de la depresión, pero la presencia de efectos secundarios y poca seguridad, pronto los convirtieron en un problema aparente. En los años 80's y 90's se introdujeron los inhibidores selectivos de la serotonina (5-hidroxitriptamina; 5HT) y / o de la recaptura de noradrenalina (NA) (Reid y Stewart, 2001).

Los inhibidores selectivos de la recaptura de 5HT (ISRS), de NA (INIA) o de 5HT/NA (IRSN) poseen un mayor margen de seguridad, así como una gran utilidad en el tratamiento de la ansiedad, pero no ofrecen ganancia real en la eficacia comparada con los de la primera generación (antidepresivos tricíclicos, recaptura de NA), que actúan a través de mecanismo monoaminérgico (Krishnan y Nestler, 2008).

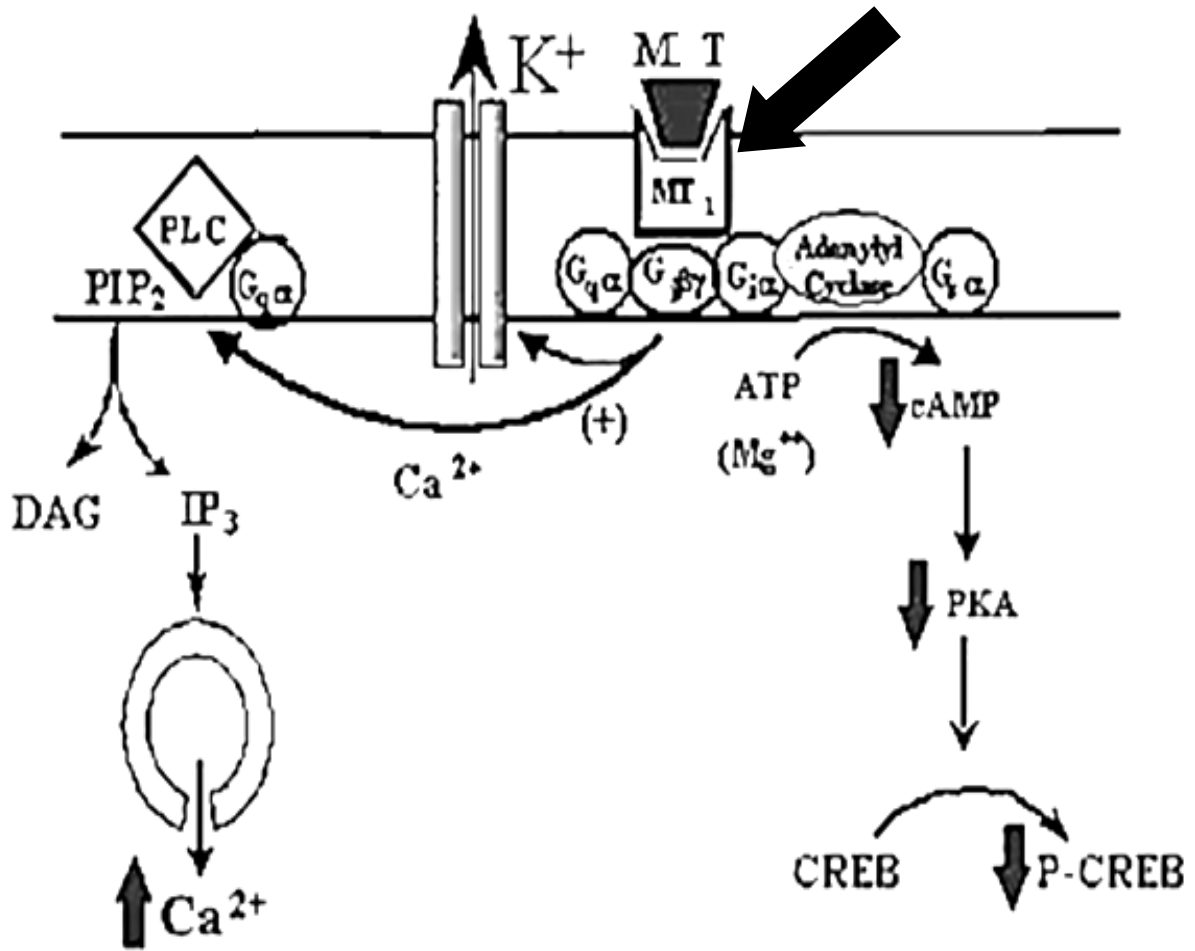
Estos antecedentes muestran que el tratamiento está dirigido hacia las monoaminas y que se requieren tratamientos alternativos que no involucren a estas vías; esto se basa en la existencia de aproximadamente 30 receptores involucrados en los trastornos depresivos, lo que da pauta a la interacción de fármacos, tal como la co-administración de un ISRS con litio para la depresión resistente, este tratamiento sigue siendo una opción atractiva y validada clínicamente, (Sungho et al., 2007). También existen fármacos para el tratamiento de la depresión que no actúan por las vías de las monoaminas. Estas investigaciones se han centrado principalmente en ligandos como la neuroquinina y el factor de liberación de receptores de corticotropina, desafortunadamente, los ensayos clínicos realizados han sido decepcionantes, irónicamente, porque estas

sustancias son muy selectivas y por lo que no producen el efecto esperado (Krishnan y Nestler 2008).

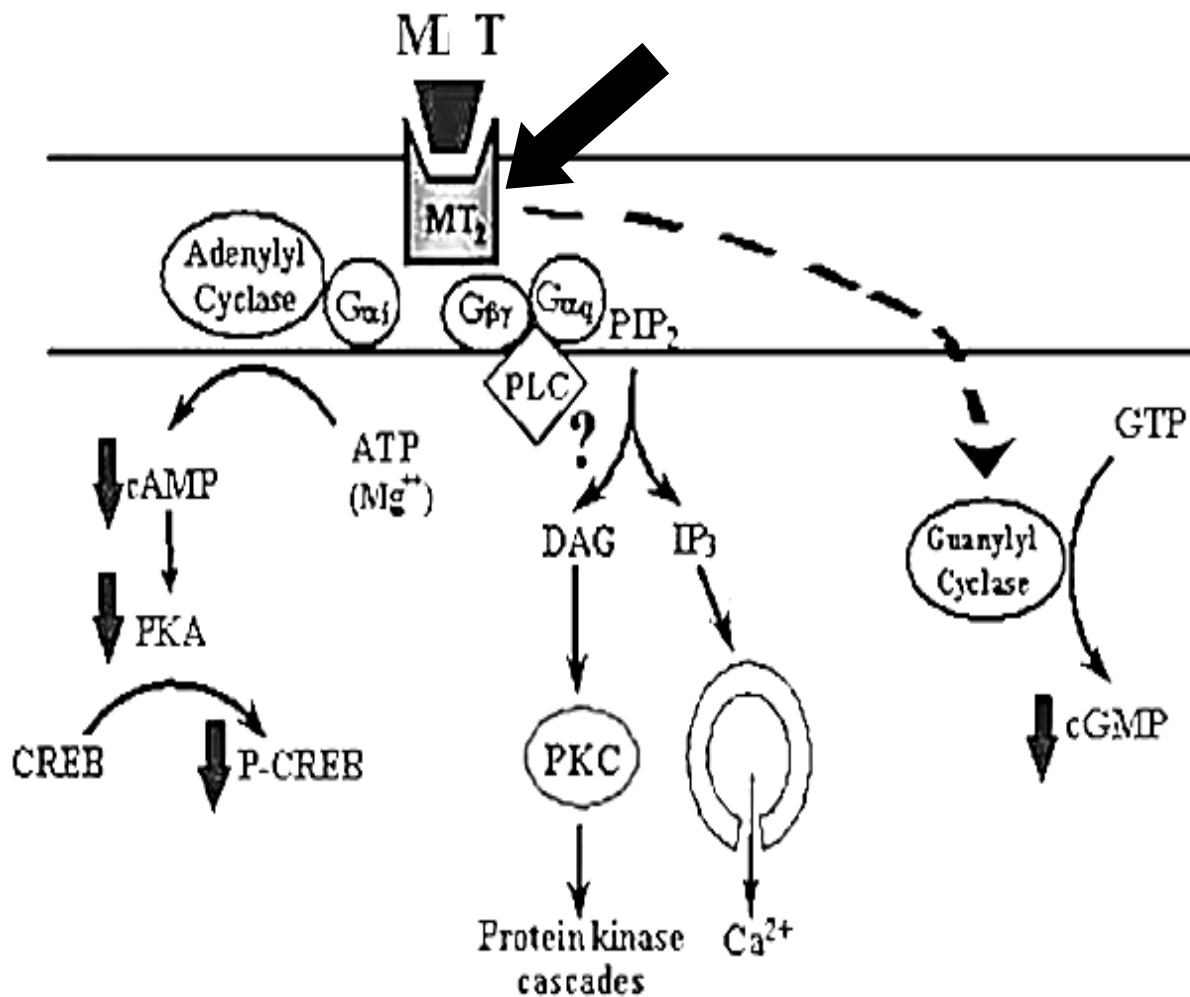
Por otro lado, ensayos piloto han reportado efectos antidepresivos de los antagonistas del N-metil-D-aspartato (NMDA), pero sin embargo, no poseen todas las características que debe cumplir un fármaco antidepresivo. Sustancias diseñadas para manipular directamente las señales intracelulares, controlar la neurogénesis y la capacidad de recuperación neuronal son también de interés antidepresivo. Como podemos observar, los tratamientos antidepresivos desde sus inicios hasta la fecha no son del todo satisfactorios (Sungho et al., 2007). Un enfoque alternativo, atractivo e innovador hacia un mejor tratamiento de la depresión se centra en otro tipo de sustancias, como es el caso de la melatonina, un importante regulador de los ritmos circadianos, que en la depresión están desfasados (Srinivasan et al., 2011). La Melatonina (MT), N-acetil-5-metoxitriptamina, es una neurohormona secretada durante la noche por la glándula pineal (GP). En animales vertebrados ejerce principalmente sus efectos a través de los receptores de membrana MT1 y MT2, que están acoplados a proteínas G y difieren en cuanto a la afinidad por la MT, la cual muestra una mayor afinidad por el receptor MT2 (Kato et al., 2005). Las vías de transducción de señales para estos receptores varían entre los diferentes tejidos y células, y se ha confirmado que la inhibición de la adenilato ciclasa puede ser un mecanismo de señalización para MT1 y MT2 (Esquema 1 y 2) (Reppert et al., 1995). También se ha reportado que el receptor MT1 está acoplado a diferentes proteínas G,

incluyendo Gia2, Gia3 y Gaq, quienes median la inhibición de la fosfolipasa C β (Brydon et al., 1999).

Por otro lado, la activación de los receptores MT2 también puede dar lugar a la inhibición de la formación de guanosín-3-5- monofosfato cíclico (GMPc) (Petit et al., 1999). En estructuras como el núcleo supraquiásmatico (NSQ), la MT aumenta la actividad de la proteína cinasa C (Esquema 2) a través de la activación de receptores MT2 (Hunt et al., 2001). La activación de los receptores por MT controla los ritmos circadianos, estacionales y la regulación del sueño, lo que ha llevado a plantear la importancia de la misma en el desarrollo de los individuos. La regulación del sueño no solo se relaciona con el descanso de la persona, ya que una alteración en el ciclo circadiano, en particular sobre la MT puede producir daños en el sistema nervioso central (SNC) (Pandi et al., 2006).



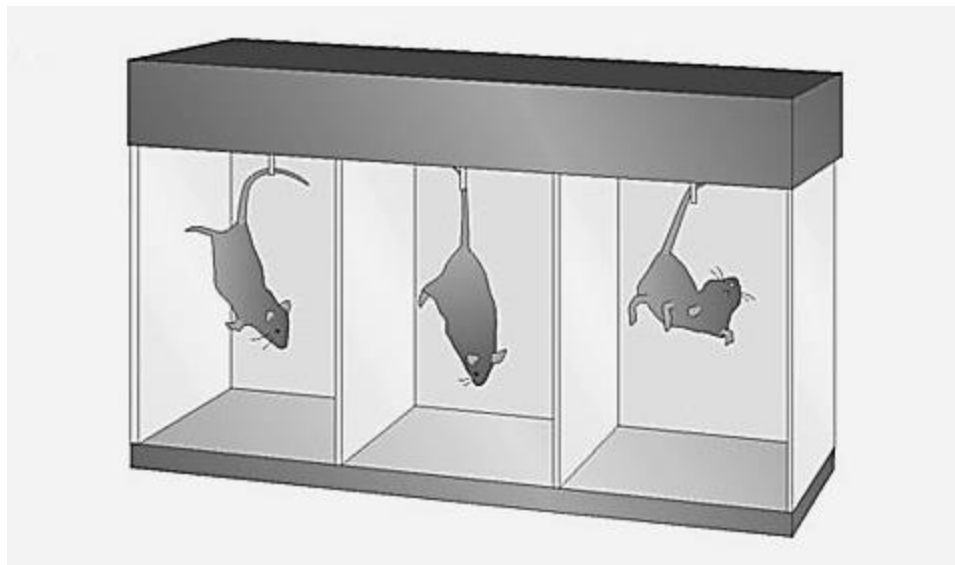
Esquema 1. Señalización de la activación del receptor MT1 (Reppert et al, 1995).



Esquema 2. Señalización de la activación del receptor MT2. (Reppert et al, 1995).

La deficiencia de MT o de sus receptores MT1 y MT2, dan como resultado una alteración del sueño, dando como consecuencia una relación estrecha entre los trastornos del sueño y los trastornos del estado de ánimo, algunos autores sugieren que la MT relaciona estos dos trastornos implicando así a la MT en la fisiopatología de la depresión; (Srinivasan et al., 2009). En el año 2000 se demostró que la administración de MT fue eficaz para mejorar el sueño en los pacientes con trastorno depresivo (Dalton et al., 2000), una administración de MT

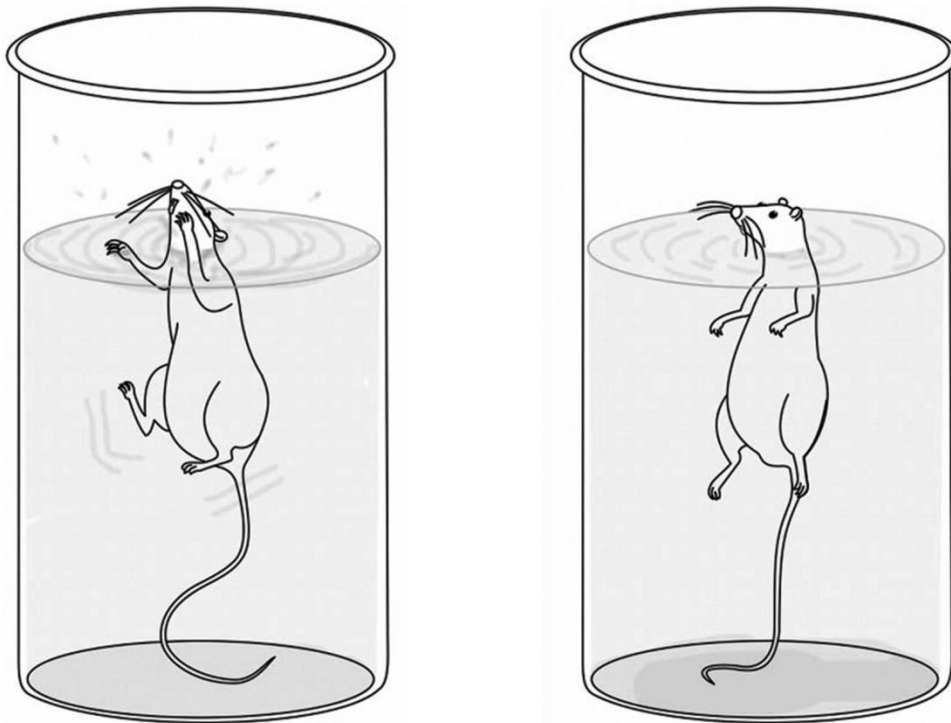
exógena ha mostrado disminuir algunos síntomas de la depresión (Pandi et al, 2008). Para evaluar el efecto antidepresivo se han desarrollado diferentes modelos, la MT ha mostrado un carácter antidepresivo, en modelos animales como: suspensión en cola (Esquema 3) (TST), nado forzado (Esquema 4) (FST) y estrés crónico leve. La MT ha mostrado ser eficaz en estos 3 modelos contra la depresión (Matthew et al, 2003; Bernardo et al, 2009; Binfaré et al, 2010).



Esquema 3. Prueba de suspensión en cola (Binfaré et al, 2010).

Reforzando esta idea existen estudios en ratones de tipo C57BL knock-out para MT1, donde se muestran déficits en la respuesta sensoriomotora y alteraciones en el comportamiento en comparación a los ratones tipo salvaje, en la prueba del sobresalto acústico (PPI); esta prueba consiste en estimular al ratón mediante sonidos de diferente intensidad para evaluar la capacidad de respuesta ante estos estímulos.

Los ratones de esta misma cepa también muestran un aumento en la depresión (Weil et al., 2006); esta fue evaluada en la FST donde se evalúa la desesperación del animal, que es obligado a nadar en un cilindro donde no hay escape hasta que muestra un estadio de desesperación donde solo realiza movimientos necesarios para flotar (Esquema 4), a este comportamiento se le llama inmovilidad y es la que se cuantifica en la prueba (Porsolt et al 1978). El estudio en ratones knock-out para MT1, revela una implicación directa de estos receptores sobre la depresión (Weil et al, 2006).

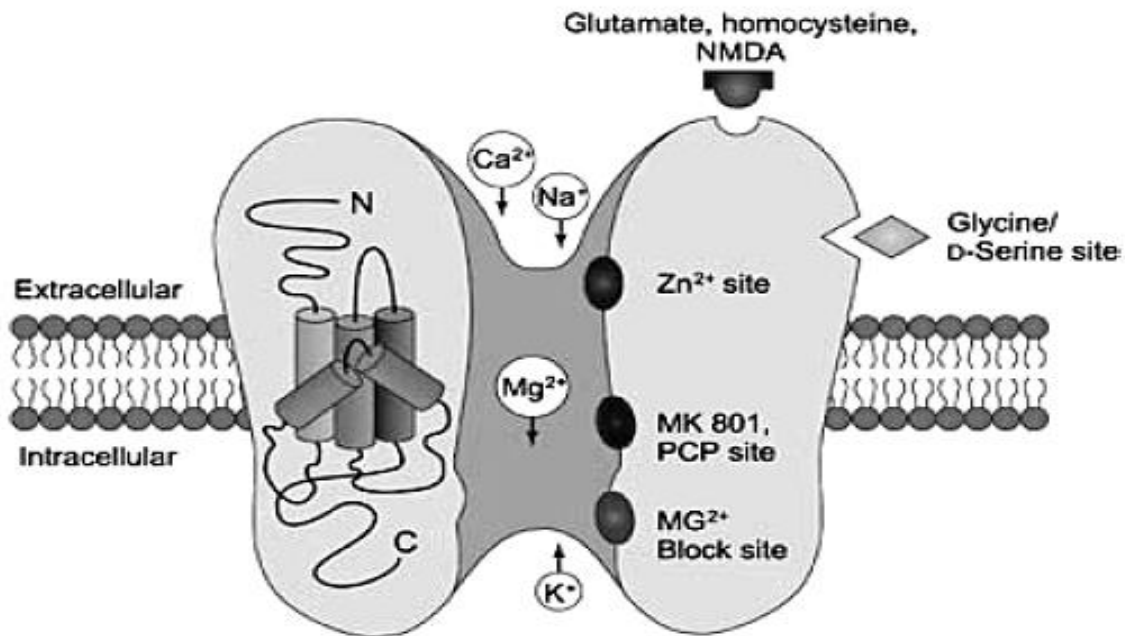


Esquema 4. Prueba de nado forzado (www.springerimages.com).

En lo que respecta al receptor MT2, este ha sido implicado en la depresión donde se muestra que existen polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) que afectan su expresión y se asocian a la depresión; el estudio se realizó en pacientes

hombres y mujeres con trastorno depresivo recurrente, utilizando la genotipificación y cebadores específicos para los polimorfismos, mostrando así que existe una relación en la expresión del mRNA MT2 y las variantes genéticas que influyen en la susceptibilidad para la depresión recurrente, mostrando que el receptor MT2 está implicado en la etiología de la depresión (Gałecka et al., 2011).

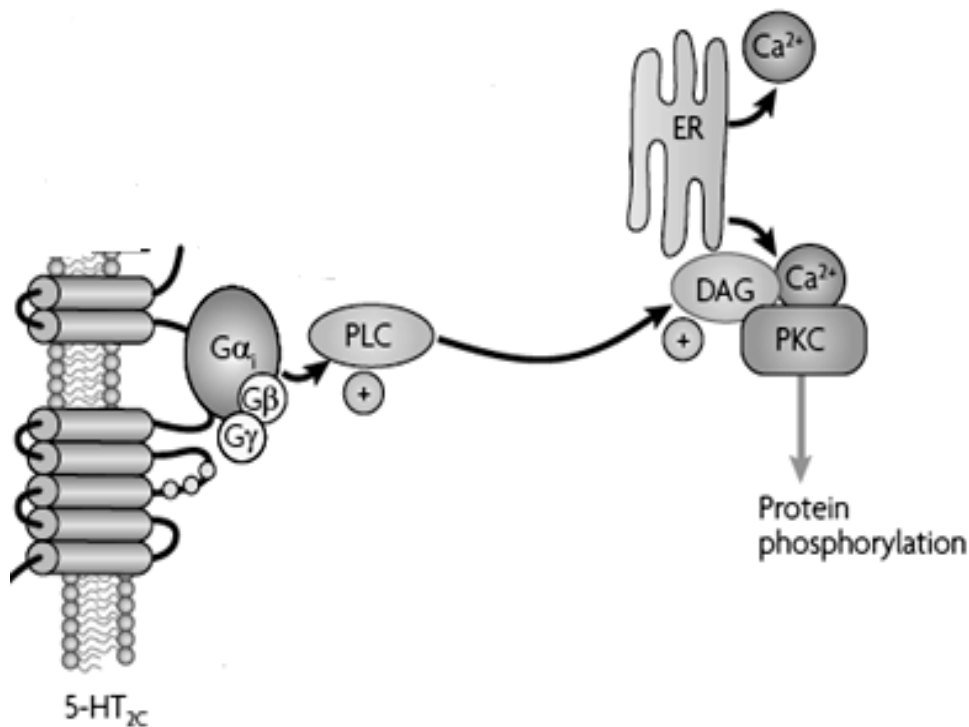
Sin embargo, el efecto de MT no solo se le atribuye a la vía de activación de receptores MT1 y MT2 ya que el efecto antidepresivo se ha relacionado con otras vías de señalización implicadas en la conducta, como lo son los receptores de dopamina, serotonina, glutamato y la vía del óxido nítrico (Binfaré et al., 2010, Sutcu et al., 2006). La vía sobre la cual se ha propuesto que tiene mayor relación la MT es la vía del NMDAr (Esquema 5) ya que en un estudio se muestra que la administración de MT 20 mg/kg por vía ip., a ratas Wistar durante 4 semanas, aumenta la densidad de NMDAr en el hipocampo, zona del cerebro que está implicada en la etiología de la depresión, aunque el mecanismo por el cual la MT incrementa los receptores NMDA no se ha descrito (Sutcu et al., 2006). Otro experimento muestra que la MT antagoniza los receptores NMDA (Mantovani et al, 2005).



Esquema 5. Receptor NMDA (Mantovani et al, 2005).

Un estudio en ratones evaluó la relación de los receptores de dopamina (D1 y D2) con el efecto antidepresivo de la MT en la TST y en la FST, mostrando evidencia de que el efecto antidepresivo de MT puede estar estimulando a los receptores D1 y D2 ya que el efecto de MT fue inhibido por antagonistas de estos receptores como el haloperidol y el SCH23390 (Binfaré et al., 2010). Otro estudio, relaciona indirectamente a la MT con los receptores 5HT- 2A (Esquema 6) como principal blanco por el cual se lleva a cabo el efecto antidepresivo, este experimento se realizó en ratas Wistar y estudió la relación de MT con corticosterona, la cual atenúa los efectos de MT en la FST y el mecanismo por el cual se lleva a cabo es que la MT antagoniza a los receptores 5HT-2A, donde la corticosterona estimula a estos receptores e inhibe el efecto de MT (Hill et al., 2003). Como podemos ver el mecanismo por el cual la MT presenta un efecto antidepresivo no está claro, pero

sí ejerce este efecto y en otro estudio se muestra que también puede potenciar el efecto de los antidepresivos clásicos como lo es el de la imipramina (Ergün et al., 2008), aquí se muestra que la MT puede tener un efecto potenciador en la administración de imipramina en la FST ya que la administración de antidepresivos clásicos aumenta la expresión de receptores MT1 y MT2 (Hariharasubramanian et al., 1986).



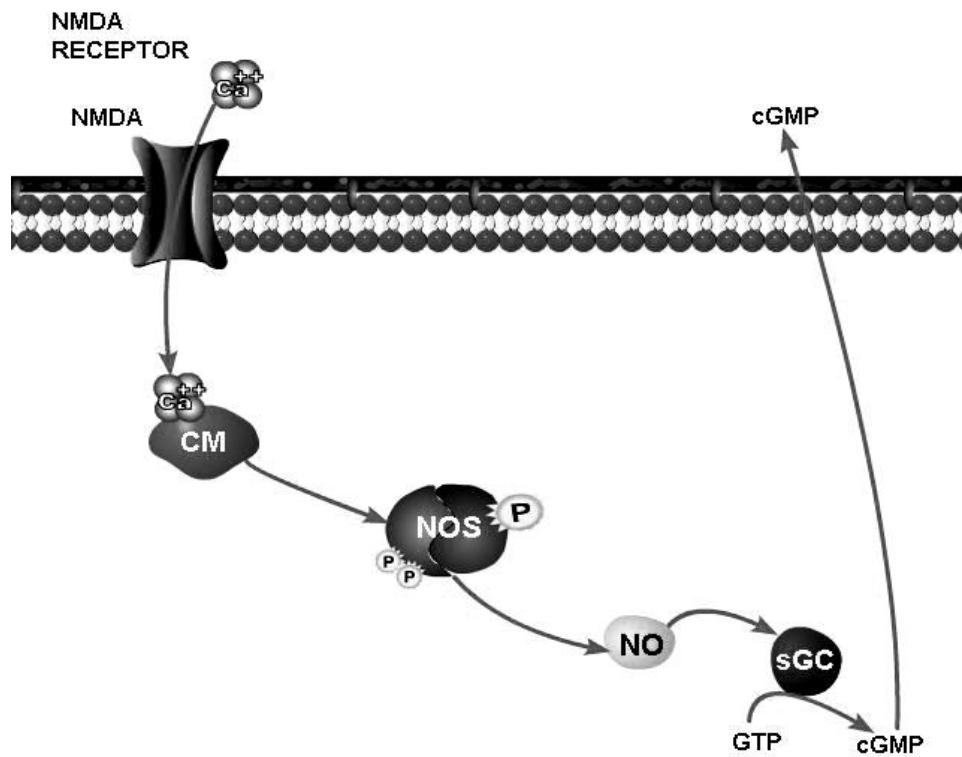
Esquema 6. Vía de Señalización del Receptor 5HT-2C (Ergün et al., 2008).

Sin embargo, el corto tiempo de vida media de la MT y su inestabilidad no le han permitido ser eficaz en otros modelos para la depresión por lo que se busca obtener compuestos similares a la MT pero con mayor efecto, o con mayor afinidad por los receptores de MT1 y MT2 dando así como resultado un efecto

antidepresivo, tal es el caso de la Agomelatina, que es un análogo de MT con carácter antidepresivo que se encuentra en el mercado como el principal tratamiento de este tipo contra la depresión, debido a sus bajos efectos secundarios y su mejora en el sueño en pacientes con depresión, también ha mostrado ser eficaz en modelos para la depresión donde la MT no ejerce algún efecto como en la impotencia aprendida, y la disminución de la hiperactividad en ratas bulbectomizadas (de Bodinat et al., 2010, Norman et al., 2012).

Agomelatina se muestra como un nuevo tratamiento que propone un efecto sinérgico con un mecanismo de acción de agonismo de los receptores MT1 y MT2 y un antagonismo de los receptores 5HT 2C propiciando una combinación de mecanismos que dan como resultado un nuevo tratamiento para la depresión (Norman et al., 2012). Se han comercializado otros análogos de MT como el Ramelteón y aunque tiene afinidad por los receptores MT1 y MT2 no muestra un carácter antidepresivo como la Agomelatina. El Ramelteón sólo muestra características contra el insomnio lo que nos deja en duda si los receptores de MT son los responsables del efecto antidepresivo de Agomelatina (Bodinat et al., 2010). Otro análogo de MT que muestra un carácter ansiolítico antidepresivo es el compuesto Neu-P1, el cual produce efectos en pruebas donde MT no ha mostrado efectos contra la depresión como lo es el caso de la prueba de la impotencia aprendida. La evaluación del efecto antidepresivo del Neu-P11 nos muestra la posibilidad de que dicho efecto sea por vía no melatoninérgica. Los autores de ese trabajo mencionan como posibilidad la relación de este efecto antidepresivo con el complejo GABA, el receptor NMDA y la vía del óxido nítrico (Esquema 7) o en su

defecto con los receptores 5HT mostrando una nueva alternativa para el tratamiento de estos trastornos afectivos (Tian et al., 2010).



Esquema 7. Vía de señalización del NMDAr (Mantovani et al, 2005).

Con base a estos antecedentes y en la búsqueda de un antidepresivo con mayor tiempo de vida media, mayor estabilidad y menores efectos adversos en la Facultad de Química de la UNAM, se han sintetizado los análogos 1-N sustituidos de MT por el Doctor Alfonso Lira Rocha y la Doctora Ofelia Espejo González (Lira-Rocha et al., 2002).

Objetivos.

Evaluar a MT, sus análogos 1-N-sustituidos M2B (N-{2-[5-metoxi-1-(4-metilbencil)-1H-indol-3-il] etil} acetamida), M5C (N-{2-[5-metoxi-1-(4-nitrobenzoil)-1H-indol-3-il] etil} acetamida) (Figura 1) y Fluoxetina (antidepresivo clásico) en la FST y dilucidar el mecanismo de acción mediante la combinación de MT con GMP, ácido ascórbico, L-arginina y Luzindol.

Hipótesis.

La MT así como los análogos de MT con estructura similar a MT podrán ejercer un efecto antidepresivo en la FST además que el uso de los antagonistas disminuirá el efecto producido por MT.

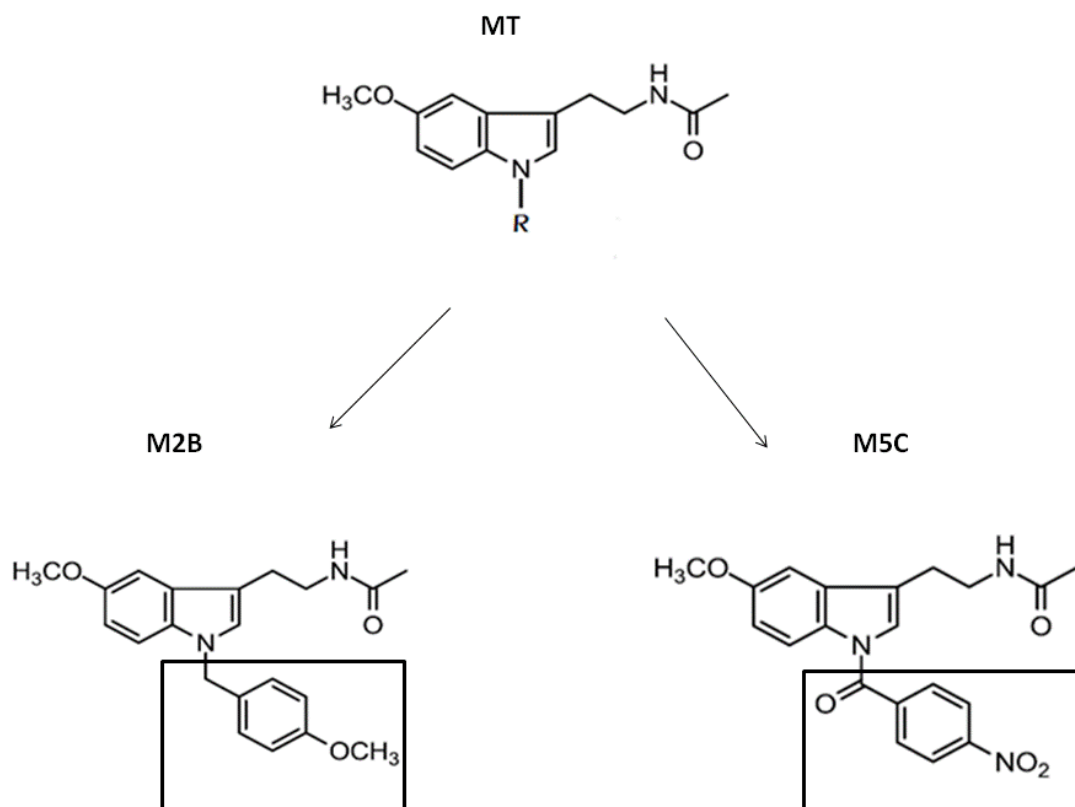


Figura 1. Estructuras químicas de los análogos 1-N-sustituídos de MT como M2B: (N-{2-[5-metoxi-1-(4-metilbencil)-1H-indol-3-il] etil} acetamida) y M5C: (N-{2-[5-metoxi-1-(4-nitrobenzoil)-1H-indol-3-il] etil} acetamida).

Material y métodos.

Animales.

Se utilizaron 112 ratas Wistar macho (200-250 g) (Laboratorios Harlan México), almacenadas en cajas de policarbonato transparente y en condiciones estándares de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad relativa (50 %) y luz (12/12 h). Los animales se adaptaron durante una semana a estas condiciones y tuvieron libre acceso al agua y alimento (Laboratory Rodent Chow 5001). Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062 -ZOO-1999 y aprobado por el comité de ética local, oficio/FQ/CICUAL/067/13.

Fármacos.

Como vehículo (0.1 mL/100 g) se utilizó Tween 80 (Merck) diluido en solución salina isotónica estéril, SSI (0.9 %, Abbott) con una concentración al 5%, la MT (10 mg/kg) (Sigma Aldrich) y sus análogos M2B y M5C (10 mg/kg) (UNAM, Facultad de Química) se disolvieron en Tween 80 y en SSI. El luzindol (5 mg/kg) (Sigma-Aldrich), se disolvió en SSI con DMSO 1% (J.T. Baker); el cis-4-fenil-2-propionamidotetralina (3 mg/kg) [(4P-PDOT) (TOCRIS)], se disolvió en SSI etanol 1%; fluoxetina (8 mg/kg); L-arginina (750 mg/kg); guanosín-5'-monofosfato (250 mg/kg) (GMP) inhibe al NMDAr; ácido ascórbico (100 mg/kg) estas últimas se disolvieron en el vehículo y adquirieron en Sigma-Aldrich México.

Prueba de nado forzado (FST).

Los estudios de comportamiento se realizaron con la prueba FST, previamente descrita y modificada, en donde se aumentó la profundidad del agua para incrementar la sensibilidad (Porsolt et al., 1978; Hill et al., 2003). Las ratas se separaron al azar, en 14 grupos experimentales (n=8): Vehículo, MT, fluoxetina, M2B, M5C, GMP, L-arginina, ácido ascórbico, luzindol, 4P-PDOT, GMP + MT, L-arginina + MT, Ac. Ascórbico + MT y Luzindol + MT.

Los experimentos se llevaron a cabo entre las 12:00 y 17:00 h en condiciones estándares y con luz roja (50 watts). Las ratas se colocaron individualmente en cilindros de metacrilato (OMNIALVA, 60 cm de altura, 25 cm de diámetro interno), los cuales contenían agua ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) a una altura de 40 cm. Para evitar la interferencia de sustancias que pueden afectar el comportamiento de los animales en la FST, se cambió el agua del cilindro entre cada experimento.

Prueba preliminar.

La FST consta de un entrenamiento previo, en el que los animales nadan durante 15 minutos, que es un tiempo suficiente de adaptación a las condiciones del cilindro. La prueba preliminar facilita el desarrollo de la inmovilidad durante la sesión de prueba y aumenta la sensibilidad para la detección del comportamiento antidepresivo (Borsini et al., 1989).

Prueba.

Veinticuatro horas después a la prueba preliminar y 30 minutos antes del experimento, los fármacos se administraron vía i.p., de acuerdo al diseño experimental; posteriormente, las ratas se colocaron dentro del cilindro durante 5 minutos. Para evaluar la co-administración, primero se administró la sustancia inhibidora, 30 min después se administró la MT y 20 minutos después se llevó a cabo la FST. La inmovilidad se consideró en el momento que la rata estaba inmóvil y sólo realizó los movimientos mínimos necesarios para mantenerse a flote (Porsolt et al., 1978). El tiempo de inmovilidad se registró en segundos (s) y se videograbó con una cámara acoplada a un software (OMNIALVA).

Prueba de campo abierto.

Ocho días posteriores a la FST se realizó la prueba de campo abierto para cuantificar la actividad locomotriz. Las ratas se colocaron en forma independiente, en una caja de metacrilato transparente (40x40x40 cm) durante 10 minutos, grabando la sesión con una videocámara acoplada a un software (OMNIALVA), que determinó la distancia total recorrida en cm. Las sustancias se administraron de la misma forma que en la FST.

Análisis estadístico.

Para ambas pruebas se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 6. Los datos se reportaron como la media \pm error estándar ($M \pm S.E.M.$). Se realizó una prueba de análisis de varianza (ANDEVA) de una vía y una prueba post hoc de Tukey, considerando una diferencia estadística significativa de $p < 0.05$.

Resultados.

Efecto de MT y sus análogos.

La MT y la fluoxetina disminuyeron significativamente ($p < 0.01$) el tiempo de inmovilidad (153.6 ± 10.53 s y 158.7 ± 4.14 s, respectivamente) al compararlas con el vehículo (202.1 ± 6.97 s) en la FST (Figura 2A); sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos con MT y fluoxetina. En la prueba de campo abierto, la MT y la fluoxetina no modificaron la actividad locomotriz, mostrando una distancia total recorrida para MT de 1665.0 ± 154.0 cm y fluoxetina de 1512.1 ± 118.7 cm, comparadas con la distancia obtenida con el vehículo (1611.8 ± 116.9 cm) (Figura 2B); también se evaluó a los análogos M2B y M5C dando como resultado un tiempo de inmovilidad de 158.0 ± 9.7 s y 146.1 ± 15.3 s respectivamente, los cuales disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) el tiempo de inmovilidad comparado con el vehículo (Figura 2C). Estos resultados indican que los análogos muestran un efecto similar a MT. En la prueba de campo abierto el M2B (1527.2 ± 116.93 cm) y M5C (1623.4 ± 152.03 cm) no muestran diferencia significativa en la distancia total recorrida (Figura 2D).

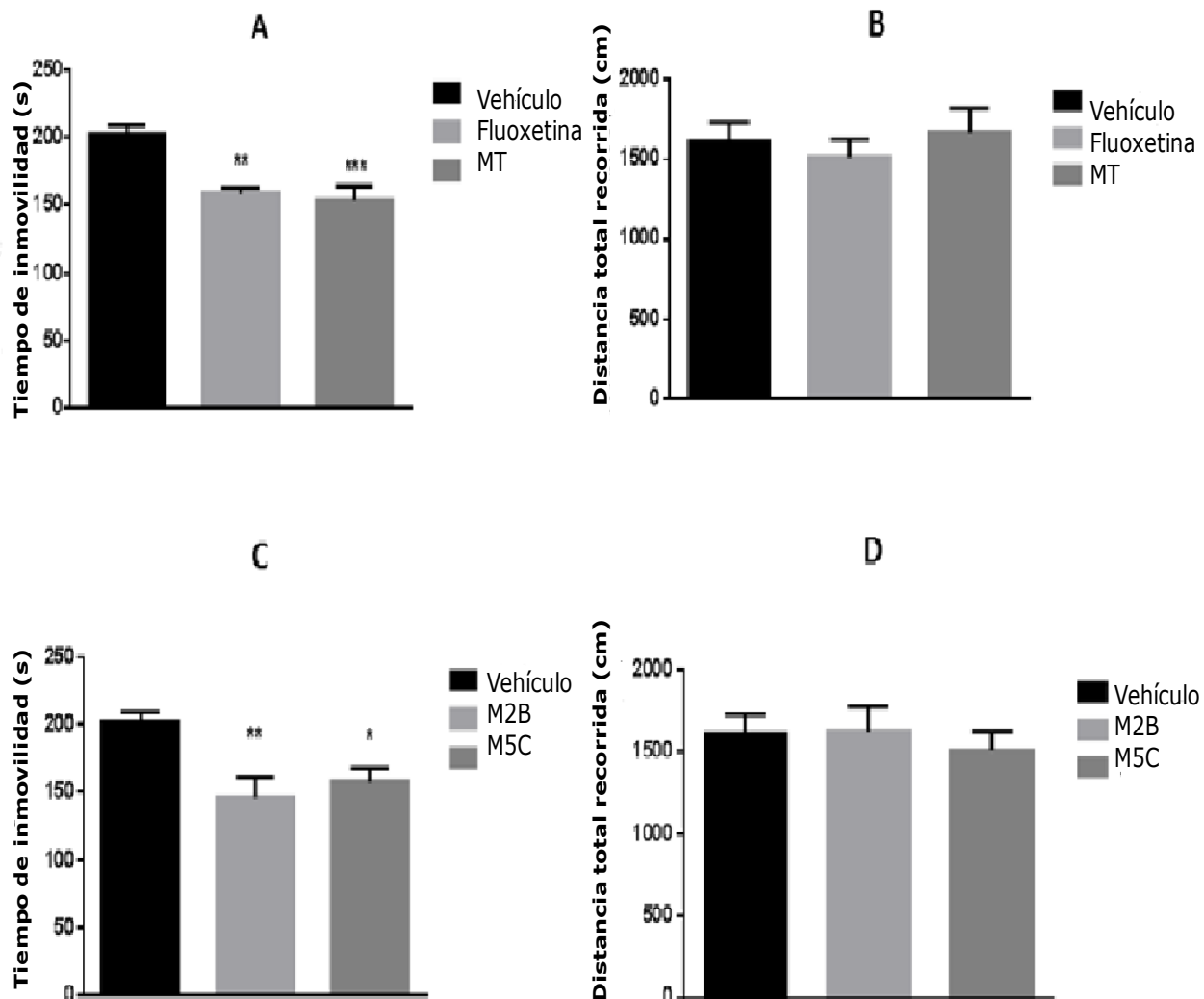


Figura 2. Efecto del tratamiento con fluoxetina (8 mg/kg) y MT (10 mg/kg) dado por el tiempo de inmovilidad en la FST (A). Actividad locomotriz en la prueba de campo abierto de las sustancias evaluadas en FST determinada por la distancia total recorrida (B). Efecto del tratamiento con M2B (10 mg/kg) y M5C (10 mg/kg) dado por el tiempo de inmovilidad en la FST (C). Actividad locomotriz en la prueba de campo abierto de las sustancias evaluadas en FST determinada por la distancia total recorrida (D). Cada barra representa la media \pm S.E.M. (n=8); *

$p < 0.05$, $**p < 0.01$ y $***p < 0.001$; en comparación con el control tratado con vehículo.

Interacción de MT con sustancias que bloquean el NMDAr y un sustrato de la NOS.

Se evaluó la interacción con el GMP, nucleótido que se sabe inhibe algunas acciones del NMDAr (Schmidt et al., 2000) por que no mostró un cambio significativo en el tiempo de inmovilidad (205.9 ± 7.84 s), para el caso de la co-administración de GMP y MT se obtuvo un tiempo de inmovilidad de 140.5 ± 7.1 s, produciendo una disminución significativa ($P < 0.0001$) comparado con el tratamiento de GMP (Figura 3A). En la prueba de campo abierto no se encontró diferencia entre los grupos tratados (Figura 3B), lo que sugiere que no hay efecto estimulante con GMP y con la combinación entre GMP y MT. Posteriormente, se evaluó al ácido ascórbico (174.3 ± 9.51 s) que se sabe, bloquea algunas acciones del NMDAr (Zomkowski et al., 2002) y el ácido ascórbico en combinación con MT (173 ± 11.76 s) no presentan diferencia significativa, lo que nos indica que el ácido ascórbico bloquea los efectos de MT (Figura 3C). Los resultados de la actividad locomotriz para el tratamiento con ácido ascórbico (1648.3 ± 91.32 cm) y la interacción de ácido ascórbico con MT (1636.9 ± 107.61 cm) no muestran diferencia significativa lo que descarta algún efecto estimulante para ambas sustancias (Figura 3D). Tampoco hubo diferencia significativa en las respuestas con L-arginina un sustrato de la NOS (Da Silva et al., 2000) (172.3 ± 11.76 s) y con la interacción de L-arginina con MT (174.31 ± 9.51 s) lo que muestra que L-arginina inhibe el efecto antidepresivo de la MT (Figura 4A). De igual forma,

ambos tratamientos no presentaron efecto sobre la actividad locomotriz, con una distancia total recorrida para L-arginina de 1648.2 ± 227.72 cm y de L-arginina con MT de 1600.7 ± 187.65 (Figura 4B).

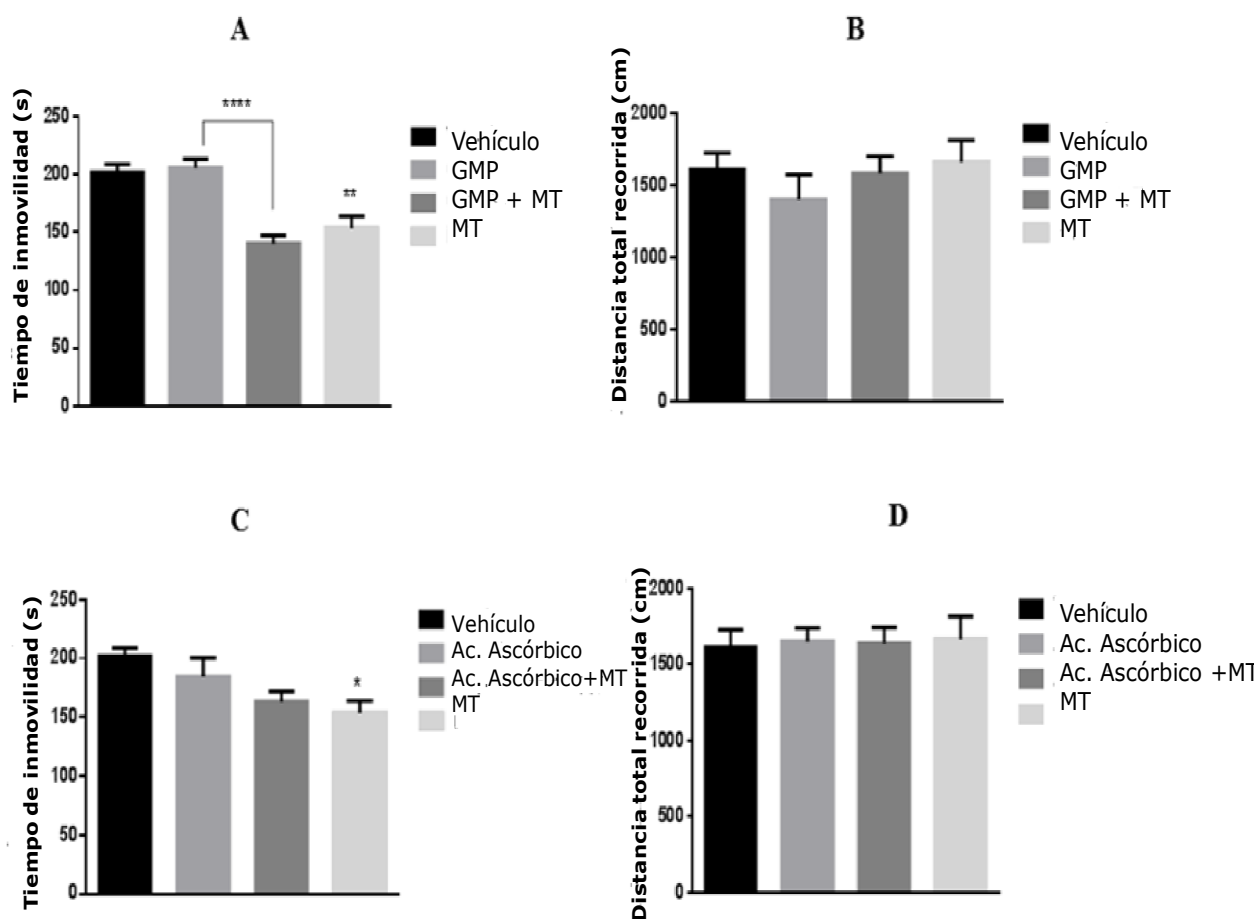


Figura 3. Efecto del pre tratamiento con GMP (250 mg/kg) y MT (10 mg/kg) dado por el tiempo de inmovilidad en la FST (A). Actividad locomotriz en la prueba de campo abierto de las sustancias evaluadas en FST determinada por la distancia

total recorrida (B). Pre tratamiento con ácido ascórbico (100 mg/kg) y la posterior administración de MT (10 mg/kg) dado por el tiempo de inmovilidad en la FST (C). Actividad locomotriz en la prueba de campo abierto de las sustancias evaluadas en FST determinado por la distancia total recorrida (D). Cada barra representa la media \pm S.E.M. (n=8); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$; en comparación con el control tratado con vehículo.

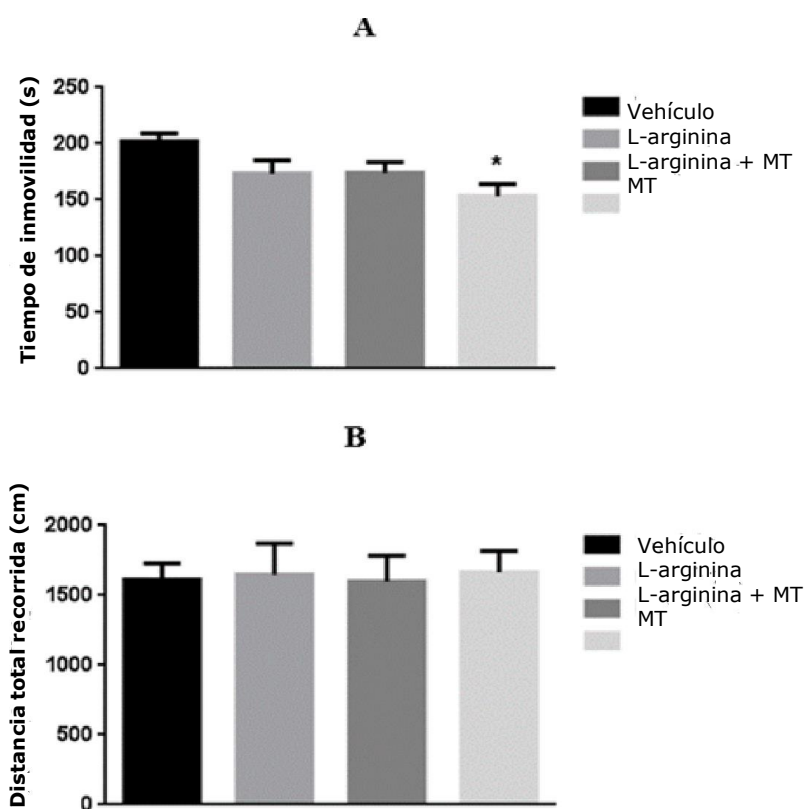


Figura 4. Efecto del pre tratamiento con L-arginina (100 mg/kg) y administración de MT (10 mg/kg) dado por el tiempo de inmovilidad en la FST (A). Actividad

*locomotriz en la prueba de campo abierto de las sustancias evaluadas en FST determinado por la distancia total recorrida (B). Cada barra representa la media±S.E.M. (n=8); * p<0.05, en comparación con el control tratado con vehículo.*

Interacción de MT con antagonista MT1/MT2.

Por último se evaluó la interacción de MT con los receptores MT1/MT2 empleando un antagonista como lo es luzindol. Los resultados obtenidos con el luzindol (142.8 ± 5.49 s) y el tratamiento de luzindol más MT (143.1 ± 10.93 s) mostraron una diferencia significativa con respecto al vehículo (202.1 ± 7.04 s) ($p < 0.0001$) (Figura 5A); sin embargo, no se encontró diferencia entre el tratamiento con luzindol y la combinación de este con MT. Con el fin de esclarecer el efecto obtenido por el antagonista luzindol, se evaluó al 4P-PDOT que es un antagonista selectivo para MT2 (Lucarini et al., 2006), presentando un tiempo de inmovilidad de 148.5 ± 7.6 s, el resultado obtenido mostró una diferencia significativa ($p < 0.001$) con respecto al vehículo (202.1 ± 7.04 s) (Figura 5A). El 4P-PDOT (1600.9 ± 87.33 cm), luzindol (1445.2 ± 179.29 cm), luzindol más MT (1520.5 ± 111.61 cm) mostraron que no existe diferencia en la actividad locomotriz (Figura 5B), efectos que demuestran que los antagonistas MT2 y la combinación con MT ejercen un efecto antidepresivo.

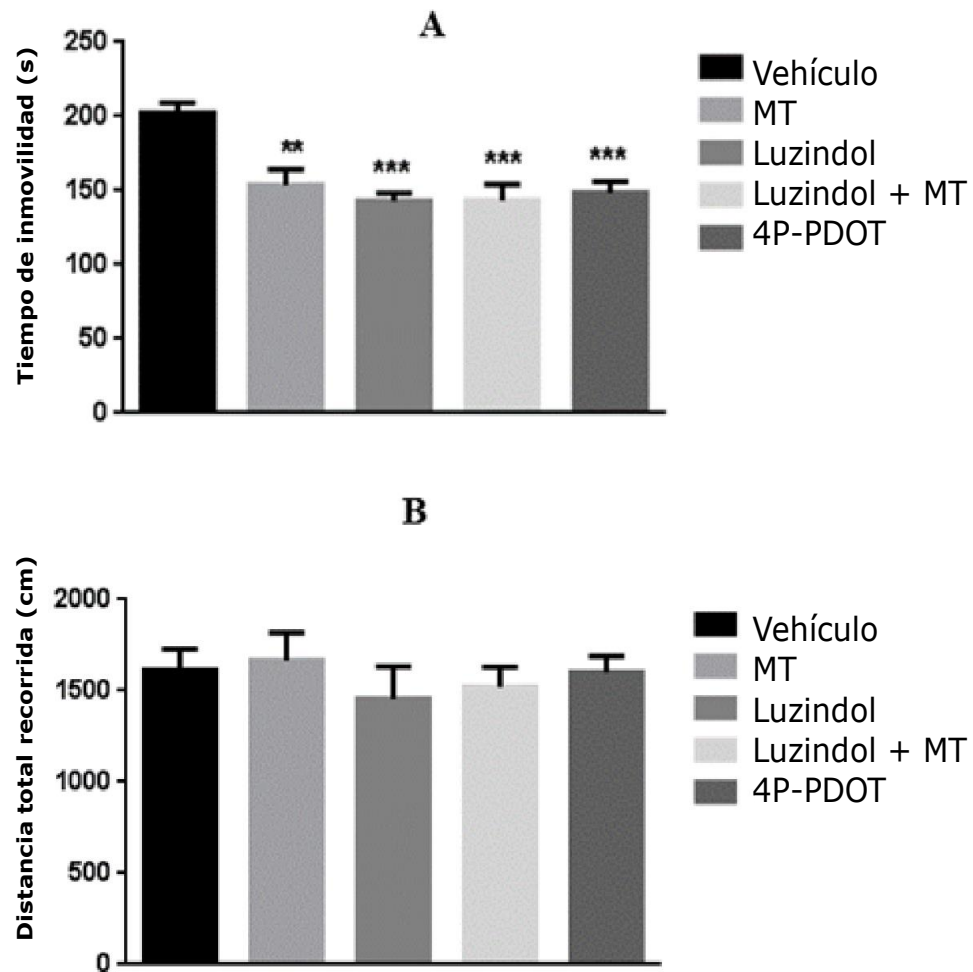


Figura 5. Efecto del pre tratamiento con luzindol (5 mg/kg) y la posterior administración de MT (10 mg/kg), la administración de 4P-PDOT (3 mg/kg) dado por el tiempo de inmovilidad en la FST (A). Actividad locomotriz en la prueba de campo abierto de las sustancias evaluadas en FST determinada por la distancia

*total recorrida (B). Cada barra representa la media \pm S.E.M. (n=8); ** $p < 0.01$, *** $p < 0.01$; en comparación con el control tratado con vehículo.*

Discusión.

La FST es una prueba de comportamiento ampliamente utilizada para la selección de nuevos agentes antidepresivos y explora el mecanismo subyacente de la depresión debido a la rápida aplicación de la FST y las características confiables a través de experimentos en la misma cepa de animales (Petit-Demouliere et al., 2005; Porsolt et al., 1977). Los resultados en el presente estudio proponen una alternativa de tratamiento contra la depresión, en cuanto al sistema que involucra a la MT ya que los resultados obtenidos muestran que no existen diferencias entre un tratamiento con MT y un tratamiento con un antagonista de los receptores 5HT-2C que es un antidepresivo clásico (Figura 1A), se ha reportado que el tratamiento de estos antidepresivos aumenta la densidad de receptores a MT (Nemeroff y Owens, 2002), también el tratamiento con imipramina incrementa las concentraciones de MT séricas (Hariharasubramanian et al., 1986). Por otra parte, se ha reportado un efecto aditivo cuando se administra imipramina con MT a dosis sub-efectivas (20 mg/kg y 5 mg/kg respectivamente) en la FST lo que nos sugiere que en el papel de los antidepresivos clásicos interviene el sistema melatoninérgico. Es por ello que se podría contar con una buena terapia de tratamientos combinados, cuando los pacientes presenten resistencia a algún tratamiento (Hariharasubramanian et al., 1986). Los análogos 1-N-sustituidos fueron sintetizados con el fin de obtener compuestos similares a MT con una posible actividad terapéutica. Los análogos M2B y M5C evaluados en este estudio

(Figura 1) mostraron una actividad antidepresiva en la FST, éstos análogos difieren en términos de afinidades con respecto a la 2-yodo-melatonina; el análogo M5C tiene un grupo voluminoso y electro-donador que cambia las interacciones con los receptores de MT mostrando menor afinidad que el análogo M2B, donde el sustituyente tiene un grupo electro-atractor (Lira-Rocha A et al., 2002), ambos compuestos logran disminuir de manera significativa el tiempo de inmovilidad comparado con el vehículo (Figura 3A); ambos análogos no modificaron la actividad locomotriz, lo que nos permite descartar cualquier tipo de efecto estimulante del sistema nervioso. También hemos reportado que nuestros análogos 1-N- sustituidos tienen efectos ansiolítico, sedante y anticonvulsivo (Bustamante–García R et al., 2013).

Por otra parte algunas acciones de MT han mostrado inhibir el NMDAr (Lapin IP et al., 1998) y este efecto se atribuye a una acción directa sobre el canal, además de mostrar un efecto aditivo con cationes como el Zinc (Zn^{2+}) y Magnesio en la respuesta a la estimulación sensomotora cortical del cuerpo estriado de rata (Escames et al.,1998). Por otro lado, en los resultados obtenidos con el ácido ascórbico se observa un bloqueo de los efectos de MT en la FST (Figura 3A), indicando que el ácido ascórbico podría actuar como un neuromodulador que cambia el estado redox del receptor NMDA, logrando inhibir algunas acciones de los antagonistas de éste receptor (Binfaré et al., 2009). Dosis menores a las utilizadas en este trabajo, muestran una actividad antidepresiva (Moretti et al., 2011; Moretti et al., 2012.). Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos en un estudio realizado por Mantovani et al., en 2003 en ratones Suizos; en el trabajo

se reportó que el ácido ascórbico inhibió el efecto de la MT en la TST a dosis de 1mg/kg lo que apoya de manera importante que la MT presenta una interacción con el NMDAr. Por su parte en la FST, el GMP por sí solo no tiene efecto antidepressivo, sin embargo disminuyó el tiempo de inmovilidad cuando se administró con MT, y a su vez, esta disminución se aprecia mejor que cuando se administró MT sola. En el año 2000 Eckeli et al., demostraron en otro estudio que el GMP puede o no tener características antidepressivas, las cuales dependen de la dosis; ante ello, los autores atribuyeron este efecto a una posible activación indirecta de serotonina y a una inhibición del NMDAr, también el pretratamiento con GMP inhibió los efectos del Zn^{2+} , quien manifestó una acción de tipo antidepressiva en la FST (Rosa et al., 2003), el uso de GMP en el pretratamiento con MT parece un poco confuso ya que aunque el GMP no muestra una actividad antidepressiva tampoco parece bloquear los efectos de MT como se mostró en el estudio donde bloqueó los efectos del Zn^{2+} . Se sabe que la activación del receptor NMDA por glutamato activa al complejo calcio calmodulina (Ca^{2+} -CaM) (Benítez-King G et al., 1996), éste a su vez activa a la nNOS (Ghasemi y Dehpour, 2011), por ello decidimos realizar la combinación de L-arginina con MT. La L-arginina bloquea los efectos de inhibidores de la nNOS y de sustancias que inhiben a esta enzima en las TST y FST (Zomkowski et al., 2010; Moretti et al., 2011; Zhang et al., 2013; Zomkowski et al., 2012). Nuestros resultados mostraron que la L-arginina inhibió los efectos de MT en la FST (Figura 4A), lo que nos sugiere que la MT esta inhibiendo las acciones de la nNOS; estos resultados concuerdan con los reportados por Mantovani et al., (2003) en la TST. Benítez-King et al., reportaron en 1996 que la MT inhibió directamente a la CaM y esta podría ser una posible

explicación de por qué se inhiba a la nNOS. Otra posibilidad es la activación de los receptores MT2 y por otro lado la inhibición indirecta de la CaM.

Por último evaluamos la interacción de MT con el antagonista luzindol en la FST y campo abierto, Dubocovich et al., reportaron en 1990 que el luzindol (30 mg/kg) disminuyó el tiempo de inmovilidad en ratones C3H/HeN en la FST, en éste mismo estudio los autores realizaron una interacción con MT (30 mg/kg) mostrando que el efecto de luzindol se ve revertido por la misma y sugiriendo que este efecto es por antagonismo de la actividad de MT. En otro estudio Sumaya et al., en 2005 utilizaron ratones transgénicos knock-out MT1 y MT2 (MT1KO, MT2KO) para relacionar el efecto de luzindol con alguno de estos receptores, el efecto antidepresivo de luzindol en la FST solo se observó en los ratones MT1KO, con esto sugirieron que el efecto antidepresivo de luzindol en ratones C3H/HeN puede ser mediado a través de MT2. Micale et al., en 2006 estudiaron en ratas Wistar el efecto del luzindol (0.25 mg/kg), el cual revierte la disminución del tiempo de inmovilidad inducido por MT (0.5 mg/kg), además no produjo un cambio significativo en el rendimiento en la FST. En nuestro estudio el luzindol disminuyó el tiempo de inmovilidad en la FST, a dosis menores a las utilizadas en los trabajos reportados con ratones, pero a dosis mayores a las administradas en ratas; las dosis pueden ser la razón del por qué no se encontró el efecto con luzindol. Nuestro grupo de trabajo es el primero en utilizar conjuntamente la FST y la prueba de campo abierto, en esta última la actividad locomotriz no se modificó, por lo que descartamos un efecto estimulante y así comprobamos el efecto antidepresivo de luzindol; sin embargo, hasta el momento no se ha esclarecido

bien el mecanismo de acción por el cual el luzindol actúa como antidepresivo, pero ahora nosotros reportamos que tanto el luzindol como la MT ejercen un mismo efecto. Por otra parte, la MT ha mostrado ser el agonista natural de los receptores MT1 y MT2, en cambio el luzindol se ha considerado como un antagonista no selectivo de estos receptores, pero también se ha encontrado que puede ejercer una actividad de agonista inverso; los agonistas inversos estabilizan la forma libre del receptor y se utilizan para detectar la actividad constitutiva del mismo, mediante la reducción de la actividad independiente del agonista (Dubocovich et al., 2010). En células CHO que expresan MT1, el luzindol produjo un pequeño aumento del AMPc estimulado por forskolina, lo que sugiere que puede actuar como agonista inverso en el receptor MT1. El luzindol también disminuye la expresión del receptor MT1, interfiriendo con la síntesis y/o degradación de éste (Kokkola et al., 2007). Además del luzindol se ha reportado que el 4P-PDOT presenta un carácter de agonista inverso, produciendo la disminución del guanosín basal 5-O-(3 - [35S] tio) y el aumento de la formación de AMPc en las células CHO que expresan al receptor de hMT1 de alta densidad y aparentemente muestra mayor afinidad por este receptor en presencia de GTP. Los estudios donde se reporta que el luzindol y el 4P-PDOT son agonistas inversos, no concuerdan con los que muestran que estas sustancias ejercen actividad sobre el receptor MT2. Nonno et al., en 1999 publicaron que el 4-P-PDOT es un agonista parcial y Browning et al., en 2000 reportaron que tanto luzindol como 4P-PDOT son agonistas parciales de los receptores MT2. Cogé et al., en 2009 manejan que el comportamiento del 4P-PDOT como agonista parcial del receptor hMT2 parece ser una característica particular de éste. Como

podemos ver, el mecanismo de estas sustancias no está bien esclarecido, en nuestro estudio obtuvimos un efecto antidepresivo similar entre la MT, luzindol y 4P-PDOT, este trabajo es la primera evidencia donde se muestra que el 4P-PDOT tiene una actividad antidepresiva y que no modifica la actividad locomotriz, lo que nos sugiere que las 3 sustancias están actuando por un mecanismo de acción similar; otra posible explicación puede ser que los resultados se deben a la desensibilización de los receptores MT2. Gerdin et al., en 2004 demostraron que la administración de concentraciones de MT similares a las fisiológicas durante la fase de obscuridad, desensibilizaron a los receptores MT2 en el SNC de rata, además, en células recombinantes de mamífero que expresan receptores MT2, encontraron que la internalización de estos receptores es mediada por la MT y es dependiente de la concentración; la disminución en el número de receptores es parcialmente recuperable y depende de la nueva síntesis de proteínas, con una recuperación total de la densidad de los receptores 8 h después, estos mismos autores reportaron en condiciones similares que la desensibilización de los receptores MT1, no fue acompañada por la regulación a la baja de los receptores MT1. Teen y Niles demostraron en 1993 en la FST un incremento de aproximadamente 3 veces las concentraciones de MT en suero y un decremento en la densidad de los sitios de unión. La FST en nuestro estudio implicó un entrenamiento, con posterior administración de las sustancias, que pudiera provocar una desensibilización del receptor MT2, y es por ello que se observa el mismo efecto para MT, luzindol y 4P-PDOT sin embargo esto se tiene que demostrar en estudios posteriores a este. Por otro lado, en la etiología de la depresión se ha implicado al receptor MT2, como lo muestra un estudio en

pacientes con trastorno depresivo recurrente, ya que existen SNPs que afectan la expresión de este receptor, lo que permite establecer una estrecha relación entre la expresión del mRNA, MT2 y las variantes del gen de éste receptor, que pueden desempeñar un papel desfavorable en la determinación del factor de riesgo de trastorno depresivo recurrente (Galecka et al., 2011).

Conclusión.

Nuestro trabajo sugiere que los análogos de MT 1-N-sustituidos y los antagonistas a los receptores MT1/MT2 presentan un efecto antidepresivo en la FST; sin embargo, es necesario esclarecer el mecanismo por el cual se lleva a cabo dicho efecto. También, demostramos que existe una estrecha relación entre el efecto de MT y la vía NMDAr-óxido nítrico.

Referencias

- Alguacil, F.L., Alamo C., Iglesias, V. (1996). Contribución de los estudios preclínicos los acontecimientos y terapéutica de la depresión. *Psicothema*. 8 (3):657-667.
- Arango, V., Emsberger, V., Marzuk, P.M., Chen, I.S., Tierney, H., Stanley, M., Reis, D.J. (1990). Autoradiographic demonstration of increased serotonin 5HT₂ and b adrenergic receptor binding sites in the brain of suicides victims. *Archives of general psychiatry*. 47: 1038-47.
- Benítez-King G, Ríos A, Martínez A, Antón-Tay F (1996). In vitro inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochem Biophys Acta* 1290(2):191-196.
- Binfaré RW, Rosa AO, Lobato KR, Santos AR, Rodrigues AL (2009). Ascorbic acid administration produces an antidepressant-like effect: evidence for the involvement of monoaminergic neurotransmission. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30;33 (3):530-540.
- Binfaré RW, Mantovani M, Budni J, Santos AR, Rodrigues AL (2010). Involvement of dopamine receptors in the antidepressant-like effect of melatonin in the tail suspension test. *Eur J Pharmacol* 638(1-3):78-83.
- Borsini F, Lecci A, Sessarego A, Frassine R, Meli A (1989). Discovery of antidepressant activity by forced swimming test may depend on pre-exposure of rats to a stressful situation. *Psychopharmacol* 97(2):183-188.

- Browning C, Beresford I, Fraser N, Giles H (2000). Pharmacological characterization of human recombinant melatonin mt (1) and MT (2) receptors Br J Pharmacol 129(5):877-886.
- Brydon L, Roka F, Petit L, de Coppet P, Tissot M, Barrett P, Morgan PJ et al (1999). Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G (i2), G (i3), and G (q/11) proteins. Mol Endocrinol 12:2025-2038.
- Bustamante-García R, Naranjo-Rodríguez EB, Lira-Rocha AS, Ortiz-Osornio A, Picazo O (2013). Behavioural actions of two new 1-N substituted analogues of melatonin. Behav Brain Res 236(1):148-156.
- Claustrat B, Brun J, Chazot G (2005). The basic physiology and pathophysiology of melatonin. Sleep Med Rev 9(1):11-24.
- Cogé F, Guenin SP, Fery I, Migaud M, Devavry S, Slugocki C et al (2009). The end of a myth: cloning and characterization of the ovine melatonin MT (2) receptor. Br J Pharmacol 158(5):1248-1262.
- Da Silva GD, Matteussi AS, Dos Santos AR, Calixto JB, Rodrigues AL (2000). Evidence for dual effects of nitric oxide in the forced swimming test and in the tail suspension test in mice. Neuroreport 11(17):3699-36702.
- Dalton EJ, Rotondi D, Levitan RD, Kennedy SH, Brown GM (2000). Use of slow-release melatonin in treatment-resistant depression. J Psychiatry Neurosci 1:48-52.

- de Bodinat C, Guardiola-Lemaitre B, Mocaër E, Renard P, Muñoz C et al (2010). Agomelatine, the first melatonergic antidepressant: discovery, characterization and development. *Nat Rev Drug Discov* 9(8):628-642.
- Detanico BC, Piato AL, Freitas JJ, Lhullier FL, Hidalgo MP et al (2009). Antidepressant-like effects of melatonin in the mouse chronic mild stress model. *Eur J Pharmacol* 607 (1-3):121-125.
- Dolberg OT, Hirschmann S, Grunhaus L (1998). Melatonin for the treatment of sleep disturbances in major depressive disorder. *Am J Psychiatry* 155(8):1119-1121.
- Dubocovich ML, Ewa Mogilnicka 1 and Pilar M. Areso (1990). Antidepressant-like activity of the melatonin receptor antagonist, luzindole (N-0774), in the mouse behavioral despair test. *Eur J Pharmacol* 182:313-325.
- Dubocovich ML, Delagrange P, Krause DN, Sugden D, Cardinali DP, Olcese J (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev* 62(3):343-380.
- Duman, R.S., Heninger, G.R., Nestler, E.J. (1997). A molecular and cellular theory of depression. *Archives of general psychiatry* 54: 597-606.
- Eckeli AL, Dach F, Rodrigues AL (2000). Acute treatments with GMP produce antidepressant-like effects in mice. *Neuroreport* 11(9):1839-1843.

- Ergün Y, Orhan FO, Karaaslan MF (2008). Combination therapy of imipramine and melatonin: additive antidepressant effect in mouse forced swimming test. *Eur J Pharmacol*;591(1-3):159-63.
- Escames G, Acuña-Castroviejo D, León J, Vives F (1998). Melatonin interaction with magnesium and zinc in the response of the striatum to sensorimotor cortical stimulation in the rat. *J Pineal Res* 24(2):123-129.
- Eser D, Baghai TC, Möller HJ (2010). Agomelatine: The evidence for its place in the treatment of depression. *Core Evid*15(4):171-179.
- Gałecka E, Szemraj J, Florkowski A, Gałecki P, Bieńkiewicz M, Karbownik-Lewińska M, Lewiński A (2011). Single nucleotide polymorphisms and mRNA expression for melatonin MT (2) receptor in depression. *Psychiatry Res* 189 (3):472-4.
- Ghasemi M, Dehpour AR (2011). The NMDA receptor/nitric oxide pathway: a target for the therapeutic and toxic effects of lithium. *Trends Pharmacol Sci* 32(7):420-434.
- Guadarrama, L., Escobar, A., Zhang, L., (2006). Bases neuroquímicas y neuroanatómicas de la depresión. *Revista Facultad de Medicina México*. 49 (2): 66-72.
- Hariharasubramanian N, Nair NP, Pilapil C, Isaac I, Quirion R (1986). Effect of imipramine on the circadian rhythm of plasma melatonin in unipolar depression *Chronobiol Int* 3(1):65-69.

- Hill MN, Brotto LA, Lee TT, Gorzalka BB (2003). Corticosterone attenuates the antidepressant-like effects elicited by melatonin in the forced swim test in both male and female rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27(6):905-911.
- Hunt AE, Al-Ghoul WM, Gillette MU, Dubocovich ML (2001). Activation of MT(2) melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. *Am J Physiol Cell Physiol* 280(1):110-118.
- Kato K, Hirai K, Nishiyama K, Uchikawa O, Fukatsu K, Ohkawa S et al (2005). Neurochemical properties of ramelteon (TAK-375), a selective MT1/MT2 receptor agonist. *Neuropharmacol* 48(2):301-310.
- Krishnan V, Nestler EJ (2008). The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455 (7215):894-902.
- Kokkola T, Vaittinen M, Laitinen JT (2007). Inverse agonist exposure enhances ligand binding and G protein activation of the human MT1 melatonin receptor, but leads to receptor down-regulation. *J Pineal Res* 43(3):255-262.
- Lapin IP, Mirzaev SM, Ryzov IV, Oxenkrug GF (1998). Anticonvulsant activity of melatonin against seizures induced by quinolinate, kainate, glutamate, NMDA, and pentylenetetrazole in mice. *J Pineal Res* 24(4):215-218.

- Lira-Rocha A, Espejo-González O, Naranjo-Rodríguez EB (2002). Receptor-binding studies of 1-N-substituted melatonin analogues. *Eur J Med Chem* 37(12):945-951.
- Lucarini S, Bedini A, Spadoni G, Piersanti G (2008). An improved synthesis of cis-4-phenyl-2-propionamidotetralin (4-P-PDOT): a selective MT(2) melatonin receptor antagonist. *Org Biomol Chem* 6: 147-150.
- Mantovani M, Pértile R, Calixto JB, Santos AR, Rodrigues AL (2003). Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and the L-arginine-nitric oxide pathway. *Neurosci Lett* 343(1):1-4.
- Matthew N. H, Lori A. Brottoa,b, Tiffany T.-Y. Leec, Boris B. Gorzalka (2003). Corticosterone attenuates the antidepressant-like effects elicited by melatonin in the forced swim test in both male and female rats *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27(6):905-911.
- Micale V, Arezzi A, Rampello L, Drago F (2006). Melatonin affects the immobility time of rats in the forced swim test: the role of serotonin neurotransmission. *Eur Neuropsychopharmacol* 16(7):538-45.
- Moretti M, Freitas AE, Budni J, Fernandes SC, Balen Gde O, Rodrigues AL (2011). Involvement of nitric oxide-cGMP pathway in the antidepressant-like effect of ascorbic acid in the tail suspension test. *Behav Brain Res* 225(1):328-333.

- Moretti M, Budni J, Ribeiro CM, Rodrigues A (2012). Involvement of different types of potassium channels in the antidepressant-like effect of ascorbic acid in the mouse tail suspension test. *Eur J Pharmacol* 687(1-3):21-27.
- Nestler, E. J. et al. Neurobiology of depression. *Neuron* 34, 13–25 (2002).
- Nemeroff CB and Owens MJ (2002). Treatment of mood disorders. *Nat Neurosci* 5:1068-1070.
- Norman TR, Cranston I, Irons JA, Gabriel C, Dekeyne A, Millan MJ, Mocaër E (2012). Agomelatine suppresses locomotor hyperactivity in olfactory bulbectomised rats: a comparison to melatonin and to the 5-HT(2c) antagonist, S32006. *Eur J Pharmacol.* 2012; 674(1):27-32.
- Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R (2006). Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J* 273 (13):2813-2838.
- Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJ, Zisapel N, Cardinali DP (2008). Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol* 85(3):335-353.
- Petit L, Lacroix I, de Coppet P, Strosberg AD, Jockers R (1999). Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway. *Biochem Pharmacol* 58(4):633-639.

- Petit-Demouliere B, Chenu F, Bourin M (2005). Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacol (Berl)* 177:245–255.
- Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M (1978). Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 47(4):379-391.
- Reid IC, Stewart CA. How antidepressants work. *Br J Psychiatry* 2001; 178: 299-303.
- Reiter RJ, Tan DX, Fuentes-Broto L (2010). Melatonin: a multitasking molecule *Prog Brain Res* 181:127-151.
- Rosa AO, Lin J, Calixto JB, Santos AR, Rodrigues AL (2003). Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide pathway in the antidepressant-like effects of zinc in mice. *Behav Brain Res* 144(1-2):87-93.
- Sarti P, Magnifico MC, Altieri F, Mastronicola D, Arese M (2013). New Evidence for Cross Talk between Melatonin and Mitochondria Mediated by a Circadian-Compatible Interaction with Nitric Oxide. *Int J Mol Sci* 14(6):11259-76.
- Schmidt AP, Lara DR, de Faria Maraschin J, da Silveira P A, Onofre Souza D (2000). Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. *Brain Res* 864(1):40-3.

- Spadoni G, Bedini A, Rivara S, Mor M (2011). Melatonin receptor agonists: new options for insomnia and depression treatment. *CNS Neurosci Ther* 17(6):733-41.
- Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Trakht I, Spence DW, Hardeland R, Poeggeler B, Cardinali DP (2009). Pathophysiology of depression: Role of sleep and the melatonergic system. *Psychiatry Research* 165 (2009) 201–214.
- Sungho Maeng, PhD, and Carlos A. Zarate, Jr, MD (2007) The Role of Glutamate in Mood Disorders: Results from the Ketamine in Major Depression Study and the Presumed Cellular Mechanism Underlying its Antidepressant Effects *Current Psychiatry Reports* 2007, 9:467–474.
- Sutcu R, Yonden Z, Yilmaz A, Delibas N (2006). Melatonin increases NMDA receptor subunits 2A and 2B concentrations in rat hippocampus. *Mol Cell Biochem*;283(1-2):101-5.
- Tenn C and Niles L (1993). Physiological regulation of melatonin receptors in rat suprachiasmatic nuclei: diurnal rhythmicity and effects of stress. *Mol Cell Endocrinol* 98(1):43-8.
- Tian SW, Laudon M, Han L, Gao J, Huang FL, Yang YF, Deng HF (2010) Antidepressant- and anxiolytic effects of the novel melatonin agonist Neu-P11 in rodent models *Acta Pharmacol Sin*; 31(7):775-83.

- Turek FW, Gillette MU (2004). Melatonin, sleep, and circadian rhythms: rationale for development of specific melatonin agonists. *Sleep Med* 5(6):523-32.
- Weil ZM, Hotchkiss AK, Gatién ML, Pieke-Dahl S, Nelson RJ (2006). Melatonin receptor (MT1) knockout mice display depression-like behaviors and deficits in sensorimotor gating. *Brain Res Bull* ;68(6):425-9.
- Zhang GF, Wang N, Shi JY, Xu SX, Li XM, Ji MH, Zuo ZY, Zhou ZQ, Yang JJ (2013). Inhibition of the L-arginine-nitric oxide pathway mediates the antidepressant effects of ketamine in rats in the forced swimming test. *Pharmacol Biochem Behav* 110C:8-12.
- Zhang GF, Wang N, Shi JY, Xu SX, Li XM, Ji MH, Zuo ZY, Zhou ZQ, Yang JJ (2013). Inhibition of the L-arginine-nitric oxide pathway mediates the antidepressant effects of ketamine in rats in the forced swimming test. *Pharmacol Biochem Behav* 110C:8-12.
- Zomkowski AD, Hammes L, Lin J, Calixto JB, Santos AR, Rodrigues AL (2002). Agmatine produces antidepressant-like effects in two models of depression in mice. *Neuroreport* 13(4):387-91.
- Zomkowski AD, Engel D, Gabilan NH, Rodrigues AL (2010). Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effects of escitalopram in the forced swimming test. *Eur Neuropsychopharmacol* 20(11):793-801.

- Zomkowski AD, Engel D, Cunha MP, Gabilan NH, Rodrigues AL (2012).
The role of the NMDA receptors and l-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine
monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of duloxetine in
the forced swimming test. *Pharmacol Biochem Behav* 103(2):408-17.

- http://www.springerimages.com/Images/LifeSciences/1-10.1007_978-3-0346-0228-0_12-2