



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANSIOLÍTICO Y ANTIDEPRESIVO DE
ANÁLOGOS DE MELATONINA M6A Y M7A**

TESIS

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

PRESENTA

AARÓN ALMARAZ SÁNCHEZ



MÉXICO, D.F.

2016



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: JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ

SECRETARIO: Profesor: MARÍA EVA GONZÁLEZ TRUJANO

1er. SUPLENTE: Profesor: OSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ

2° SUPLENTE: Profesor: ALFONSO SEBASTIÁN LIRA ROCHA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE NEUROFARMACOLOGÍA, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, FACULTAD DE QUÍMICA, EDIFICIO "A" LAB 1-E

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Elia Brosla Naranjo Rodríguez

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha

SUSTENTANTE (S):

Aarón Almaraz Sánchez

ÍNDICE

RESUMEN	III
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE GRÁFICAS	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1. Farmacología de la Ansiedad y el Trastorno de Ansiedad Generalizada	2
2.1.1. Terapéutica de la ansiedad.....	2
2.2. Depresión	3
2.2.1. Terapéutica de la depresión.....	4
2.3. Melatonina	5
2.3.1. Biosíntesis, metabolismo y degradación.....	6
2.3.2. Ciclo circadiano y calendario endocrino	7
2.3.3. Receptores a MT.....	9
2.3.4. Farmacología de la MT.....	10
2.3.5. Melatonina en el Tracto Gastrointestinal (TGI)	11
2.3.6. Agonistas y antagonistas Melatoninérgicos	13
2.3.7. Toxicidad.	14
2.3.8. Análogos de Melatonina	14
2.3.8.1. Análogos 1-N Sustituidos	16
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVOS	18
5.1. Objetivo General.	18

5.2. Objetivos particulares.	18
6. MATERIAL Y MÉTODOS	19
6.1. Preparación: cristalería, biológico, alimenticio y reactivos.	19
6.2. Preparación de las sustancias	20
6.3. Prueba de Enterramiento de Esferas	20
6.3.1. Evaluación.....	21
6.3.2. Experimentos	22
6.4. Prueba de Nado Forzado	22
6.4.1. Evaluación	23
6.4.2. Experimentos	24
6.5. Prueba de Campo Abierto (OFT)	24
6.5.1. Evaluación	25
6.6. Sistema de Tejido Aislado <i>in vitro</i>	25
6.6.1. Evaluación	26
6.6.2. Experimentos	26
6.7. Prueba de toxicidad	27
6.8. Análisis Estadístico	27
7. RESULTADOS	28
7.1. Ansiedad: Prueba de enterramiento de esferas.	28
7.2. Depresión: Prueba de Nado Forzado.	29
7.3. Actividad Motriz: Prueba de campo abierto.	32
7.4. Efectos <i>in vitro</i>	36
7.5. Prueba de toxicidad.	38
8. DISCUSIÓN	39
9. CONCLUSIONES	44
10. PERSPECTIVAS	45
11. BIBLIOGRAFÍA	46

RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de análogos estructurales de melatonina "M6A y M7A" y su tendencia a conferir propiedades ansiolíticas y antidepresivas. Para alcanzar este objetivo utilizamos los modelos de enterramiento de esferas (0.125, 0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 mg/kg), nado forzado (0.125 mg/kg) y campo abierto (0.125 mg/kg).

Las dosis que presentaron un efecto ansiolítico en la prueba de Enterramiento de Esferas fueron de 0.125 mg/kg para cada análogo, en comparación con Melatonina y Diazepam como control positivo a dosis de 0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 mg/kg. Los análogos de melatonina disminuyeron significativamente el número de esferas enterradas por los roedores en un ambiente controlado ($p < 0.05$), lo que se traduce en un mayor efecto ansiolítico en comparación con Diazepam, Melatonina y por supuesto el vehículo.

Al evaluar los análogos a dosis equivalentes en un modelo de depresión, como el de Nado Forzado, se obtuvo una disminución del tiempo de inmovilidad al administrar los análogos, incluso mejor que la reportada por los controles positivos (Agomelatina y Melatonina), lo cual nos indica que dichos análogos también confieren un efecto antidepresivo similar al de la melatonina y agonistas como la agomelatina.

No se encontraron cambios en la actividad locomotriz las ratas evaluadas. El análogo M7A presentó una similitud con la Melatonina en la relajación observada en duodeno de rata evaluado en un sistema de tejido aislado.

Las pruebas de toxicidad efectuadas para el M7A indican que dichos análogos son seguros, al determinarse que su toxicidad puede ser mayor a la dosis de 100 mg/kg i.g.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

4P-PDOT	(4-fenil-2-propionaminotetralina)
5HT	5 – Hidroxitriptamina
5-HTP	5-Hidroxitriptófano
[2-I ¹²⁵]-MT	2-Iodo ¹²⁵ -Melatonina
AMT	Agomelatina
A1	Análogo 1 (M6A)
A2	Análogo 2 (M7A)
AMPc	Adenosín Monofosfato Cíclico
ANDEVA	Análisis de varianza
ATP	Adenosín Trifosfato
BK _{Ca}	Canal de Potasio Activado por Ca ²⁺
BMNEP	N-Bromoacetil-2-Iodo-5-Metoxitriptamina
BZP	Benzodiazepinas
CREB	cAMP-Elemento de Respuesta de Unión a Proteínas
CE	Célula Enterocromafín
DBI	Péptido Inhibidor de Diazepam
DZ	Diazepam
DDM	Desorden de Depresión Mayor
DA	Dopamina
DAG	Diacélglicerol
ER	Retículo Endoplásmico
EEM	Error Estándar de la Media

FLU	Fluoxetina
FST	Prueba de Nado Forzado (por sus siglas en inglés)
FP	Receptor de Prostaglandina F _{2α}
GP	Glándula Pineal
GABA	Ácido Gama-Amino Butírico
GMP	Guanosín Monofosfato
GsCS	Ganglio Simpático Cervical Superior
GMPc	Guanosín Monofosfato Cíclico
GP	Glándula Pineal
hMT1	Receptor MT1 Humano
HIOMT	Hidroxi-indol-O-metil-transferasa
IBMX	Isobutil-metilxantina
INT	Íntegro
i.p	Intraperitoneal
i.g.	Intragástrico
MT	Melatonina
MBT	Prueba de Enterramiento de Esferas (por sus siglas en inglés)
MT6s	6-Sulfatoximelatonina
MT ₁	Receptor 1 a Melatonina
MT ₂	Receptor 2 a Melatonina
MT ₃	Receptor 3 a Melatonina
NE	Norepinefrina
NAS	N-Acetil serotonina
NA	Noradrenalina

NSQ	Núcleo Supraquiasmático
NAT	N-Acetil-transferasa
OFT	Prueba de Campo Abierto (por sus siglas en inglés)
OECD	Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (Por sus siglas en inglés)
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PLc	Fosfolipasa C
PIP2	Fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato
PKA	Proteína Cinasa tipo A
PKC	Proteína Cinasa tipo C
Px	Pinealectomía
PEG	Polietilenglicol
SNC	Sistema Nervioso Central
SSI	Solución Salina Isotónica
TAG	Trastorno de Ansiedad Generalizada
TGI	Tracto Gastrointestinal
TRH	Tracto Retino-hipotalámico
VEH	Vehículo
VDCC	Canal de Ca ²⁺ Dependiente de Voltaje

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del receptor GABA y sus principales agonistas	3
Figura 2. Estructura de la agomelatina.	4
Figura 3. Fisiología de la secreción de Melatonina	5
Figura 4. Conexiones entre los ojos (retina) y la GP	7
Figura 5. Regulación de MT a nivel estacional	8
Figura 6. Vías de señalización de los receptores MT1 y MT2	10
Figura 7. Estructura de los principales antagonistas MT	14
Figura 8. Efecto neuromodulador de análogos híbridos de pinolina-melatonina ..	15
Figura 9 Melatonina y Análogo Indol-3-carboxi-aldehído-hidrazona	15
Figura 10 Análogos 1-N Sustituídos	16
Figura 11. Modelo para la prueba de enterramiento de esferas.	21
Figura 12. Prueba de Nado Forzado	23
Figura 13. Modelo de Campo Abierto	25
Figura 14. Porción de duodeno aislado <i>in vitro</i>	26

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Niveles de MT en fluidos corporales	11
Tabla 2. Diferencia entre producción-efecto de la MT en dos niveles.	12
Tabla 3. Dosis empleadas para la MBT.	22
Tabla 4. Dosis empleadas en la FST	24
Tabla 5. Dosis empleadas en la prueba de toxicidad	27
Tabla 6. Prueba de toxicidad del M7A.....	38

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Conteo y promedio de esferas enterradas en MBT.	28
Gráfica 2A. Tiempo de movimiento dentro del cilindro de exploración	29
Gráfica 2B. Distancia recorrida.	30
Gráfica 2C. Velocidad promedio	30
Gráfica 2D. Tiempo de inmovilidad.	31
Gráfica 2E. Tiempo de buceo	31
Gráfica 3A. Tiempo de movilidad en OFT.	33
Gráfica 3B. Distancia recorrida en OFT.	33
Gráfica 3C. Velocidad promedio en OFT.	34
Gráfica 3D. Tiempo de inmovilidad en OFT.	34
Gráfica 3E. Diferencia de tiempo de permanencia entre zonas en OFT.	35
Gráfica 4A. Área bajo la curva de la respuesta del tejido.....	36
Gráfica 4B. Amplitud de la respuesta.	37
Gráfica 4C. Tensión del tejido.	37

1. INTRODUCCIÓN:

La ansiedad y la depresión son dos trastornos emocionales complejos, que implican también problemas en pensamiento y conducta. Aunque son distintos, presentan ciertas similitudes que pueden ocasionar confusión al intentar distinguirlos [1]. Cada uno tiene sus propias características y síntomas y requieren tratamientos diferentes.

La ansiedad se define como un sistema de alerta que se activa en previsión de un peligro o amenaza futuro. Como respuesta a los estímulos o situaciones que se presentan, resulta muy fácil que se asocie a diferentes estímulos o situaciones. Genera con los elementos amenazantes, conductas como el escape, la evitación o la lucha. Las emociones presentes en los trastornos de ansiedad van desde el simple nerviosismo a episodios de terror o pánico [1].

La depresión es el diagnóstico psiquiátrico que describe un trastorno del estado de ánimo, transitorio o permanente, caracterizado por sentimientos de abatimiento, infelicidad y culpabilidad, además de provocar una incapacidad total o parcial para disfrutar de las cosas y de los acontecimientos de la vida cotidiana. Los trastornos depresivos pueden estar, en mayor o menor grado, acompañados de ansiedad. [1].

El trastorno mixto ansioso-depresivo es cuando se presentan ambos cuadros de ansiedad y depresión, lo cual señala que probablemente estos dos padecimientos sean regulados por una vía en común o con mediadores análogos [1].

Por otro lado, correlacionando efectos centrales con periféricos, específicamente del sistema nervioso central y gastrointestinal, el parasimpático estimula la actividad gastrointestinal e inhibe la actividad central a través del sistema colinérgico (acetilcolina por receptores muscarínicos). Sin embargo, la relación de melatonina en ambos sistemas es a través del neurotransmisor serotonina (receptores 5-HT) ya que este es el precursor de la melatonina en su síntesis. Por lo tanto los estudios in vitro permiten establecer esta relación.

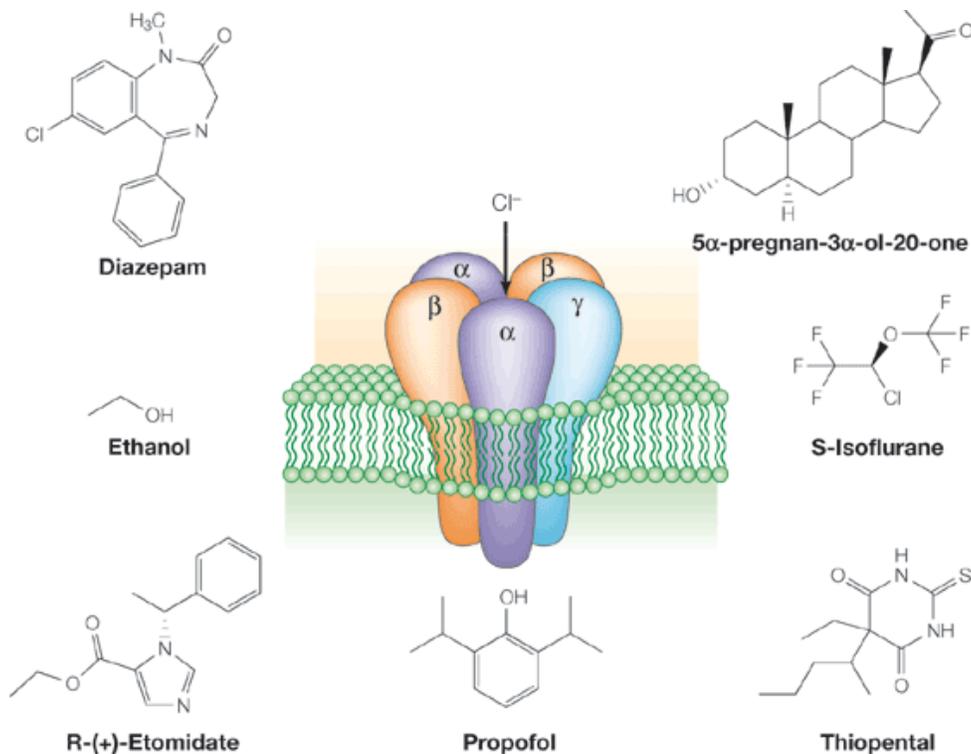
2. ANTECEDENTES

2.1. Ansiedad

La ansiedad ha sido estudiada como respuesta emocional y como rasgo de personalidad. Como emoción, la ansiedad puede ser entendida como un conjunto de manifestaciones fisiológicas y expresivas, ante una situación o estímulo, que es evaluado por el individuo como potencialmente amenazante, aunque objetivamente pueda no resultar peligroso [2]. La ansiedad tiene una prevalencia en la población mundial que va del 1.5 al 5.9% [3, 4] y de esa población tiene un promedio de duración de 10 años en el paciente [5].

2.1.1. Terapéutica de la ansiedad

Los tratamientos clásicos para la ansiedad somática (física) son las benzodiazepinas (BZP) [6] las cuales son moduladores alostéricos positivos del receptor de ácido γ -aminobutírico tipo A (GABA-A, figura 9) que inducen efectos ansiolíticos, de relajación muscular, anticonvulsivos, sedantes e hipnóticos [7]. El Diazepam es un derivado de la 1,4-benzodiazepina, es el fármaco prototipo con propiedades ansiolíticas [8], anticonvulsivantes [9] y sedantes [10]. La pregabalina es otro de los fármacos actualmente usados en el tratamiento del Trastorno de ansiedad generalizado (TAG) la cual actúa sobre los canales de calcio dependientes voltaje disminuyendo la liberación de neurotransmisores como el glutamato y la noradrenalina (NA), causantes de excitación a nivel neuronal [11].



Nature Reviews | **Neuroscience**

Figura 1. Esquema del receptor GABA y estructura de sus principales agonistas. [7]

2.2. Depresión

La depresión es un trastorno crónico y recurrente que hoy en México constituye un problema de salud pública que afecta del 12 al 20% de la población adulta (18-65 años) [12]. Esta produce altos costos de tratamiento hospitalario, internalización y otros aún mayores como el ausentismo laboral [13]. Múltiples monoaminas como la 5-HT, la NE y la dopamina (DA) están implicadas en la fisiopatología de la depresión cuando se encuentran en niveles por debajo de los normales, es por eso que son blancos en los tratamientos clásicos hacia este trastorno [13]. Dentro de un estudio de mercado realizado en Estados Unidos, se determinó que la venta de antidepresivos hacia el 2020 aumentará de 10.9 a 14.0 billones de dólares, incrementando la rentabilidad en un 40% [14].

2.2.1. Terapéutica de la depresión

La teoría de las mono-aminas dirige el tratamiento mediante la modulación de estas moléculas (5-HT, NE y DA) empleando inhibidores de su recaptura a nivel sináptico pero su principal limitante es cuando hay una producción nula de los mismos debido a una falla en la cascada de señalización (disminución de la síntesis o de la liberación de los neurotransmisores) en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada y alteraciones inflamatorias neurodegenerativas (esclerosis múltiple) [13]. Otras investigaciones sobre esta falla señalan que el mejor tratamiento contra la depresión es el uso simultáneo de MT con antidepresivos clásicos [15]. Sin embargo, otros autores afirman que estas terapias afectan la neurogénesis y la producción de otros neurotransmisores a nivel cerebral [16].

Debido a las limitantes de la teoría de las mono-aminas y a los efectos adversos y secundarios como la dependencia y tolerancia, se ha buscado una alternativa, la AMT [17]. La AMT (figura 10) es un agonista de los receptores MT1 y MT2 así como antagonista del receptor de serotonina 5-HT_{2C} que provee efectos cronobióticos, antidepresivos y ansiolíticos, pero no tiene efectos en la recaptura de mono-aminas ni afinidad por los receptores α,β -adrenérgicos, histaminérgicos, colinérgicos, dopaminérgicos ni gabaérgicos [17].

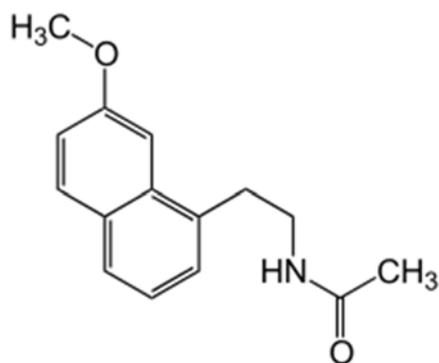


Figura 2. Estructura de la agomelatina. [17]

2.3. Melatonina

La GP o epífisis es una pequeña glándula endócrina situada en el centro del cerebro de los vertebrados. En la antigüedad, René Descartes la describió como “El tercer ojo” o “El asiento del alma”. Se encarga de sintetizar y secretar melatonina (MT) que es un indol que se sintetiza a partir del aminoácido triptófano [18]. En la figura 1 se muestra la secreción de MT en la GP.

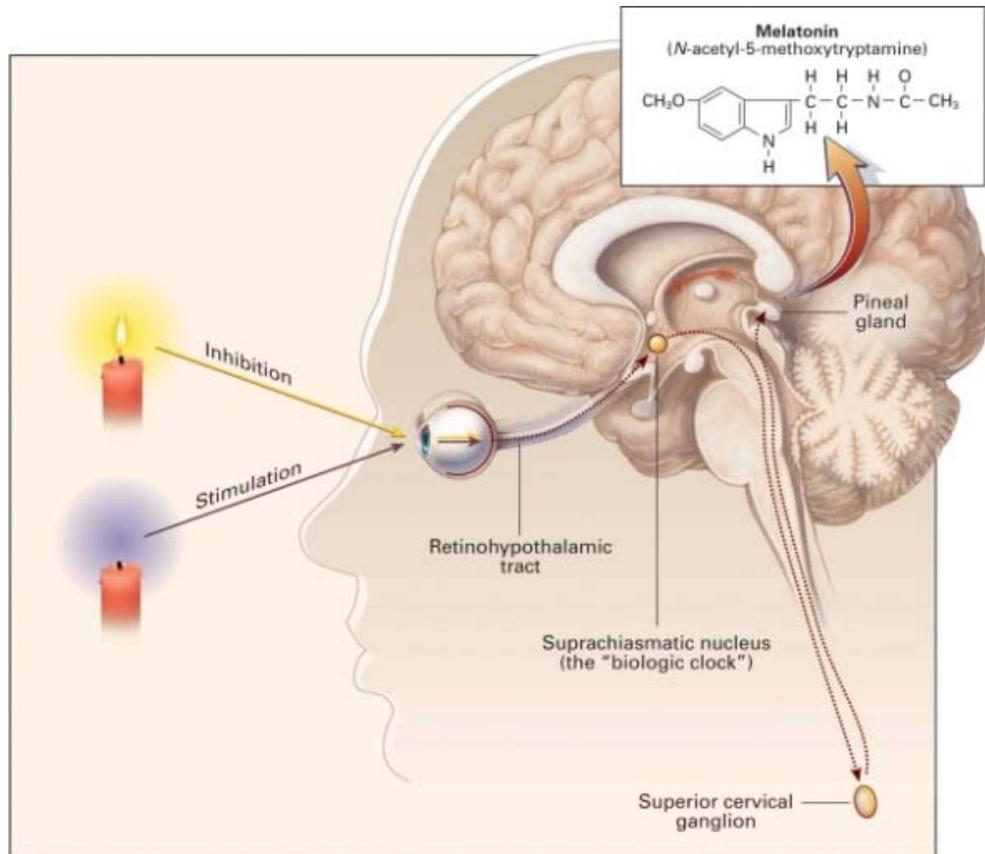


Figura 3. Fisiología de la secreción de MT. La producción es mediada por las fibras nerviosas postganglionares de la retina que pasan a través del Tracto Retinohipotalámico (TRH) hacia el Núcleo Supraquiasmático (NSQ), posteriormente al Ganglio simpático Cervical Superior (GsCS) y finalmente a la GP [19].

La MT fue descubierta originalmente como una molécula que actúa sobre los melanocitos, aclarando la piel de anfibios y peces [20] presentando un pico máximo de secreción durante un periodo prolongado de oscuridad indicando “noche” al organismo [21]. La síntesis de MT está regulada por un fotoperiodo por lo que su secreción se ve disminuida en presencia de luz [22], demostrando que la señal que envía la retina hacia el SNC está mediada intrínsecamente por células ganglionares fotosensibles que pueden responder a intensidades de luz que tienden a ser bajas [23].

La MT es una neuro-hormona que tiene un tiempo de vida corto, es inestable a la luz y a la temperatura cuando se encuentra en solución, características que no le permiten tener un uso farmacológico potencial.

2.3.1. Biosíntesis, metabolismo y degradación

La síntesis de MT inicia con la ausencia de luz, a cual repercute en la activación de la N-Acetil-transferasa (NAT), la enzima clave en la síntesis del metoxindol [24]. La síntesis de MT en todas las células que la producen consta de 4 pasos: primero, el precursor L-triptófano es tomado de la circulación sanguínea y es convertido en 5-hidroxitriptófano (5-HTP) en la mitocondria y después descarboxilado en el citosol por la L-aromático-amino ácido descarboxilasa, hasta formar serotonina (5-HT) la cual es acetilada en N-acetil-serotonina por la NAT [25] la cual es considerada la enzima limitante para su producción debido a que su activación depende de la ausencia de luz. Finalmente, la NAS es metilada por la Hidroxi-indol-O-metil-transferasa (HIOMT) para formar MT [26]. En la figura 2 se muestra el flujo de síntesis de MT.

La MT es principalmente degradada por las monooxigenasas P₄₅₀ del hígado para dar 6-hidroximelatonina y luego 6-sulfatoximelatonina, principal metabolito presente en la orina [20, 27].

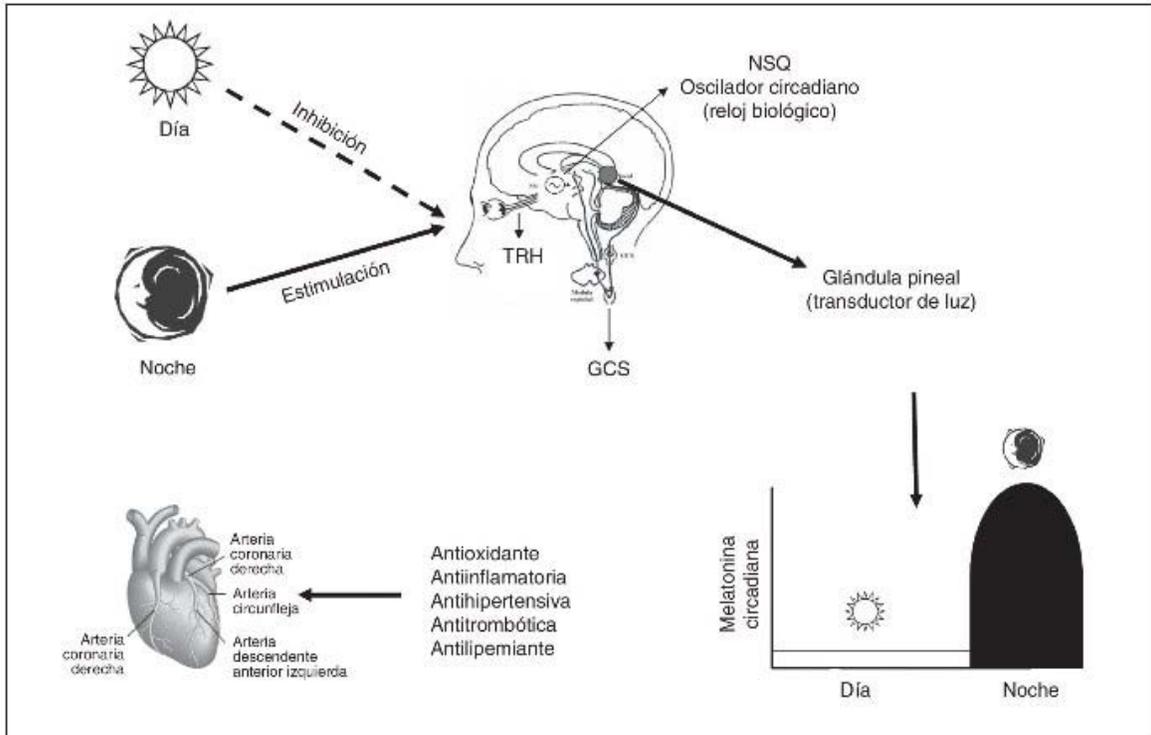


Figura 4. Conexiones entre los ojos (retina) y la GP. La NE es liberada en la noche desde las terminales nerviosas simpáticas intrapineales e interactúa con los receptores β -adrenérgicos, induciendo la conversión de ATP a AMPc, esta última causa la activación de la NAT, importante en la síntesis de MT. [28]

2.3.2. Ciclo circadiano y calendario endocrino

El ciclo de la MT endógena es considerado el mejor reloj biológico para el SNC en humanos. La MT puede ser cuantificada directamente en muestras de saliva y plasma o directamente en sus metabolitos en la orina, como la 6-Sulfatoximelatonina, los cuales nos proveen de información acerca del ciclo circadiano mediante estudios de laboratorio [29].

La producción de MT en 24 horas no solo representa el reloj endógeno circadiano, también provee información estacional durante el año. Específicamente, las concentraciones de MT dependen de la duración de la noche y esto bien se sabe que varía a lo largo de las estaciones del año [30]. Esta regulación del fotoperíodo es en consecuencia de la adaptación del SNC a las condiciones externas, si la

actividad de la MT se ve desfavorecida repercutirá directamente en las funciones neurológicas. Cuando la GP es removida (pinealectomía o Px), se pierde la adaptación de los mamíferos hacia el entorno estacional [31]. Algunas investigaciones afirman que la re-sincronización del ciclo incluso sin tratamientos, ayuda directamente en todas las afecciones relacionadas a la deficiencia en la actividad de la MT [32]. El contraste entre las emisiones de luz durante el invierno y el verano son necesarias para aportar información al sistema sobre reproducción, pelaje, metabolismo y funciones inmunológicas [33] tal como se muestra en la figura 3.

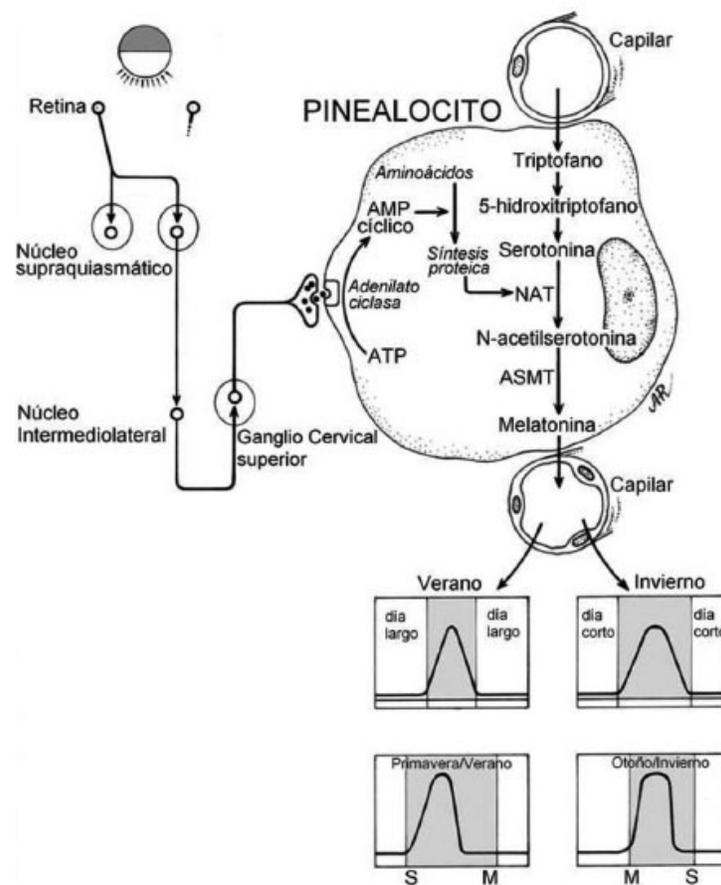


Figura 5. Regulación de MT a nivel estacional. La intensidad y duración del ciclo luz-oscuridad proporciona información acerca de las condiciones exteriores para el organismo y prepara al SNC para su adaptación al medio. (Bustos y cols, 2012 [34])

Notables ejemplos de la regulación metabólica que ejerce la MT son mediante la secreción de insulina y homeostasia de la glucosa[35] [36].

2.3.3. Receptores a MT

La MT endógena actúa mediante la activación de receptores ligados a proteína G, esto se comprobó mediante el uso de isótopos como el 2-(I¹²⁵)-melatonina (2-I¹²⁵-MT), identificada y cuantificada por su alta afinidad a los receptores de MT en vertebrados [37]. Se han identificado tres receptores en mamíferos: MT1, MT2 de carácter membranal [38] y MT3 de carácter citosólico [39]. El receptor MT2 es principalmente expresado en la retina y en el hipocampo. Las características del MT2 son similares a las del MT1 siendo su unión a proteína G la única característica que pudiese ser distinta [38]. En la figura 4 se esquematizan las señalizaciones de ambos receptores.

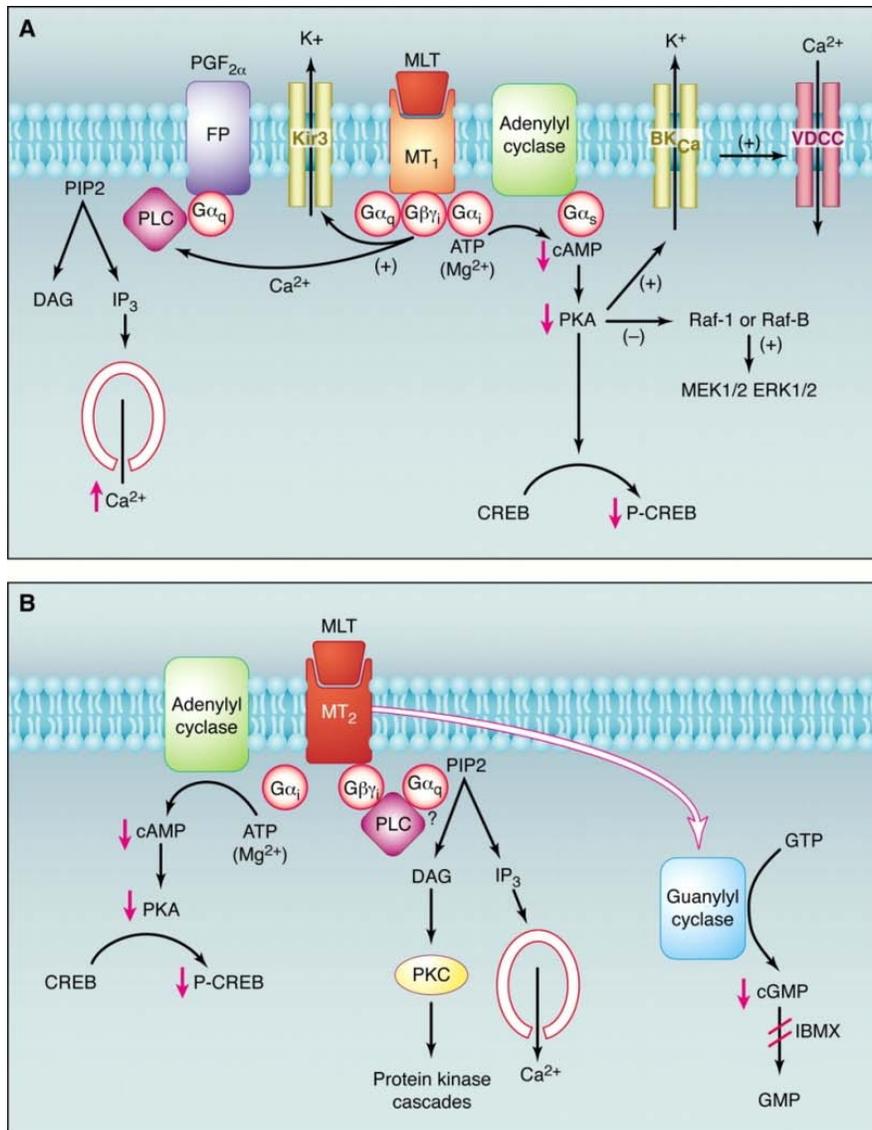


Figura 6. Vías de señalización de los receptores MT1 y MT2. A) Señalización del receptor MT1 acoplado a proteínas G (q y α). B) Activación del receptor MT2: no se ha confirmado que tenga acoplamiento con proteínas G (q_i) por lo que la teoría que sea mediante activación de PKC sigue dominante [40].

2.3.4. Farmacología de la MT

Uno de los usos principales es para re-sincronizar el ciclo circadiano en el famoso jet-lag en el cual, una adecuada administración de MT ayuda a reestablecer dicha descompensación debida al trabajo nocturno o los viajes entre varios husos horarios [29]. La administración de MT (0.3-5mg/kg) también ha sido usada en las

horas previas al descanso para combatir el insomnio [41, 42]. Provee mejoras en las condiciones y la calidad de sueño así como una regulación positiva de la temperatura corporal [41] además de ser empleada en tratamientos contra el reflujo esofágico [43], cáncer [44], enfermedades cardiovasculares [45], como anticonvulsivante [46, 47], antioxidante [45, 48], analgésico [49], sedante [50], hipnótico [51-53], pre-anestésico [54], ansiolítico [55, 56] y antidepresivo [57, 58] entre otros. Además de la GP, también existen otros tejidos donde se sintetiza la MT, en la tabla 1 se aprecia la participación de distintos fluidos en que podemos encontrar MT.

Tabla 1. Niveles de MT en fluidos corporales

Fluido	MT (pg/mL)	Especie	Referencia
Líquido			
Cefalorraquídeo	1.47-542	Humano	[59]
	2,000-	Humano, rata, cerdo,	
Bilis	11,000	mono	[60]
Líquido Folicular	36.5 ±4.8	Humano	[61]
Líquido Amniótico	25-158	Humano	[62]
Saliva	11-63	Humano	[63]
Líquido Sinovial	79.8 ±38.9	Humano	[64]
Leche Materna	36-99	Humano	[65]
Cámara anterior del ojo	28-70	Conejo	[66]

2.3.5. Melatonina en el Tracto Gastrointestinal (TGI)

Se ha demostrado la existencia y síntesis de MT en diversos tejidos extrapineales como en el TGI, en 1975 se descubrió mediante técnicas de inmunohistoquímica en las células enterocromafines de la mucosa gástrica [67] y se conoce, que su

concentración es 400 veces mayor que en la GP y 100 veces mayor que en el plasma. Al parecer, las concentraciones de MT en el TGI no dependen del fotoperiodo si no únicamente de la ingesta de alimento [67], principalmente una dieta rica en triptófano, el precursor directo de la MT. Esto se ha demostrado mediante la Px, en donde las concentraciones de MT no cambian a pesar de haberse extirpado la GP [68]. La MT producida por las células enterocromafines (CE) de la mucosa gástrica es liberada a los vasos sanguíneos y difundida hacia otros tejidos, actuando como antagonista de los efectos contráctiles de la 5HT [69] y relajando el tejido [70]. En respuesta a estímulos nerviosos, las CE del duodeno proximal liberan MT la cual se une a receptores MT2 causando liberación de iones Ca^{2+} y bicarbonato, esto sirve para neutralizar el ácido contenido en el estómago una vez que se libera en el duodeno [71], en este tejido la MT juega un papel importante en el control neuro-humoral de la barrera mucosa a nivel de receptores nicotínicos [72], en la tabla 2 se compara la secreción de MT en la GP y en el TGI.

Tabla 2. Diferencia entre producción-efecto de la MT en SNC (GP) y Sistema Nervioso Gastrointestinal (duodeno) [70].

Comparación de Melatonina en sistemas Pineal y Gastrointestinal de mamíferos [70]		
	GP	TGI
Sitio de producción	Pineal	Células enterocromafínes
Modo de secreción	Circadiano	Estable o episódico
Modo de acción	Endócrina	Endócrina, paracrina y luminal
Modo de liberación	Inmediata	En respuesta a alimento
Acumulación desde circulación	Indeterminado	Determinado
Respuesta al ayuno	Disminuye	Incrementa
Respuesta al alimento	Sin respuesta	Incrementa

Esta comparación de MT en ambos sistemas nos permite realizar estudios centrales y periféricos, por un lado, por otro lado el GABA en ambos sistemas disminuye la actividad eléctrica cerebral dependiente de la dosis y/o concentración.

En este experimento no aplicamos DZ directamente al tejido, porque en un estudio previo de ácido γ -aminobutírico (GABA-B) [73] y colon, reportamos relajación y contracción, del tejido con GABA, principal neurotransmisor en el SNC en mamíferos que desempeña un papel importante en la reducción de la excitabilidad neuronal a lo largo del sistema nervioso. En humanos, el GABA es directamente responsable de la regulación del tono muscular [74], Entonces, estudios bioquímicos, electrofisiológicos y últimamente, técnicas de biología molecular han demostrado que los receptores GABAA son complejos supramoleculares heterogéneos y que existe un péptido inhibidor a DZ (DBI), por un lado. Por otro lado, hay la posibilidad de que nuestros estudios *In Vitro* con los *In Vivo* y su interacción con la familia de péptidos DBI, represente una novedosa y correlación neuroquímica significativa en la patología neuropsiquiátrica, sostenida por una alteración de la transmisión GABAérgica [75], estudios que actualmente estamos realizando en nuestro laboratorio (no reportados).

2.3.6. Agonistas y antagonistas Melatoninérgicos

La similitud entre los receptores MT1 y MT2 ha hecho difícil la selección de agonistas selectivos para cada uno de dichos receptores. Actualmente, los agonistas de MT actúan de igual manera sobre MT1 y MT2, como la agomelatina (S20098, Servier), el ramelteón (TAK-375, Takeda), LY156735 (Eli Lilly), el tasimelteón (VEC-162, Bristol-Myers Squibb). Desafortunadamente no está aún claro como estos agonistas actúan ya que la comparación directa con MT no es un requisito para su producción y comercialización [76, 77].

En la figura 5 se muestra la estructura de los principales antagonistas de los receptores MT que son: Luzindol (N-acetil-2-benzyltryptamina), el cual es no selectivo [78], 4P-PDOT [79] y BMNEP los cuales son MT2 selectivos [80].

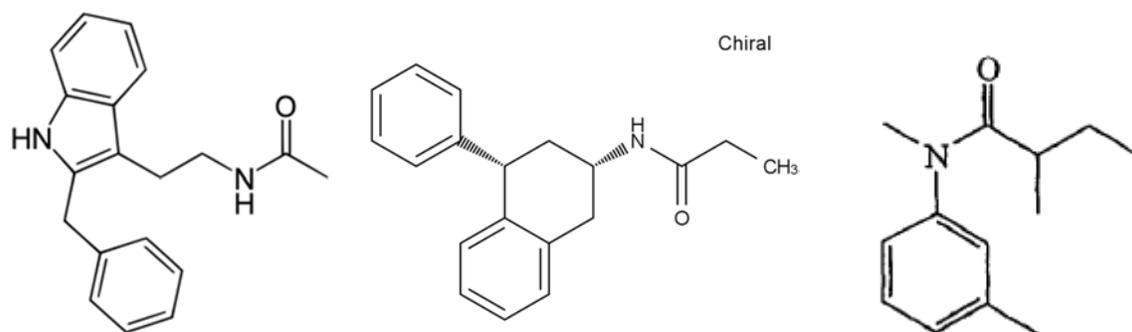


Figura 7. Estructura de los principales antagonistas MT, respectivamente: Luzindol, 4-P-PDOT y BMNEP. [80]

2.3.7. Toxicidad

La MT es una molécula relativamente segura, su disminución endógena provoca alteraciones severas al organismo lo cual indica su acción continua en el mismo. Se ha determinado que tiene una toxicidad baja a dosis altas (mayores a 200 mg/kg/día) en ratas Sprague-Dawley de 15 a 39 semanas de gestación. Estas dosis exceden 70,000 veces las requeridas para la inducción del sueño. A pesar de la administración no se observó mortalidad en las ratas ni en los fetos una vez extirpados y examinados [81].

Hay varios estudios realizados para determinar la toxicidad de la MT, pero no se ha encontrado una dosis que genere daños a la salud a pesar de que se haya evaluado en humanos [82].

2.3.8. Análogos de Melatonina

Se han llevado a cabo diversas síntesis de estructuras basadas en el núcleo indólico de la MT, dichas estructuras dependen de la interacción que se tiene con los diversos receptores o vías por las cuales la MT tiene su efecto. También se han sintetizado análogos como agonistas serotoninérgicos derivados híbridos de la 6-metoxi-tetrahidro-beta-carbolina o pinolina, una neuro-hormona también sintetizada en la GP (figura 6) y que también proviene de la 5-HT [83], los cuales proveen una modulación positiva de la neurogénesis a edades tempranas en ratas

[84], otros también para proveer de un efecto antioxidante, incluso mayor al de la MT [85] (figura 7), como ligandos agonistas no selectivos [86]. Otros análogos indólicos que poseen cualidades similares son los 2-fenil-indólicos [87], 3-propil-amino-indólicos [88], 5-bromo-indólicos [89], N-Metil-indólicos [90], 2-aldehído-indólicos [90] y 5-cloro-indólicos [91] que, además de las características de la MT, proveen propiedades antioxidantes, citoprotectoras, neuroprotectoras, anticancerígenas y tienen una baja toxicidad [85], empleados en el tratamiento de Alzheimer e incluso glaucoma [92] o Parkinson [93].

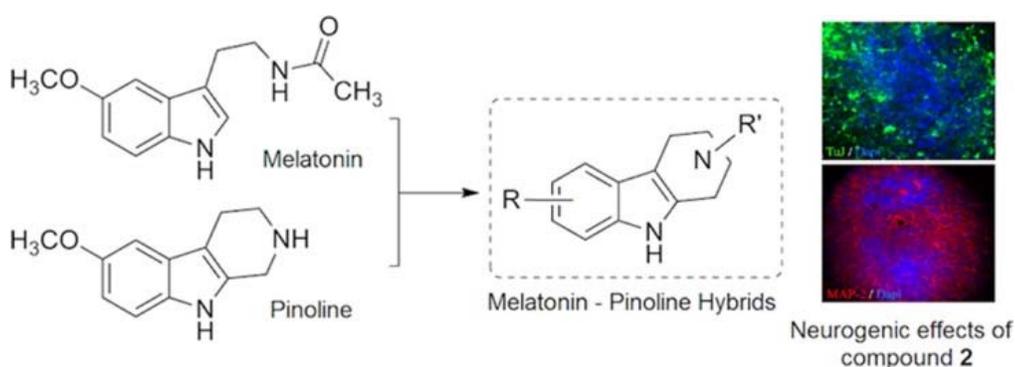


Figura 8. Efecto neuromodulador de análogos híbridos de pinolina-melatonina [84]

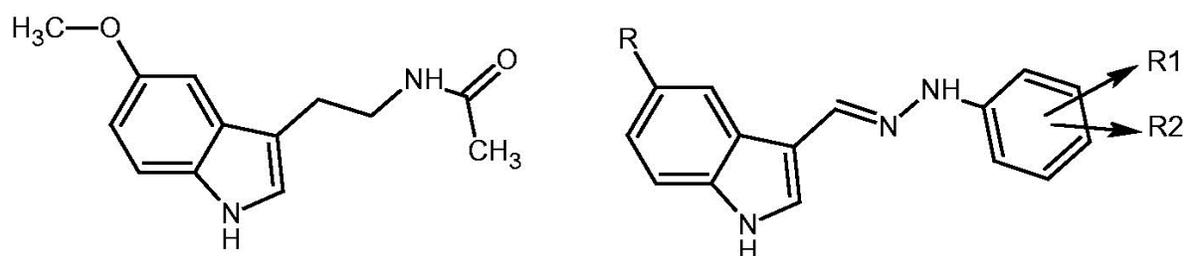


Figura 9 Melatonina (a la izquierda) análogo indol-3-carboxi-aldehído-hidrazona (a la derecha), el cual provee un efecto antioxidante mayor al de MT [85].

2.3.8.1. Análogos 1-N Sustituidos

Uno de los principios de la síntesis de este tipo de análogos es el anillo indólico y su átomo de nitrógeno en la posición 1 el cual se ha propuesto que, al estar lejos del sitio de interacción de la molécula de MT, puede ser ligado a diferentes grupos funcionales que pudiesen conferir otras propiedades a la molécula y por lo tanto, otro tipo de actividades biológicas [94]. Inicialmente, Mor y cols [95] incorporaron un grupo fenilo y un bencilo a la posición 1-N y reportaron la disminución de la afinidad a los receptores MT. Los análogos 1-N sustituidos con cianobencilo, metoxifenilo y clorofenilo (M6B, M3C y M7C) sintetizados por Lira-Rocha y cols [94] (figura 8), han sido evaluados para determinar su actividad y se ha encontrado que proveen un efecto ansiolítico, relajante muscular y adyuvante pre-anestésico, concordando con las investigaciones de Naguib y cols [54]. Otras investigaciones proponen que al igual que la MT, los análogos 1-N sustituidos tienen su efecto mediante la activación del receptor MT1, esto se determinó utilizando ratones knock-out para dicho receptor [96].

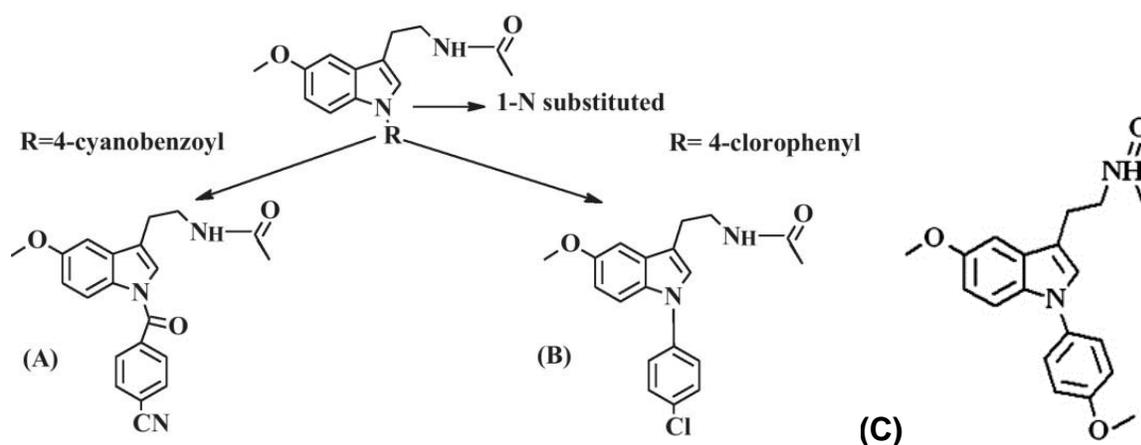


Figura 10. Análogos 1-N Sustituidos: M6B, M7C y M3C respectivamente. Lira-Rocha y cols 2002 [94]

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

- La ansiedad es un trastorno que aproximadamente el 6% de la población adulta la padece, repercutiendo en el ámbito personal y social.
- Los tratamientos contra la ansiedad producen efectos adversos o indeseados.
- La depresión es un trastorno que actualmente afecta a aproximadamente el 20% de la población adulta y prevalece en quien lo padece. Los tratamientos clásicos también conllevan efectos no deseados.
- El campo de aplicación de la MT es muy amplio debido a que posee variadas cualidades como agente terapéutico, sin embargo, el tiempo de vida media es muy corto (15-30 min).

Debido a lo anterior, se proponen alternativas hacia los trastornos en cuestión y mejorar las cualidades de la MT como molécula. Así mismo, determinar en modelos viables, evidencias de que estas moléculas podrán usarse como opción terapéutica en dichos tratamientos, obteniendo así una alternativa más que pueda emplearse para el bienestar del paciente a futuro.

4. HIPÓTESIS

Los análogos de MT, M6A y M7A producen efectos de tipo ansiolítico y antidepresivos a dosis equieficaces a DZ y AMT en diferentes modelos experimentales *in vivo, por un lado*.

Por otro lado, en modelos experimentales *in vitro* los análogos de MT producen un efecto bifásico a concentraciones equimolares.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General.

Evaluar los efectos del M6A y M7A en modelos experimentales de ansiedad y depresión.

5.2. Objetivos particulares.

- Evaluar el efecto ansiolítico de análogos de MT en Marbles Burying Test (MBT).
- Evaluar el efecto antidepresivo de análogos de MT en Forced Swimming Test (FST).
- Evaluar el efecto sobre la actividad locomotriz de análogos de MT en Open Field Test. (OFT).
- Evaluar el efecto del M7A sobre, la respuesta contráctil en un modelo “*in vitro*”.
- Determinar la toxicidad aguda del compuesto M7A.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Preparación: cristalería, biológico, alimenticio y reactivos.

- Quince cajas de 27X19 cm de boro-silicato
- Quince rejillas de acero inoxidable.
- Maskin tape
- Celofán Rojo
- Cuatro cilindros de metacrilato para nado forzado (OMNIALVA)
- Balanza granataria
- Guantes
- Canicas de vidrio azul cobalto
- Jeringas
- Frascos viales
- Caja de metacrilato para campo abierto (OMNIALVA)
- Espátulas
- Bascula analítica
- Guillotina
- Fisiógrafo Biopac Systems
- Aguja (Becton & Dickinson)
- Hilo de sutura
- Cajas Petri (Pyrex)
- Piseta
- Probeta 50, 100 y 200 mL (Pyrex)
- Análogo M6A (Lira Rocha y cols)
- Análogo M7A (Lira-Rocha y cols)
- Matraces aforados de 10, 100, 500 y 1000 mL (Pyrex)
- Matraces Erlenmeyer de 250 y 1000 mL
- Cronómetro
- Cama sanitaria Estándar y Sani-Chip (Harlan Labs. México)
- Alimento Rat Chow (Harlan Labs México)
- Tween 80 (Merck)
- Propilenglicol 400 (Merck)
- Melatonina (Sigma Aldrich)
- Diazepam (Laboratorios Roche)
- Glucosa (Laboratorios Sigma Aldrich)
- Cloruro de Sodio (JT Baker)
- Carbonato de Sodio Anhidro (JT Baker)
- Cloruro de Potasio (JT Baker)
- Fosfato de Potasio (JT Baker)

- Sulfato de Magnesio (Sigma Aldrich)
- Cloruro de Calcio (Merck)
- Ratonés CD1 (Harlan Labs. México)
- Ratas Wistar (Harlan Labs. México)
- Glucosa (Sigma Aldrich)

6.2. Preparación de las sustancias

Para administraciones i.p. se empleó Tween 80 al 15% para incorporar los sólidos como MT, AMT o análogos y posteriormente SSI para llegar a volumen.

En las administraciones i.g. se usó el Tween 80 al 25% en las primeras dosis y Tween 80 al 50% en la dosis más alta debido a las altas cantidades de análogo empleadas en las pruebas de toxicidad.

En la evaluación *in vitro* se empleó Tween 80 al 25% para algunas sesiones y PEG 400-etOH al 30-10% en otras; esto con el fin de elucidar que el vehículo no interfiriera en los resultados y encontrar una mejor forma de preservar el tejido dentro de la cámara.

6.3. Prueba de enterramiento de esferas (MBT por sus siglas en inglés).

La MBT, es una prueba que proporciona información de la conducta de un individuo, en este caso para roedores. El primer modelo en rata fue propuesto en 1978 [97] el cual consistía originalmente en el enterramiento de fuentes de voltaje presentes en una caja de cama sanitaria en la cual la rata enterraba dicha fuente para evitar volver a tocarla. Posteriormente en 1981 [98] se propuso el modelo en ratones en el cual consistía en enterrar las esferas como producto de la ansiedad del ratón. Esto permite evaluar el grado de ansiedad mediante el conteo de esferas enterradas en un lapso de 10 minutos (figura 11).



Figura 11. Modelo para la prueba de enterramiento de esferas.

6.3.1. Evaluación

Las unidades experimentales se aclimataron durante 5 días previos a la evaluación a una temperatura de $23\pm 3^{\circ}\text{C}$. Las sustancias a emplear así como los materiales necesarios se prepararon. Las cajas de boro-silicato se lavaron, secaron y posteriormente, se pesó y añadió una cantidad de 365 g de cama sanitaria Sani-Chip (Harlan Labs) a las cajas con 5 cm de altura. Una vez obtenida una superficie uniforme, se colocaron 24 canicas con ayuda de una plantilla, todas estas del mismo color azul marino de aproximadamente 1.5 cm de diámetro. Una vez realizado el marcaje por código binario en la cola de los roedores, se realizó la administración i.p. de cada tratamiento y se ingresó al ratón en la caja con las esferas. Transcurridos 30 min sin interrupción visual ni sonora, se retira al animal y se hace el conteo de las esferas enterradas con el criterio del 75% o más de la esfera enterrada, este dato provee información acerca del grado de ansiedad del ratón. Los tratamientos se muestran en la tabla 3.

6.3.2. Experimentos

Diseño experimental: En esta tabla se muestran 17 grupos experimentales, en donde se utilizaron diferentes dosis para la prueba de MBT.

Tabla 3.

TRATAMIENTO	DOSIS (mg/kg)	TRATAMIENTO	DOSIS (mg/kg)
INT	N/A	A1-0	0.125
	Tween 80 al		
VEH	15%	A1-1	0.250
DZ1	0.250	A1-2	0.500
DZ2	0.500	A1-3	1.000
MT-1	0.500	A1-4	2.000
MT-2	1.000	A2-0	0.125
MT-3	2.000	A2-1	0.250
		A2-2	0.500
		A2-3	1.000
		A2-4	2.000

INT = Íntegro, VEH = Vehículo, DZ = Diazepam, MT= Melatonina, A1 = Análogo M6A de MT, A2 = Análogo M7A de MT

6.4. Prueba de Nado Forzado (FST)

La FST (por sus siglas en inglés) fue propuesta inicialmente por Porsolt y cols en 1978 [99]. Implica dos sesiones en las cuales se colocan a los animales, en este caso ratas Wistar, dentro de un cilindro de metacrilato (OAAquaMed, ONMIALVA) de 60 cm de altura y 25 cm de diámetro interno los cuales contienen agua a $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ a una profundidad de 40 cm como se muestra en la figura 12. Fue empleado un software de captura de imágenes (OASPADVid de ONMIALVA v.2011).



Figura 12. Prueba de Nado Forzado (DL Naturegene Life Sciences Inc)

6.4.1. Evaluación

Ratas Wistar de 240 ± 10 g de peso, previamente aclimatadas al entorno de trabajo durante una semana fueron empleadas en esta prueba. Antes de la captura de imágenes, debe realizarse un entrenamiento preliminar para adaptar a la rata a las condiciones del modelo un día antes de dicha captura, esto por 15 minutos. Una vez limpio el cilindro previo al momento de la evaluación, se realiza la administración i.p. del respectivo tratamiento y 30 minutos después se ingresa al animal en el cilindro con agua bajo luz roja de 55 watts, capturando las imágenes con el sistema durante 5 min. En el transcurso del experimento el animal nada y bucea, el programa registra el movimiento y determina el tiempo en cada zona del cilindro así como la velocidad, la distancia recorrida y el tiempo de inmovilidad, lo cual nos proporciona información acerca del grado de depresión de la rata y que, cuando el animal deja de moverse y luchar por su vida, se dice que ha entrado en un estado depresivo.

6.4.2. Experimentos

Tabla 4. Dosis empleadas en la FST. Total: 6 tratamientos.

TRATAMIENTO	DOSIS (mg/kg)
INT	N/A
VEH	Tween 80 al 15%
AMT	9.000
MT	1.000
A1-0	0.125
A2-0	0.125

INT = Íntegro, VEH = Vehículo, MT= Melatonina, AMT = Agomelatonina, A1 = Análogo M6A de MT, A2 = Análogo M7A de MT

6.5. Prueba de Campo Abierto (OFT)

Es un modelo propuesto en 1932 por Hill y cols [100] el cual consiste en observar el comportamiento de los roedores, en este caso ratas Wistar. Actualmente, se ha adaptado y mediante tecnología se ha podido perfeccionar para obtener datos más precisos. El equipo utilizado se trata de una caja de metacrilato transparente (OABioMed, OMNIALVA) de 40x40x40 como se muestra en la figura 13, con sensores de altura y cámara de captura de imágenes mediante el software (OASPADVid de OMNIALVA v.2011).

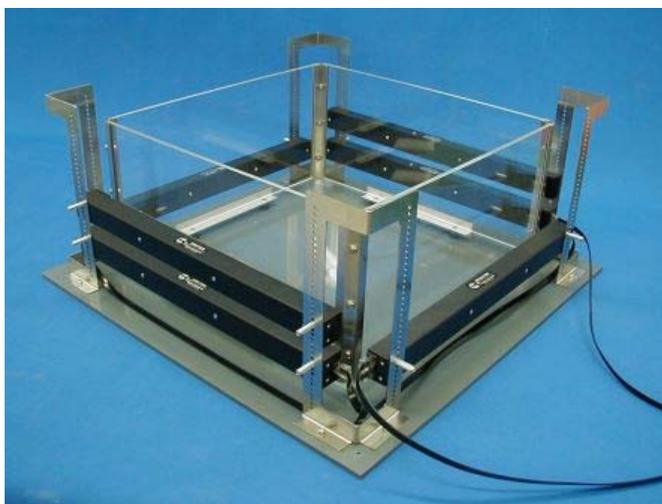


Figura 13. Modelo de Campo Abierto (OMNIALVA)

6.5.1. Evaluación

Una semana posterior a la FST se realiza la OFT para determinar la actividad locomotriz en las mismas ratas. Una vez limpio el equipo se administran las dosis de cada tratamiento, 30 minutos después se ingresan al OABioMed durante 10 minutos y se registra su actividad exploratoria mediante el software de captura. El tiempo de movilidad, la velocidad y los eventos exploratorios de levantamiento son parámetros que nos ayudan a determinar si las sustancias empleadas tienen influencia en la actividad motriz. Los tratamientos son los mismos que los empleados en la FST (ver tabla 4).

6.6. Sistema de Tejido Aislado *in vitro*

El sistema de evaluación trata de un modelo de vidrio acoplado a un sistema de captura de transductores que registra la actividad contráctil o relajante de diversos tejidos. El complejo implica un sistema de regulación de temperatura mediante recirculador con termostato y un ordenador que registra la actividad de interés. BIOPAC-Biosystems Inc, como se muestra en la figura 14, es el equipo que capta la actividad, siendo Acknowledge 3.9.1 el software utilizado para el registro en el ordenador. Se emplea solución Ringer-Krebs-HCO³⁻ a 37±1°C.

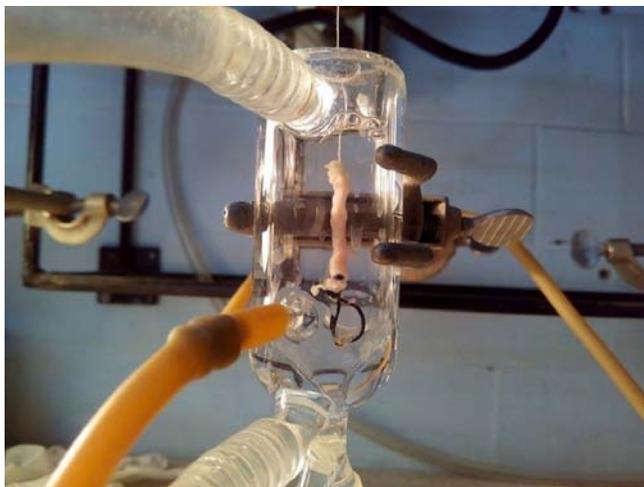


Figura 14. Porción de duodeno aislado *in vitro*.

6.6.1. Evaluación

Inicialmente se realizó la calibración y lavado del equipo. Se utilizaron ratas Wistar macho de 230 ± 10 g con 6 horas de ayuno previo mínimo, se sacrificaron por decapitación con guillotina y se disecó y seccionó la parte proximal y distal del duodeno, un centímetro aproximadamente de cada porción. Se montó el tejido en el sistema *in vitro* sumergido en solución Ringer-Krebs- HCO_3^- a 37°C y burbujeo con gas carbógeno (95% O_2 y 5% CO_2) con luz abierta y cerrada en diferentes sesiones. La parte inferior del duodeno se sujetó a la base de la cámara y la parte superior directamente al transductor que está conectado a la interfase universal (BIOPAC-Systems). La tensión inicial fue de 1g y se estabilizaron los tejidos durante media hora mínimo. La administración de las concentraciones fue directamente en la cámara de cristal de doble pared para tejido aislado. Los parámetros evaluados fueron área bajo la curva, amplitud y frecuencia.

6.6.2. Experimentos

Las concentraciones tanto de M7A como de MT fueron: 10, 20, 40, 80, 160, 320 y 640 μL .

6.7. Prueba de toxicidad

El protocolo empleado para las pruebas de toxicidad aguda fue el dictado por la OECD [101] modificado logarítmicamente para proveer una curva de 4 puntos. Para la prueba se emplearon 13 ratones por compuesto (M7A) de la cepa ICR (Harlan Labs) de 24 ± 2 g de peso, habituados previamente por 4 días a las condiciones del laboratorio en cajas de borosilicato con comida y agua *ad-libitum*. La administración fue i.g. con cánula para ratón. Se observaron continuamente durante la primera hora posterior a la administración y subsecuentemente a las 2, 4, 8, 24, 48 y 72 horas. Se empleó un control al cuál únicamente se le administró el vehículo (Tween 80), los tratamientos se muestran en la tabla 5

Tabla 5. Dosis empleadas en la prueba de toxicidad, ajustada de la OECD [101]. Total: 5 tratamientos.

Dosis mg/kg	Unidades
0.1	n=3
1.0	n=3
10.0	n=3
100.0	n=3
Íntegro	n=1

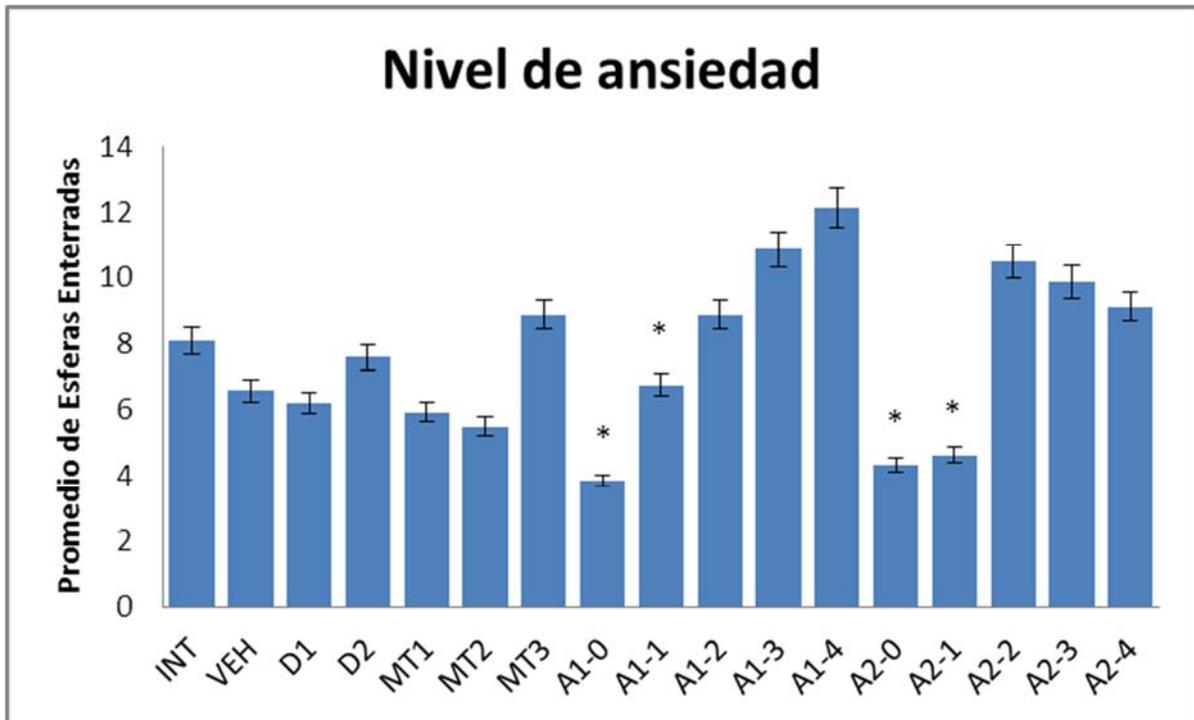
6.8. Análisis Estadístico

Para cada prueba se realizó un Análisis de Varianza (ANDEVA) de una vía, utilizando un software estadístico OriginPro 8 (v.8.0724). Para la MBT se aplicó una prueba *post-hoc* de Tukey para comparaciones múltiples, para una significancia de $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1. Ansiedad: Prueba de enterramiento de esferas.

Se observó una disminución significativa dentro de los tratamientos con análogo, tanto con M6A como M7A. La estadística indica que hay una diferencia entre los grupos seleccionados comparados con el VEH, de acuerdo a la gráfica 1.



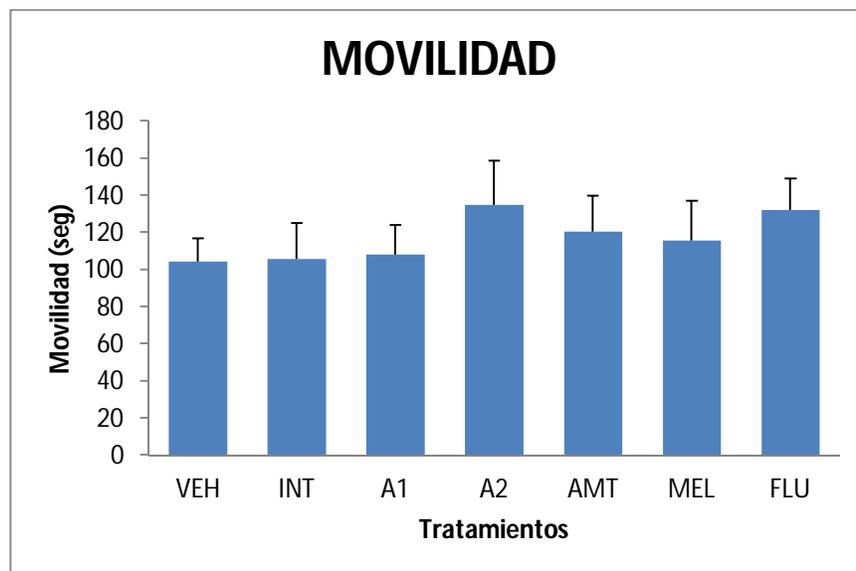
Gráfica 1. Conteo y promedio de esferas enterradas en el modelo de ansiedad. Las comparaciones entre tratamientos indican que las dosis menores de análogo tienen una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Total: 17 tratamientos. INT = Íntegro, VEH = Vehículo, DZ = Diazepam, MT= Melatonina, A1 = Análogo M6A de MT, A2 = Análogo M7A de MT

Los datos se presentan como el promedio \pm el error típico de la media. El animal presentó más ansiedad si el número de esferas fue mayor por tanto, un efecto ansiolítico se verá en aquellos que enterraron una menor cantidad de canicas en la cama sanitaria de aserrín (Harlan Labs). El análisis estadístico muestra que no hay diferencias significativas entre el grupo íntegro y aquellos que únicamente

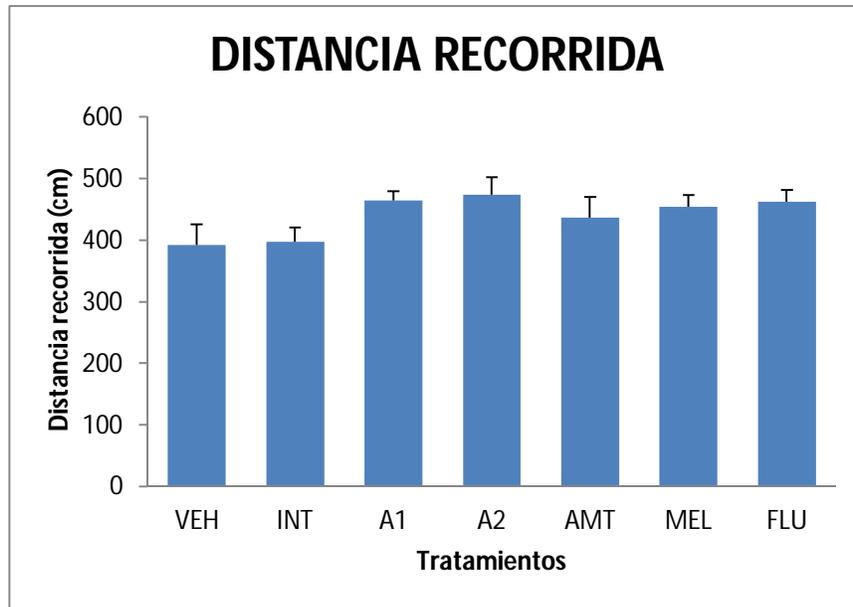
fueron administrados con el vehículo y además, las comparaciones entre tratamientos indican que el DZ y la MT tampoco tuvieron mayor diferencia comparados con el VEH. Al comparar los tratamientos de análogo se muestra que solamente aquellas dosis que fueron bajas (0.125 y 0.25) de cada uno de ellos con el VEH, tuvieron una diferencia estadística ($p < 0.05$).

7.2. Depresión: Prueba de Nado Forzado.

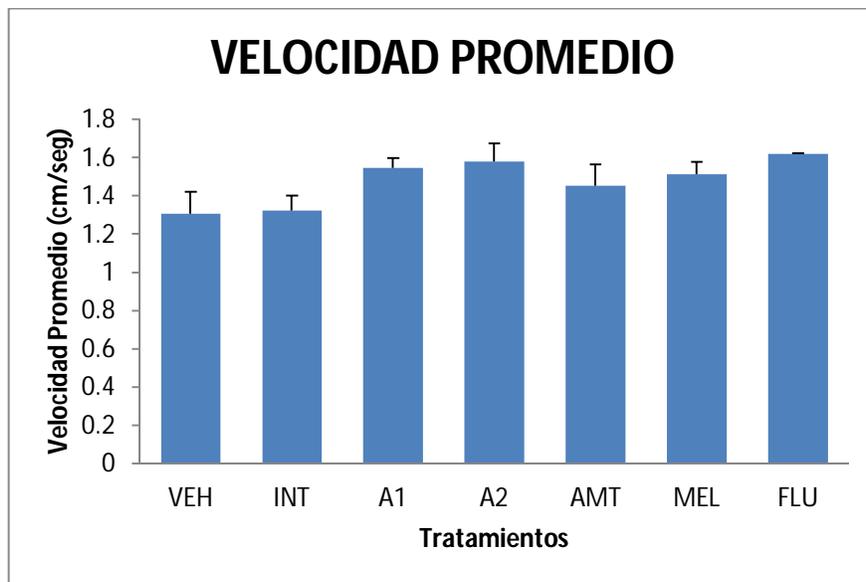
Dentro de los tratamientos con AMT, MT y análogos se observó una disminución de los niveles de depresión comparados contra el VEH, como se muestra en las siguientes gráficas.



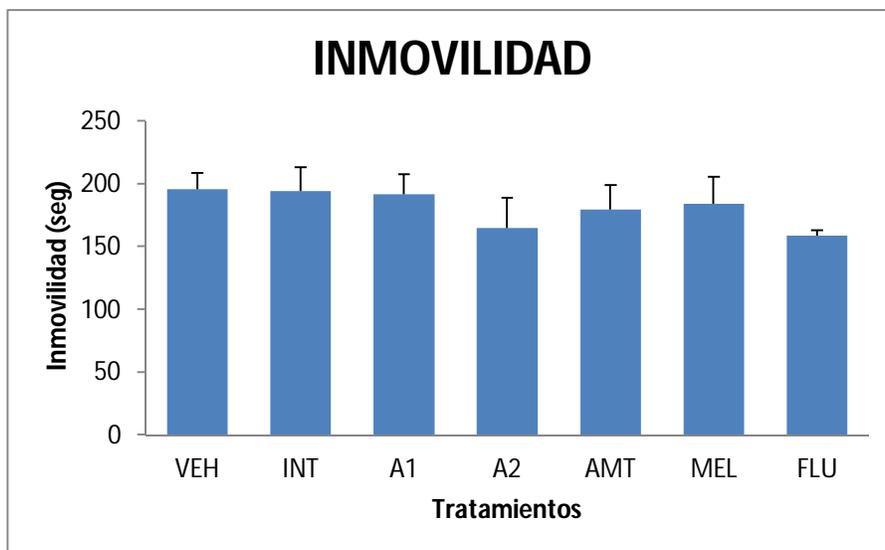
Gráfica 2A. Muestra el tiempo de movimiento del animal dentro del cilindro de exploración. Datos de FLU tomados de Díaz-Hernández 2014 [102](NS).



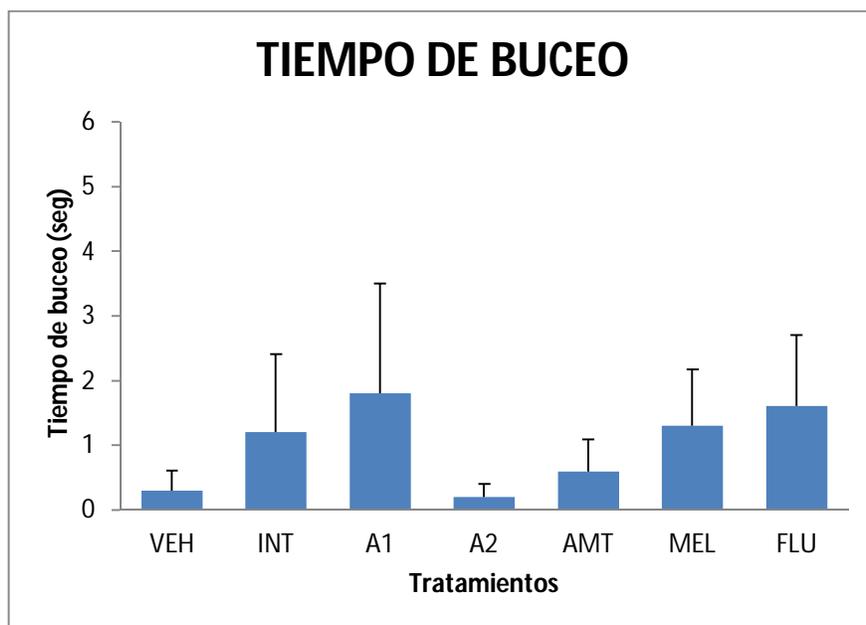
Gráfica 2B. Distancia recorrida. Indica cuanto el animal recorrió nadando dentro del cilindro de exploración. Datos de FLU tomados de Díaz-Hernández 2014 [102](NS).



Gráfica 2C. Velocidad promedio. Indica qué tan rápido el animal se movía dentro del cilindro de exploración. Datos de FLU tomados de Díaz-Hernández 2014 [102](NS).



Gráfica 2D. Tiempo de inmovilidad. Señala qué tiempo el animal estuvo sin movimiento dentro del cilindro de exploración. Datos de FLU tomados de Díaz-Hernández 2014 [102](NS).

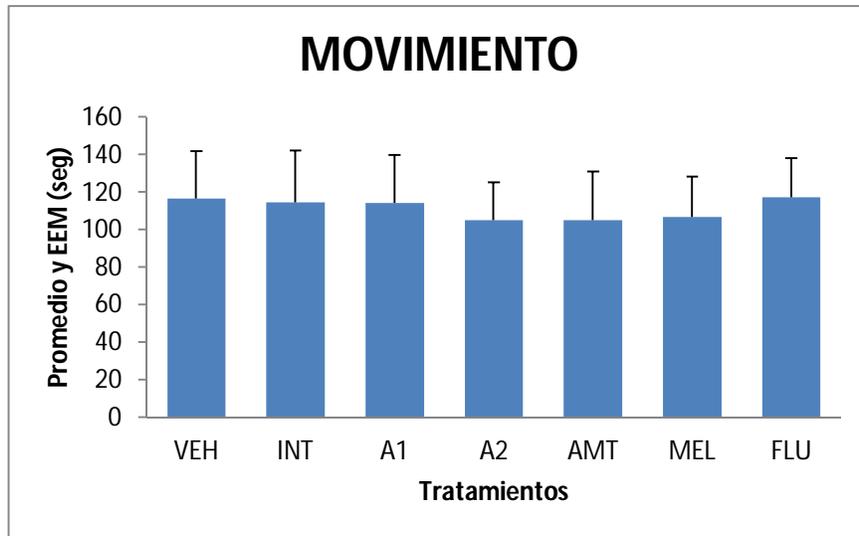


Gráfica 2E. Tiempo de buceo. Indica el tiempo en el que el animal estuvo por debajo del nivel superior del agua. Parámetro proporcionado por el software de evaluación en la prueba. Datos de FLU tomados de Díaz-Hernández 2014 [102](NS).

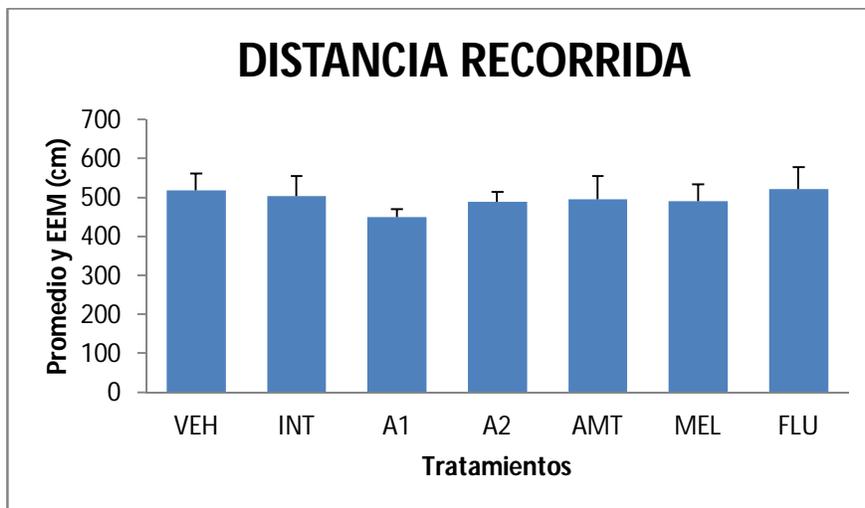
Dentro de la información que brinda el modelo propuesto y el software de captura se determinan los factores que llevan a elucidar el estado depresivo del animal, indicando como parámetro fundamental el tiempo de inmovilidad, el cual se encuentra estrechamente relacionado con el nivel de depresión que presenta la unidad biológica dentro de la prueba. Se entiende que el animal al entrar en un estado depresivo deja de luchar por su supervivencia y deja de nadar (gráfica 2D) o bucear para buscar una salida, generando otro dato que indica el tiempo invertido en la búsqueda dentro del agua (gráfica 2E). Otros parámetros también importantes son la velocidad de movimiento (gráfica 2C) que relacionan la necesidad con respecto al tiempo de encontrar una alternativa de entorno que sea más propicio para la rata, así como la distancia que se recorre dentro y fuera del nivel del agua, señalando la amplitud de exploración dentro el cilindro (gráfica 2B).

7.3. Actividad Motriz: Prueba de campo abierto.

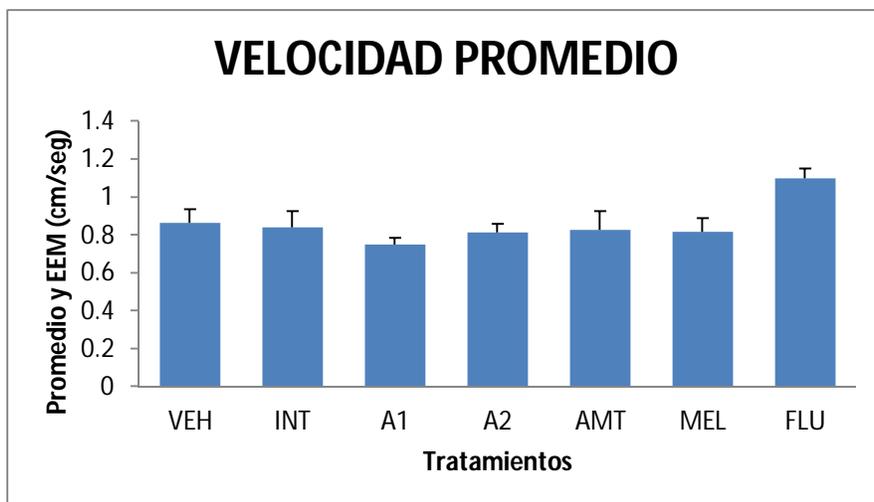
Los datos recopilados en esta prueba son de las mismas unidades biológicas empleadas en la FST, una vez realizada la prueba de depresión a los animales se les administran las sustancias e ingresan a evaluación en el modelo de campo abierto 30 minutos después de la administración. El software de captura es el mismo y se determinan los parámetros que se muestran en las siguientes gráficas, observándose una estrecha similitud entre los tratamientos con MT, AMT y análogos lo cual, determina que las condiciones motrices no son afectadas tras a administración de las sustancias de interés.



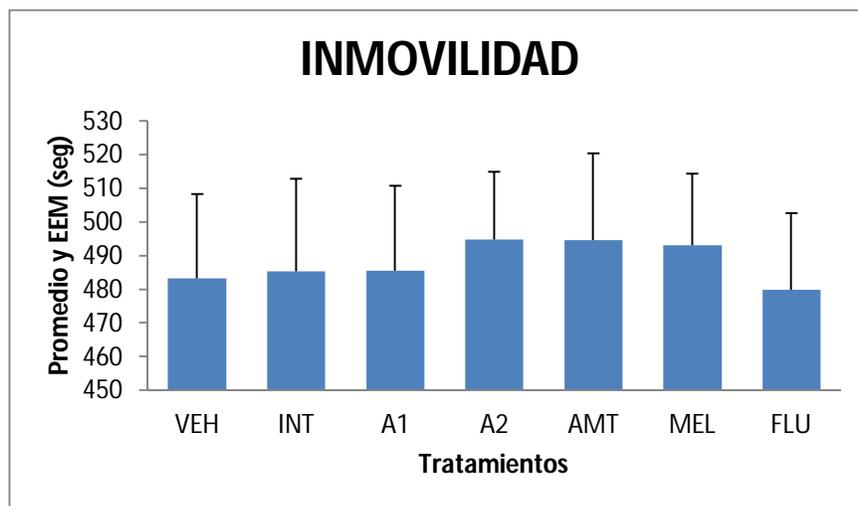
Gráfica 3A. Tiempo de movilidad. Se muestra el tiempo en el que el animal estuvo en constante movimiento, esto ya sea por exploración o debido a movimientos propios del cuerpo como el acicalamiento. Parámetro proporcionado por el software de evaluación en la prueba. Datos de FLU tomados de Díaz-Hernández 2014 [102](NS).



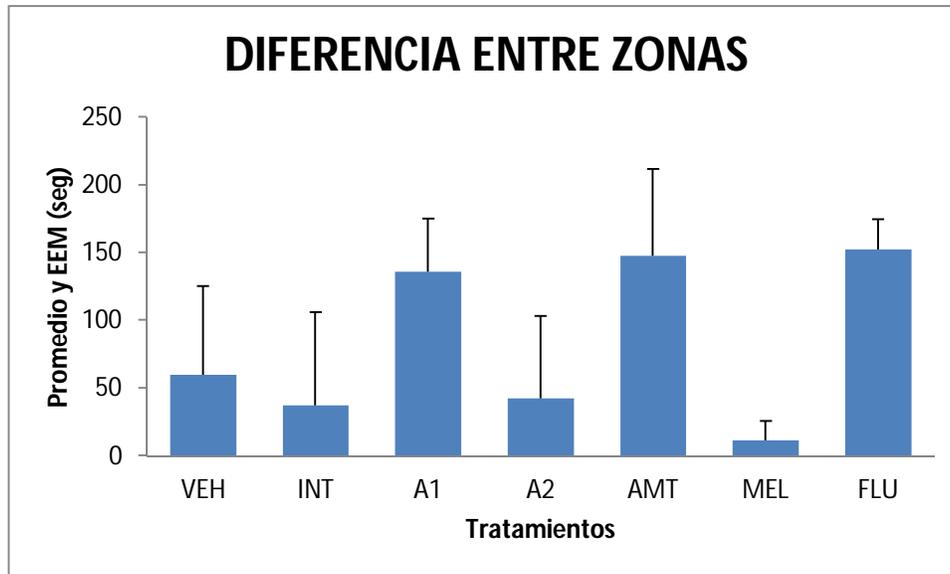
Gráfica 3B. Distancia recorrida. Indica la cantidad de movimiento que se tuvo por parte de la unidad biológica, esto genera información cuantificable de la capacidad exploratoria. Parámetro proporcionado por el software de evaluación en la prueba. Datos de FLU tomados de Díaz-Hernández 2014 [102](NS).



Gráfica 3C. Velocidad promedio. Señala la rapidez con la que la rata se movía dentro del campo exploratorio, esto genera una idea directa de la calidad del movimiento. Parámetro proporcionado por el software de evaluación en la prueba. Datos de FLU tomados de Díaz-Hernández 2014 [102](NS).



Gráfica 3D. Tiempo de inmovilidad. Muestra el promedio de lapsos en los que el animal no presentó movimiento alguno ya sea exploratorio o de acicalamiento ya sea por letargo o incapacidad. Parámetro proporcionado por el software de evaluación en la prueba. Datos de FLU tomados de Díaz-Hernández 2014 [102](NS).



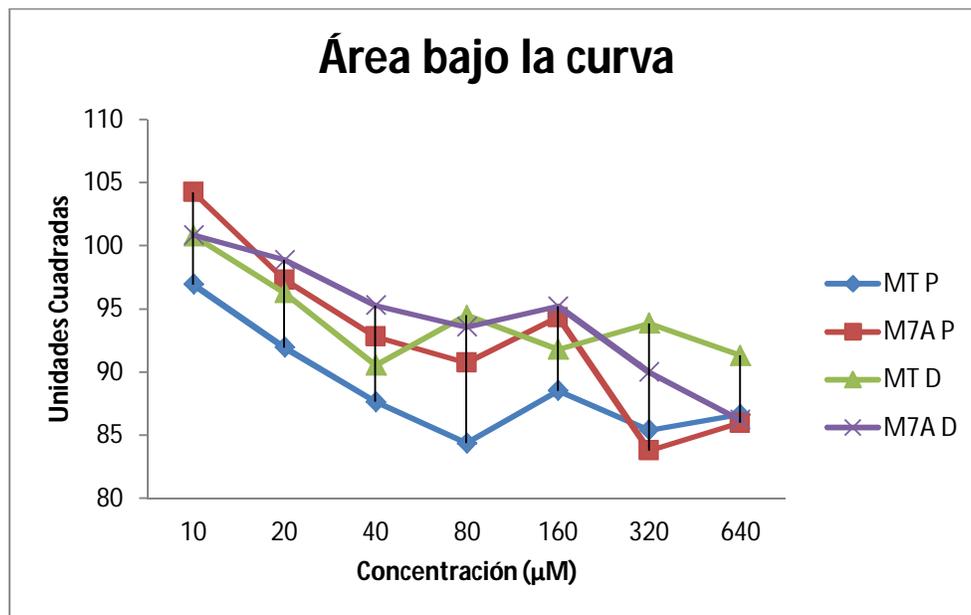
Gráfica 3E. Diferencia de tiempo de permanencia entre zonas. El área delimitada por el modelo comprendía dos zonas, los datos indican que el animal estuvo intercalando entre zonas dependiendo del nivel de exploración. Parámetro proporcionado por el software de evaluación en la prueba. Datos de FLU tomados de Díaz-Hernández 2014 [102](NS).

Los datos de la captura de imágenes generaron los reportes anteriores. En relación al movimiento del animal, nos señala que los tratamientos ya conocidos y anteriormente evaluados en la FST no tienen una diferencia significativa, comparados contra el VEH al indicarse que la rata no ve afectada su capacidad motriz al administrársele alguna de estas sustancias, entre ellas los análogos M6A y M7A (gráficas 3A y 3D). La distancia recorrida indica la cantidad de movimiento que se tuvo dentro de la cámara de exploración, lo cual nos determina qué tanto el animal estuvo en movimiento ya sea por exploración o acicalamiento (gráfica 3B). En relación a la velocidad de los movimientos, se muestra qué tan rápido el animal se mueve, dato importante que señala la calidad de los movimientos ya que la distancia del mismo no nos habla si fueron movimientos lentos o rápidos, cosa que en cuestiones de alerta son indispensables para reaccionar ante cualquier situación. La diferencia de permanencia entre las zonas delimitadas para el

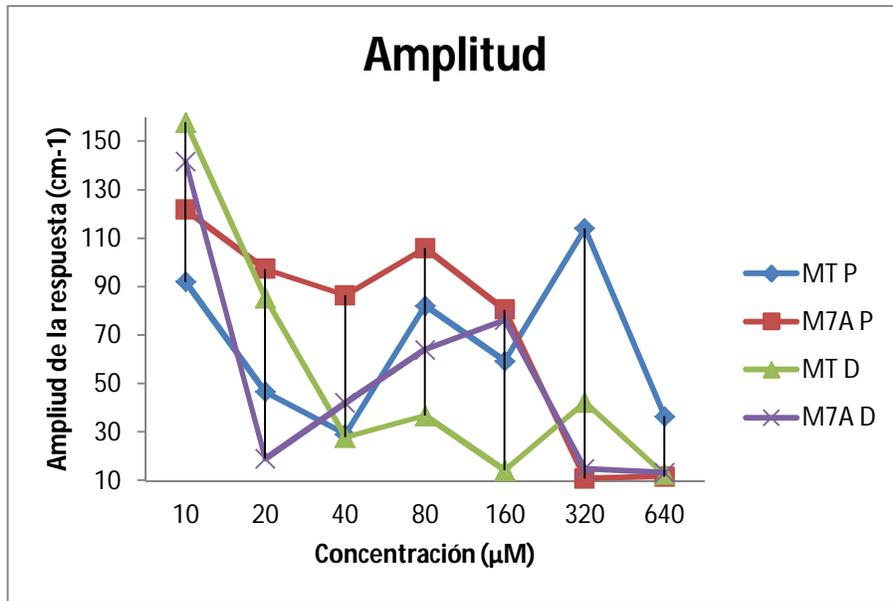
modelo hablan de qué tanto el animal permanecía en una u en otra zona, cosa que directamente indica la calidad de la exploración, entre menor sea esta diferencia significa que el animal cambiaba constantemente de posición y más rápido.

7.4. Efectos *in vitro*.

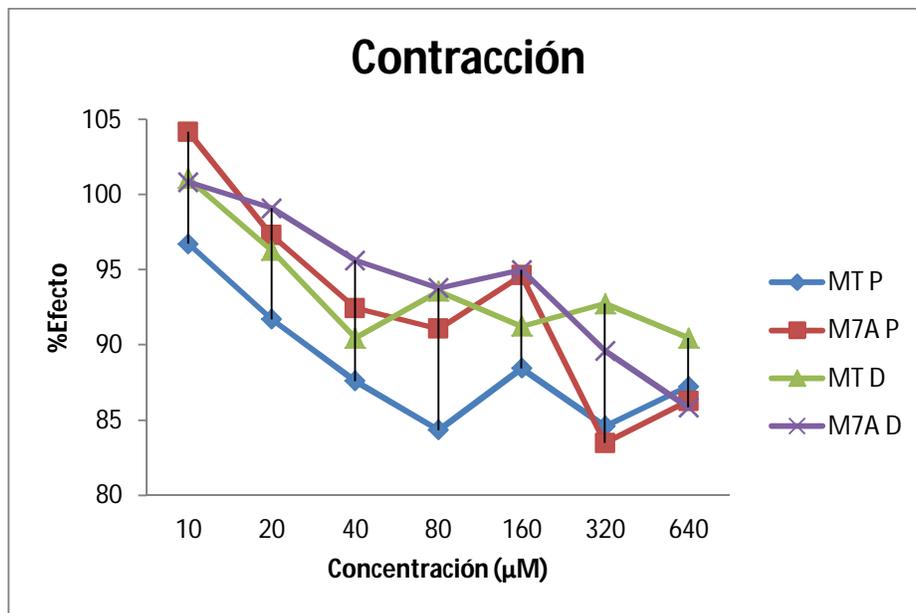
Los resultados obtenidos fueron sobre duodeno de rata en un sistema *in vitro* acoplado a un software de captura de actividad (BIOPAC-AcqKnowledge) que registra los datos en un ordenador. Las respuestas están basadas en los 5 minutos previos a la administración y 5 minutos posteriores a esta. Se muestran en las gráficas siguientes.



Gráfica 4A. Área bajo la curva de la respuesta del tejido. Se muestran las diferentes porciones de duodeno y su tratamiento. P: Proximal, D: Distal. Parámetro proporcionado por el software de evaluación en la prueba.



Gráfica 4B. Amplitud de la respuesta. Al generar el registro, la amplitud se encuentra en función del tiempo, ello determina la duración de la respuesta. P: Proximal, D: Distal. Parámetro proporcionado por el software de evaluación en la prueba.



Gráfica 4C. Tensión del tejido. La contracción se muestra en base a la tensión que se ejerce sobre el transductor tras la actividad del duodeno. P: Proximal, D: Distal. Parámetro proporcionado por el software de evaluación en la prueba.

7.5. Prueba de toxicidad.

Mediante el protocolo establecido por la OECD [101], se hicieron las adecuaciones para emplear menor cantidad de sustancia y generar una curva mediante 4 datos. El análogo estudiado fue el M7A. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Prueba de toxicidad del M7A i.g.

	Dosis			
Tratamiento	mg/kg	Población	Letalidad	Observaciones
INT	N/A	n=1	0	Normal
M7A	0.1	n=3	0	Normal
M7A	1	n=3	0	Normal
M7A	10	n=3	0	Normal
M7A	100	n=3	0	Adormecimiento temporal (4 horas)

No se encontraron evidencias suficientes para determinar que el análogo M7A fuese tóxico. Dado a la naturaleza de la estructura del análogo, muestra los signos típicos que ocasiona la MT por lo que no se considera un efecto adverso o no deseado.

8. DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo fue el de evaluar los efectos que se tienen de dos moléculas análogas de MT en los diferentes modelos experimentales propuestos y con ello determinar si son aptas para proveer un efecto similar a la MT y otras sustancias que hayan sido comprobadas dentro de los efectos buscados. Directamente se analizaron los efectos ansiolítico, antidepresivo, el efecto sobre la actividad locomotriz y sobre el tejido aislado, así como sus posibles efectos tóxicos sobre unidades biológicas.

La ansiedad y la depresión son enfermedades que actualmente están siendo manifestadas por una gran parte de la población y sus tratamientos son frecuentemente acompañados de efectos no deseados por lo cual se ha buscado una alternativa para ayudar a mejorar la calidad de vida de quienes las padecen, dado que repercute directamente en el rendimiento y formas de socialización [1].

De acuerdo a los resultados obtenidos por la MBT, podemos ver que el número de esferas que el ratón entierra, disminuye considerablemente al tratarlos con estos análogos estructurales, el modelo es utilizado al proveer información cuantificable acerca de los niveles de ansiedad del animal como lo proponen Pinel y Treit en 1978 [97]. Inicialmente se ensayaron dosis equivalentes de los análogos y MT (0.5, 1.0 y 2.0 mg/kg), suponiendo que a las mismas dosis los efectos serían similares, observándose que los análogos tenían un mejor efecto a dosis menores a las de la MT y muy similares a las de DZ (0.25 y 0.5 mg/kg). En base a esto se decidió probar con dosis menores con la idea de que el efecto ansiolítico mejorara con ello y fue así. En dos ocasiones fue utilizada una dosis al 50% de la inicial, primero la de 0.25 mg/kg, generando un efecto ansiolítico mejor que el observado a la dosis de 0.5 mg/kg, por lo que utilizamos incluso una disminución más en 0.125 mg/kg, generando un efecto en ocasiones mejor que el de las dosis mayores. Esto nos puede decir algo acerca de la disponibilidad de los receptores, sus subtipos [37], y su saturación ya que sabemos que las moléculas que probamos en este trabajo tienen un mayor tamaño en comparación con la MT y que este factor puede interferir si las concentraciones de estas son mayores

alrededor del receptor cualesquiera que fuese la vía de acción: membranal [38] o citosólica [39], interfiriendo esto en la disponibilidad de acoplar un mayor número de moléculas y tener un efecto distinto.

Los efectos ansiolíticos de estos análogos resultaron significativamente mejores en comparación de la MT e incluso comparados directamente con los del DZ, una benzodiazepina prototipo para el tratamiento del TAG y que fue utilizada como control positivo ya que se conoce, es un agonista del canal de GABA [6] produciendo un efecto ansiolítico ampliamente demostrado [56]. Estos resultados sorprenden bastante al tratarse de sustancias que se desconocía si tuviesen algún efecto o incluso si fuesen tóxicas a pesar de que anteriormente ya habían sido estudiados otros análogos de MT sintetizados por Lira y cols [94] en otros modelos experimentales. Uno de los inconvenientes del modelo de MBT es que sólo una persona debe ser quien observe y cuantifique si las esferas se encuentran enterradas a más del 75% de su tamaño ya que eso depende mucho de la perspectiva, ángulo e incluso, subjetividad del criterio en comparación con los otros modelos en los cuales un software genera el reporte con los valores precisos de los parámetros de interés.

En lo que respecta al tratamiento de la depresión es bien conocido que al mejorar las condiciones de sueño del individuo se mejoran esta al igual que otras afecciones, disminuye [30], debido a esto se ha determinado que las concentraciones endógenas de MT tienen un importante papel dentro de la calidad del sueño y con ello en el comportamiento de cada individuo como en la depresión. De acuerdo a los resultados obtenidos, se muestra que los análogos M6A y M7A también, proporcionan una disminución del nivel de depresión en los animales de experimentación, esto se demuestra mediante los parámetros obtenidos en el modelo inicialmente propuesto por Porsolt en 1978 [99]. En el momento en el que el animal entra en un estado depresivo deja de luchar por su vida y permanece inmóvil, un dato importante al momento de dictaminar el grado de depresión de cada uno de las ratas. Además de estos parámetros existe la calidad y cantidad del movimiento efectuado y que, tiene un significado diferente

cuando el animal realiza un movimiento rápido o un movimiento lento; estos datos se observan en la distancia que recorre el animal nadando y la velocidad con la que lo hace, este aspecto desafortunadamente no es cuantificable, en la MBT ya que se desconoce qué tan rápido el ratón entierra la esfera.

Una cuestión limitante de esta prueba fue que se utilizaron las dosis que en la MBT proporcionaron un mejor efecto ansiolítico (0.125 mg/kg) comparadas contra un control positivo como la AMT a una dosis de 9 mg/kg y MT a 1.0 mg/kg, aun así se observaron valores en los parámetros muy similares entre los tratamientos y claramente se aprecia una disminución del grado de depresión en los animales empleados a pesar de haberse administrado dosis mucho menores comparadas con las demás sustancias. No se observaron modificaciones en la actividad locomotriz de los animales, lo cual nos indica que el tratamiento con estas sustancias no afecta dicha actividad a las dosis evaluadas. Otros parámetros como el tiempo de movimiento señalan que los animales tratados con M6A y M7A no se ven afectados en cuestión de actividad física, al igual que la distancia que recorren dentro el campo abierto no hay diferencia estadística en comparación del VEH, tanto como con la velocidad ya que bien se sabe que este factor muestra la calidad del movimiento que se tiene dado que no es igual moverse lento o rápido debido a una situación de alerta, lucha-huida o incluso de vigilia ya que el principal problema que se muestra con los tratamientos clásicos es precisamente la afección en el estado de atención y alerta [16]. Aunado a esto, dado que el modelo fue separado en dos áreas pudo determinarse la cantidad de tiempo en el cual el animal estuvo en una u otra zona, la diferencia mínima entre ellas nos indica que el animal cambió constantemente de posición y que su actividad locomotriz no se vio afectada por ninguno de los tratamientos, incluso en la administración de DZ bajo las mismas condiciones.

En el experimento *in vitro* las respuestas obtenidas con MT y el análogo M7A este presentó una relajación muscular importante a concentraciones menores a 160 μ M, muy similares a los que presentó la MT, ambos evaluados a las mismas condiciones, concentraciones y tiempos. Este efecto se produce por la interacción

directa con los receptores de superficie e incluso su saturación, efecto observado posiblemente en la MBT dado que a concentraciones mayores a los 160 μM no hubo cambios significativos en la actividad del tejido (relajación), efecto contrario a que muestra la MT en todas sus concentraciones como es de esperarse, de acuerdo a los trabajos previos de Bubenik y cols en 2008 [70] donde se muestra un efecto relajante continuo al incrementar la concentración de MT en el medio. En lo que respecta a la respuesta del M7A a concentraciones de 320 y 640 μM , no hay cambios mayores e incluso, se observan respuestas contráctiles, una idea que podría cobrar sentido al analizar el tipo de saturación que se tiene con esta molécula sabiendo que su tamaño es mayor al de la MT y proponer la hipótesis de que se trate de una saturación del receptor, ya sea membranal [38] o citosólico [39]. En este caso se trata de una unión a nivel membranal ya que el efecto desaparece con cada lavado del tejido. Los resultados obtenidos con este modelo *in vitro* nos llevan a demostrar que el análogo evaluado en este modelo, el M7A, tiene un efecto similar al de la MT a concentraciones menores a la concentración de 160 μM y que en esa ventana ejerce un efecto muy marcado de relajación sobre el duodeno aislado de rata. En este modelo no se empleó algún sedante previo al sacrificio del animal, lo que nos indica que el efecto es producido por la acción de las sustancias administradas al tejido.

Las pruebas de toxicidad aguda indicaron que las moléculas sintetizadas por Lira-Rocha y cols [94] tienen una ventana amplia de seguridad y que por debajo de los 100 mg/kg no hay riesgo evidente de tratamiento, esto nos lleva a sugerir también que el metabolismo hepático tiene un papel fundamental dentro del metabolismo y degradación de estas sustancias. Puede sugerirse que al tratarse de moléculas análogas a la MT no tendrían mayor problema por cuestiones de seguridad, pero los grupos funcionales así como proveen mejorías en las actividades deseadas, también pueden ocasionar efectos adversos o tóxicos en el organismo, lo cual no es posible de determinar si el animal pasa por un proceso que no es notorio dentro de las primeras 72 horas. En el caso del M7A, se sabe que tiene un grupo funcional clorado, a diferencia del M6A que contiene un grupo ciano que, por falta de disponibilidad no fue posible someterlo a una evaluación de toxicidad aguda el

cual se esperaba tuviese alguna repercusión por dicho grupo funcional que se sabe, origina ciertos estragos a las funciones biológicas.

9. CONCLUSIONES

In vivo:

- 1) Mediante el modelo MBT se determinó que los análogos M6A y M7A son equieficaces ansiolíticos.
- 2) La evaluación antidepresiva se llevó a cabo con la FST y los análogos producen un efecto antidepresivo similar al de la MT y la AMT.
- 3) Con el modelo de OFT los análogos no producen efecto sobre la actividad locomotriz.
- 4) El análogo M7A no produjo efecto tóxico incluso hasta 100 mg/kg.

In vitro:

- 5) El análogo M7A produce un efecto bifásico.
- 6) El M7A produce un efecto de relajación en músculo liso duodenal proximal y distal, a concentraciones de 10 a 160 μM .
- 7) El M7A produce un efecto de contracción en músculo liso duodenal proximal y distal, a concentraciones de 320 y 640 μM .
- 8) La MT y la AMT producen disminución de la actividad eléctrica en ambos sistemas.

10.PERSPECTIVAS

- Evaluar ambos análogos a dosis equivalentes a MT en un modelo de depresión dado que las dosis de estos fueron bajas.
- Realizar un perfil metabólico en el organismo, dado que los efectos observados mediante administraciones i.g no presentan mayor problema en cuestiones de dosis y toxicidad.
- Realizar *in vitro* la evaluación del análogo M6A en un modelo de tejido aislado al igual que con el M7A.
- Determinar la toxicidad del análogo M6A, de suma importancia ya que contiene un grupo CN⁺ en su estructura y posee potencial ansiolítico, deseable de estudio.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. American Psychiatric, A. and D.-I. Task Force on, Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-IV-TR. 2000, Washington, DC: American Psychiatric Association.
2. Vindel, A.C., Cognición, emoción y personalidad: un estudio centrado en la ansiedad. 1989: Universidad Complutense, Departamento de Psicología Básica II (Procesos Cognitivos).
3. Kessler, R.C. and P.S. Wang, The descriptive epidemiology of commonly occurring mental disorders in the United States. *Annu Rev Public Health*, 2008. 29: p. 115-29.
4. Bandelow, B., et al., The diagnosis and treatment of generalized anxiety disorder. *Dtsch Arztebl Int*, 2013. 110(17): p. 300-9; quiz 310.
5. Bruce, S.E., et al., Influence of psychiatric comorbidity on recovery and recurrence in generalized anxiety disorder, social phobia, and panic disorder: a 12-year prospective study. *Am J Psychiatry*, 2005. 162(6): p. 1179-87.
6. Rickels, K., et al., Antidepressants for the treatment of generalized anxiety disorder: A placebo-controlled comparison of imipramine, trazodone, and diazepam. *Arch Gen Psychiatr*, 1993. 50(11): p. 884-895.
7. Korpi, E.R. and S.T. Sinkkonen, GABA(A) receptor subtypes as targets for neuropsychiatric drug development. *Pharmacol Ther*, 2006. 109(1-2): p. 12-32.
8. Casarrubea, M., et al., The effects of diazepam on the behavioral structure of the rat's response to pain in the hot-plate test: Anxiolysis vs. pain modulation. *Neuropharmacol*, 2012. 63(2): p. 310-321.
9. Khosla, P. and P. Pandhi, Anticonvulsant effect of nimodipine alone and in combination with diazepam on PTZ induced status epilepticus. *Indian J. Pharmacol*, 2001. 33(3): p. 208-211.
10. Olkkola, K.T. and J. Ahonen, Midazolam and Other Benzodiazepines, in *Modern Anesthetics*, J. Schüttler and H. Schwilden, Editors. 2008, Springer Berlin Heidelberg. p. 335-360.
11. Micó, J.-A. and R. Prieto, Elucidating the Mechanism of Action of Pregabalin. *CNS Drugs*, 2012. 26(8): p. 637-648.
12. Salud, S.d., Suicidios en México, una realidad social. Impre, 2011.
13. Kessler, R.C., et al., The epidemiology of major depressive disorder: Results from the national comorbidity survey replication (ncs-r). *JAMA*, 2003. 289(23): p. 3095-3105.
14. Chancellor, D., The depression market. *Nat Rev Drug Discov*, 2011. 10(11): p. 809-10.
15. de Kloet, E.R., M. Joels, and F. Holsboer, Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*, 2005. 6(6): p. 463-75.

16. Lanfumey, L., R. Mongeau, and M. Hamon, Biological rhythms and melatonin in mood disorders and their treatments. *Pharmacol Ther*, 2013. 138(2): p. 176-84.
17. Hickie, I.B. and N.L. Rogers, Novel melatonin-based therapies: potential advances in the treatment of major depression. *Lancet*, 2011. 378(9791): p. 621-631.
18. Macchi, M.M. and J.N. Bruce, Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol*, 2004. 25(3-4): p. 177-95.
19. Brzezinski, A., Melatonin in Humans. *New Engl J. of Med*, 1997. 336(3): p. 186-195.
20. Lerner, A., Isolation of Melatonin and 5-Methoxyindole-3-acetic acid from Bovine Pineal Glands. *J. Biol. Chem.*, 1960. 235.
21. Brainard, G.C., et al., Action Spectrum for Melatonin Regulation in Humans: Evidence for a Novel Circadian Photoreceptor. *J. Neurosci*, 2001. 21(16): p. 6405-6412.
22. REITER, R.J., Pineal Melatonin: Cell Biology of Its Synthesis and of Its Physiological Interactions. *Endocr. Rev.*, 1991. 12(2): p. 151-180.
23. Lewy, A., et al., Light suppresses melatonin secretion in humans. *Sci.*, 1980. 210(4475): p. 1267-1269.
24. Klein, D.C., Arylalkylamine N-Acetyltransferase: "the Timezyme". *J. Biol. Chem.*, 2007. 282(7): p. 4233-4237.
25. Voisin, P., Arylamine N-acetyltransferase and arylalkylamine N-acetyltransferase in the mammalian pineal gland. *J. Biol. Chem.*, 1984. 259: p. 10913-10918.
26. Axelrod, J., Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Sci.*, 1960. 131: p. 1312.
27. Benloucif, S., et al., Measuring Melatonin in Humans. *J. Clin. Sleep Med.*, 2008. 4(1): p. 66-69.
28. Domínguez-Rodríguez, A., et al., Melatonina y aterosclerosis coronaria. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 2015. 27(04): p. 247-256.
29. Skene, D.J. and J. Arendt, Human circadian rhythms: physiological and therapeutic relevance of light and melatonin. *Ann. Clin. Biochem.*, 2006. 43(5): p. 344-353.
30. Reiter, R.J., The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*, 1993. 49(8): p. 654-664.
31. Coomans, C.P., A. Ramkisoensing, and J.H. Meijer, The suprachiasmatic nuclei as a seasonal clock. *Front Neuroendocrinol*, 2015. 37: p. 29-42.
32. Pail, G., et al., Bright-light therapy in the treatment of mood disorders. *Neuropsychobiol*, 2011. 64(3): p. 152-62.
33. Stevenson, T.J. and B.J. Prendergast, Photoperiodic time measurement and seasonal immunological plasticity. *Front Neuroendocrinol*, 2015. 37: p. 76-88.
34. Bustos Obregón, E. and L. Torres -Díaz, Reproducción Estacional en el Macho. *Intl J. of Morphol*, 2012. 30: p. 1266-1279.
35. Karamitri, A., et al., Minireview: Toward the Establishment of a Link between Melatonin and Glucose Homeostasis: Association of Melatonin MT2

- Receptor Variants with Type 2 Diabetes. *Mol. Endocr.*, 2013. 27(8): p. 1217-1233.
36. Peschke, E., Melatonin, endocrine pancreas and diabetes. *J. Pineal Res.*, 2008. 44(1): p. 26-40.
 37. Dubocovich, M.L., Melatonin receptors: are there multiple subtypes? . *Viewpoint*, 1995. 16: p. 50-56.
 38. Reppert, S.M. and D.R. Weaver, Melatonin madness. *Cell*, 1995. 83(7): p. 1059-1062.
 39. Hardeland, R., et al., Melatonin—A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog. Neurobiol.*, 2011. 93(3): p. 350-384.
 40. Masana, M.I. and M.L. Dubocovich, Melatonin Receptor Signaling: Finding the Path Through the Dark. *Sci Signal*, 2001. 2001(107): p. pe39-pe39.
 41. Arendt, J. and D.J. Skene, Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med Rev*, 2005. 9(1): p. 25-39.
 42. Josephine, A., et al., Clinical update: melatonin and sleep disorders. *Clin. Med.*, 2008. 8(4): p. 381-383.
 43. Kandil, T.S., et al., The potential therapeutic effect of melatonin in Gastro-Esophageal Reflux Disease. *BMC Gastroenterol*, 2010. 10: p. 7.
 44. Sanchez, A., A.C. Calpena, and B. Clares, Evaluating the Oxidative Stress in Inflammation: Role of Melatonin. *Int J Mol Sci*, 2015. 16(8): p. 16981-7004.
 45. Reiter, R. and D. Tan, Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. *Card. Res.*, 2003. 58(1): p. 10-19.
 46. Muñoz-Hoyos, A., et al., Melatonin's Role as an Anticonvulsant and Neuronal Protector: Experimental and Clinical Evidence. *J. Child Neurol.*, 1998. 13(10): p. 501-509.
 47. Molina-Carballo, A., et al., Melatonin Increases Following Convulsive Seizures may be Related to its Anticonvulsant Properties at Physiological Concentrations. *Neuropediatrics*, 2007. 38(03): p. 122-125.
 48. Anisimov, V.N., et al., Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochem Biophys Acta*, 2006. 1757(5-6): p. 573-89.
 49. Shavali, S., et al., Melatonin exerts its analgesic actions not by binding to opioid receptor subtypes but by increasing the release of beta-endorphin an endogenous opioid. *Brain Res Bull*, 2005. 64(6): p. 471-9.
 50. Andersen, L.P., et al., Pharmacokinetics of high-dose intravenous melatonin in humans. *J Clin Pharmacol*, 2015.
 51. van den Heuvel, C.J., et al., Melatonin as a hypnotic: con. *Sleep Med Rev*, 2005. 9(1): p. 71-80.
 52. Zhdanova, I.V., Melatonin as a hypnotic: pro. *Sleep Med Rev*, 2005. 9(1): p. 51-65.
 53. Wang, F., et al., The GABAA receptor mediates the hypnotic activity of melatonin in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav*, 2003. 74(3): p. 573-578.
 54. Naguib, M., V. Gottumukkala, and P.A. Goldstein, Melatonin and anesthesia: a clinical perspective. *J. Pineal Res*, 2007. 42(1): p. 12-21.
 55. Caumo, W., R. Levandovski, and M.P. Hidalgo, Preoperative anxiolytic effect of melatonin and clonidine on postoperative pain and morphine

- consumption in patients undergoing abdominal hysterectomy: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *J Pain*, 2009. 10(1): p. 100-8.
56. Naranjo-Rodriguez, E.B., et al., Anxiolytic-like actions of melatonin, 5-methoxytryptophol, 5-hydroxytryptophol and benzodiazepines on a conflict procedure. *Prog Neuro-Psychopharmacol and Biol Psychiatr*, 2000. 24(1): p. 117-129.
 57. Kripke, D.F., et al., Photoperiodic and circadian bifurcation theories of depression and mania. *F1000Res*, 2015. 4: p. 107.
 58. A. Quera Salva, M., et al., Circadian Rhythms, Melatonin and Depression. *Curr. Pharm. Design.*, 2011. 17(15): p. 1459-1470.
 59. Young, S., Effect of oral melatonin administration on melatonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, indoleacetic acid, and cyclic nucleotides in human cerebrospinal fluid. *Neuroendocrinology*, 1984. 39(1): p. 87-92.
 60. Tan, D.-x., et al., High physiological levels of melatonin in the bile of mammals. *Life Sci*, 1999. 65(23): p. 2523-2529.
 61. BRZEZINSKI, A., et al., Melatonin in Human Preovulatory Follicular Fluid. *J. Clin Endocrinol & Metabol*, 1987. 64(4): p. 865-867.
 62. Mitchell, M., Melatonin in amniotic fluid during human parturition. *Br J Obstet Gynaecol*, 1978. 85(9): p. 684-686.
 63. Laakso, M., Correlation between salivary and serum melatonin: dependence on serum melatonin levels. *J Pineal Res*, 1990. 9(1): p. 39-50.
 64. Maestroni, G.J.M., et al., Melatonin in Rheumatoid Arthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2002. 966(1): p. 271-275.
 65. Illnerová, H., M. Buresová, and J. Presl, Melatonin rhythm in human milk. *J. Clin Endocrinol & Metabol*, 1993. 77(3): p. 838-841.
 66. Abe, M., et al., Circadian Rhythm of Serotonin N -acetyltransferase Activity in Rat Lens. *Exp Eye Res*, 2000. 70(6): p. 805-808.
 67. Raikhlín, N.T. and I.M. Kvetnoy, Melatonin and enterochromaffine cells. *Acta Histochem*, 1976. 55(1): p. 19-24.
 68. Bubenik, G., Pinealectomy reduces melatonin levels in the serum but not in the gastrointestinal tract of rats. *Biol Signals*, 1997. 6: p. 40-44.
 69. M. J. Pozo, P.J.G.-P., C. Camello-Almaraz, F. E. Martin-Cano, P. Pascua,, Melatonin, a Potential Therapeutic Agent for Smooth Muscle-Related Pathological Conditions and Aging. *Curr Med Chem*, 2010. 17(34): p. 4150-4165.
 70. Bubenik, G., Thirty four years since the discovery of gastrointestinal melatonin. *J Physiol Pharmacol*, 2008. 59: p. 33-51.
 71. Sjöblom, M. and G. Flemström, Melatonin in the duodenal lumen is a potent stimulant of mucosal bicarbonate secretion. *J. Pineal Res*, 2003. 34(4): p. 288-293.
 72. Sommansson, A., O. Nylander, and M. Sjöblom, Melatonin decreases duodenal epithelial paracellular permeability via a nicotinic receptor-dependent pathway in rats in vivo. *J. Pineal Res*, 2013. 54(3): p. 282-291.
 73. Luis, M.d.C.S., Interacción de Melatonina y "M5C" con receptores MT2 y GABA-B en un sistema "in vitro". 2014.
 74. Watanabe, M., et al., GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int Rev Cytol*, 2002. 213: p. 1-47.

75. Barbaccia, M.L., et al., DBI (diazepam binding inhibitor): the precursor of a family of endogenous modulators of GABAA receptor function. History, perspectives, and clinical implications. *Neurochem Res*, 1990. 15(2): p. 161-8.
76. Turek, F.W. and M.U. Gillette, Melatonin, sleep, and circadian rhythms: rationale for development of specific melatonin agonists. *Sleep Med*. 5(6): p. 523-532.
77. Zawilska, J.B., D.J. Skene, and J. Arendt, Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacol*, 2009. 61(3): p. 383-410.
78. Dubocovich, M.L., Pharmacology and function of melatonin receptors. *FASEB J*, 1988. 2(12): p. 2765-73.
79. Mailliet, F., et al., Molecular pharmacology of the ovine melatonin receptor: comparison with recombinant human MT1 and MT2 receptors. *Biochem Pharmacol*, 2004. 67(4): p. 667-677.
80. El-Sherif, Y., et al., The actions of a charged melatonin receptor ligand, TMEPI, and an irreversible MT2 receptor agonist, BMNEP, on mouse hippocampal evoked potentials in vitro. *Life Sci*, 2004. 75(26): p. 3147-56.
81. Jahnke, G., et al., Maternal and developmental toxicity evaluation of melatonin administered orally to pregnant Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci*, 1999. 50(2): p. 271-279.
82. Seabra, M.d.L.V., et al., Randomized, double-blind clinical trial, controlled with placebo, of the toxicology of chronic melatonin treatment. *J. Pineal Res*, 2000. 29(4): p. 193-200.
83. Airaksinen, M.M., et al., 6-methoxy-tetrahydro-beta-carboline (pinoline): effects on plasma renin activity and aldosterone, TSH, LH and beta-endorphin levels in rats. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1984. 107(4): p. 525-30.
84. De la Fuente Revenga, M., et al., Neurogenic Potential Assessment and Pharmacological Characterization of 6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline (Pinoline) and Melatonin-Pinoline Hybrids. *ACS Chem Neurosci*, 2015. 6(5): p. 800-10.
85. Puskullu, M.O., et al., Synthesis and evaluation of antioxidant activity of new quinoline-2-carbaldehyde hydrazone derivatives: bioisosteric melatonin analogues. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2015: p. 1-5.
86. Mathé-Allainmat, M., J. Andrieux, and M. Langlois, Recent developments in melatonin receptor ligands. *Ther*, 1997. 7(12): p. 1447-1458.
87. Suzen, S., et al., Investigation of the in vitro antioxidant behaviour of some 2-phenylindole derivatives: discussion on possible antioxidant mechanisms and comparison with melatonin. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2006. 21(4): p. 405-11.
88. Süzen, S., et al., Synthesis and analytical evaluation by voltammetric studies of some new indole-3-propionamide derivatives. *Il Farm*, 2001. 56(11): p. 835-840.
89. Gurkok, G., T. Coban, and S. Suzen, Melatonin analogue new indole hydrazide/hydrazone derivatives with antioxidant behavior: synthesis and structure-activity relationships. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2009. 24(2): p. 506-15.

90. Suzen, S., et al., Antioxidant activity of indole-based melatonin analogues in erythrocytes and their voltammetric characterization. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2013. 28(6): p. 1143-55.
91. Yilmaz, A.D., T. Coban, and S. Suzen, Synthesis and antioxidant activity evaluations of melatonin-based analogue indole-hydrazide/hydrazone derivatives. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2012. 27(3): p. 428-36.
92. Crooke, A., B. Colligris, and J. Pintor, Update in glaucoma medicinal chemistry: emerging evidence for the importance of melatonin analogues. *Curr Med Chem*, 2012. 19(21): p. 3508-22.
93. Willis, G.L., The role of ML-23 and other melatonin analogues in the treatment and management of Parkinson's disease. *Drug News Perspect*, 2005. 18(7): p. 437-44.
94. Lira-Rocha, A.e.a., Receptor-binding studies of 1-N-substituted melatonin analogues. *European J. of Med Chem*, 2002. 37(12): p. 945-951.
95. Mor, M., et al., Melatonin receptor ligands: synthesis of new melatonin derivatives and comprehensive comparative molecular field analysis (CoMFA) study. *J Med Chem*, 1998. 41(20): p. 3831-44.
96. Kopp, C., et al., Anxiolytic-like properties of melatonin receptor agonists in mice: involvement of mt1 and/or MT2 receptors in the regulation of emotional responsiveness. *Neuropharmacol*, 2000. 39(10): p. 1865-1871.
97. Pinel, J.P. and D. Treit, Burying as a defensive response in rats. *J. Comp Physiol Psychol*, 1978. 92(4): p. 708-712.
98. Poling, A., J. Cleary, and M. Monaghan, Burying by rats in response to aversive and nonaversive stimuli. *J. Exp Analysis Behav*, 1981. 35(1): p. 31-44.
99. Porsolt, R.D., et al., Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J. Pharmacol*, 1978. 47(4): p. 379-391.
100. Hall, C. and E.L. Ballachey, A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology. *Univ Calif Pub Psychol*, 1932. 6: p. 1-12.
101. OECD, Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method. 2001: OECD Publishing.
102. Hernandez, E.A.D., Efecto antidepressivo y Mecanismo de acción de la Melatonina y sus Análogos M2B y M5C en la prueba de Nado Forzado. Tesis Facultad de Quimica, 2014: p. 23.