



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---



**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“Cuantificación del efecto sedante de Melatonina en roedores”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**LILIANA QUINTANA LESCAZ**



*Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2016.*



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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:** OSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ

**SECRETARIO:**    **PROFESOR:** KENNETH RUBIO CARRASCO

**1er. SUPLENTE:** **PROFESOR:** IGNACIO GONZÁLEZ SÁNCHEZ

**2° SUPLENTE:**    **PROFESOR:** ITZEL SUSANA DE LA ROSA LARA

SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio de Neurofarmacología Edificio "A". Laboratorio 1/E. Departamento de Farmacia. Facultad de Química, UNAM.

**ASESOR:** DRA. ELIA BROSLA NARANJO RODRÍGUEZ \_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE:** LILIANA QUINTANA LESCAZ \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

**PAIP** (Programa de apoyo a Investigación y Posgrado). Clave: 5000-9164.

**Productos Médix**, S.A de C.V. Número de registro: DGAI-SPI-020413-64

Clave de Facultad de Química: FQ-10-031.

## Índice

Índice de abreviaturas	iii
Índice de figuras	V
Índice de gráficas	VI
Índice de tablas	VII
Resumen	VIII
<b>I. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1. Sedación</b>	<b>1</b>
1.1 Sedante ideal	3
<b>2. Farmacocinética del Midazolam</b>	<b>5</b>
<b>3. Mecanismo de acción de las Benzodiazepinas</b>	<b>6</b>
3.1 Propiedades farmacocinéticas del Pentobarbital	9
<b>4. Melatonina</b>	<b>10</b>
4.1 Fisiología y farmacología de Melatonina	11
4.2 Receptores de la Melatonina	14
4.3 Farmacocinética de la Melatonina	16
<b>5. Modelos para cuantificar ansiedad, relajación muscular, y sedación en roedores</b>	<b>18</b>
<b>6. Sedación deseada y no deseada</b>	<b>20</b>
<b>II.-Planteamiento del problema</b>	<b>22</b>

<b>III.-Hipótesis</b>	23
<b>IV.-Objetivos</b>	24
<b>V.-Material y Metodología</b>	25
<b>VI.-Resultados</b>	29
<b>VII.- Discusión</b>	40
<b>VIII.-Conclusiones</b>	43
<b>IX.-Perspectivas</b>	44
<b>X.-Bibliografía</b>	45
<b>XI.-Anexos</b>	50

## Índice de abreviaturas

a.a: Aminoácido  
AMP<sub>c</sub>: Adenosínmonofosfato cíclico  
ANDEVA: Análisis de Varianza  
aprox: Aproximadamente  
BP: Barrera Placentaria  
BZP: Benzodiazepinas  
Ca<sup>2+</sup>: Ión calcio  
CCDV: Canales de calcio dependientes de voltaje  
CDRC: Curva Dosis Respuesta Cuantal  
Cl<sup>-</sup>: Ión Cloro  
C<sub>max</sub>: Concentraciones plasmáticas máximas  
cm: Centímetros  
Cols: Colaboradores  
DE<sub>50</sub>: Dosis Efectiva 50  
EEG: Electroencefalograma  
EEM: Error estándar de la media  
FC: Frecuencia Cardíaca  
FR: Frecuencia respiratoria  
Fig.: Figura  
FQ: Facultad de Química  
GABA: Ácido gamma-aminobutírico  
GPCR: Receptor acoplado a proteína G  
GP: Glándula Pineal  
GSC<sub>3</sub>: Ganglios simpáticos cervicales superiores  
h: Hora  
HE: Hematoencefalica  
HIOMT: Hidroxiindol-O-metiltransferasa  
i.m: Intramuscular  
Ing: Ingeniería  
i.p: Vía de administración intraperitoneal  
kg: Kilogramo  
L: Litros  
Lab: Laboratorio

LS: Latencia de sedación  
LSR: Latencia de sedación de recuperación  
mg: Miligramos  
mGluR: Receptores metabotrópicos de glutamato  
min: Minutos  
MT: Melatonina  
NAT: N-acetiltransferasa  
NA: Noradrenalina  
NSQ: Núcleo supraquiasmático  
p.o: Vía de administración peros  
p: Pagina  
pp: Paginas  
PT: Pentobarbital  
Quím: Química  
RT: Rata  
RTN: Ratón  
seg: Segundos  
SNC: Sistema Nervioso Central  
SNS: Sistema nervioso simpático  
U.P: Unidad Probit  
Vd: Volumen aparente de distribución  
v.o : Vía de administración oral  
VGAT: Transportador de vesículas del GABA.  
 $\bar{x}$ : Promedio  
5-HT: 5-Hidroxitriptofano, 5-Hidroxitriptamina



## Índice de figuras

Fig. 1 Factores que alteran la respuesta de un fármaco	4
Fig. 2 Estructura química del midazolam	5
Fig. 3	8
a) Sinapsis GABA-érgica	
b) Representación esquemática del receptor GABA <sub>A</sub>	
Fig. 4 Estructura química del pentobarbital sódico	9
Fig. 5 Estructura química de la melatonina	10
Fig. 6 Localización de la glándula pineal	11
Fig. 7 Síntesis de Melatonina	13
Fig. 8 Regulación fisiológica de la secreción circadiana de la melatonina	14
Fig. 9 Señalización esquemática de subtipos de receptores de melatonina	15
Fig. 10 Etapas por las que cruzan las Benzodiacepinas dependiendo de la dosis	19
Fig. 11 Diagrama de trabajo General	28

## Índice de gráficas

Gráfica 1. Curvas dosis respuesta cuantal (CDRC) a PT para ratones	30
Gráfica 2. CDRC a PT para ratas	31
Gráfica 3. CDRC a MT para ratones	32
Gráfica 4. CDRC a MT para ratas	33
Gráfica 5. Comparación de la DE <sub>50</sub> de PT vs DE <sub>50</sub> de MT en ratas por vía i.p	34
Gráfica 6. Promedio de la latencia (seg) para sedación en <i>ratones</i> vs la dosis	35
Gráfica 7. Promedio de la latencia (seg) de sedación en <i>ratas</i> vs la dosis	36
Gráfica 8. Comparación del promedio de la latencia de sedación para MT en ratones vs ratas por la misma vía de administración i.p	37
Gráfica 9. Contraste del promedio de latencia de sedación de MT en <i>ratones</i> por vía i.p vs vía p.o	38
Gráfica 10. Comparación de la latencia de sedación de MT en <i>ratas</i> por vía i.p vs vía p.o	39

## **Índice de tablas**

Tabla 1.- Espectro de sedación	2
Tabla 2.-Dosis efectiva 50 para PT y MT en ratón y rata por vía de administración i.p y p.o	29
Tabla 3. Resultados obtenidos de MT en ratón y rata por vía de administración i.p y p.o	29

## Resumen

La melatonina (*MT*), *N-Acetil-5-metoxitriptamina*, es una hormona nocturna que se sintetiza en la glándula pineal y ejerce sus efectos a través de receptores ( $MT_1$  y  $MT_2$ ) acoplados a proteínas G, los  $MT_3$  pertenecen a la familia de la quinonareductasa. Dentro de los efectos de *MT* tenemos: regulación de los ritmos circadianos (tratamiento del Jet-lag), suplemento alimenticio, ansiedad, depresión y trastornos del sueño, por lo que la *MT* se utiliza como inductor de este, entre otros. Sin embargo, por sus diversas propiedades la *MT* se consume indiscriminadamente por millones de personas, es por ello que se tuvo el interés en conocer la dosis a la cual se presenta el efecto de sedación, ya que este efecto puede conllevar a riesgos severos, por ejemplo; inhabilitar actividades cotidianas de las personas; como el manejar un auto o maquinaria. Con este objetivo se utilizó el método directo, el cual consiste en observar el comportamiento de los roedores, por una hora, desde que se administra el fármaco hasta observar movimientos desordenados, disminución de la actividad motora, relajación, etc., una vez recopilados los resultados se realizó la Curva Dosis Respuesta Cuantitativa a *MT* a las dosis 7.5, 10, 15, 30, 40 mg/kg encontrando como resultado que la *MT* presenta una sedación “mínima” a la dosis de 10 mg/kg, y una sedación “leve”, a dosis de 40 mg/Kg, comparada con el control positivo que fue Pentobarbital (PT) a dosis de 5 mg/kg (sedación “leve”), de acuerdo a la escala de Salamone. Asimismo, las latencias de sedación se compararon entre especies (ratón y rata), y vías de administración (i.p., y p.o) resultando que no hay diferencia significativa entre las especies, pero si, entre las vías de administración para la latencia de recuperación de la sedación.

## **I. Introducción**

### **1. Sedación**

La sedación en humanos se define como “un estado de depresión de la actividad del sistema nervioso central (SNC) que permite el tratamiento a realizar” (Arlachov Y, 2012). Dentro de los modelos para la evaluación del efecto de sedación en roedores existe el método directo, el cual consiste en la cuantificación de la latencia de sedación en la que se presenta la incoordinación motora (Naguib M, 2003).

De acuerdo a la American Society of Anesthesiologists (ASA), la sedación abarca un espectro que va desde la sedación mínima o ansiolisis a la anestesia general; estos efectos dependen de la dosis (Tabla 1). La ansiolisis experimental equivale a un estado inducido farmacológicamente en el que las funciones cognitivas y motoras están alteradas. La sedación y analgesia moderada, también conocida como sedación consciente, es un estado de sedación en el que el individuo responde a órdenes verbales con o sin una ligera estimulación táctil. La ansiolisis, sedación y analgesia moderada no modifican las funciones respiratoria y cardiovascular. La sedación y analgesia profunda consiste en una depresión inducida farmacológicamente del grado de consciencia en la que los individuos sólo responden propositivamente a la estimulación reiterada o dolorosa. La anestesia general equivale a la pérdida de la consciencia en forma reversible inducida farmacológicamente en la que no hay respuesta a los estímulos dolorosos. La sedación profunda y la anestesia general,

disminuyen la frecuencia cardiaca (FC), y la frecuencia respiratoria (FR) (Doyle L, 2006).

Estado	Ansiolisis/ sedación mínima	Sedación consciente/ sedación moderada y analgesia	Sedación profunda/ analgesia	Anestesia general
Capacidad de respuesta	Normal a la estimulación verbal	A la estimulación verbal o táctil ligera	A la estimulación repetida o dolorosa	Sin respuesta a la estimulación dolorosa
Vía respiratoria	Mantenida	Mantenida	Puede necesitar intervención	Necesita a menudo la intervención
Ventilación	Normal	Adecuada	Puede necesitar asistencia	Suele necesitar asistencia
Función cardiovascular	Normal	Mantenida	Habitualmente mantenida	Puede estar alterada

Tabla 1 Espectro de sedación (Doyle L, 2006).

Para evaluar las etapas de sedación se empleó la escala propuesta por Salamone en 2006, y citada por Rivera y cols., 2015 quienes las mencionan en orden numérico descendente, de la siguiente manera:

Etapa 5: Despierto y activo. Locomoción, movimiento y hábitos sin alteración.

Etapa 4: Despierto e inactivo. Locomoción y hábitos disminuidos.

Etapa 3: Sedación leve. Ojos abiertos, ligeros movimientos, conservando su postura y respuesta a estímulos táctiles.

Etapa 2: Sedación moderada. Ojos semicerrados, pérdida total de postura y no responde a estímulos táctiles.

Etapa 1: Sedación profunda. Apenas abre los ojos, pérdida total de postura y movimiento. Sólo responde a estímulos dolorosos.

Etapa 0: Sueño. Completamente dormido.

## 1.1 Sedante ideal

Estas etapas participan en la clasificación del “sedante ideal”, el cual debe de ajustarse en lo posible a las siguientes condiciones (Valdivieso A, 1998):

- 1) Efecto rápido.
- 2) Vida media corta.
- 3) Eliminación mediante metabolitos inactivos.
- 4) Metabolismo y eliminación no condicionada a órganos susceptibles (hígado y riñón).
- 5) Carente de interacción medicamentosa
- 6) Suficiente efecto sedante sin repercusión hemodinámica o respiratoria
- 7) Ausencia de toxicidad hepática, renal, medular o suprarrenal

Dado que no existe una sustancia que cumpla todas estas condiciones, se emplean un gran número de fármacos sedantes dentro de los cuales tenemos a las benzodiacepinas (BZP'S) y los Barbitúricos. Para la sedación aplicada a procedimientos diagnóstico-terapéuticos como preanestésicos de corta o mediana duración, algunas se aproximan bastante al fármaco sedante ideal, por sus características farmacocinéticas y sus mínimos efectos adversos (Valdivieso A, 1998).

Sin embargo, existen factores que determinan la respuesta fisiológica de un fármaco entre los que se comprende la variabilidad biológica tal como se muestra en la Fig.1.

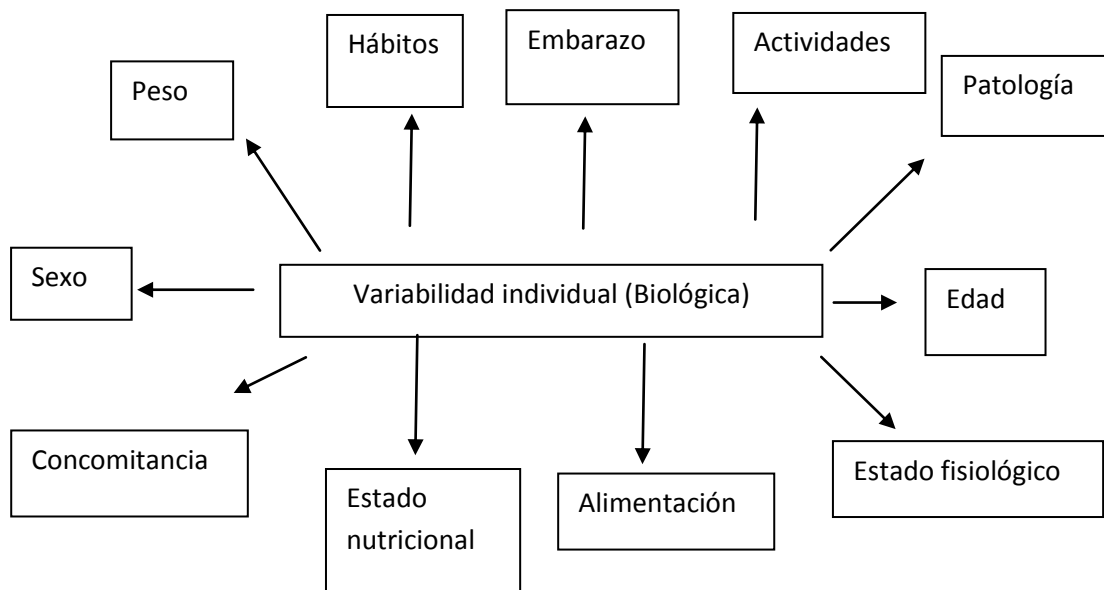


Fig. 1 Factores que alteran la respuesta de un fármaco (Mendoza N, 2008).

En busca del sedante ideal (Serrano V, 2005), se recurre a grupos de fármacos que presentan este efecto tal es el caso del midazolam (Fig. 2), una benzodiazepina (BZP) que se caracteriza por producir un efecto rápido y de corta duración debido a su rápido metabolismo. El midazolam tiene un efecto inductor del sueño y sedante muy rápidos, con intensidad pronunciada. También, ejerce un efecto ansiolítico, anticonvulsivante y relajante muscular dependiente de la dosis.



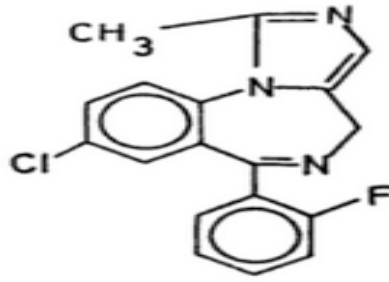


Fig. 2 Estructura Química del Midazolam (Velasco A, 1988).

## 2. Farmacocinética del Midazolam

Las características farmacocinéticas del midazolam son las siguientes (Katzung BG, 1995):

- **Absorción:** Administrado por vía oral la biodisponibilidad es del 44%.
- **Curva de concentración plasmática:** La concentración plasmática máxima se obtiene aproximadamente (aprox) 30 minutos (min) post-administración intramuscular.
- **Distribución:** Lenta y atraviesa las barreras hematoencefalica (HE) y placentaria (BP).
- **Volumen de distribución (Vd):** 1 a 2.5 L/Kg ( o 77L/70 Kg)
- **Unión a Proteínas:** 95% principalmente a albúmina
- **Vida media:** 1.8 a 3 h en voluntarios sanos.
- **Metabolismo:** Extracción hepática del 40% a 50%. Es hidrolizado por la enzima CYP3A4
- **Principal metabolito:** Alfa-hidroximidazolam, farmacológicamente activo. Produce un 10 % a los efectos de la dosis intravenosa.
- **Eliminación:** Menos del 1% de la dosis se recupera en orina en forma inalterada. Del 60% a 80% de la dosis es excretada en la orina como conjugado glucorónido-alfa-hidroximidazolam.

Dadas estas propiedades farmacocinéticas del midazolam se utiliza en humanos como preanestésico y transoperatorio (Goodman & Gilman, 2008).

### 3. Mecanismo de acción de las Benzodiazepinas

Para abordar el mecanismo de acción de las BZP'S se debe tener en cuenta que es a través de los receptores del ácido gamma-aminobutírico (GABA) los cuales se clasifican en tres tipos principales (GABA<sub>A</sub>, B y C) (Goodman & Gilman, 2008).

- El receptor GABA<sub>A</sub> (el subtipo más prominente de receptor GABA), un conducto iónico para cloro (Cl<sup>-</sup>) activado por ligando, o receptor ionotrópico.
- El receptor GABA<sub>B</sub>, es un receptor acoplado a proteína G (GPCR) o receptores metabotrópicos.
- El receptor GABA<sub>C</sub>, un conducto de Cl<sup>-</sup> activado por transmisor.

Considerando lo anterior; el mecanismo de acción de las BZP'S consiste en la unión a componentes moleculares del receptor GABA<sub>A</sub> presente en las membranas neuronales en el SNC. Este receptor ionotrópico, proteína heteroligomérica transmembranal que funciona como un canal del ion Cl<sup>-</sup>, es activado por el neurotransmisor inhibitor GABA. Las propiedades características del receptor GABA<sub>A</sub> consisten en una estructura pentamérica constituida de cinco subunidades seleccionadas de ocho clases de polipéptidos. Las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (Fig. 3 a y b), son esenciales para el funcionamiento fisiológico y farmacológico normal. El papel de las otras subunidades es la modulación de la actividad del canal.

El receptor GABA es el principal neurotransmisor inhibitor del SNC. Las BZP'S potencian la inhibición GABAérgica a todos los niveles del neuroeje, incluyendo médula espinal, hipotálamo, hipocampo, sustancia negra, corteza cerebelosa y corteza cerebral, aumentando la eficiencia de la inhibición sináptica GABAérgica a través de la hiperpolarización de la membrana, lo cual reduce la frecuencia de descarga de neuronas críticas de muchas regiones del encéfalo. El aumento en el canal de iones de  $Cl^-$  inducido por la interacción de BZP'S con GABA asume la forma de un incremento en la frecuencia de apertura de canales, debido a un aumento de afinidad del receptor por el GABA. Existen tres tipos de interacciones de ligandos con receptores de BZP'S (Mendoza N, 2008):

1) Los agonistas: Facilitan la acción del GABA y actúan como moduladores alostéricos positivos de la función del receptor, que se manifiestan por efectos anticonvulsivos y ansiolíticos.

2) Los antagonistas: Son tipificados por el derivado BZP'S sintético flumacenil, que bloquea específicamente las acciones de las BZP'S.

3) Los agonistas inversos: Actúan como moduladores alostéricos negativos de la función del receptor GABA. Su interacción con los receptores de benzodiazepinas pueden producir ansiedad y convulsiones producidas por las carbolinas que a su vez pueden bloquear efectos de las benzodiazepinas por un lado.

Por otro lado, un derivado del ácido barbitúrico que utiliza principalmente en roedores es el pentobarbital sódico (PT) (Fig. 4), porque posee propiedades sedantes-hipnóticos que deprimen la actividad del SNC

dependiente de la dosis, produciendo en forma progresiva una gama de respuestas, en humano y roedores; como tranquilidad o somnolencia (sedación), sueño (hipnosis farmacológica), pérdida del conocimiento, estado de coma, anestesia quirúrgica y depresión de la respiración y cardiovascular. Estas son algunas de las propiedades que comparten con un gran número de sustancias químicas, entre ellas los anestésicos generales (Mendoza N, 2008).

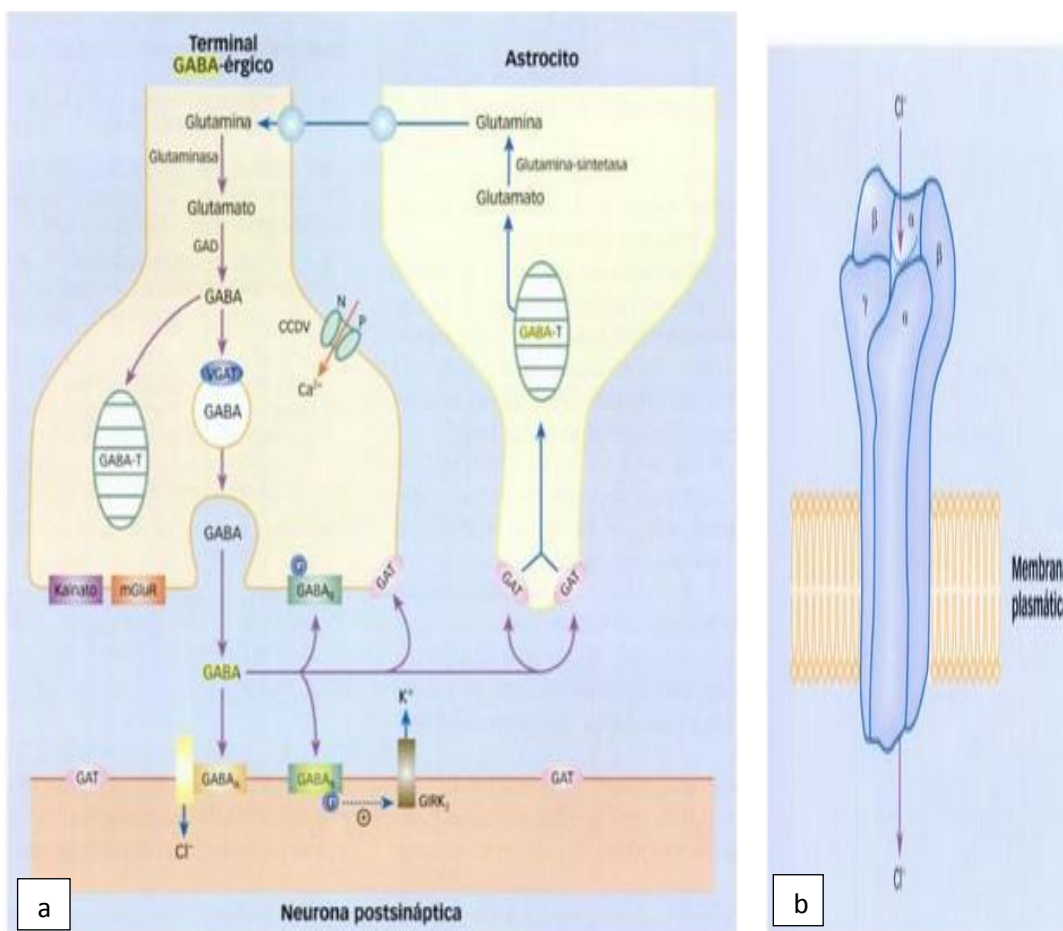


Fig. 3 Se muestra la sinapsis GABAérgica.

a) Los canales iónicos y los receptores de GABA se indican mediante rectángulos, CCDV: Canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje de los tipos N y P; GABA<sub>A</sub>: receptores ionotrópicos, GABA<sub>B</sub>: receptores metabotrópicos acoplados a proteína G, GABA-T: acoplados a proteína G; mGluR: receptores metabotrópicos de glutamato; VGAT: transportador vesicular de GABA (Velázquez L, 2008).

b) Representación esquemática del receptor GABA<sub>A</sub> con 5 subunidades, el canal central para el cloro, y los loci de acción de las BZP (Velázquez L, 2008).

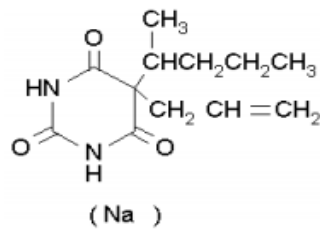


Fig. 4 Estructura Química del Pentobarbital sódico (Remington A, 2008).

### 3.1. Propiedades farmacocinéticas del Pentobarbital (María L, 2010):

- **Absorción:** Se absorbe fácilmente pasando a la sangre y combinándose con las proteínas, llegando luego a los tejidos, en especial al adiposo. El nivel sanguíneo del producto cae rápidamente y se concentra en el hígado y riñón. La biodisponibilidad > 90 %.
- **Unión a proteínas:** 65%.
- **Distribución:** Es distribuido a lo largo del cuerpo. Se extiende a través de placenta en el tejido fetal y puede aparecer en la leche en pequeñas cantidades. Después de la inyección intravenosa, el pentobarbital en el plasma alcanza el equilibrio de distribución en el cerebro dentro de 3-4 minutos.
- **Metabolismo:** Se metaboliza en el hígado, la velocidad de inactivación hepática por hidroxilación es de un 0.5 %/h.
- **Vida Media:** 15-50 h (Salazar M, 2009).
- **Vd:** 0.5-1.0 L/Kg (Salazar M, 2009).
- **Eliminación:** Aproximadamente el 50% de la dosis del pentobarbital dada se recupera en orina como el trihidroxi metabolito.

#### 4. Melatonina

Los fármacos previamente mencionados son conocidos por su mecanismo de acción y los efectos que producen, un tercer grupo es la Melatonina (MT), de la cual su mecanismo de acción no es del todo conocido, sin embargo, se sabe que es una hormona científicamente denominada N-acetyl-5-metoxytryptamina. Su nombre se compone de “mela”, debido a su efecto blanqueante y “tonina”, porque se deriva de la serotonina. Es una indolamina, es decir, un compuesto que tiene un grupo amino y que deriva del indol, un hidrocarburo que tiene un anillo hexagonal unido a uno pentagonal (Fig. 5). Concretamente pertenece a la familia de los metoxiindoles, los cuales son sintetizados a partir del aminoácido (a.a) triptófano (Lobato A, 2015).

La MT posee dos grupos funcionales, el grupo hidroxilo y el grupo alcoxi, lo que permite la unión con sus receptores. Estos son de membrana, nucleares y mitocondriales. Según el receptor al cual se una activará una u otra función (Lobato A, 2015).

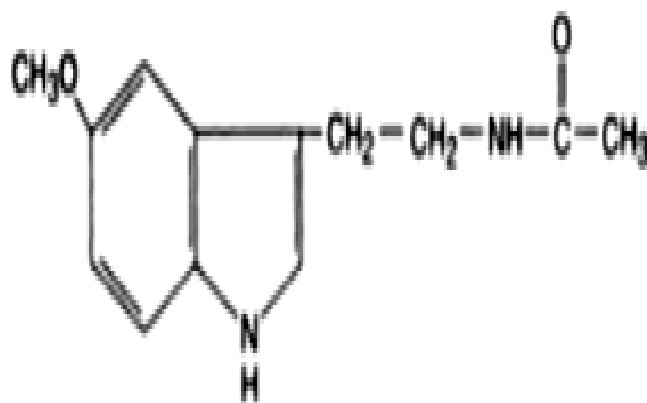


Fig. 5 Estructura Química de la Melatonina (Goodman & Gilman, 2008).

#### 4.1. Fisiología y farmacología de Melatonina

En la especie humana, la glándula pineal (GP) o epífisis cerebri es un pequeño órgano piriforme de color rojo grisáceo que ocupa la depresión existente entre los tubérculos cuadrigéminos superiores. Está debajo del rodete del cuerpo caloso, separada del mismo por la tela coroidea del tercer ventrículo y las venas cerebrales contenidas en ella (Fig. 6). En la GP hay dos tipos de células:

- 1) Pinealocitos, que son las células predominantes y características del parénquima pineal, productoras de indolaminas (MT en su mayor parte) y péptidos.
- 2) Células neurogliales, situadas entre los pinealocitos a los que cubren y separan parcialmente, similares a los astrocitos.

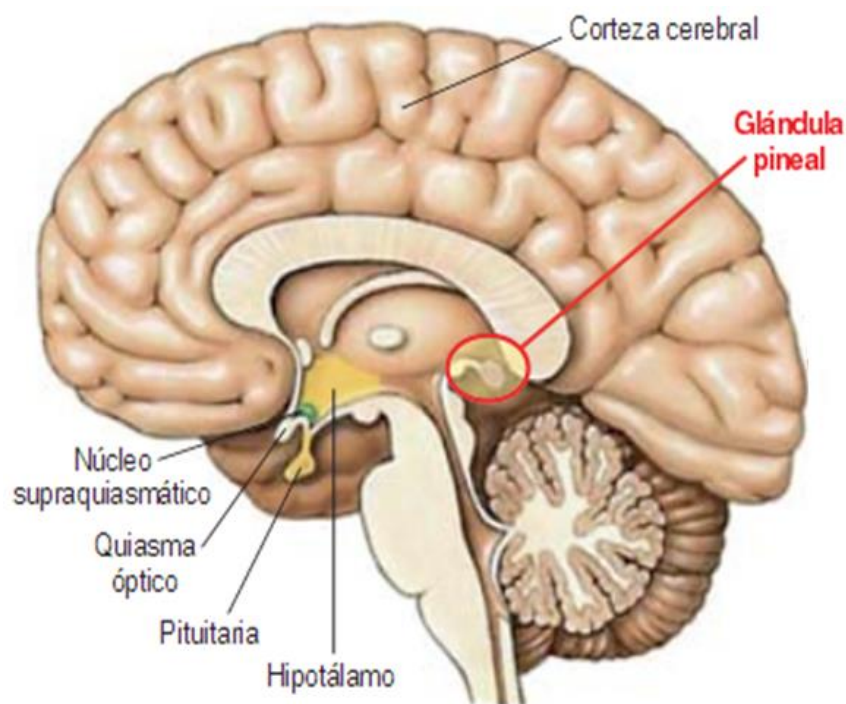


Fig. 6 Localización de la glándula pineal (Guerrero J, 2007).

Farmacológicamente la MT en su biosíntesis el triptófano es convertido en primer lugar a 5-hidroxitriptófano mediante la enzima triptófano hidrolasa. El 5-hidroxitriptófano es descarboxilado a 5-Hidroxitriptamina (serotonina) (5-HT). La síntesis de MT a partir de serotonina es catalizada por dos enzimas: arilalkilamina N-acetiltransferasa (NAT) e hidroxiindol-O-metiltransferasa (HIOMT), ambas enzimas limitadas en gran parte a la GP (Fig. 7) (Domínguez A, et al. 2009). En la GP, tanto la síntesis como la secreción masiva de MT se producen durante la noche; la luz es el principal factor ambiental que regula la secreción de MT. El estímulo lumínico procedente de la retina se transmite a través del tracto retinohipotalámico al núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo (“reloj biológico”) y de allí al sistema nervioso simpático (SNS) a través de fibras procedentes de los ganglios simpáticos cervicales superiores (GSC<sub>S</sub>). Los estímulos adrenérgicos (noradrenalina) (NA) alcanzan la GP y estimulan mayoritariamente receptores beta adrenérgicos en los pinealocitos. Esto inicia la producción de MT por un aumento intracelular del Adenosínmonofosfato cíclico (AMP<sub>C</sub>). La síntesis y la liberación se estimulan por la oscuridad y se inhiben por la luz siguiendo un ritmo circadiano. Durante las horas de luz las células fotorreceptoras retinianas están hiperpolarizadas, situación que inhibe la liberación de NA. En la oscuridad, los fotorreceptores liberan NA, que activa el sistema, y se produce el aumento en la actividad glandular. La MT se libera, fundamentalmente, en sangre por difusión pasiva, a medida que aumenta su síntesis. Su liberación tiene lugar tras el comienzo de la oscuridad; el pico de concentración sérica (60-120 pg/ml) se produce en medio de la



noche, entre las 2:00 y las 4:00 am (Fig. 8). Posteriormente, desciende de forma gradual, y sus concentraciones séricas son menores durante el día (10-20 pg/ml) (Domínguez A, et al. 2009).

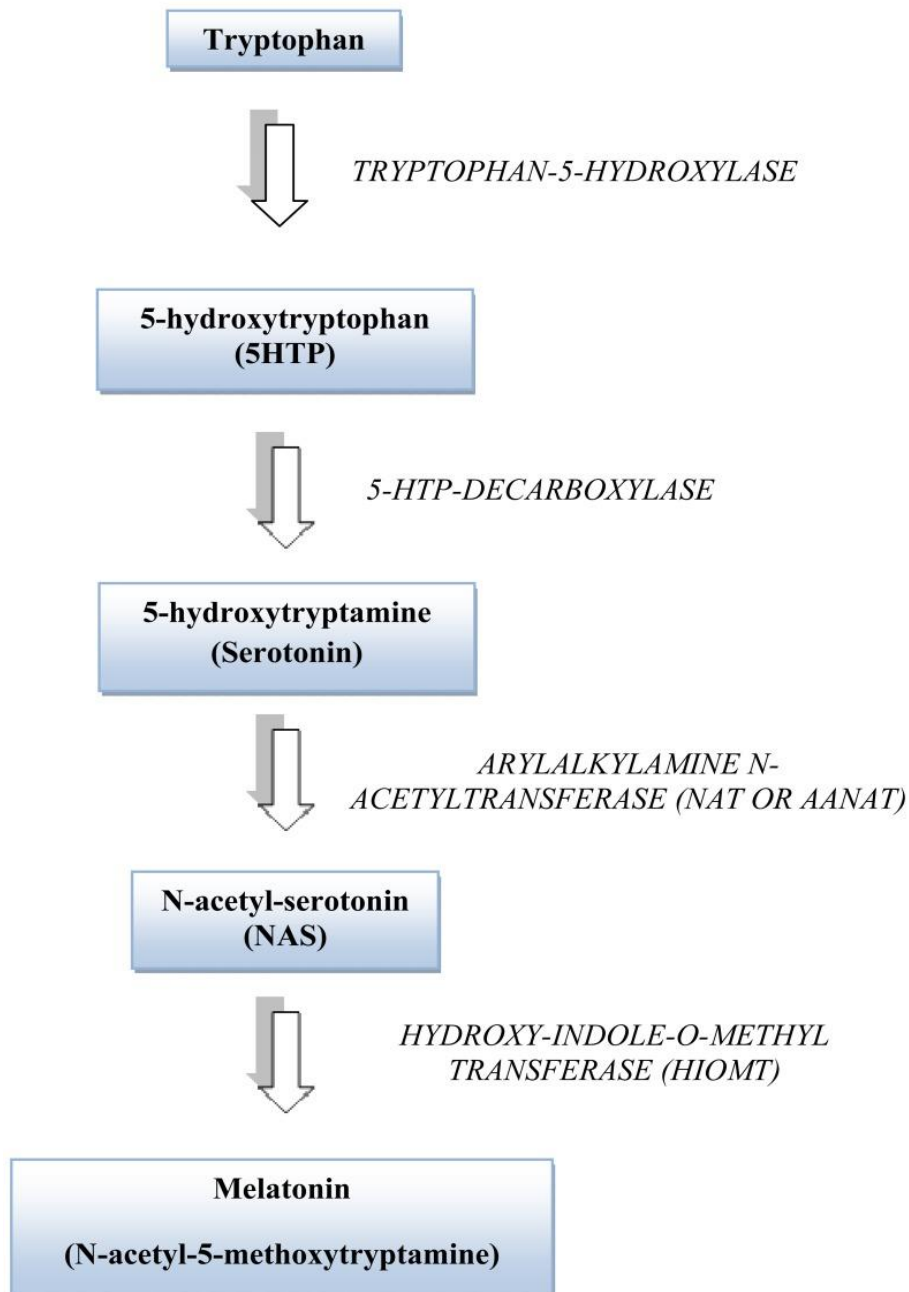


Fig. 7 Síntesis de Melatonina (Srinivasan V, 2012).

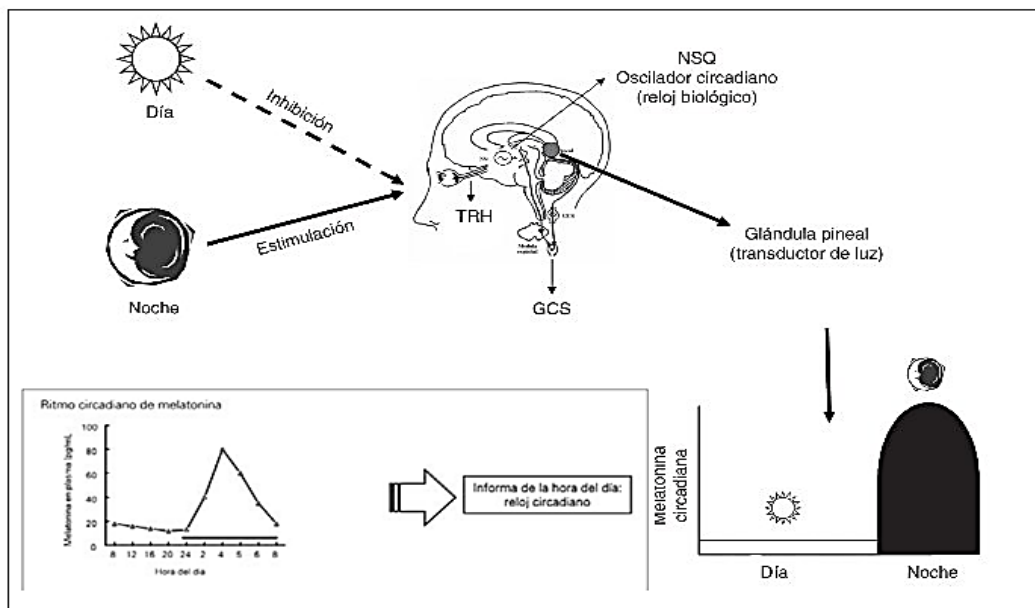


Fig. 8 Regulación fisiológica de la secreción circadiana de la melatonina (Domínguez A, 2009).

#### 4.2. Receptores de la Melatonina

Se sabe que la MT actúa a través de tres tipos de receptores: **receptor MT1** (Alta afinidad picomolar), **receptor MT2** (Baja afinidad nanomolar), receptor MT3 aunque este último no se ha encontrado todavía en los seres humanos (Fig. 9). A continuación mencionaremos las características de cada uno de los receptores de MT.

- El receptor MT1 es de 350 a.a de longitud y acoplado a la proteína Gi, estos se expresan en el cerebro, el sistema cardiovascular (incluyendo los vasos sanguíneos periféricos, aorta y corazón), sistema inmunológico, testículos, ovario, piel, hígado, corteza suprarrenal, placenta, retina, páncreas y el bazo (Dubocovich y Markowska, 2005; Fischer et al, 2008; Pandi S, et al, 2008; Slominski et al, 2008).

- El receptor MT2 compuesto por 363 a.a y muestra homología de 60% con el receptor MT1 (Reppert et al., 1996). El receptor MT2 se ha encontrado en el sistema inmune, cerebro (hipotálamo, NSQ), retina, pituitaria, vasos sanguíneos, testículos, tracto gastrointestinal, glándulas mamarias, tejido adiposo, y la piel (Dubocovich et al., 2005).
- El receptor MT3 es una proteína que comparte un 95% de homología con la quinonoreductasa humana, una enzima que participa en la desintoxicación, y se expresa en el hámster (Nosjean et al., 2001). Los niveles más altos se encontraron en el hígado y los riñones con cantidades moderadas en el corazón, tejido adiposo y cerebro (Nosjean et al., 2001). También, se expresan en la retina del conejo (Pintor et al., 2001).

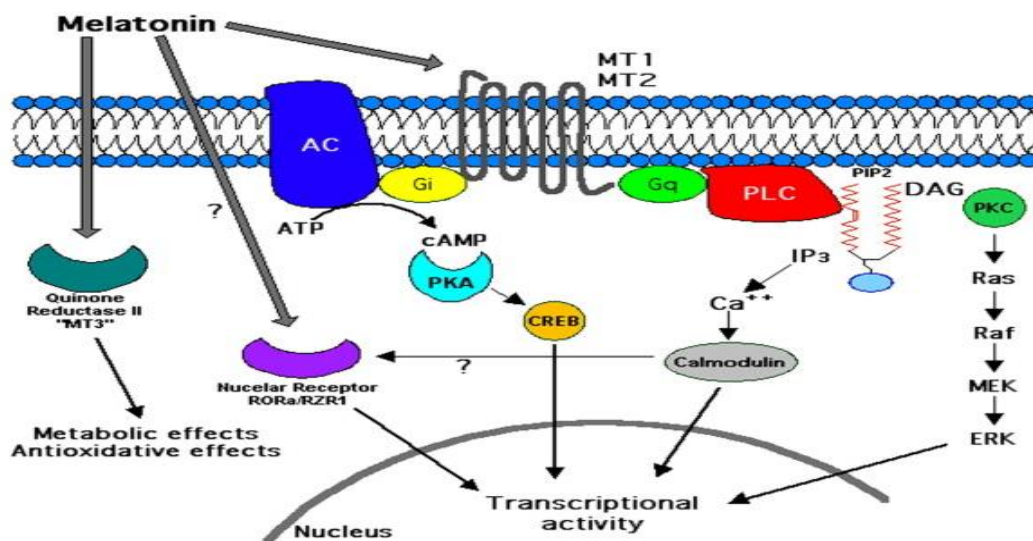


Fig. 9 Señalización esquemática de subtipos de receptores de melatonina (Slominski R, 2012. La melatonina ejerce muchos de sus efectos biológicos a través de MT1 o MT2 receptores de membrana (acoplados a proteínas G) o, según algunos autores, a través de receptores nucleares (Rorà / RZR1). Se muestran vías conocidas para ser activado por receptores de la melatonina de señalización. Quinonoreductasa II ("receptores MT3") se ha demostrado sólo en hámster y conejo (Slominski R, 2012).

### 4.3. Farmacocinética de la Melatonina

La degradación de la MT se produce en primer lugar en el hígado y secundariamente en el riñón. En el hígado, por hidroxilación a 6-hidroxi melatonina y posteriormente, es conjugada con ácido sulfúrico o con ácido glucurónico y excretada por la orina. La excreción urinaria de 6-sulfatoxi melatonina, el principal metabolito de la MT, se correlaciona estrechamente con la concentración sérica de MT (Kopin y cols., 1961). En humanos, no obstante, el 90% de la MT suele estar en forma de 6-sulfatoxi melatonina en plasma u orina. La ruta del metabolismo que se presenta depende de la vía de administración. La MT alternativamente también es diacetilada a 5-metoxitriptamina, la cual es diaminada a ácido 5-metoxiindolacético y a 5-metoxitriptofol (Cahill G, 1989). Esto se produce principalmente en la retina y el hígado. En cuanto a la farmacocinética la vida media de la MT en circulación es de aproximadamente 10 min (Ilinerova y cols., 1978). La MT oral muestra picos de concentración plasmática en humanos después de 60 min con fases de eliminación de 3 a 45 min sin embargo, se observan grandes variaciones individuales en la concentración plasmática de MT que son atribuidas a las diferencias en la absorción (Aldhous y cols., 1985). Tras alcanzar un pico máximo, la concentración en plasma la MT permanece por encima de los valores normales de 3 a 7 h después de la administración de dosis orales en un rango de 2 a 5 mg. La administración intravenosa en humanos, que evita el problema de la

variación en absorción de los individuos, ha confirmado que la sulfatación es la mayor vía metabólica en humanos (Arendt J, 1995).

La curva de eliminación de la MT por vía intravenosa es una exponencial negativa que presenta dos pendientes, alfa y beta, con un  $t_{1/2}$  para  $\alpha$  de 1.35 min un  $t_{1/2}$  para  $\beta$  de 28.4 min, con aclaramiento sistémico de 966 mL/min y volumen aparente de distribución (Vd) de 35.1 L.

Desde que Lerner (Lerner & Case, 1958 citado por Wurtman R, 1985), describió a la MT hasta mediados de los setenta, la MT se consideraba una hormona exclusiva de la GP, desde hace diez años se conoce que la MT se sintetiza en diversos órganos extrapineales y tejidos (Guerrero J. 2007), entre ellos se encuentran: retina, cuerpo ciliar, glándula de Harder, cerebro, timo, epitelio respiratorio, médula ósea, intestino, ovarios, testículos, placenta, linfocitos y piel. La síntesis extrapineal de la melatonina no sigue un ritmo luz/oscuridad y se especula con que sea consumida localmente por los tejidos, cumpliendo una función protectora contra el estrés oxidativo (Domínguez A, 2009).

La MT presenta ciertas limitantes en cuanto a la biodisponibilidad, la MT oral es baja (<15%) debido a su gran metabolismo de primer paso en el hígado (Citocromo CYP 1A1 y 1A2) y los alimentos retrasan su absorción reduciendo las concentraciones plasmáticas máximas (Cmax); su unión a proteínas plasmáticas no es fuerte distribuyéndose en todos los tejidos y líquidos corporales; se excreta por la orina más del 85% como 6-sulfatoximelatonina; su vida media en adultos jóvenes es de 30-50 min y en la presentación prolongada es de alrededor de 2 h (Gaitan M, 2015).

La MT circulante es transportada en el plasma en parte unido a albúmina (70%) y en parte en forma libre (30%) (Alonso R, 1999).

## **5. Modelos para cuantificar ansiedad, relajación muscular, y sedación en roedores**

Dado que ciertos fármacos como las BZP'S producen una serie efectos desde ansiolisis hasta la muerte dependiendo de la dosis (Fig. 10), es importante conocer los modelos que existen para clasificar las diferentes fases; hoy en día se conoce modelos para cuantificar ansiolisis, relajación muscular, y sedación en roedores, tal es el ejemplo del método directo, el cual consiste en la cuantificación de la latencia de sedación (LS) en la que se presenta la incoordinación motora, también se puede hacer uso de equipos que sirvan para medir la actividad motora espontánea mostrada por los roedores, por ejemplo, un actímetro, que consta de unidades sensoras las cuales registran la actividad de los animales a través de un sistema electromagnético y acopladas a un programa que permita al ordenador la adquisición y almacenamiento de los datos procedentes de las unidades sensoras. A los 30 min de la administración del vehículo o del fármaco los animales se introducen en cajas de metacrilato blanco (35 x 35 x 45 cm) que están situadas encima de las placas sensoras del actímetro, durante un periodo de 30 min. El ordenador realizaba un registro de actividad cada 5 min, es decir, a los 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min de la prueba (Aguilar C, 1997).

Asimismo, se puede auxiliar con pruebas de actividad locomotriz, plus maze, rota-rod, y cuerda tirante (Naguib M, 2006). El **Plus maze** es un modelo ansiolítico de tipo no condicionado que se basa en la tendencia natural que tienen los roedores a evitar espacios abiertos y elevados (Pellow S, 1985). La prueba consiste en cuantificar el tiempo en el que los roedores permanecen en las zonas abiertas y zonas cerradas del laberinto; así como el número de veces que éstas entran en cada una de ellas. Por lo tanto se considera disminución del estado ansioso (ansiólisis) cuando más tiempo y mayor número de entradas a zonas abiertas se presente. Por el contrario, el aumento del estado ansioso (ansiogénesis) se tendrá si el tiempo de permanencia en zonas cerradas es mayor (Bertoglio L, 2005).

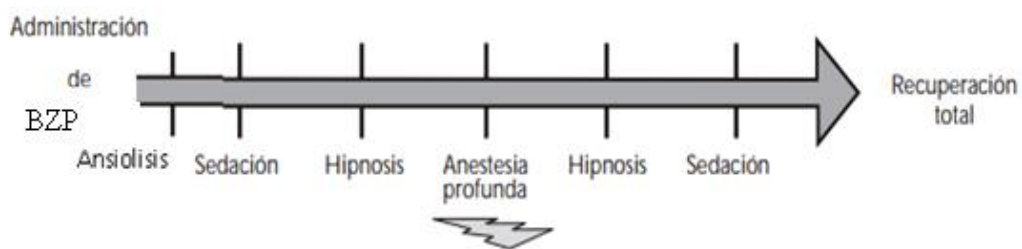


Fig. 10 Se muestran las diferentes etapas por las que cruzan las BZP'S dependiendo de la dosis (Parra M, 2013).

En cuanto a la relajación muscular tenemos el modelo del **rodillo giratorio rota-rod** que permite cuantificar el efecto de un fármaco sobre la relajación muscular en roedores, al evaluar la resistencia al cansancio y la coordinación motora. Esto es, a un mayor número de caídas del roedor

del rotor se tendrá una coordinación motora menor, por lo tanto, un efecto relajante muscular mayor del fármaco administrado (Farkas S, 2005).

También, si tenemos un fármaco con actividad miorelajante se produce un deterioro en la habilidad de los roedores para agarrarse con las extremidades de una cuerda rígida, los parámetros de evaluación, son la latencia de la primera caída y el número de caídas durante 2 min **modelo de la cuerda tirante**) (Bonnetti E, 1982). Por lo que este tipo de modelos representan una forma fácil y efectiva de evaluar la acción que pudieran presentar los fármacos (Bonetti E, 1982). En cuanto a modelos para evaluar la sedación, tenemos el método directo previamente mencionado y el **cilindro de exploración** un modelo sencillo basado en el comportamiento de los roedores de explorar un ambiente extraño, este modelo consiste en evaluar por 5 min el número de levantamientos del roedor sobre sus extremidades traseras el cual está relacionado con un estado de alerta. La disminución del número de levantamientos por el efecto de un fármaco está relacionada con un efecto tranquilizante, se ha utilizado para medir el efecto sedante de fármacos depresores del SNC (Navarrete A, 2007).

## 6. Sedación deseada y no deseada

El efecto de sedación en caso de ser deseada es de gran utilidad, para trastorno del sueño, amnesia, antes de los procedimientos médicos y quirúrgicos, (endoscopía y broncoscopía) así como la premedicación previa a la anestesia y anestesia intravenosa para el tratamiento de la epilepsia y trastornos convulsivos, como preanestésico, relajante muscular en trastornos neuromusculares específicos, como auxiliares en



diagnóstico, para el tratamiento neurológico y psiquiátricos como las manías (Mendoza N, 2008). Pero es un gran problema cuando la sedación es no deseada y se presenta como efectos adversos comunes de los sedantes hipnóticos que resultan de la depresión de las funciones del SNC que son dosis dependientes. En pacientes ambulatorios, dosis bajas producen somnolencia, trastornos del juicio, disminución de las habilidades motoras y alto riesgo para conducir automóvil, y realizar un trabajo. Las BZP'S causan amnesia anterógrada dosis dependientes, alteran la capacidad de aprender nueva información, particularmente la que implica un esfuerzo en el proceso cognoscitivo, no alteran la recuperación de información previamente aprendida. En ancianos se produce letargo y fatiga con la mitad de las dosis del adulto, la susceptibilidad es más común en las enfermedades cardiovasculares y respiratorias o con daño hepático y exacerban problemas respiratorios en apnea del sueño sintomático (Mendoza N, 2008). Es por eso que es de gran importancia concientizar el uso indiscriminado de la MT, dentro de las dosis frecuentes de consumo son: la MT en personas con alteraciones de sueño es de 3-10 mg, en el jet-lag una dosis de 2-5 mg de MT antes de dormir (Lobato A, 2015), se ha demostrado que bajas dosis de MT 0.3-1 mg producen efectos beneficiosos sobre el sueño de individuos jóvenes y sanos (Rufo M, 2002).

## **II. Planteamiento del problema**

La MT es utilizada actualmente por millones de personas en todo el mundo como suplemento natural, contra las alteraciones circadianas (jet-lag) (**Costello R, 2014**) y para la regulación de los trastornos del sueño (**Van G, 2010**), entre otros.

También, se menciona que algunos efectos fisiológicos de la MT podrían ser dependientes de la dosis (**Marseglia L, 2015**), como la presencia de hipotermia, un descenso del estado de alerta o posibles alteraciones en las funciones reproductoras, las que aún no se han evaluado suficientemente, en aquellas personas que han tomado grandes dosis de MT durante un tiempo prolongado (**Rufo M, 2002**), asimismo **Chen Q**, y Cols. en 2015 realizaron un estudio en ratas donde encontraron que la MT ejerce efectos tanto excitadores e inhibidores sobre el intestino dependiendo de la dosis. Pequeñas dosis de MT aceleran el tránsito intestinal en ratas, mientras que las dosis altas invierten este efecto (**Chen Q**, y Cols 2015).

Es por ello que se tuvo el interés en conocer la dosis a la cual se presenta la sedación, para concientizar sobre el uso indiscriminado de la MT, ya que el mal uso de los medicamentos puede afectar el resultado que se desea, obteniendo un beneficio menor o que ocurran reacciones adversas y en consecuencia que no se obtenga el efecto deseado. Cuando no se tienen en cuenta las condiciones clínicas del paciente, es más probable que el comportamiento farmacocinético del medicamento sea modificado o que haya una falta de eficacia y por eso es importante individualizar el tratamiento. La falta de cumplimiento por parte del paciente es otra causa de fracaso terapéutico.

### **III. Hipótesis**

- ❖ Se conoce que el pentobarbital en humanos a dosis de 2.5-5 mg/kg produce un efecto sedante característico, entonces el pentobarbital presentaría el mismo efecto en ratas y ratones para poder comparar este efecto con la MT.
  
- ❖ Se ha documentado en humanos que la MT administrada vía i.v disminuye la latencia de su efecto sedante en comparación con la vía oral, entonces, este efecto se presentará de la misma forma en los roedores.
  
- ❖ Si los ratones presentan un metabolismo más acelerado que las ratas, entonces la latencia y duración de este efecto será más rápido que en ratas.

#### **IV. Objetivos**

- ❖ Elaboración de la Curva Dosis Respuesta Cuantal de MT para determinar la  $DE_{50}$  para sedación.
  
- ❖ Comparación del efecto sedante de MT con dos diferentes vías de administración (i.p y p.o).
  
- ❖ Determinar si existen diferencias en el tiempo de latencia del efecto sedante de MT en dos diferentes especies de roedores (ratón y rata).

## **V. Material y Metodología**

### **Reactivos biológicos**

-60 ratas machos de 130-180 g (Cepa Wistar. Laboratories Harlan México, S.A de C.V).

-60 ratones macho de 25-30 g (Cepa ICR. Laboratories Harlan México, S.A de C.V).

### **Material para la prueba de Sedación**

- **Material de curación**

-Jeringas de 1 mL y 3 mL

- **Material de vidrio**

-Frascos viales

-Vasos de precipitado de 50 mL

- **Equipo**

-Balanza analítica Mettler Toledo AG 204.

-Balanza granataria Casa vales S.A.

-Ipad Apple de 32 Gb.

- **Material de acero inoxidable**

-Cánula para rata y ratón

-Espátula

- **Material de borosilicato**

-4 Cajas de borosilicato transparentes con rejilla 54x27x22 cm

## Reactivos

-Tween 80 al 7.5% (Laboratorio Merck, Lote: S7089587)

-Melatonina (Grado reactivo, Lote: 011M1321V, Laboratorio: Sigma-Aldrich)

-Pentobarbital Sódico. Hecho en México por: Salud y Bienestar Animal, S.A de C.V., Cad: MAR17

-Agua destilada (Lab. De Ing. Quím. FQ-UNAM).

## Metodología

En la Fig. 11 podemos observar el diagrama de trabajo general, que consta de:

Pesar y solubilizar a la melatonina, (vehículo Tween 80 al 7.5%, aforar con agua destilada).

Pesar y marcar a las ratas y ratones (Harlan Laboratories, S.A de C.V) (método binario), colocarlas en cajas de borosilicato transparentes con cama sanitaria (Harlan Laboratories, S.A de C.V), en condiciones de temperatura ambiente ( $23\pm 1^{\circ}$  C), luz (12/12 h) y humedad relativa (40%).

Los animales se adaptaron a las condiciones del laboratorio por una semana y tuvieron acceso libre al agua y alimento (Harlan Laboratories, S.A de C.V).

Se formaron grupos aleatorios de ratones (n=6) y ratas (n=6), se utilizaron las siguientes dosis de MT y PT (7.5, 10, 15, 30, 40 mg/kg), para ratones y ratas respectivamente, todas las sustancias se administraron al grupo 1 vía i.p y al grupo 2 vía p.o.

El método directo es un modelo para cuantificar el efecto sedante de una sustancia, obteniendo una respuesta del tipo todo o nada, esta prueba consiste en administrar el fármaco, y colocar al roedor en una mesa de trabajo, (asegurando que no se pueda caer), para poder observar su comportamiento y cuantificar el tiempo en que el roedor presentan alguna de estas propiedades características del efecto sedante como; la disminución de la actividad motora, incoordinación motora, relajación, hipersensibilidad, ojos semicerrados, pérdida de la postura y si responde a estímulos táctiles por una hora.

El análisis estadístico se realizó mediante un Análisis de Varianza (ANDEVA) de una vía, y la prueba de Dunnett para comparar varios grupos de tratamiento contra un solo control, empleando el Programa electrónico Sigma Plot versión 12.0. Los datos se presentan graficados como la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Los datos indicaron diferencia significativa en el rango  $p < 0.05$ .



Pesar la Melatonina.



Disolver la Melatonina en tween 80 al 7.5%, aforar con agua destilada.



Pesar y marcar a las ratas y ratones (método binario).

Se formaron grupos aleatorios de ratones (n=6) y ratas (n=6), se utilizaron las siguientes dosis de MT y PT (7.5, 10, 15, 30, 40 mg/kg), para ratones y ratas respectivamente, todas las sustancias se administraron al grupo 1 vía i.p y al grupo 2 vía p.o.



Se observó el comportamiento del roedor, y se cuantifico el tiempo en que se presente alguna de las propiedades características del efecto sedante como; la disminución de la actividad motora, incoordinación motora, relajación, hipersensibilidad, ojos semicerrados, perdida de la postura y si responde a estímulos táctiles por una hora.

Se realizó el análisis estadístico mediante un Análisis de Varianza empleando el Programa electrónico Sigma Plot versión 12.0.

**Fig. 11 Diagrama general de trabajo**



## VI. Resultados

Los resultados obtenidos se presentan en tablas y gráficas.

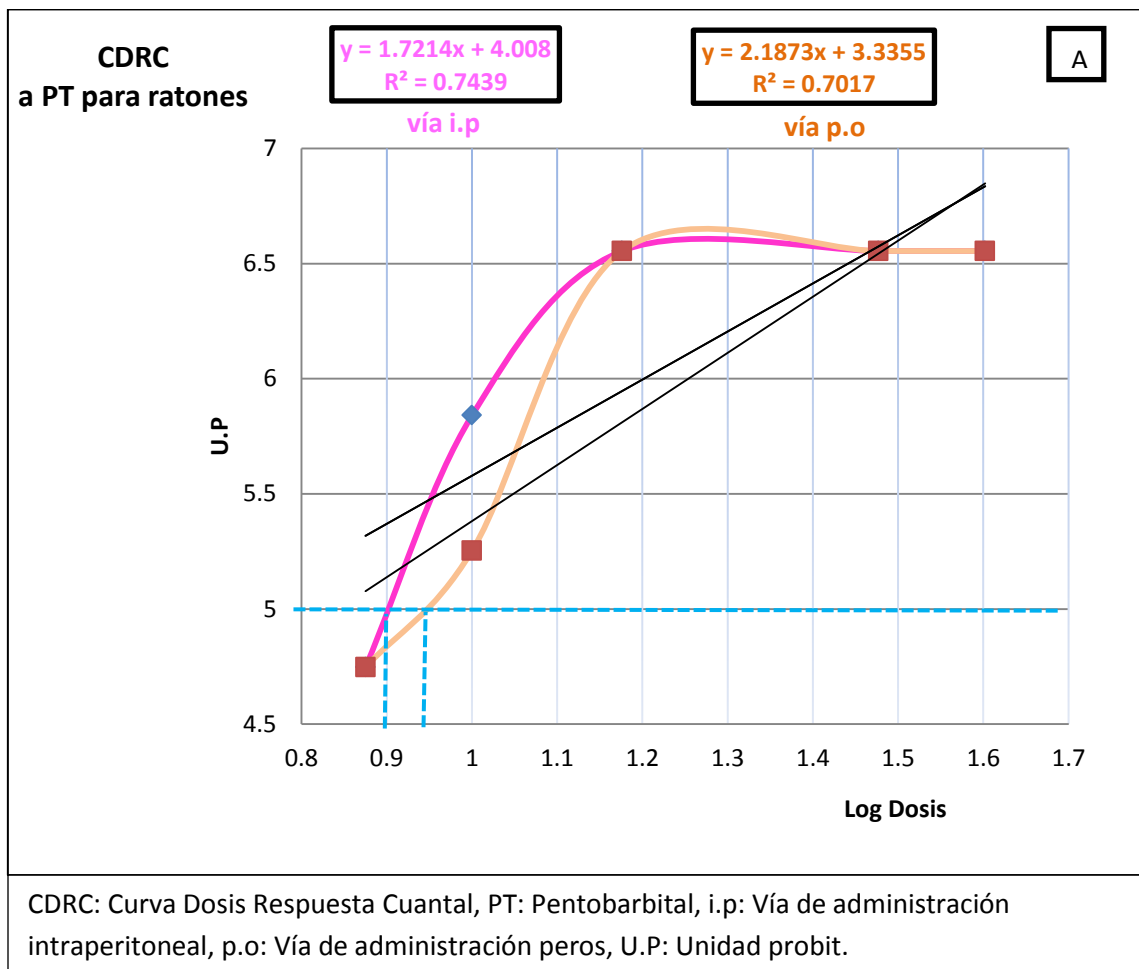
**Tabla 2.** Dosis efectiva 50 ( $DE_{50}$ ) para PT y MT en ratón y rata por vía de administración i.p y p.o.

$DE_{50}$ (mg/kg)	Ratón vía i.p	Ratón vía p.o	Rata vía i.p	Rata vía p.o
PT	3.8	5.7	5.3	7.0
MT	6.9	8.1	10.3	12.1

**Tabla 3.** Resultados obtenidos de MT en ratón y rata por vía de administración i.p y p.o.

Especie	Comparación	Vía de administración	Dosis de MT (mg/kg)	P<0.05
Ratón	PT vs MT	i.p	10,15,30	Significancia
Ratón	PT vs MT	p.o	10,15	Significancia
Rata	PT vs MT	i.p	10,15,30	Significancia
Rata	PT vs MT	p.o	-	-
Ratón vs rata	Diferentes especies	i.p	30	Significancia
Ratón vs rata	Diferentes especies	p.o	-	-
Ratón	Vías de administración	i.p vs p.o	-	-
Rata	Vías de administración	i.p vs p.o	40	Significancia

**Gráfica 1.** En el panel A, se muestran las Curvas Dosis Respuesta Cuantal (CDRC) de PT para ratones, donde cada punto representa las unidades probit (U.P) con respecto al logaritmo de la dosis (Log). A partir de las ecuaciones de las rectas se determinó la DE<sub>50</sub>, la primera ecuación en color rosa corresponde a la vía i.p con una DE<sub>50</sub>= 3.8 mg/kg, y la segunda ecuación en color anaranjado corresponde a la vía p.o con una DE<sub>50</sub>= 5.7 mg/kg.



Ejemplo de cálculo para obtener la DE<sub>50</sub>, la ecuación de la recta para PT que se muestra a continuación corresponde a la vía de administración i.p para ratones.

$$y = 1.7214x + 4.008$$

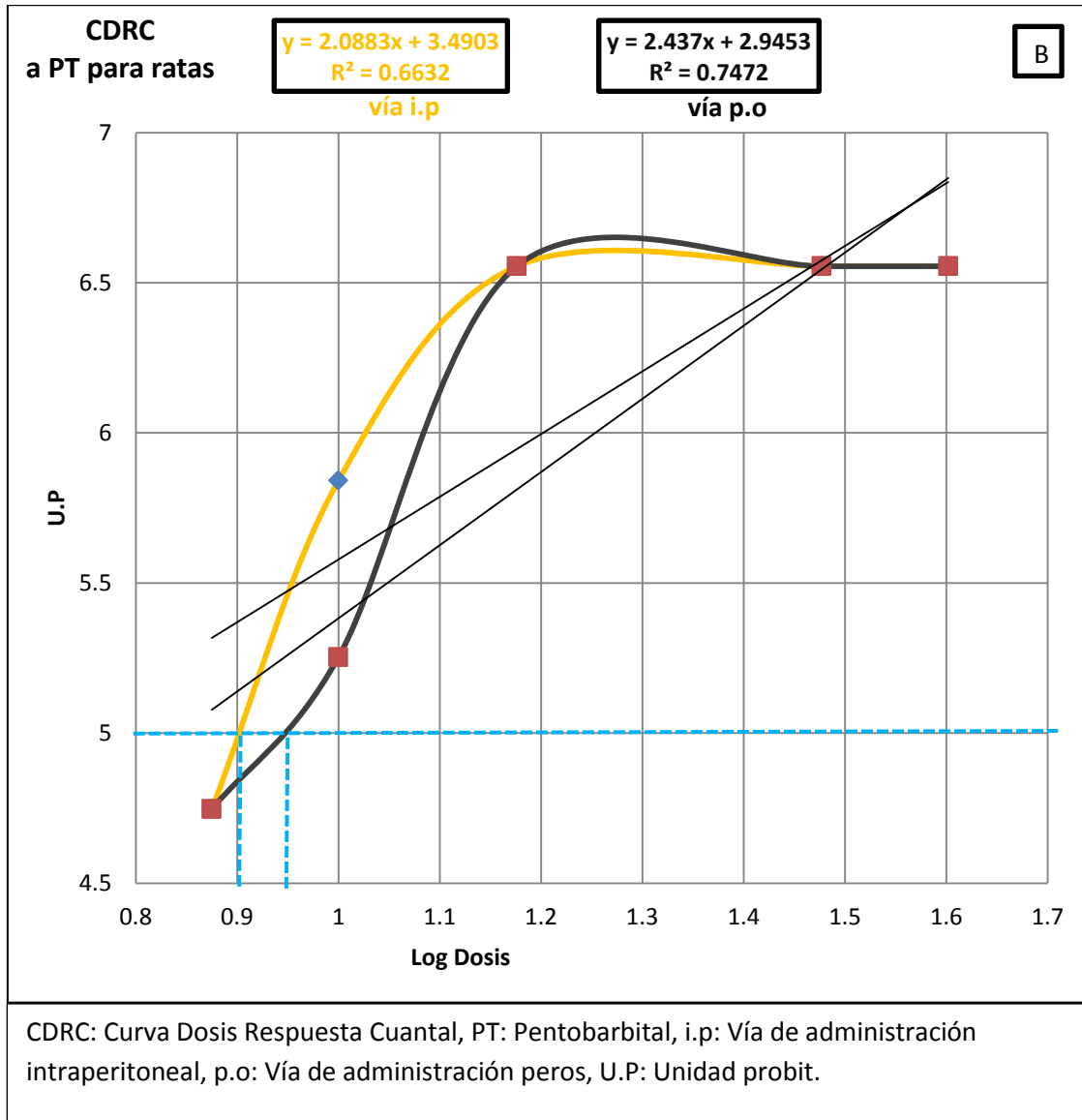
$$DE_{50} = 10^{(5-b)/m}$$

$$DE_{50} = 10^{(5-4.008)/1.7214}$$

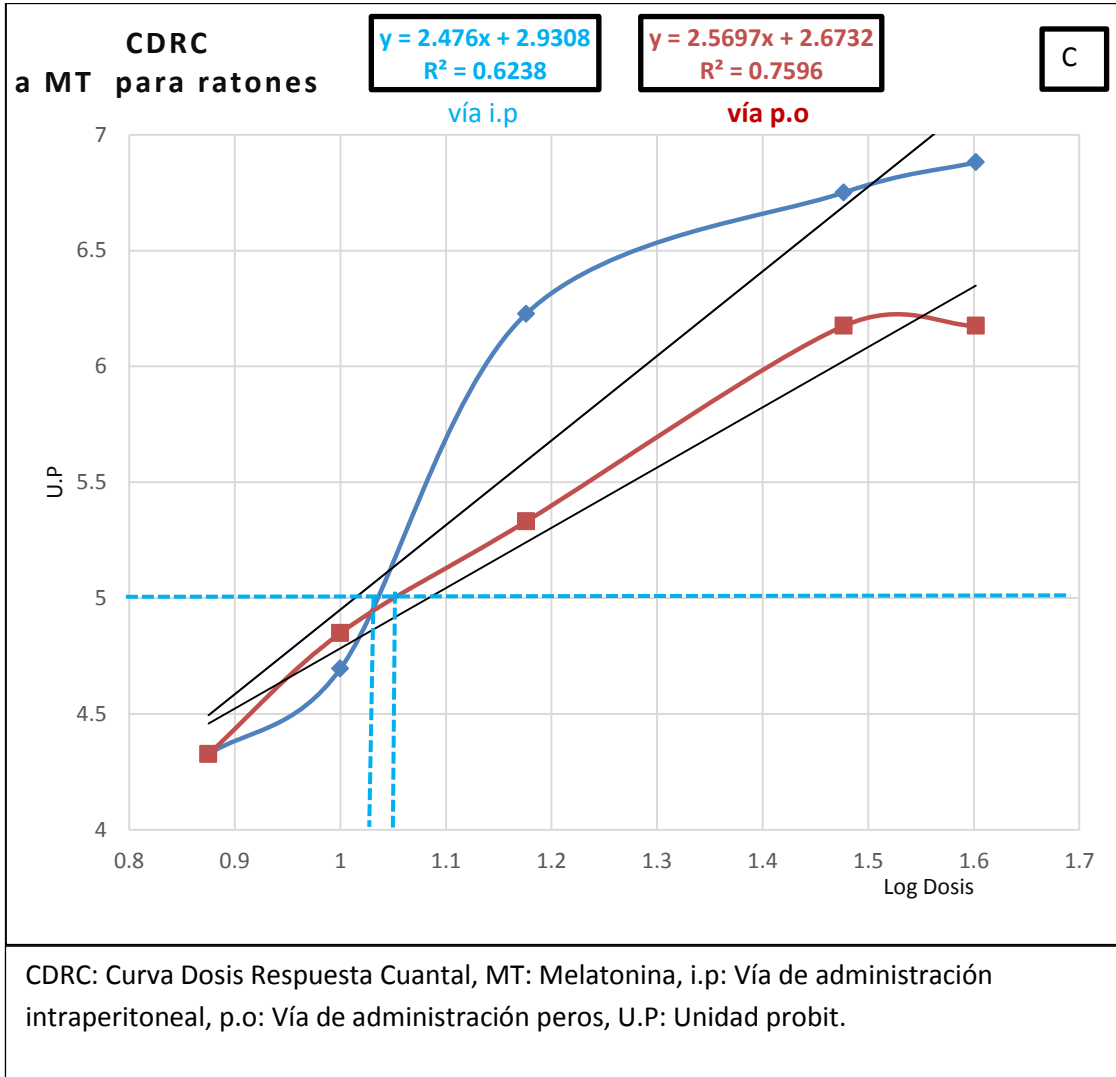
$$DE_{50} = 10^{(0.576)}$$

$$DE_{50} = 3.8 \text{ mg/kg}$$

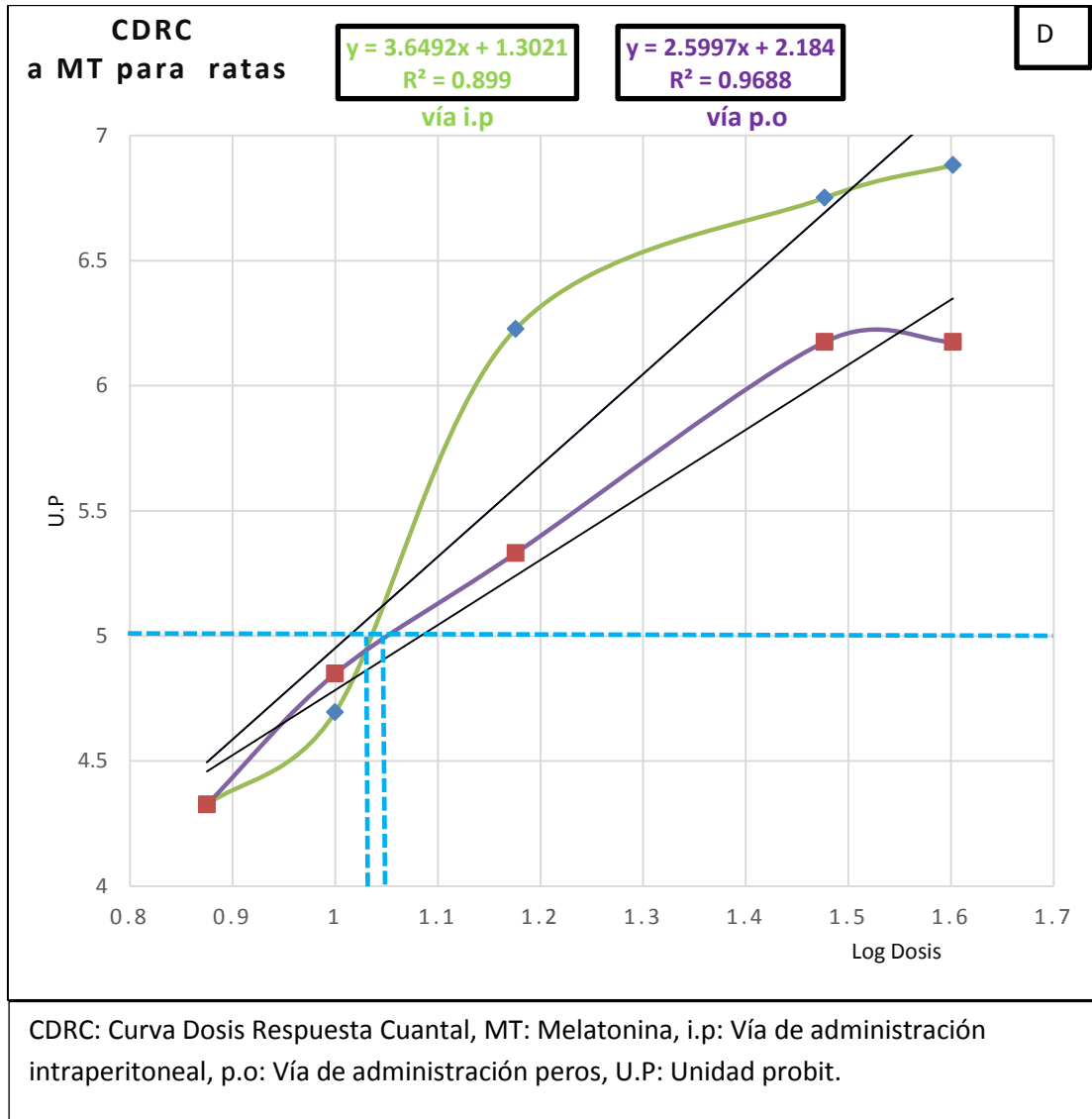
**Grafica 2.** Para el panel B se observa la CDRC de PT para ratas, la ecuación de la recta en color amarillo es para la vía i.p con una  $DE_{50} = 5.3$  mg/kg, la ecuación de la recta en color negro es para la vía p.o con una  $DE_{50} = 7.0$  mg/kg



**Gráfica 3.** En el panel C, se muestra la CDRC de MT para ratones. La primera ecuación en color azul corresponde a la vía i.p con una  $DE_{50} = 6.9$  mg/kg, y la segunda en color rojo corresponde a la vía p.o con una  $DE_{50} = 8.1$  mg/kg.

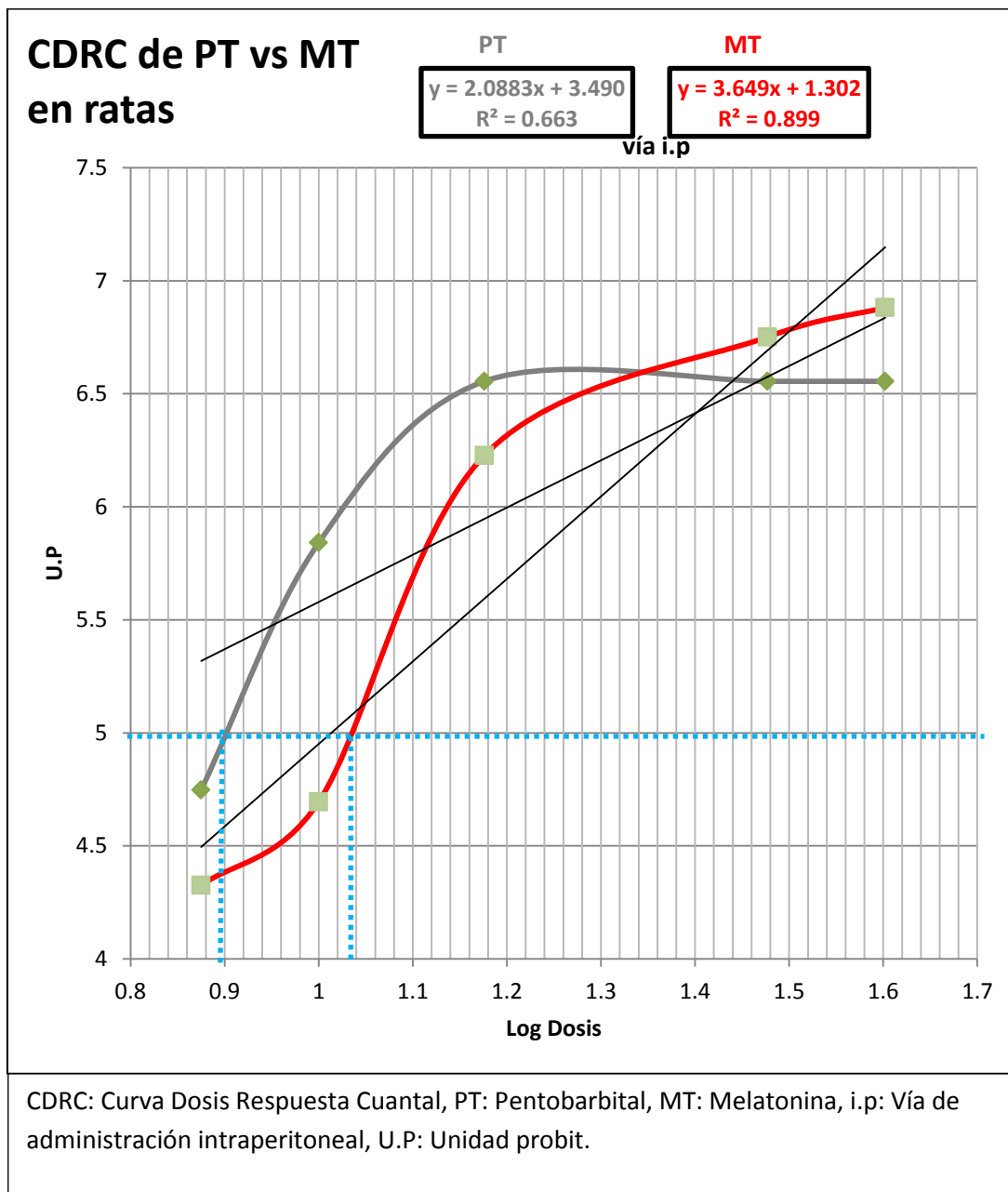


**Grafica 4.** Para el panel D se observa la CDRC de MT para ratas, la ecuación de la recta en color verde es para la vía i.p con una  $DE_{50} = 10.3$  mg/kg, la ecuación de la recta en color morado es para la vía p.o con una  $DE_{50} = 12.1$  mg/kg.

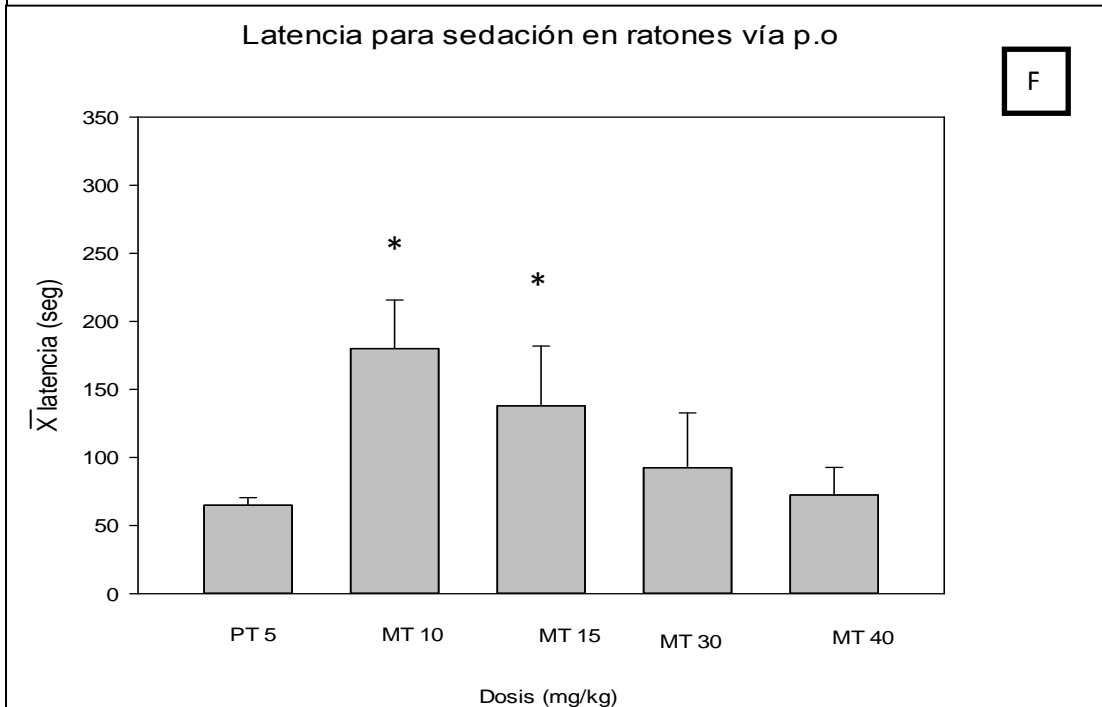
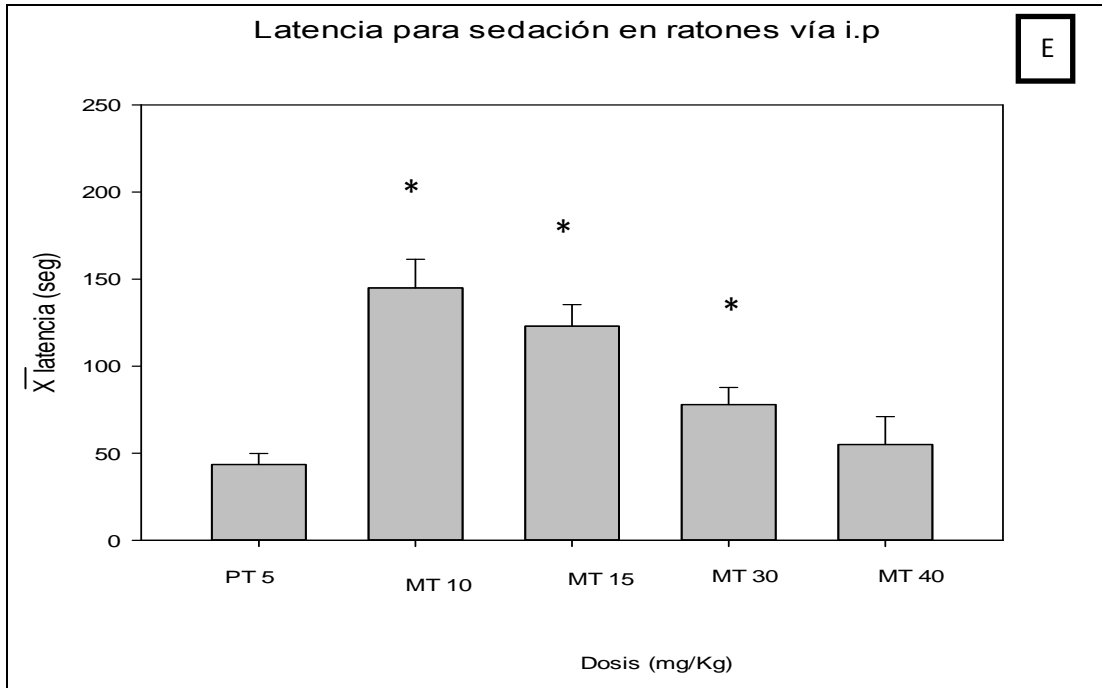


**Gráfica 5.** Comparación de la DE<sub>50</sub> de PT vs DE<sub>50</sub> de MT en ratas por vía i.p.

La primera ecuación en color gris corresponde al PT con una DE<sub>50</sub>= 5.3 mg/kg, y la segunda ecuación en color rojo corresponde a la MT con una DE<sub>50</sub>= 10.3 mg/kg.

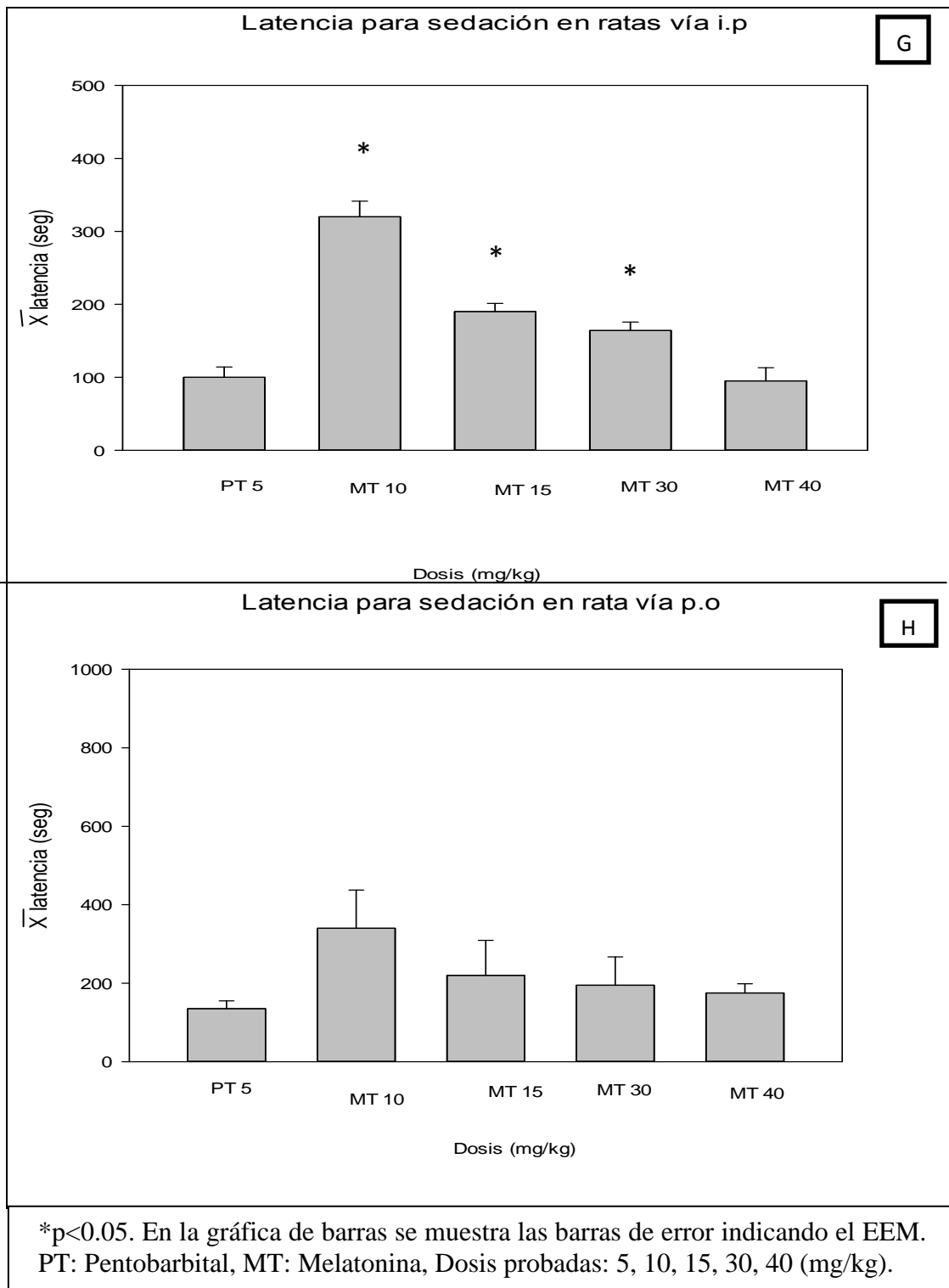


**Gráfica 6.** Se muestra el promedio de la latencia (seg) para sedación en ratones vs la dosis, en el panel E, el efecto de sedación se presentó a las dosis de MT 10, 15 y 30 mg/kg por vía i.p y en el panel F, el efecto de sedación se presentó a dosis de 10, 15 mg/kg por vía p.o,  $p < 0.05$ .



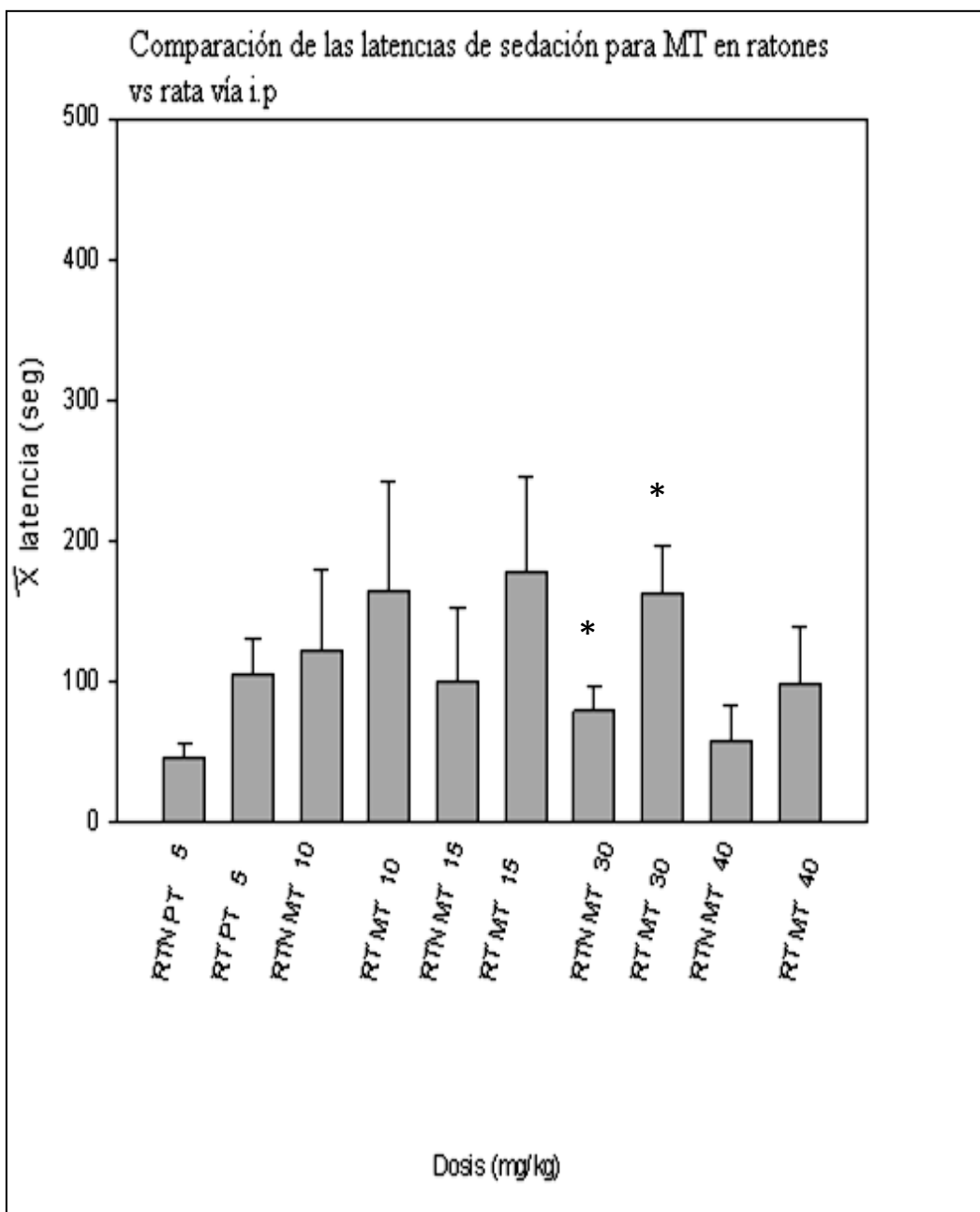
\* $p < 0.05$ . En la gráfica de barras se muestra las barras de error indicando el EEM. PT: Pentobarbital, MT: Melatonina, Dosis probadas: 5, 10, 15, 30, 40 (mg/kg).

**Gráfica 7.** Se presenta el promedio de la latencia (seg) de sedación en ratas vs la dosis; en el panel G, el efecto de sedación se presenta a las dosis de MT 10, 15, 30 mg/kg por vía i.p y en el panel H, se observa que no hay diferencia significativa en la latencia de sedación por vía p.o.



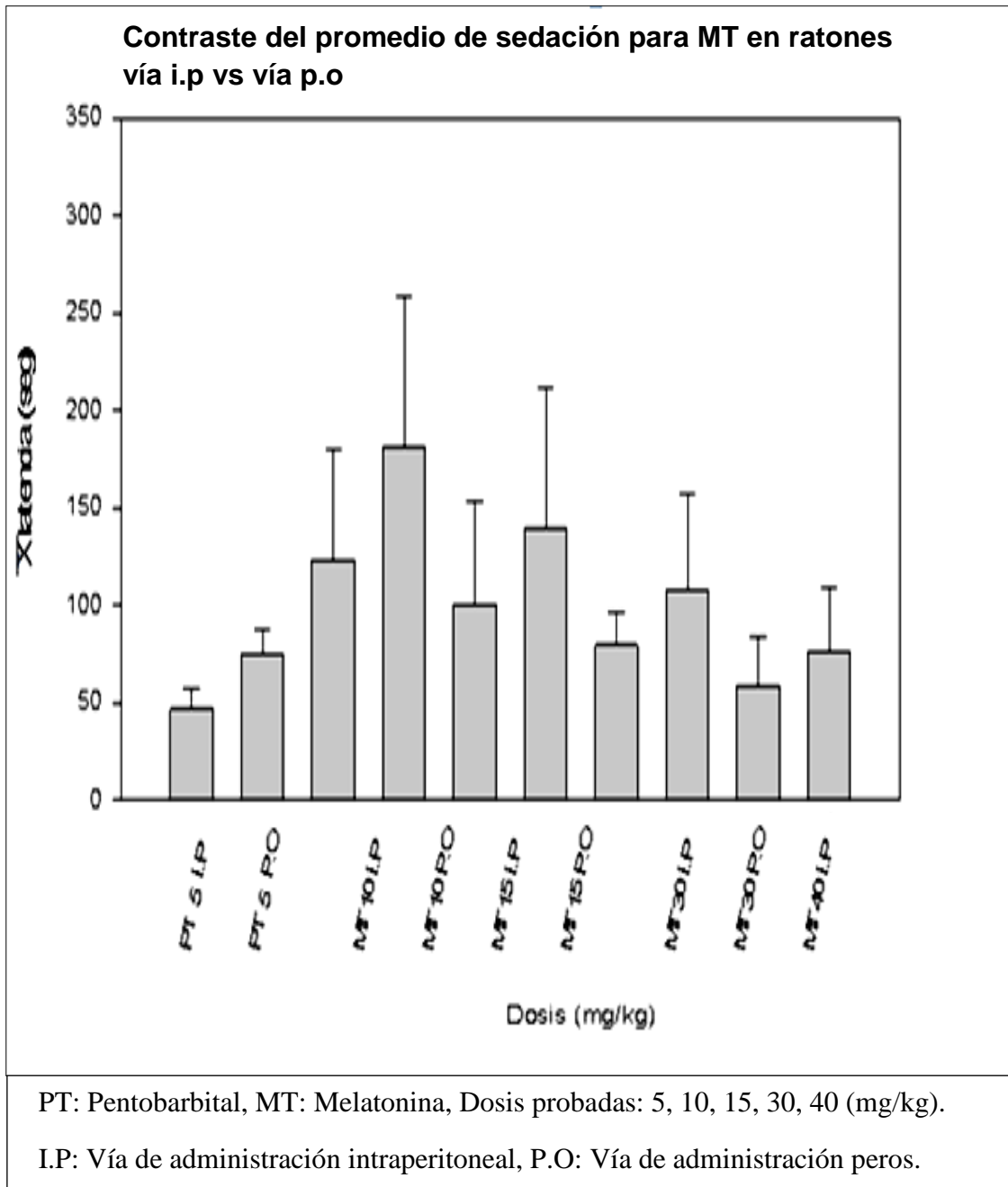


**Gráfica 8.** Se compara el promedio de la latencia de sedación de MT en ratones vs ratas por la misma vía de administración i.p., hay diferencia significativa a la dosis de MT 30 mg/kg  $p < 0.05$ , y por vía p.o no hay diferencia significativa.

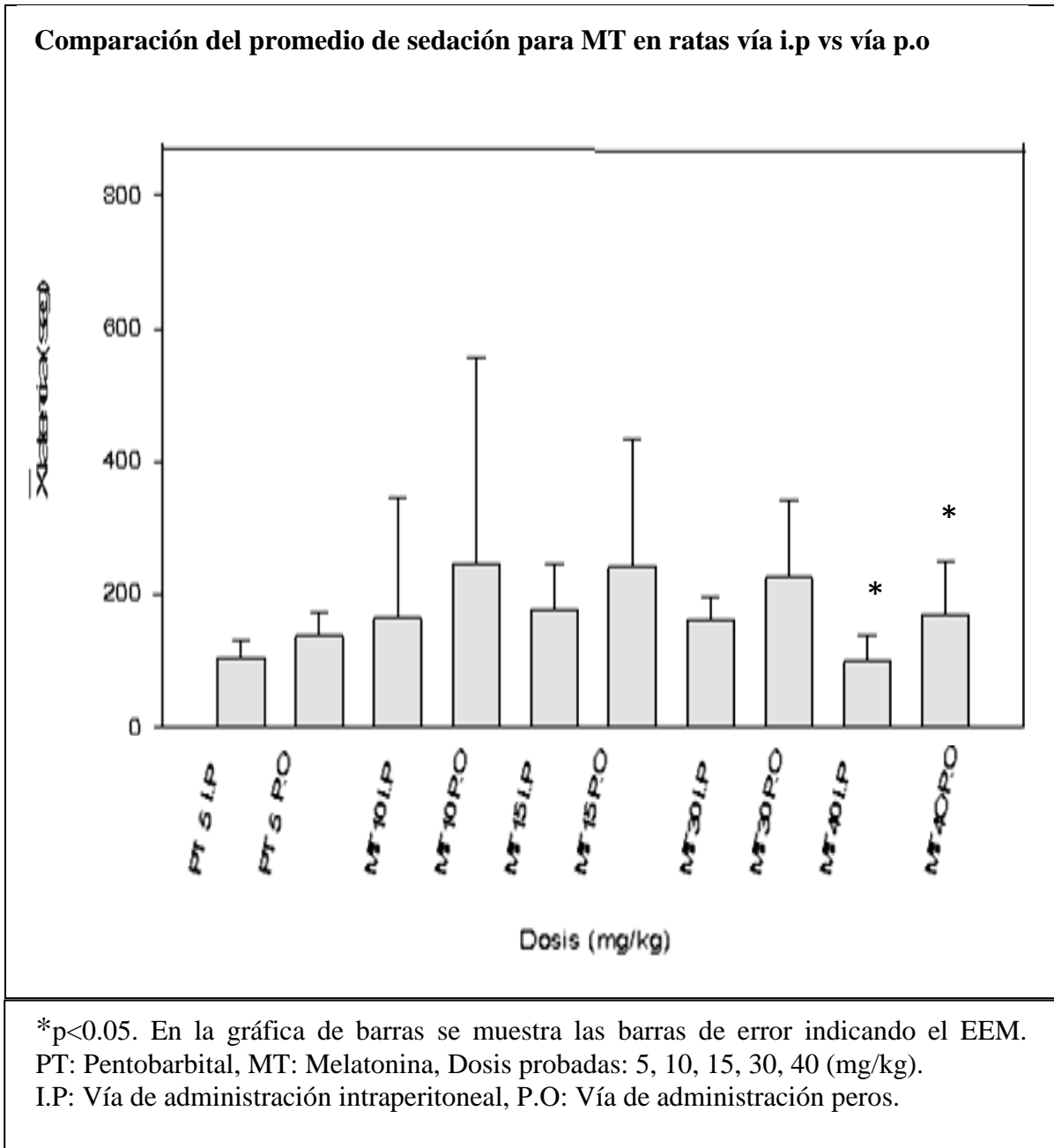


\* $p < 0.05$ . En la gráfica de barras se muestra las barras de error indicando el EEM. RTN: Ratón, RT: Rata, PT: Pentobarbital, MT: Melatonina, Dosis probadas: 5, 10, 15, 30, 40 (mg/kg).

**Gráfica 9.** Se contrasta el promedio de latencia de sedación de MT en ratones por vía de administración i.p vs vía p.o. no hay diferencia significativa para sedación.



**Gráfica 10.** Se compara la latencia de sedación de MT en ratas por vía de administración i.p vs vía p.o hay diferencia significativa en la dosis de 40 (mg/kg)  $p < 0.05$ .



## VII. Discusión de resultados

Una vez realizada la CDRC para sedación con PT se decidió utilizar como control (+) la dosis de 5 mg/kg para ratón y rata, por las vías de administración i.p y p.o esto con el fin de no tener una variabilidad mayor en los datos, para tomar esta decisión se consultó en la literatura donde se encontró que **Gomella T. en 2006, Sheta S. en 2010, Tintinalli J. en 2013,** realizaron estudios en humanos para evaluar el efecto del PT, a dosis 2-6 mg/kg, por vía v.o, i.v, i.m, concluyendo que el PT a las dosis mencionadas actúa como sedante.

Con base a los resultados encontrados la MT produce sedación leve (++) a partir de la dosis de 10 mg/kg en ratón y rata por las vías de administración i.p y p.o, y realizando una revisión en la literatura sobre el efecto que provoca la MT dependiendo de la dosis, se encontró lo siguiente: **Holmes W. en 1982,** realizó un estudio en ratas (160-185 g) con MT administrando vía i.p 10 mg/kg o vehículo, concluyó que la MT a ésta dosis es un agente eficaz para inducir el sueño, ya que produce una reducción significativa en el inicio del sueño. Asimismo **Dollins A. en 1994,** realizó un estudio en 20 voluntarios hombres sanos a dosis 0.1-10 mg vía v.o de MT o placebo, doble ciego, el resultado fue que el efecto sedante de la MT se asoció a una simple prueba de sueño, además de que se encontró que a todas las dosis decrece la latencia de sueño, sin embargo, en nuestro estudio en los ratones y ratas tratados con MT a dosis de 7.5 mg/kg visualmente no se detectó sedación, esto puede ser debido a un error visual de detección, para ello se sugiere el uso de EEG el cual puede ser de gran ayuda, ya que las pruebas eléctricas se destinan a la identificación de las estructuras neurológicas que no son

aparentes mediante la inspección directa. También, como se muestra en la gráfica 7, panel H, no hay diferencia significativa en el promedio de latencia de sedación en ratas vía p.o, debido a que las latencias de sedación son similares entre ellas ( $\bar{x}=203$  seg), la diferencia radica en la latencia de recuperación entre especies y vías de administración, en ratas la latencia de recuperación vía i.p> 60 min y en ratones la latencia de recuperación por vía p.o es aprox 25 min a dosis de 40 mg/kg de MT, es por ello que la mayoría de estudios reportados son en rata. Por lo que se sugiere el uso del actímetro que sirve para medir la actividad motora espontánea mostrada por los animales y con ello poder discernir entre las diferentes dosis de MT si hay diferencia significativa o no en la latencia de sedación.

De igual forma al comparar los resultados de las especies y las vías de administración solo hay diferencia significativa en altas dosis de MT a 30 y 40 mg/kg (Gráficas 8 y 10), esto se puede atribuir a que a mayor dosis, mayor efecto, y en cuanto a la vía de administración la i.p, no sufre el metabolismo del primer paso.

En el mismo sentido **Kurdi S. en 2013**, realizó una revisión en la literatura y encontró, que la premedicación en humanos con MT a dosis 0.05, 0.1 o 0.2 mg/kg por vía sublingual se asocia con la ansiólisis preoperatoria y sedación, sin perjudicar la orientación, habilidades psicomotoras o impacto en la calidad de la recuperación (**Samarkandi A, 2005, Naguib M, 2000**). Igualmente, en un estudio con 75 mujeres, **Naguib y Samarkandi, en 1999** encontraron que los pacientes que recibieron premedicación con 5 mg de MT y 100 min en precirugía tuvieron una disminución significativa en los niveles de ansiedad y aumento en los niveles de sedación, sin amnesia para eventos

pre-operatorios. De la misma manera **Naguib M. en 2006** y Cols., demostraron que la MT por vía oral (0,2 mg/kg) produce pérdida de la conciencia de seres humanos acompañados de un patrón de actividad EEG similar a la observada durante la pérdida inducida por anestésicos por vía intravenosa. Del mismo modo **Fallah R. en 2014**, realizó un estudio con 60 niños de 1 a 8 años quienes requirieron EEG, se separaron en dos grupos, los del grupo 1 recibieron oralmente MT 0.3 mg/kg y los del grupo 2 recibieron 0.75 mg/kg de midazolam, encontrándose que la MT es segura y efectiva en la inducción de la sedación en niños. En el mismo sentido **Patel T. en 2015**, realizó un estudio con el objetivo de evaluar y comparar los efectos de la MT y midazolam por vía oral sobre la ansiedad preoperatoria, y la sedación, además de evaluar las funciones psicomotoras y cognitivas, el estudio lo realizó con 120 pacientes de 16-55 años, cada grupo de 40 pacientes recibió MT, midazolam, y placebo, estos pacientes fueron sometidos a cirugía electiva por lo que requieren anestesia general. Los pacientes del grupo 1, recibieron 0,4 mg/kg de MT, los del grupo 2 recibieron 0.2 mg/kg de midazolam, y los del grupo 3 recibieron tabletas de multivitamínicos los cuales fueron usados como placebo, por vía oral (60-90 min antes de la inducción). El estudio mostró que la MT tiene propiedades sedantes, en comparación con el placebo, pero no fue a la par con el grupo de midazolam. La MT produce suficiente sedación que tranquilizó al paciente e indujo un sueño natural que es muy deseable en comparación con la sedación profunda producida por el grupo de midazolam. Por lo tanto, los pacientes sedados con MT requirieron menos monitorización preoperatoria (sedación leve) que los pacientes sedados con midazolam (sedación

moderada a profunda). La MT fue similar al placebo y no produjo ninguna alteración psicomotora ni en la función cognitiva. De esta misma forma nuestro estudio demuestra que la MT tiene propiedades sedantes, como se observa en la tabla 2, y en la gráfica 5, se requiere aprox el doble de dosis de MT, para producir el mismo efecto sedante que el PT por ambas vías y especies. Considerando los resultados obtenidos en este estudio y extrapolando a la escala propuesta por Salamone sobre los grados de sedación; las dosis probadas de MT se encuentran entre el rango de etapa 3 - 4.

Sin embargo, en estudios realizados por **Capuzzo et al., en 2006**, **Sury M, en 2006**, **Isik B, en 2008**, reportaron que la MT en humanos a las dosis (3-10 mg), por vía oral, no contribuyeron a la sedación.

## **VIII. Conclusiones**

- ❖ La MT a dosis de 10 mg/kg produce una sedación mínima, en ratón y rata por vía de administración i.p y vía p.o.
- ❖ La MT a dosis de 40 mg/kg produce una sedación leve en ratón y rata por vía de administración i.p y vía p.o.
- ❖ No hay diferencia en la latencia de sedación entre especies.
- ❖ Hay diferencia en el tiempo de recuperación de acuerdo a la vía de administración.

## **IX. Perspectivas**

- ❖ Con base al efecto sedante de la MT, podría ser combinada con Benzodicepinas para funcionar como adyuvante anestésico, debido a que la MT potencializa el efecto de las benzodicepinas por lo que requeriría menor cantidad de fármaco para producir sedación.



## X. Bibliografía

**Aguilar C**, López J, Efectos de la morfina sobre la actividad motora en ratones macho, *Psicothema*, 1997. Vol. 9, nº 1, pp. 27-32.

**Aldhous M.**; Franey C.; Wright J. y Arent J. Plasma concentrations of melatonin in man following oral absorption different preparations. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* 19:517-521. 1985.

**Alonso R.** La glándula pineal. En: *Fisiología Humana* Eds.: Tresguerres J.A.F. Aguilar E.; Cachofeiro M.V. y cols. Mc Graw-Hill. Interamericana. 1999. pp. 891-901.

**Arendt J.** Melatonin and the mammalian pineal gland. Ed. Arent J. Chapman and Hall. 1995. 1-5.

**Arlachov Y**, Ganatra RH. Sedation/anaesthesia in paediatric radiology. *Brit. J Radiol.* 2012; 85: 1019.

**Benitez G.** "Melatonina: una hormona inteligente" Melatonina: un destello de vida en la oscuridad, fondo cultura económica, 2008, pp. 35-45.

**Bertoglio LJ**, Carobrez AP. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005; 29: 8: 1193-205.

**Bloomfield E**, Masaryk TJ, Caplin A, Obuchowski NA, Schubert A, Hayden J, et al. Intravenous sedation for MR imaging of the brain and spine in children: Pentobarbital versus propofol. *Radiol.* 1993; 186: 93–7.

**Bonetti E.** Benzodiazepine Antagonist. Neurological and Behavioral Effects. *Psychopharmacol* 1982; 78: 8-18.

**Cahill G.M.** y Besharse J.C. Retinal melatonin in metabolized within the eye of *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 1098-1102. 1989.

**Capuzzo M**, Zanardi B, Schiffino E, Buccoliero C, Gragnaniello D, Bianchi S, et al. Melatonin does not reduce anxiety more than placebo in the elderly undergoing surgery. *Anaesth Analg.* 2006; 103: 121–3.

**Chen Q**, Fichna J, Bashashati M, Li Y-Y, Storr M. Distribution, function and physiological role of melatonin in the lower gut. *World J. of Gastroenterol.: WJG.* 2011; 17: 34: 3888-3898.

**Costello R**, Lentino CV, Boyd CC, et al. The effectiveness of melatonin for promoting healthy sleep: a rapid evidence assessment of the literature. *Nutrition J.* 2014; 13: 106.

**Dollins A**, et al. Effect Inducing Nocturnal Serum Melatonin Concentrations in Daytime on Sleep, Mood, Body Temperature, and Performance. National Academy of Sciences of United States of America, Vol. 91, No. 5, 1994, 1824-1828.

**Domínguez A**, Samimi S, González P, Kaski J. Melatonina y aterosclerosis coronaria. Clin e Invest en arterioscl, 2009, 27: 05: 247-256.

**Doyle L**, Colletti J. Sedación y analgesia en los procedimientos pediátricos. Pediatr Clin N Am 53. 2006. 279 – 292.

**Dubocovich M.L.**, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals Endocrine, 27. 2005. pp. 101–110.

**Dubocovich ML**, Delagrange P, Krause DN, Sugden D, Cardinali DP, Olcese J. International Union of Basic and Clin Pharmacol LXXV. Nomenclature, Classification, and Pharmacol of G Protein-Coupled Melatonin Receptors. Pharmacol Review 2010; 62: 3: 343-380.

**Fallah R**, Yadegari Y, Behdad S, AkhavanKarbasi S. Melatonin and intravenous midazolam administered orally in drug induced sleep electroencephalography of children: randomized clinical trial of efficacy. Arch Iran Med. 2014 Nov; 17: 11: 741-5.

**Farkas S**, Berzsenyi P, Kárpáti E, Kocsis P, Tarnawa I. Simple pharmacological test battery to assess efficacy and side effect profile of centrally acting muscle relaxant drugs. J Pharmacol Toxicol Methods. 2005 Sep-Oct; 52: 2: 264-73.

**Fischer T.W.**, Slominski A., Tobin D.J., Paus R. Melatonin and the hair follicle J. Pineal Res., 44. 2008. pp. 1–15.

**Gaitán M**, Rondón A. Eficacia de la melatonina en insomnio primario en el adulto mayor, Escuela de Ciencias de la Salud. Bogotá 2015.

**Gomella T**. Medicamentos de uso común. Neonatología. 5ª. Ed. Panamericana, 2006, p.705.

**Goodman & Gilman**. Hipnóticos y sedantes. Manual de Farmacología y terapéutica, 2da. ed. Mc Graw Hill, 2008, p. 280.

**Guerrero J**. La melatonina. Investigación y ciencia, 2007.

**Holmes S**, Sugden D. Effects of melatonin on sleep and neurochemistry in Br. J. Pharmacol. 1982; 76: 1: 95-101.

**Illnerova H.**; Backstrom M.; Saaf J.; Wetterberg L. y Vangbo B. Melatonin in rat pineal gland and serum: rapid parallel decline after light exposure at night. Neurosci. Lett. 9: 189-193. 1978.

**Ionescu D**, Badescu C, Ilie A, Miclutia I, Iancu C, Ion D, et al. Melatonin as pre medication for laparoscopic cholecystectomy: A double blind, placebo controlled study. *South. African J. of Anesth. And Analg.* 2008; 14: 8–11.

**Isik B**, Baygin O, Bodur H. Premedication with melatonin vs midazolam in anxious children. *Paediatr Anesth.* 2008; 18: 635–41. 22.

**Ismail S**, Mowafi HA. Melatonin provides anxiolysis, enhances analgesia, decreases intraocular pressure, and promotes better operating conditions during cataract surgery under topical anesthesia. *Anesth Analg.* 2009; 108: 1146–51.

**Kopin I.J.**; Pare C.M.B.; Axelrod J. y Weissbach H. The fate of melatonin in animals. *J. Biol. Chem.* 236: 3072-3073. 1961.

**Kurdi S**, Madhuri S, and Tushar Patel. “The Role of Melatonin in Anesth. and Critical Care.” *Ind. J. Anesth.* 57.2. 2013: 137–144.

**Lobato A**. La melatonina más allá del ritmo circadiano, Universidad de Valladolid, 2015.

**Lerner A.B.**, Case, J.D., Takahashi, Y., Lee, T.H. and Mori, N. 1958. Isolation of melatonin, pineal factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.* 80: 2587-2595.

**Marseglia L**, D’Angelo G, Manti S, et al. Analgesic, Anxiolytic and Anesthetic Effects of Melatonin: New Potential Uses in Pediatrics. Haenen GRMM, ed. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16: 1: 1209-1220.

**Mendoza N**. Factores que determinan el efecto del fármaco. *Farmacología médica*. Ed. panamericana, 2008, p.127 y pp. 303-311.

**Meilán, María L**. Libro electrónico de anestesiología, reanimación y tratamiento del dolor. Anestesia para la cirugía de la epilepsia, parte I. Junio 2000. <http://www.uam.es/departamentos/medicina/anesnet/forconred/neuro/epilepsia/epilepsia1.htm>

**Naguib M**, Samarkandi AH. La premedicación con melatonina: Una comparación de doble ciego, controlado con placebo con midazolam *Br J Anesth.* 1999; 82: 875-80.

**Naguib M**, Samarkandi AH. The comparative dose-response effects of melatonin and midazolam for premedication of adult patients: A double blinded, placebo controlled study. *Anesth Analg.* 2000; 91: 473–9.

**Naguib M**, Samarkandi AH, Moniem MA, Mansour anguila-D, Alshaer AA, Al-Ayyaf HA, et al. Efectos de la melatonina sobre la premedicación del

propofol y curvas dosis-respuesta de inducción de tiopental: Estudio doble ciego aleatorizado *Anesth Analg* 2006; 103: 1448-1452.

**Navarrete A**, Medina L, Balderas J. Determinación experimental de la dosis efectiva 50 sedante en ratones. *Farmacología 1*, Guion de prácticas, Universidad Autónoma de México, Facultad de Química, 2007, pp.29-32.

**Nosjean O.**, Nicolas J.P., Klupsch F., Delagrangre P., Canet E., Boutin J.A. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2, *Biochem. Pharmacol.*, 61. 2001. pp. 1369–1379.

**Pandi S.R.**, Trakht I., Srinivasan V., Spence D.W., Maestroni G.J., Zisapel N., Cardinali D.P. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways, *Prog. Neurobiol.*, 85. 2008. pp. 335–353.

**Patel T**, Kurdi MS. A comparative study between oral melatonin and oral midazolam on preoperative anxiety, cognitive, and psychomotor functions. *J. Anaesth Clin Pharmacol.* 2015; 31: 1: 37-43.

**Pellow S**, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Meth.* 1985 Aug; 14: 3: 149-67.

**Pintor J.**, Martin L., Pelaez T., Hoyle C.H., Peral A. Involvement of melatonin MT(3) receptors in the regulation of intraocular pressure in rabbits. *Eur. J. Pharmacol*, 416 .2001. pp. 251–254.

**Remington A.** Sedantes e hipnóticos. *Farmacología*. 20ª Ed. Panamericana. 2008. p. 1682.

**Reppert S.M.**, Weaver D.R., Ebisawa T., Mahle C.D., Kolakowski L.F. Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary, *FEBS Lett.*, 386.1996. pp. 219–224.

**Rivera L**, Medina R, Castañón P, Pérez C. Efecto sedante del midazolam genérico vs innovador en ratas Wistar. *Acta Pediatr Mex* 2015; 36: 434-441.

**Rufo M.** Melatonina y epilepsia. *NEUROLOGÍA* 2002; 35: S51-S58.

**Salazar M**, Peralta C, Pastor F. Barbitúricos. *Tratado de psicofarmacología*. 2da. Ed. Panamericana, 2009, p. 374.

**Samarkandi A**, Naguib M, Riad W, Thalaj A, Alotibi W, Aldammas F, et al. Melatonin vs. midazolam premedication in children: A double blind, placebo-controlled study. *Eur J Anesth.* 2005; 22: 189–96.

**Serrano V**, Estudio observacional del uso de midazolam genérico en el Instituto Oncológico Nacional de Panamá, para la sedación consiente en

pacientes sometidos a gastroscopia. Universidad Autónoma de Barcelona, 2005, p.15.

**Sheta S**, Procedural sedation analgesia. Saudi J. Anaesth. 2010; 4: 1: 11-16.

**Slominski A.**, Tobin D.J., Zmijewski M.A., Wortsman J., Paus R. Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions, Trends Endocrinol. Metab., 19. 2008. pp. 17–24.

**Slominski RM**, Reiter RJ, Schlabritz - Loutsevitch N, Ostrom RS, Slominski AT. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. Mol Cell Endocrinol. 2012 Apr 4; 351: 2: 152-66.

**Srinivasan V**, Lauterbach EC, Ho KY, Acuña-Castroviejo D, Zakaria R, Brzezinski A. Melatonin in antinociception: its therapeutic applications. Curr Neuro pharmacol. 2012;10: 2: 167-78.

**Sury M**, Fairweather K. The effect of melatonin on sedation of children undergoing magnetic resonance imaging. Br J Anesth. 2006; 97: 220–5.

**Tintinalli J**. “Sedación y analgesia”. Medicina de urgencias, 7ª. Ed. Mc Graw Hill 2013, p. 288.

**Valdivielso A**. Dolor agudo, analgesia y sedación en niño: Detección y valoración. An Esp Pediatr 1998; 48: 81-88.

**Van G**, Korzilius HPLM, Smits MG. The Use of Exogenous Melatonin in Delayed Sleep Phase Disorder: A Meta-analysis. Sleep. 2010; 33: 12: 1605-1614.

**Velasco A**. Benzodiacepinas. Compendio de psiconeurofarmacología. Ed. Díaz de Santos,1988, p.82.

**Velázquez L**. Sistema Nervioso Central. Farmacología Básica y Clínica.18ª Ed. Panamericana. 2008. pp.196-197.

**Waldhauser F**, Weiszenbacher G, Tatzer E, Gisinger B, Waldhauser M, Schemper M. Alterations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging. J Clin Endocrinol Metab 1988;66: 648-52.

**Wurtman R. J**. “Melatonin as a Hormone in Humans: A History.” The Yale J. Biol. and Medicine 58.6.1985: 547–552.

## **XI Anexos**

**Anexo 1.** Tabla de conversión de proporción ( $p_i$ ) a unidades probit ( $y_i$ ) (Navarrete A, 2007).

Tabla de conversión de proporción ( $p_i$ ) a unidades probit ( $y_i$ )

$p_i$	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09
0.00	---	2.673	2.945	3.119	3.249	3.355	3.445	3.524	3.595	3.659
0.10	3.718	3.773	3.825	3.874	3.920	3.964	4.006	4.046	4.085	4.122
0.20	4.156	4.194	4.228	4.261	4.294	4.326	4.357	4.388	4.417	4.447
0.30	4.476	4.505	4.532	4.561	4.588	4.615	4.642	4.669	4.695	4.721
0.40	4.747	4.773	4.798	4.824	4.849	4.874	4.900	4.925	4.950	4.975
0.50	5.000	5.025	5.050	5.075	5.100	5.125	5.151	5.176	5.202	5.227
0.60	5.253	5.279	5.305	5.331	5.358	5.385	5.412	5.439	5.467	5.495
0.70	5.524	5.553	5.582	5.612	5.643	5.674	5.706	5.739	5.771	5.806
0.80	5.841	5.878	5.915	5.954	5.994	6.036	6.080	6.126	6.175	6.227
0.90	6.282	6.341	6.405	6.476	6.555	6.645	6.751	6.881	7.054	7.327

$p_i$	0.000	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.007	0.008	0.009
0.97	6.88	6.896	6.911	6.927	6.944	6.960	6.978	6.996	7.014	7.034
0.98	7.054	7.075	7.097	7.121	7.145	7.171	7.198	7.227	7.258	7.291
0.99	7.327	7.366	7.409	7.458	7.513	7.576	7.652	7.748	7.879	8.091

Anexo 2. Carta del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL).



FACULTAD DE QUÍMICA  
COMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO  
Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO  
OFICIO/FQ/CICUAL/130/16  
ASUNTO: Aprobación de Protocolo

**DRA. ELIA BROSLA NARANJO RODRÍGUEZ**  
**FARMACIA**  
*Presente*

Por medio de la presente le informamos que el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química, UNAM, ha revisado el Protocolo con el título:

**"Síntesis de derivados 1-N sustituidos de melatonina como potenciales agentes ansiolíticos."**

**No. de animales empleados en el estudio:** 42 ratones machos ICR  
42 ratas machos Wistar

Emitiendo el dictamen de: **APROBADO**

**Con una vigencia de:** 1 año posterior a la fecha de aprobación.

Sin más por el momento le enviamos un cordial saludo.

Atentamente  
*"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"*  
Ciudad Universitaria, Ciudad de México a 08 de Marzo del 2016

**M. en C. Ma. Isabel Gracia Mora**  
**Presidenta del CICUAL**

C.c.p. Dr. Jorge Vázquez, Director de la FQ.  
C.c.p. Dr. Felipe Cruz, Secretario Académico de Investigación y Posgrado, FQ.  
C.c.p. H. Consejo Técnico FQ.  
C.c.p. Comisión de Seguridad e Higiene, FQ.  
C.c.p. Mtra. Patricia Santillán, Secretaria Administrativa, FQ.  
C.c.p. Expediente CICUAL.