

49
205



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**



**“ANALISIS DE LAS ACCIONES ANSIOLITICAS DE LA
MELATONINA EN RATA”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

VICTOR MENDOZA FERNANDEZ

DIRECTOR INTERNO: Q. F. B. MARICELA NOE MARTINEZ

DIRECTORES EXTERNOS: DR. EN C. CRUZ REYES VAZQUEZ

DRA. EN C. ELIA BROSILA NARANJO RODRIGUEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

C O N T E N I D O

CAPITULO	PAGINA
Prólogo	1
I. Introducción	3
II. Planteamiento del problema	28
Objetivo	29
Hipótesis	29
III. Material y Método	30
IV. Resultados	36
V. Discusión y Conclusiones	45
VI. Referencias	49

Prólogo.

Quizá la alteración psicológica más frecuente en los seres humanos es la ansiedad. Esta alteración es percibida como una experiencia consciente, que se caracteriza por la presencia de un temor intenso, preocupante y de origen interno, provocando amplios cambios fisiológicos (37).

Con el propósito de aliviar este padecimiento, se han desarrollado sustancias capaces de modificar los efectos producidos por la ansiedad. Para el análisis farmacológico de tales sustancias se utilizan varios modelos de tipo conductual, los cuales simulan situaciones de conflicto y ansiedad en animales experimentales. Cuando el fármaco es capaz de reducir o controlar dicho cuadro, éste se considera como ansiolítico.

En los últimos años las benzodiazepinas, fármacos con acciones sobre los sistemas GABAérgicos cerebrales, han mostrado una gran eficacia en el tratamiento de ansiedad, angustia y depresión (46). Por esta razón son considerados como fármacos ansiolíticos clásicos, que sirven de patrón de referencia para los nuevos compuestos con posibles acciones ansiolíticas (33).

Sin embargo, desde un punto de vista clínico, el uso prolongado de las Benzodiazepinas produce muchos efectos secundarios, algunos de ellos severos, los cuales incluso ponen en peligro la existencia del individuo. Por tal motivo, diversos grupos de investigadores se han dado a la tarea de obtener sustancias ansiolíticas con efectos secundarios mínimos.

Tal es el caso de la Buspirona (55), un nuevo fármaco ansiolítico con un mecanismo de acción diferente al de las

Benzodiazepinas, dicha sustancia es un antagonista de los receptores 5-HT_{1A} serotoninérgicos (28,66).

Por otro lado, la Melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina, hormona secretada por la glándula pineal, cuyo principal sitio de acción es el Sistema Nervioso Central (SNC), provoca efectos conductuales muy similares a los inducidos por las Benzodiazepinas, como la sedación, la sensación de bienestar, la hipnosis y en animales experimentales y humanos ejerce efectos anticonvulsivos, además de que incrementa la unión estereoespecífica del GABA a sus sitios de acción cerebral (1,21,45,36,49).

Con base en estos antecedentes, se sugiere que la Melatonina puede también mostrar acciones ansiolíticas similares a las provocadas por las Benzodiazepinas. Para analizar tal sugerencia, en el presente trabajo utilizamos un modelo de ansiedad conocido como Nado Forzado y realizamos un estudio comparativo entre la Melatonina, 2 Benzodiazepinas (Diazepam y Clorodiazepóxido) y la Buspirona.

CAPITULO I: Introducción.

1.1 Aspectos Históricos de la Glándula Pineal.

La existencia de la glándula pineal es conocida desde la más remota antigüedad; sin embargo, su función es aún enigmática en muchos aspectos. A través de la historia se le han asignado funciones muy variadas; así para los Hindues la pineal constituía el órgano de la clarividencia, la meditación y la tranquilidad. Los griegos le asignaron una función relacionada con la capacidad de pensar. Para ellos, la pineal constituía un órgano regulador del "fluido vital", formando parte del origen de los pensamientos (79).

En el siglo XVII (1664) el filósofo francés René Descartes, definió a la glándula pineal como : "el lugar donde se asienta el alma, ejerciendo el control sobre el cuerpo y regulando la circulación de los pensamientos que provienen y se dirigen al cerebro" (60,79).

En el transcurso del siglo XIX y principios del siglo XX, las investigaciones microscópicas de la pineal, se acompañaron de observaciones clínicas y de estudios experimentales. Así, en 1905 Studnicka (30) menciona que la glándula pineal requiere de tres células importantes para su función. Este autor describe que una de ellas tiene mucha semejanza con las células fotorreceptoras de los ojos laterales de algunos reptiles (31). Tal analogía también está presente en los mamíferos (32).

Por su parte McCord y Allen en 1917 describieron el efecto aclarador sobre la piel de anfibios que ejercen algunos extractos

provenientes de la pineal de bovinos (52). Posteriormente Rowan en 1925, analizó el efecto de estos mismos extractos sobre la conducta cíclica de algunas especies de aves (30).

Los resultados de estos estudios mostraron la importancia farmacológica y endócrina que ésta glándula posee, y puntualizaron su relación con las variaciones cíclicas ambientales, particularmente con el fotoperíodo (ciclo luz/obscuridad), así como su relación con la actividad reproductora de algunas especies (57).

Las acciones de la glándula pineal son ejercidas a través de compuestos químicos (hormonas) secretadas en relación al patrón fotoperiódico y de las cuales la más estudiada es la Melatonina (60). El término Melatonina fue implementado por Lerner y Case en 1957, para designar al extracto de la pineal que produce el aclaramiento de la piel de los anfibios, por su acción directa sobre los melanóforos (16,79). En 1958, estos mismos autores determinaron la estructura química de la Melatonina. En 1960, Kappers después de un amplio estudio anatómico concluye que la pineal es un órgano neuroendócrino-sensitivo, al describir la innervación que el ganglio simpático cervical superior establece con la glándula pineal en animales superiores, señalándolo como el único puente de información entre la glándula y el resto del SNC (22,30,41).

En el mismo año Bagnara (16) mostró que en los anfibios la glándula pineal es estimulada por la oscuridad para producir la Melatonina. Tales hallazgos servirían de base para que Fiske propusiera el modelo de transductor fotoneuroendócrino para la

pineal (79).

Posteriormente, en 1962 Dodt y Heerd fueron los primeros en mostrar en forma directa la relación entre la actividad funcional de la glándula y la cantidad de luz presente en el medio ambiente (16,30). Un año después Wurtam, mostró que la pineal secreta no sólo una, sino toda una familia de hormonas (indoles y péptidos) (22,59).

Estudios más recientes (39,40) fundamentados en la información proveniente de trabajos de autores como Romijn (31,63), implican a la Melatonina en la actividad funcional de muchos órganos y sistemas, tanto endócrinos como neurales, mostrando que los estímulos estresantes alteran la producción de Melatonina, al incrementar la actividad de las enzimas que participan en su síntesis (39,40,69). Sin embargo, el mecanismo de acción que juega la pineal no está aún definido, se ha sugerido que la Melatonina, podría ser considerada como una hormona antiestrés en ciertas situaciones de conflicto (49,60). Así Rivest en 1978 y Milline en 1980, consideraron a la glándula pineal como "un modulador de las reacciones fisiológicas de defensa y de adaptación al síndrome del estrés" (39,63).

1.2 Aspectos Anatómicos de la Glándula Pineal.

La glándula pineal muestra variaciones anatómicas, morfológicas y funcionales de acuerdo a la especie, el sexo, la edad y el período ambiental fótico-térmico en que se estudie (16,23,30,59); así, la pineal en vertebrados inferiores interactúa de manera casi directa con la luz, ya que en estos animales; se encuentra inmediatamente por debajo de un adelgazamiento óseo del cráneo, el que permite el paso de la luz. En contraste, en los animales superiores no existe una disposición anatómica similar, aunque su actividad bioquímica está modulada por la cantidad de luz ambiental percibida a través de los ojos frontales.

Desde un punto de vista ontogénico, la glándula pineal se origina de una invaginación del diencéfalo y al igual que los ojos laterales, su origen es de tipo neuroepitelial (8,31). En los vertebrados inferiores, más que hablar de una sola glándula pineal, deberíamos de hablar de un sistema pineal, ya que ésta se encuentra asociada con otros órganos pineales (16,59,79). Contrariamente, en los vertebrados superiores el sistema pineal comprende únicamente a la glándula pineal (22).

En el hombre la glándula pineal, conocida también como Epiphysis cerebri, se localiza en la región telencefálica-diencefálica caudal, considerada como el techo del cerebro, cerca de la porción terminal posterior del tercer ventrículo, debajo del extremo posterior del cuerpo calloso, además está unida por un tallo a la comisura posterior y habenular (24,30,38). A simple vista, la glándula es un cuerpo aplanado cónico, cubierto por la piamadre, sostenido por numerosos tabiques de tejido

pineal de humanos, ésta muestra una gran inervación e irrigación (22,38,41) Fig. 2.

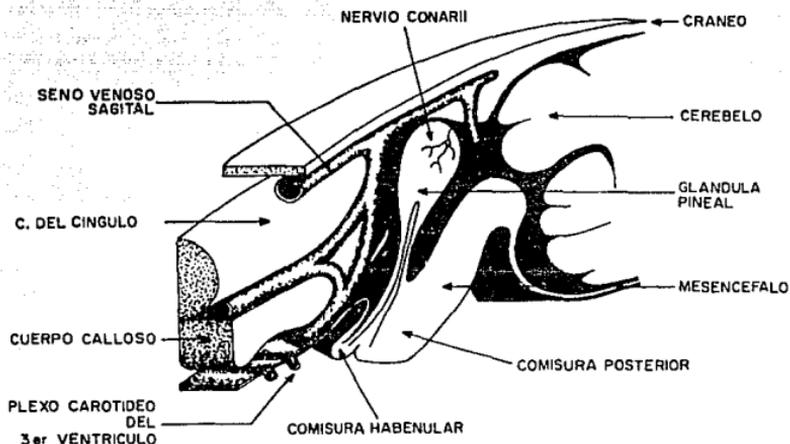


Fig 2. Esquema que representa el corte longitudinal del cerebro de rata que muestra las relaciones anatómicas de la GP con otras estructuras (22).

Su única entrada nerviosa ocurre a través del ganglio simpático cervical superior del que se originan los nervios conarios, los cuales inervan en forma exclusiva a la pineal (57). Dicho ganglio es de tipo adrenérgico, cuyo neurotransmisor liberado es la Noradrenalina (41,69,73). El concepto de órgano fotoneuroendócrino implica una entrada nerviosa con información fótica y una salida hormonal a través de la vía sanguínea (3,12,13,39).

1.3 Aspectos Funcionales de la Glándula Pineal.

La pineal como un elemento fotoneuroendócrino mantiene en constante comunicación a los organismos con las condiciones fóticas ambientales, regulando mediante la síntesis de Melatonina; sistemas como el nervioso y el endócrino (24). Actualmente a la Melatonina se le considera como un sincronizador biológico, por lo que ésta glándula constituye un órgano necesario para la adaptación de varios organismos a las condiciones del medio ambiente (31). Dentro de las funciones que se le atribuyen a la glándula pineal, las más ampliamente descritas son las relacionadas con la actividad reproductora en algunas especies no mamíferas y mamíferas (principalmente en hámster y carnero) (57), en la termoregulación y cambios de coloración en animales de sangre fría (16) y en ritmos circadianos de conductas de actividad/reposo (actividad locomotriz) en ciertas especies de animales (23,60,73).

Todas las funciones señaladas anteriormente, se relacionan con la actividad de los períodos de luz y oscuridad (73,79). Así la actividad hormonal de la glándula depende de un mensaje fótico que recibe a través del ganglio simpático cervical superior y posiblemente de otras señales hormonales que recibe por medio de su amplia vascularización (22,41).

El principal sitio donde la Melatonina ejerce sus efectos es el SNC, particularmente el hipotálamo anterior, el que se considera como el principal reloj biológico presente en los mamíferos (41,61). Tiene también efecto sobre la hipófisis donde estimula la producción y liberación de varios factores liberadores de hormonas como: el

factor liberador de la hormona luteinizante, factor de liberación de la hormona folículo estimulante y sobre los factores de liberación e inhibición de prolactina (52,58,59). Otra glándula sobre la que tiene efecto, es la tiroides al inhibir la producción principalmente de tiroxina (T_3) y de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) (76).

En muchas especies, la reproducción es una de las funciones estacionales, subordinada a la duración de la iluminación, a la que corresponde una cierta duración de la secreción nocturna de Melatonina (3,30). En los mamíferos los datos más completos se han analizado en carnero y hámster, donde la pinealectomía conduce, a largo plazo; una desincronización de la actividad reproductora en relación al ciclo anual del entorno. Además la administración "ad hoc" de Melatonina en éstos animales, permite restaurar el ciclo estacional de la reproducción (58,79). En ciertas especies no mamíferas la pinealectomía puede provocar una reducción en el peso de las gónadas y de la producción de las células sexuales (efecto antigonadótropico), también puede tener el efecto inverso (efecto progonadótropico), según la especie considerada pueden observarse uno u otro o ambos efectos, datos todavía bastante someros (57,60,73).

En el caso del hombre, la asociación entre la pineal y la actividad sexual, se sugirió cuando a fines del siglo pasado, se mostró que la pubertad precoz se asocia con tumores de la pineal. Durante mucho tiempo se ha considerado que la pineal es el órgano que determina el inicio de la pubertad en los humanos, sin embargo; esto no es aceptado en forma definitiva (13). En las mujeres, se muestran

variaciones de los niveles de Melatonina muy relacionado con el ciclo hormonal. Así, los niveles más bajos de la hormona ocurren durante la ovulación, con una caída brusca de los niveles 24 horas antes de que ésta ocurra, y los niveles más altos durante la menstruación. En la etapa de la gestación humana, también los niveles de Melatonina muestran un aumento importante que sugiere que ésta hormona participa en el inicio del trabajo de parto (53).

Además de sus efectos sobre la endocrinología de la reproducción, la Melatonina influye inhibiendo la acción de la hormona adrenocorticotrófica (58).

El papel ejercido por la pineal y la Melatonina en el ritmo de cambio de coloración ha sido objeto de numerosas investigaciones (24,52). Recientemente, Binkley (24) y sus colaboradores han mostrado que el cambio de coloración en la piel del camaleón se debe a la liberación de Melatonina (más oscuro en la noche y más claro en el día), así también que la ablación de la pineal suprime el cambio nocturno de coloración. El complejo pineal ejerce igualmente su influencia en el control de la temperatura corporal o termoregulación (16). Para elevar su temperatura corporal, los lagartos aprovechan los recursos térmicos del entorno por medio de cambios de postura; orientación del cuerpo, etc. (30,57). La ablación de su órgano parietal se acompaña de comportamientos inadaptados que se traducen en un aumento excesivo de la temperatura corporal (73).

El modo de acción de la pineal sobre el ritmo circadiano de la actividad locomotriz ha sido estudiada sobretodo en algunas especies no mamíferas, este ritmo persiste en las condiciones de aislamiento

temporal con una duración cercana de 24 horas (60). En ciertas especies colocadas en obscuridad continua, la ritmicidad desaparece tras la ablación de la glándula, lo que sugiere un oscilador intrapineal que dirige un mensaje a ciertos centros nerviosos implicados en la ritmicidad de la actividad (73).

Por otra parte el incremento en la concentración de catecolaminas encontradas en sangre, posteriores a estímulos estresantes, siempre se acompañan de un incremento en las concentraciones de Melatonina (12,26,63). Estos efectos sugieren que la Melatonina podría revertir aquellas alteraciones hormonales provocadas por el estrés (18,34,40), lo que haría de ella una "glándula tranquilizadora" además de su efecto sincronizador y estabilizante (39,63). La administración de Melatonina a ratas pinealectomizadas produce una reducción significativa en los efectos producidos por estímulos estresantes, tales como la inmovilización y el frío (34,39).

Neurológicamente, la Melatonina es capaz de inducir sueño con un patrón muy similar al fisiológico en una gran variedad de animales, como el pollo, la rata (36), el gato (45) y los humanos (21). Su administración en dosis bajas, induce una sensación de bienestar, y a dosis mayores provocan sedación (1,21). Este efecto es lo suficientemente importante para ejercer acciones anticonvulsivas, en varios modelos experimentales y en humanos (1). El mecanismo por el cual estos efectos son producidos es aún desconocido.

Estudios bioquímicos han mostrado que la Melatonina incrementa la unión del ácido gama-amino-butírico (GABA) marcado a su receptor

GABA_A cerebral, de una manera significativa y en forma muy similar a como lo hacen las Benzodiazepinas. Por lo que es probable que algunas de éstas acciones estén reflejando un incremento de la actividad GABAérgica cerebral (14,43,44,64).

1.4 Hormonas de la Glándula Pineal.

Desde 1963, sabemos que la pineal secreta toda una familia de hormonas. De acuerdo a su estructura química éstas pueden clasificarse como péptidos e indoles. Aunque la Melatonina ha sido la hormona más estudiada de todas, no es el único indol con actividad que se conoce. De hecho en el caso de los indoles se han caracterizado tres diferentes familias, los 5 metoxi-indoles, los 5-metoxitriptofoles y los indoles asociados al ácido acético (26). Todos los indoles de la pineal poseen el anillo indólico característico del aminoácido triptofano. Fig. 3.

Además estas hormonas derivan de la serotonina, un neurotransmisor con amplia distribución cerebral, intestinal y uterina (4). La vía metabólica de síntesis de los indoles requiere de varias enzimas, las más importantes son la N-acetilserotonina, la cual constituye la enzima limitante (69) y la Hidroxi-indol-o-metil transferasa (HIOMT), que es exclusiva de los tejidos que producen Melatonina, como la pineal, la retina, el intestino (69) y la glándula harderiana de los roedores (58).

Una característica importante y única de la secreción de estos indoles, es su dependencia con la cantidad de luz ambiental. En condiciones fisiológicas éstas hormonas son secretadas durante la escotofase, mientras que sus valores mínimos, detectables en sangre, se presentan durante la fotofase. Fig. 4. Es más, si durante la escotofase, cuando las concentraciones de Melatonina son elevadas, se aplica un pulso de luz de intensidad suficiente (2000 o más Luxes), durante un corto período (2 min) se provoca un bloqueo de la secreción de la Melatonina (30,75,73).

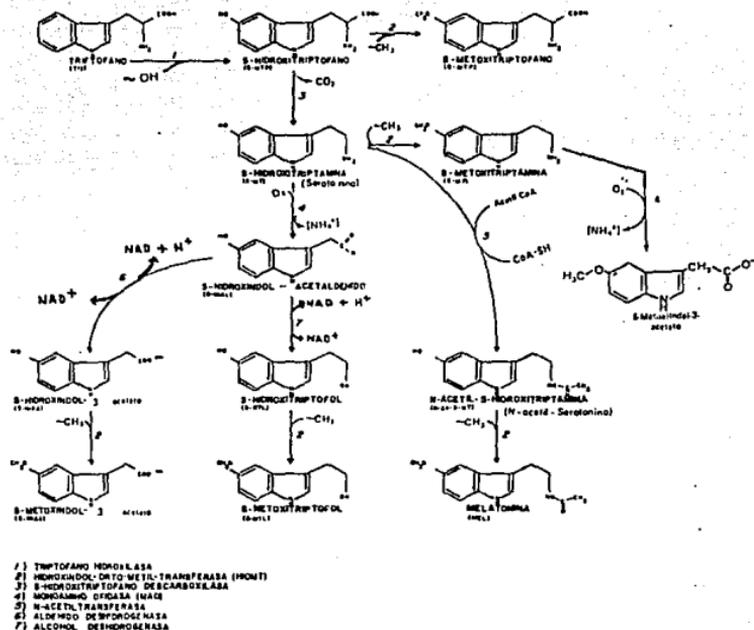


Fig. 3. Metabolismo indólico en la glándula pineal (4).

Esta secreción sincronizada de indoles pineales, depende de la integridad del circuito neural que provee información lumínica a la pineal. Entonces una lesión de la retina, el núcleo supraquiasmático o el ganglio simpático cervical superior, determinarán la pérdida de sincronía del ritmo, pero no afectarán la ritmicidad de tal secreción (69,79). El mediador de este circuito neural a nivel de la pineal es la Noradrenalina. Su acción depende de receptores β -adrenérgicos acoplados a la síntesis de

AMPCíclico y su sensibilidad es variable a lo largo del día. Fármacos como el propranolol y la clonidina, agentes utilizados para tratar la hipertensión, son capaces de bloquear tales receptores.

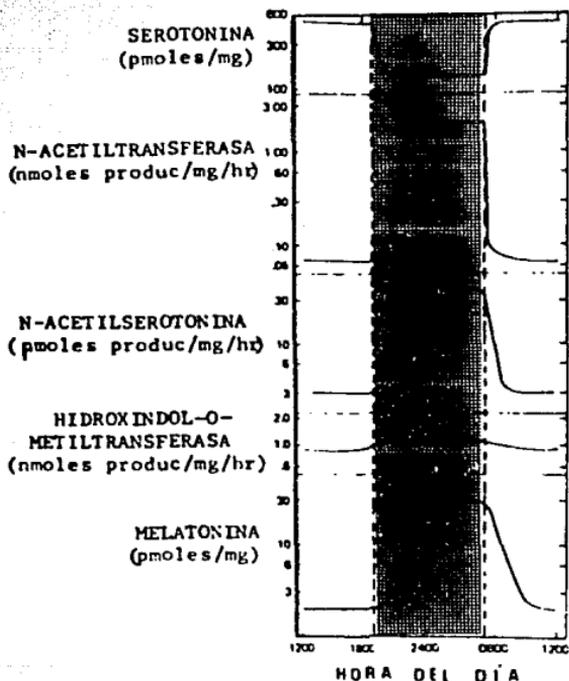


Fig. 4. El ritmo de secreción de la Melatonina es dependiente del fotoperíodo, y muy próximo al de la actividad de una de las enzimas de síntesis la serotonina N-acetil transferasa (NAT) (79).

También el colocar al individuo en un medio con luz constante, bloquea inicialmente este ritmo de secreción, pero posteriormente, el ritmo se llevará a cabo de la misma manera, aunque no sincronizado con el medio ambiente (63,79).

Un punto importante dentro de la fisiología de estas hormonas secretadas por la pineal es su mecanismo de acción a nivel de la membrana celular. Algunos de sus efectos a nivel de órganos periféricos probablemente sea del tipo nuclear (19). Es decir, se hablaría de receptores intracelulares. Sin embargo, muchos de sus efectos, por su latencia, probablemente sean debidos a una acción a nivel de la membrana celular (21,24). Hasta ahora el mecanismo de acción molecular que la Melatonina ejerce en la membrana celular de muchos órganos y sistemas, es aún desconocido (40,80).

La búsqueda de un receptor para la Melatonina ha sido una tarea poco fructífera. Inicialmente algunos estudios de unión a ligandos, utilizando Melatonina marcada con H^3 , han dado resultados muy contradictorios y no reproducibles (51). Recientemente varios autores han utilizado otro radioisótopo que emite una radiación más potente como el I^{123} , y han descrito la existencia de receptores específicos. Sin embargo, los únicos sitios cerebrales donde estos receptores han sido localizados son la eminencia media y la pars tuberalis de la hipófisis (2,22,41). Lo cual no explicaría el resto de los efectos conductuales y electrofisiológicos observados después de la administración de Melatonina y que seguramente resultan de la acción de esta hormona sobre estructuras cerebrales diferentes a estos dos sitios cerebrales mencionados (51,61).

Utilizando técnicas de inmunocitoquímica, se han encontrado diferentes tipos de péptidos en la pineal. El primero de ellos, fue la arginina-vasotocina, un péptido que muestra actividad en los vasos sanguíneos, pero que también parece estar involucrado en otro tipo de acciones cerebrales (68). Se describió la presencia de un factor peptídico inductor de sueño, el cual es un tripéptido. Péptidos como la neurotensina, y algunas endorfinas también han sido encontradas en la glándula pineal (7).

Desafortunadamente aún desconocemos cual es la función de estas sustancias dentro de la pineal (54,68). Se ha sugerido que la arginina-vasotocina ejerce efectos antigonadotrópicos, aunque tal efecto parece no muy claro (4,7,26,57). Existen aún otra serie de compuestos que secreta la glándula pineal, pero que no han sido aún catalogados como hormonas o como compuestos con una actividad fisiológica clara. Tal es el caso de las β -carbolinas. Estos compuestos son capaces de desplazar a las benzodiazepinas de sus sitios de unión específica (44,68), produciendo efectos opuestos a los de las Benzodiazepinas, incluyendo las corrientes de cloro inducidas por GABA y la inducción de convulsiones (28). Por esta razón, algunos autores consideran que estas sustancias son los ligandos endógenos de tales receptores, e implicaría además la existencia de un mecanismo antiansiológico fisiológico. Sin embargo, esta idea no es del todo aceptada (31,41,63).

1.5 Ansiedad.

Cualquier amenaza a la integridad física y emocional del individuo provoca automáticamente varias respuestas de adaptación, una de ellas es la ansiedad (37). Aparentemente la ansiedad surge cuando se amenaza el equilibrio corporal (18,74). Esta se caracteriza por un sentimiento de aprehensión en respuesta al peligro que amenaza la integridad del individuo.

La ansiedad se presenta como un síntoma temprano que denota únicamente una alteración emocional. Es una alteración psicológica, percibida como un sentimiento subjetivo de tensión aumentada y lasitud, es una experiencia consciente que reporta un temor intenso, preocupante y se conceptualiza con una génesis interna (37). Es una reacción emocional a un objeto concreto o identificado (65,74).

La ansiedad no es sólo un miedo, ya que carece de un objeto específico del medio ambiente que lo provoque, sino que está constituida por un temor doloroso que a diferencia del estrés, se manifiesta también en situaciones que simbolizan conflictos e impulsos inconscientes. La ansiedad es un acontecimiento común en todos los individuos y es un mecanismo útil y adaptativo para preveer y solucionar los problemas. Sin embargo, aunque algunos grados leves de ansiedad favorecen las capacidades creativas del individuo, la ansiedad grave o de larga duración provoca una notable disminución de tales capacidades (74).

La ansiedad debe distinguirse de otras enfermedades, para su tratamiento, por lo que se han descrito los siguientes síntomas generales: palpitaciones, taquicardia, opresión torácica, dificultad para respirar, sensación sofocante de asfixia, indigestión, diarrea,

vértigo, cambios en el apetito, transpiración, micción frecuente, rubor, dermatitis ficticia, cefalea, dolores musculares, insomnio y temores irrazonables (28).

Quizá en los humanos el principal mecanismo productor de ansiedad sea el estrés. El término se refiere a una respuesta de adaptación que se acompaña de cambios fisiológicos y conductuales fácilmente identificables y generalmente provocados por situaciones que pongan en peligro la integridad del individuo; como el calor, el frío, las infecciones, los cambios extremos del medio ambiente, etc. Para muchos investigadores, el estrés es sinónimo de ansiedad. Sin embargo; se trata de situaciones aunque vinculadas diferentes (18).

La génesis de la ansiedad es muy complicada, aunque generalmente su origen está basada en las excesivas estimulaciones que llegan al organismo por la actividad desgastante, a la sobrestimulación nerviosa, la cual es provocada por elevada responsabilidad, preocupaciones, disgustos y defectos de la armonía familiar (17,18).

Este tipo de actividad humana convierte a la mayor parte de los individuos en un blanco fácil del estrés y de la ansiedad. En la actualidad, los fármacos más vendidos en todos los continentes son aquellos utilizados para tratar la ansiedad (24,27). Además, existe un incremento alarmante en el uso de fármacos antidepresivos, sustancias que alivian la depresión que es la etapa siguiente a la ansiedad (46,47).

Uno de los primeros enfoques neurofisiológicos sobre la ansiedad, fue planteado por Pavlov en 1927, quién sugirió que el estado de ansiedad inducido experimentalmente, resulta del

desequilibrio de la relación normal entre la excitación y la inhibición cerebral (18). Posteriormente Battie en 1962, menciona que la ansiedad está en función de la intensidad del estímulo estresante. Experimentalmente, se observó que los animales colocados en paradigmas de conflicto (cuando existen en forma simultánea o inmediata sucesiva dos respuestas o tendencias de acción incompatibles) muestran signos característicos de ansiedad con parámetros conductuales y fisiológicos cuantificables (65,74).

Probablemente, en los últimos años el principal avance en el estudio de la ansiedad, ha sido la obtención de fármacos ansiolíticos más específicos. Estas sustancias han servido como herramienta para estudiar y entender la neurofisiología de la ansiedad. Los fármacos utilizados para atenuar la reacción emocional producida por la ansiedad son denominados como ansiolíticos (28). Agentes psicofarmacológicos administrados bajo el contexto de una terapia de apoyo manipulativa, para aliviar los síntomas de la ansiedad, de la tensión y de la depresión (34).

1.6 Fármacos ansiolíticos

Desde tiempos muy remotos, el hombre ha buscado sustancias capaces de modificar los efectos del estrés y de las sensaciones de tensión y ansiedad. La mayor parte de estos esfuerzos, han finalizado con el desarrollo de sustancias que provocan sedación; quizá el ejemplo más característico sea el etanol (50).

En el año de 1957 Léo Sternbach del grupo Hoffman la Roche de New Jersey, sintetizaron e introdujeron al mercado a las benzodiazepinas (28), las cuales presentaron efectos más específicos sobre la ansiedad, aunque cuando se aplican dosis mayores, sus efectos sedantes se hacen más evidentes. Actualmente estos fármacos son los más comúnmente empleados en el tratamiento de la ansiedad (27,28,46,47).

Los efectos ansiolíticos de las benzodiazepinas han sido demostrados en animales de laboratorio. En aquellos procedimientos donde el factor fundamental es una situación de conflicto. Sin embargo, en el caso del hombre la evaluación de éste tipo de compuestos es más difícil debido al aspecto no farmacológico tan importante que contiene, es decir, la respuesta del fármaco depende de un estado emocional y de efectos placebos que ocurren en el tratamiento de la ansiedad. Como consecuencia los resultados observados son en ocasiones contradictorios (18,28,34,50).

Entre las benzodiazepinas más importantes están el clorodiazepóxido, el diazepam, el oxazepam, el clorazepato y el lorazepam. Estas sustancias comparten varias propiedades físicas, terapéuticas y presentan una relación estructura actividad farmacológica. En particular, todas ellas provocan ansiólisis,

sedación y sueño, es decir son hipnóticas, también poseen acciones anticonvulsivas, lo cual las hace útiles en el tratamiento de la epilepsia. Por ésta razón cuando se manifiestan sus efectos sedantes, también se observan varios grados de relajación muscular (47,50).

El mecanismo de acción farmacológico que utilizan las benzodiazepinas esta relacionado con la función de los sistemas neuronales cerebrales que utilizan al GABA como neurotransmisor (14). Esta sustancia, la cual ejerce influencias de tipo inhibitor, provoca una hiperpolarización celular, la cual se traduce como un estado de hipoexcitabilidad neuronal (14,20,29). Estos efectos son resultado de la unión del GABA a sus receptores específicos cerebrales. El receptor GABA es una proteína pentamérica de la cual 3 subunidades son las que están completamente identificadas que son alfa, beta y gamma y el receptor actúa como un canal del ión cloro. Actualmente, se han descrito dos tipos de receptores al GABA los receptores $GABA_A$, los cuales son sensibles a la bicuculina y estan acoplados al ionóforo del ión Cl^- , y los receptores $GABA_B$, los cuales son insensibles a bicuculina y actúan a través de los canales de los iones Ca^{++} y K^+ (72). Los efectos provocados por las benzodiazepinas, son mediados básicamente por los receptores $GABA_A$. El receptor $GABA_A$ se encuentra cerrado cuando no está unido a GABA o a las benzodiazepinas. En respuesta a GABA el cual se une a la subunidad alfa el canal se abre para permitir la entrada de iones cloro dentro de la célula, la conductancia mediada por el cloro es incrementada cuando la benzodiazepina se une a la subunidad gamma (10,29).

En presencia de las benzodiazepinas, tanto la afinidad como la eficacia de la neurotransmisión GABAérgica se incrementa. Este efecto parece ser consecuencia de una interacción alostérica provocada por la asociación de las benzodiazepinas a una porción del receptor GABAérgico. El resultado final siempre es una reducción de la excitabilidad neuronal (25,29). Sin embargo, se observó que en concentraciones terapéuticas las benzodiazepinas también pueden reducir la excitabilidad de algunas neuronas mediante acciones que no involucran al GABA y no provocan alteraciones en la permeabilidad al ión Cl^- (20). Además existen compuestos como las β -carbolinas endógenas que pueden inhibir competitivamente el proceso de unión y las acciones biológicas de las benzodiazepinas (29).

Como consecuencia de ésta amplia gama de efectos clínicos, es de esperarse que los efectos colaterales adversos provocados por la administración de estos compuestos también sean abundantes. Así, se describieron efectos tales como somnolencia, flacidez muscular, náuseas, vómitos, diarrea, torpeza en los movimientos, ataxia, fiebre, cefalea, palpitaciones, dolor precordial, visión borrosa, disminución de la profundidad de la ventilación, prurito, y sequedad bucal. En algunas mujeres se presentan irregularidades en la menstruación pudiendo llegar a la anovulación (28,62). También se han descrito efectos teratogénicos y algunos otros efectos tóxicos sobre el feto (43). Desde un punto de vista psicológico, los efectos colaterales más importantes son una reducción en el aprendizaje, la aparición de períodos prolongados de amnesia, depresión (46,7), una reducción de la capacidad cognoscitiva (11), abatimiento, dificultad para la concentración y apatía (33).

Desde un punto de vista metabólico, estos compuestos poseen efectos colaterales serios como elevaciones de la fosfatasa alcalina, la transaminasa glutámico oxalacética, la bilirrubina directa e indirecta, el colesterol sérico y la glucosa sanguínea, sobretodo cuando se utiliza en terapias prolongadas (2 meses) (62). Adicionalmente, la administración crónica de estos fármacos provoca tolerancia y desafortunadamente una dependencia física importante provocando un síndrome de abstinencia, en ocasiones tan peligroso como el de los opioides por varias semanas (28,47).

Tal cantidad de efectos colaterales indeseables, hacen indispensable la búsqueda de fármacos ansiolíticos más selectivos con menos efectos colaterales. Recientemente se incorporaron al grupo de fármacos ansiolíticos, un conjunto de compuestos con estructura química totalmente diferente a la de las benzodiazepinas y que aparentemente poseen un mecanismo de acción no relacionado con los sistemas GABAérgicos cerebrales, tal es el caso de la buspirona, la cual es ya utilizada en la clínica (32,66). Este fármaco, inicialmente considerado como una sustancia con acción antidopaminérgica (70), ejerce una acción directa sobre los receptores $5HT_{1A}$ de índole serotoninérgico (28,55). La diferencia clínica importante de este tipo de compuestos, reside en su capacidad de producir sólo un grado mínimo de sedación y de carecer de los efectos colaterales característicos de las benzodiazepinas (55).

La existencia de receptores específicos (receptores $GABA_A$ y $GABA_B$) para las benzodiazepinas, implica la existencia de una sustancia endógena sintetizada por el organismo, que en condiciones

fisiológicas se asocia a este tipo de receptores. Tal implicación sugiere que el organismo posee un sistema ansiolítico endógeno (40,41,64). Este ligando endógeno es aún desconocido, pero existen datos experimentales que sugieren la participación de algunos compuestos provenientes de varias estructuras cerebrales, una de estas estructuras es la glándula pineal (63).

Se observó que la Melatonina influye en varios aspectos de la conducta del hombre, especialmente en algunas situaciones estresantes. En estas condiciones se incrementa en forma importante la Melatonina sérica (39,40), lo que sugiere que la pineal produce una acción tranquilizadora al revertir los efectos del estrés. También la secreción de Melatonina se modifica durante los desórdenes psicóticos en humanos; así, trabajos de Mendelewicz y cols., en 1979, encontraron niveles significativamente reducidos de Melatonina en pacientes con depresión. En el mismo año, Lewi reportó que la Melatonina estaba baja en pacientes maniáticos. De forma similar se describieron muchos casos de pacientes esquizofrénicos con niveles bajos de Melatonina (6).

En cuanto al mecanismo de acción utilizado por la Melatonina para provocar tales efectos, estudios electrofisiológicos demostraron que la Melatonina reduce la actividad eléctrica del cerebro de manera similar a como lo hacen las sustancias GABAérgicas, desde los patrones electroencefalográficos hasta la descarga unitaria de las neuronas tanto hipotalámicas como extrahipotalámicas, en ratas con movimiento libre (67). Además algunas evidencias neuroquímicas apoyan esta sugerencia; por ejemplo, Marangos y cols., (44) mostraron que la Melatonina reduce

la unión de H³-diazepam de sus sitios de unión específicos en las membranas del cerebro de ratas. Según estos autores, la Melatonina interactúa en forma directa con el complejo benzodiazepina-ionóforo-GABA (43). Una de las grandes ventajas que posee la Melatonina sobre las benzodiazepinas, es su enorme margen de seguridad. Aunque dosis elevadas de Melatonina producen sedación, no se han detectado efectos tóxicos de la misma, de hecho aún no se han determinado las dosis tóxica₅₀ y letal₅₀ de este compuesto. Adicionalmente no se ha descrito la existencia de tolerancia o dependencia a la Melatonina en la literatura internacional (57).

Estos datos proponen una relación entre la Melatonina, y en general con todos los indoles de la pineal, y los mecanismos GABAérgicos. Esta relación fue inicialmente postulada por Romijn (63) y después por Cardinali y cols., (12,14). Por lo que la Melatonina ejercería efectos similares a los provocados característicamente por el GABA y las benzodiazepina. Por lo cual es posible que la Melatonina ejerza también efectos ansiolíticos similares a los provocados por las benzodiazepinas.

CAPITULO 2.

2.1 Planteamiento del problema.

La relación entre la ansiolisis y los metoxi-indoles de la pineal fue puesta en evidencia en un trabajo previo, empleando el modelo clásico de conflicto descrito por Vogel y cols. Los resultados de este estudio mostraron que los efectos inducidos por la Melatonina son muy similares a los observados por la aplicación de diazepam, clordiacepóxido y buspirona (49).

En este modelo experimental, se analiza la supresión de una respuesta innata del animal (beber agua) por su asociación con un estímulo aversivo (choque eléctrico). Tal situación provoca que la frecuencia de la respuesta innata, en animales privados de agua durante 48 horas, se reduzca considerablemente e incluso llegue a desaparecer, lo que provoca la situación de conflicto. En este caso dos impulsos, saciar la sed y evitar el choque eléctrico, se contraponen (18).

Al igual que la mayoría de los modelos experimentales, éste presentó algunos inconvenientes que lo alejan de ser un modelo experimental ideal. Por ejemplo, se observó que algunos fármacos considerados no ansiolíticos, como la anfetamina, la reserpina, el LSD y la mianserina provocan efectos antiansiedad, cuando se utiliza este modelo experimental, lo que sugiere la falta de selectividad del modelo (48). Por esta razón resulta conveniente, analizar las propiedades ansiolíticas de los fármacos utilizando varios modelos experimentales, cuyos resultados en conjunto determinarían con mayor exactitud el perfil ansiolítico de un fármaco (37).

2.2 Objetivo.

Realizar un análisis comparativo entre los efectos provocados por tres fármacos ansiolíticos clásicos, diazepam, clordiazepóxido y buspirona con la melatonina en el modelo ansiogénico de Nado Forzado en rata.

2.3 Hipótesis.

Si la Melatonina posee acciones anti-ansiedad, entonces sus efectos en este modelo experimental serán muy similares a los provocados por los otros fármacos ansiolíticos.

CAPITULO 3: material y método.

3.1 Materiales.

3.1.1. Material biológico.

Para este estudio se utilizaron 60 ratas macho de la cepa Wistar, con edad aproximada de tres meses. El peso de los animales osciló entre 180 y 210 g. Las ratas fueron obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina y no tenían alguna experiencia experimental previa. Los animales fueron mantenidos en condiciones ambientales típicas del laboratorio desde 15 días antes de iniciar la fase experimental. Cada animal residía en una jaula individual (35 x 25 x 20 cm) de acrílico transparente y con el techo de reja de acero inoxidable. Las condiciones de luz y oscuridad se mantuvieron constantes con 14 horas de iluminación por 10 de oscuridad. El período luminoso se iniciaba a las 6:00 AM y finalizaba a las 20:00 hrs. Durante los 15 días de adaptación a las condiciones del laboratorio y durante la fase experimental, los animales siempre tuvieron acceso directo y libre al agua y alimento (Purina Rat Chow).

3.1.2. Materiales.

Para realizar la prueba de nado forzado, se utilizó un cilindro de vidrio transparente y liso de 6 mm de grosor, con 25 cm de diámetro y 30 cm de altura, con una tapa que permite la libre ventilación. Se agregaban 10.6 litros de agua a $25 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$, lo que en el cilindro correspondía a una altura de 20 cm. Se mantuvo lo más constante la temperatura del agua utilizando un calentador de agua sumergible y un termómetro graduado. La temperatura se verificaba

inmediatamente antes de que se introdujera en ella al sujeto e inmediatamente después de retirarlo. En términos generales la oscilación de la temperatura nunca fue mayor a 1.5 °C. Utilizamos también un cronómetro electrónico (Haar), el cual permite determinar hasta centésimas de segundo. Durante la sesión de prueba se utilizó un contador electrónico digital (Fred Haud), alimentado por una fuente de poder de corriente directa (GRASS) Fig. 5. Además utilizamos hojas de registro donde se inscribían los valores correspondientes para cada animal y grupo experimental. Una vez finalizada la prueba, utilizamos un sistema de secado constituido por una caja de acrílico transparente y un foco de 100 watts, colocado a 15 cm por arriba del animal, lo que le proporciona una temperatura de 28° a 30 °C.

Utilizamos cuatro diferentes fármacos: Melatonina (Sigam Chemicals, St. Louis Mo, USA) en dosis de 1.0 y 2.0 mg/Kg; Buspirona (Sigam Chemicals) 5 y 10 mg/Kg; Diazepam (Hoffman LaRoche, New Jersey, USA) 1 y 2 mg/Kg y Clorodiazepóxido (Hoffman LaRoche) 5 y 10 mg/Kg. Para preparar la administración de melatonina o de diazepam, inicialmente se disolvían 1 o 2 mg del fármaco en 100 ul de etanol al 10% (V/V), aforándose hasta 1 ml, con 900 ul de una solución de polietilenglicol al 10 % (V/V).

Finalmente, la solución alcanzaba una concentración de polietilenglicol al 10 % y de etanol al 1 %. La buspirona se disolvió en 1 ml de agua bidestilada y el clorodiazepóxido en 1 ml de solución salina isotónica (0.9 %). Todos los fármacos se prepararon inmediatamente antes de su administración, la cual siempre fue intraperitoneal, utilizando para ello jeringas de tuberculina de 1 ml.

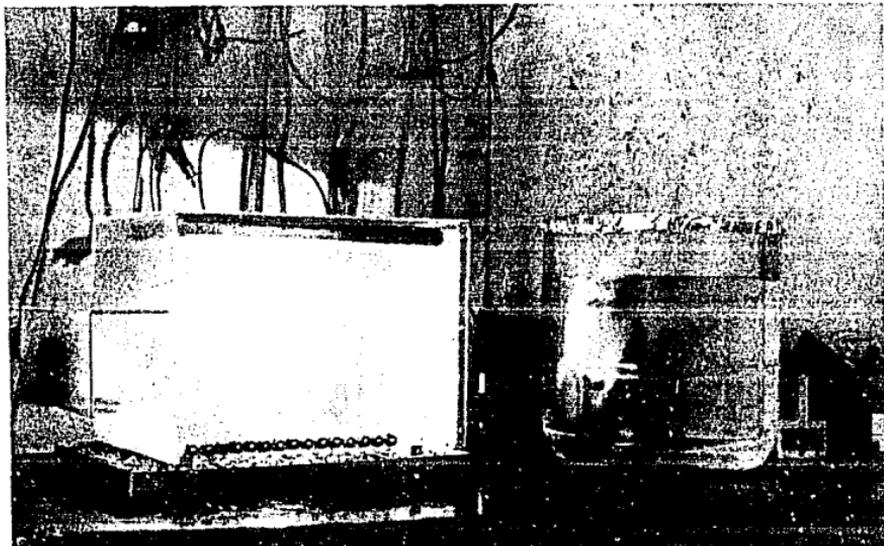


Fig. 5. Se muestra el equipo utilizado en la prueba de nado forzado: cilindro con agua, rata dentro del cilindro, contador y caja de secado.

Con el total de sujetos se formaron grupos aleatorios de 5 individuos cada uno, hasta conformar 12 grupos en total. Cuatro de ellos se consideraron como controles y recibieron la administración del vehículo correspondiente. Los 8 grupos restantes recibieron las diferentes dosis de los diferentes fármacos. Los animales se utilizaron sólo una vez. Bajo ninguna circunstancia, el animal recibió más de una dosis de alguno de los fármacos. Todos los fármacos y vehículos se administraron 30 minutos antes del inicio de la sesión de prueba.

3.2 Método: Prueba de Nado Forzado.

Una de las características indispensables que debe poseer un modelo experimental ideal es su potencialidad para reproducir con relativa facilidad cierto tipo de conductas, las cuales sean medibles, y de esta forma nos permitan comprender el fundamento de ellas (19,34,37). El empleo de modelos en la investigación de la farmacología conductual, ha contribuido a la comprensión y caracterización de los mecanismos de acción de diferentes fármacos. El creciente consumo de fármacos ansiolíticos que actúan a nivel del SNC y algunos de sus efectos colaterales, han aumentado el interés por encontrar nuevos compuestos farmacológicos ansiolíticos; así como la necesidad de encontrar pruebas o modelos que permitan la valoración preclínica de estas sustancias (5,18).

Uno de los modelos que se utilizan con relativa frecuencia en la actualidad es el modelo de Nado Forzado. Este modelo descrito por Forsolt y cols., (56) inicialmente fue considerado como un modelo de depresión sensible a muchos de los fármacos antidepresores (32,35,56). Sin embargo, estudios recientes muestran que este modelo presenta acciones ansiogénicas, las cuales provocan respuestas características de la ansiedad sensibles a los fármacos ansiolíticos. En este modelo el animal presenta una serie de respuestas sugerentes de un estado estresante y que constituyen tanto respuestas emocionales como adaptativas (5,9). La diferencia entre este modelo experimental y el de Vogel (49), es que en el primero no existe una situación de conflicto claramente involucrada.

En el presente trabajo, el experimento consistió en dos sesiones, una de ensayo y otra de prueba. Ambas sesiones

princiaron con la instalación del equipo; que consiste en llenar el cilindro con agua hasta 20 cm de altura y calentarla hasta alcanzar una temperatura de $25^{\circ} \pm 1.5^{\circ} \text{C}$, la cual se mantenía así durante todo el experimento. Una vez alcanzada esta temperatura, se verificaban las diferentes conexiones del equipo, de la caja de secado y del cronómetro electrónico y se actualizaban las hojas de registro. Posteriormente, se marcaba a cada una de las ratas en la cola, utilizando un sistema binario y un marcador resistente al agua. Se pesaba entonces al animal en una balanza granataria (OHUS), después de lo cual se procedía a la sesión de ensayo. Al inicio de ésta, simultáneamente se activaba el cronómetro electrónico y se colocaba al animal en el cilindro con agua, durante 15 minutos; con el objetivo de observar su comportamiento, teniendo cuidado de que los individuos no se ahogaran. Los animales que no aprendieron a mantener el equilibrio fueron eliminados del experimento. Una vez finalizado este período, se retiraba la tapa del cilindro y se sacaba al animal del mismo, para colocarlo en la caja de secado, hasta que éste fuese completo. Tal procedimiento se realizaba para cada uno de los sujetos.

Exactamente después de 24 horas de la sesión de ensayo, y treinta minutos después de pesar al sujeto y administrar el fármaco vía intraperitoneal, los animales fueron nuevamente introducidos dentro del mismo recipiente con agua a $25^{\circ} \pm 1.5^{\circ} \text{C}$, durante sólo 5 min. En este período se cuantificó, empleando para ello el cronómetro electrónico, el tiempo que el animal permanecía completamente inmóvil, y con el contador electrónico el número de buzos que realizaba el sujeto (el número de veces que el animal

sumergía la cabeza dentro del agua). Al final de los 5 minutos, cuando se extraía a los sujetos del cilindro se contaban el número de bolos fecales que el sujeto excretó durante ese período. Tanto el tiempo de inmovilidad, como el número de buzos y de bolos fecales fue registrado para cada animal. Los sujetos nuevamente fueron colocados en la caja de secado y una vez finalizado éste, fueron retornados a su caja de almacenamiento.

La observación y cuantificación de estos parámetros, permitió evaluar el estado de ansiedad provocado por la situación estresante. Convirtiéndose entonces en variables que podemos emplear para discernir entre el efecto provocado por uno u otro fármaco.

El análisis estadístico se efectuó inicialmente con la prueba de Bartlett para homogeneidad de varianzas, para cada uno de los parámetros obtenidos. Después se empleó la prueba de ANOVA de Friedaman para determinar diferencias entre los grupos controles y los experimentales. Finalmente la prueba de Tukey, mostró qué grupos experimentales son diferentes a los grupos controles (15).

CAPITULO IV

IV. 1. RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en relación al tiempo de inmovilidad tanto para los grupos controles (n=10) como para los experimentales se muestran en el cuadro No. 1. En este cuadro se muestra que el tiempo de inmovilidad registrado para los grupos controles es muy similar y no existe diferencia estadística significativa entre ellos, por lo que podemos decir que el vehículo no tiene efecto alguno sobre los parámetros en estudio (35).

La administración de Melatonina a la dosis de 1.0 mg/Kg (n=10) provocó un tiempo promedio de inmovilidad de 99.7 ± 2.1 seg y con la dosis de 2.0 mg/Kg (n=10) se produjo un tiempo de inmovilidad promedio de 151.0 ± 2.5 seg. En esta prueba conductual de **Nado Forzado** la Melatonina a las dos dosis estudiadas, mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0058$), comparados con los grupos control: CTRL1 55.7 ± 2.0 seg y CTRL2 56.1 ± 1.6 seg (n=10).

Por otro lado, la administración de diazepam a la dosis de 1.0 mg/Kg provocó un tiempo de inmovilidad promedio de 78.2 ± 4.3 seg no significativo estadísticamente ($p < 0.0058$) comparado con los grupos control. Sin embargo, la dosis de 2.0 mg/Kg mostró un aumento significativo en el tiempo de inmovilidad 111.9 ± 5.6 seg.

El clordiazepóxido a la dosis de 5.0 mg/Kg presentó un efecto no significativo estadísticamente con un tiempo de inmovilidad de 62.9 ± 2.8 seg y a la dosis de 10.0 mg/Kg ejerce un tiempo de inmovilidad promedio de 98.5 ± 3.1 seg efecto no significativo en comparación con los controles.

Los grupos de tratamiento con buspirona a la dosis de 5.0 mg/Kg y 10 mg/Kg provocaron un tiempo de inmovilidad estadísticamente significativo ($p < 0.0058$) de 121.9 ± 3.8 seg y de 133.5 ± 2.8 respectivamente, comparados con los grupos control.

Cuadro No. 1

Tiempo de inmovilidad durante la prueba de Nado Forzado.

Grupos (mg/Kg)	\bar{X} (seg)	E.S. ($p < 0.0058$)	
Ctrl.1 (SSF)	55.7	2.0	
Ctrl.2 (PEG 10%)	56.1	1.6	
Melatonina (1.0)	99.7	2.1	*
Melatonina (2.0)	151.0	2.5	**
Diazepam (1.0)	78.2	4.3	N.S.
Diazepam (2.0)	111.9	5.6	**
Clordiacepóxido (5.0)	62.9	2.8	N.S.
Clordiacepóxido (10.0)	98.5	3.1	*
Buspirona (5.0)	121.9	3.8	**
Buspirona (10.0)	133.5	2.8	**

\bar{X} = promedio(seg).

ES = error estándar.

SSF= solución salina fisiológica.

PEG= polietilenglicol (10%).

*,** = diferencias significativas.

NS = no significativo.

Ctrl = controles.

Los resultados obtenidos se graficaron considerando el tiempo de inmovilidad con respecto a los fármacos utilizados, y se muestran en la Fig. No.6.

TIEMPO DE INMOVILIDAD

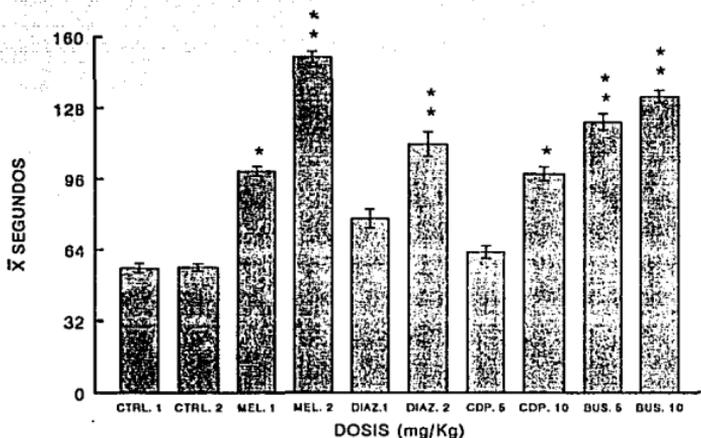


Fig. No. 6. En esta gráfica se observa que el tiempo de inmovilidad es mayor para los grupos tratados (n=10) con MEL 1.0 y 2.0 mg/Kg y con DIAZ 2.0 mg/Kg, y son diferentes estadísticamente (*,**) con una $P < 0.0058$, comparados con el control. Abreviaturas: CTRL. control, MEL. Melatonina, DIAZ. diazepam, CDP. clorodiazepóxido y BUS. buspirona.

El siguiente parámetro medido durante la sesión de prueba fue el número de buzos; es decir, el número de veces que el animal introducía la cabeza dentro del agua, cuyos resultados se presentan en el cuadro No. 2 .

Cuadro No. 2
Número de buzos.

Grupos (mg/Kg)	\bar{X}	E.S.	(p<0.05)
Ctrl.1	13.5	1.3	
Ctrl.2	13.6	1.2	
Melatonina (1.0)	5.8	0.60	*
Melatonina (2.0)	3.6	0.28	**
Diazepam (1.0)	3.9	0.58	**
Diazepam (2.0)	7.3	0.44	*
Clordiacepóxido (5.0)	4.8	0.80	**
Clordiacepóxido (10.0)	6.3	0.77	*
Buspirona (5.0)	1.5	0.12	**
Buspirona (10.0)	1.8	0.10	**

\bar{X} = promedio del número de buzos.

ES= error estándar.

*,**= diferencias estadísticamente significativas.

Ctrl.= control.

El promedio del número de buzos para los dos grupos controles es muy similar, siendo para el Ctrl.1 de 13.5 ± 1.3 y para el Ctrl.2 de 13.6 ± 1.2 , no mostrando diferencias significativas entre ellos.

El efecto producido por la Melatonina sobre el número de buzos a la dosis de 1.0 mg/Kg es de 5.8 ± 0.60 y a la dosis de 2.0 mg/Kg de 3.6 ± 0.28 fue de disminución con relación al control, siendo estadísticamente significativos ($P < 0.005$).

Los efectos producidos por las Benzodiazepinas administradas, muestran una relación dosis-efecto tanto para el diazepam como para el clordiacepóxido con la administración de ambas dosis, pero comparados con el control muestran una disminución significativa

($p < 0.005$), del número de buzos. El diazepam a la dosis de 1.0 mg/Kg presentó un promedio de 3.9 ± 0.58 y a la dosis de 2.0 mg/Kg fue de 7.3 ± 0.44 . Para el clordiazepóxido a la dosis de 5.0 mg/Kg se observa una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.005$) en el promedio del número de buzos, así como a la dosis de 10.0 mg/Kg. Para el caso de la buspirona ambos efectos fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$), teniendo para la dosis de 5.0 mg/Kg un promedio de 1.5 ± 0.12 y para la dosis de 10.0 mg/Kg de 1.8 ± 0.10 comparados con los grupos control. Estos datos se presentan en la Fig. No. 7.

PROMEDIO DE BUZOS

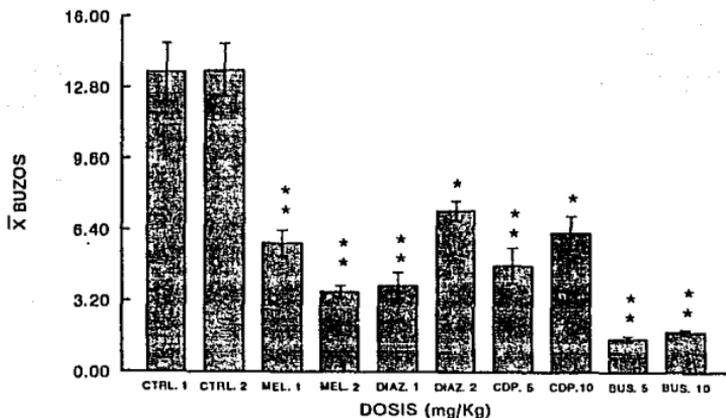


Fig. No. 7. En esta gráfica se muestran los datos en promedio del número de buzos realizados por las ratas en la prueba de nado forzado, se observa una disminución estadística significativa (*,**), con la administración de BDZ, y de BUS a ambas dosis. Abreviaturas: CTRL. control, MEL. Melatonina, DIAZ. diazepam, CDP. clordiazepóxido y BUS. buspirona.

El tercer parámetro cuantificado durante el presente experimento fue el número de bolos fecales excretados, presentándose en el cuadro No. 3.

Cuadro No.3

Número de bolos fecales excretados.

Grupo (mg/kg)	\bar{X}	E.S.	(p<0.011)
Ctrl.1	3.8	0.60	
Ctrl.2	4.0	0.57	
Melatonina (1.0)	2.7	0.40	N.S.
Melatonina (2.0)	2.0	0.31	*
Diazepam (1.0)	2.1	0.29	*
Diazepam (2.0)	1.5	0.11	*
Clordiacépoído (5.0)	1.05	0.07	**
Clordiacépoído (10.0)	2.5	0.30	N.S.
Buspirona (5.0)	1.3	0.09	**
Buspirona (10.0)	1.1	0.05	**

\bar{X} = Promedio.

ES= error estándar.

*,**= diferencias estadísticamente significativas.

NS= no significativo.

Ctrl= control.

La Melatonina a la dosis de 1.0 mg/Kg no presenta diferencias significativas estadísticamente (p<0.011) comparados con los grupos control al tener un promedio de 2.7 ± 0.40 ; sin embargo, a la dosis de 2.0 mg/Kg presenta un promedio de 2.0 ± 0.31 el efecto si es significativo comparado con los grupos controles.

El diazepam tanto a la dosis de 1.0 como a la de 2.0 mg/Kg si tiene efecto significativo estadísticamente (p<0.011) sobre el

número de bolos fecales excretados al presentar un promedio disminuido de 2.1 ± 0.29 y de 1.5 ± 0.11 respectivamente, comparados con los grupos control.

El clordiacepóxido presenta a la dosis de 5.0 mg/Kg una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.011$) en el número de bolos excretados de 1.05 ± 0.07 y para la dosis de 10.0 mg/Kg de 2.5 ± 0.30 efecto no significativo ($p < 0.011$) en comparación con los grupos control.

La buspirona presenta efectos significativos ($P < 0.011$), sobre la disminución del número de bolos fecales excretados; comparados con los grupos control, durante la prueba de Nado Forzado. A la dosis de 5.0 mg/Kg el promedio obtenido es de 1.3 ± 0.09 y para la dosis de 10.0 mg/Kg de 1.1 ± 0.05 . Los datos obtenidos se muestran en la Fig. No. 8.

PROMEDIO DE BOLOS FECALES

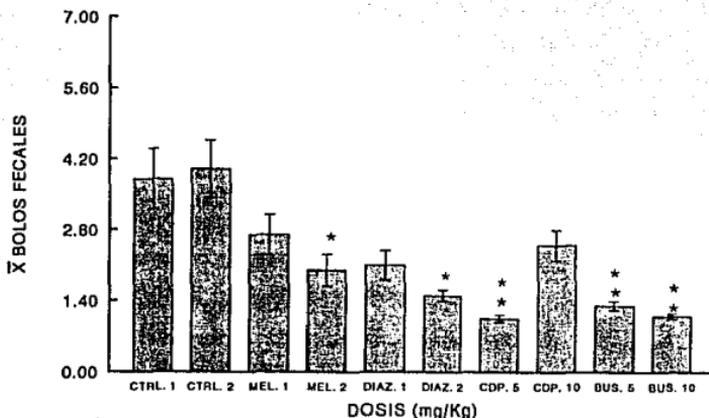


Fig. No. 8. En esta gráfica se muestra promedio de bolos fecales, obtenidos durante la prueba de nado forzado. Se observa una disminución significativa (*, **) en los grupos a los que se les administró MEL, DIAZ, BUS a ambas dosis y CDP a 5.0 mg/Kg y BUS. Abreviaturas: CTRL. control, MEL: Melatonina, DIAZ. diazepam, CDP. clorodiazepóxido y BUS. buspirona.

CAPITULO V

5.1 Discusión.

La ansiedad es un estado emocional que ha dado origen a diversos estudios, los cuales están encaminados a disminuirla, con esta finalidad se han diseñado modelos experimentales en animales. Los modelos son de tipo conductual y se basa en ciertos parámetros. Así pues, el modelo que utilizamos en estos experimentos permite establecer el perfil ansiolítico de las sustancias utilizadas. El modelo de **Nado Forzado** permite considerar en los animales el tiempo de inmovilidad, la respuesta de buceo y el número de bolos fecales excretados (5,56), como respuestas sensibles y selectivas a los agentes ansiolíticos.

Debido a la naturaleza de la respuesta de buceo, ésta se considera como respuesta de escape similar a la que presentan algunos humanos ante situaciones aversivas productoras de ansiedad. Esta similitud posiblemente se puede encontrar en los cuadros clínicos de ansiedad en donde los humanos que la sufren tratan de escapar de lugares cerrados, de viajar solos, etc. y para los cuales se llega a emplear como tratamiento psicofarmacológico a las Benzodiazepinas (27,29).

De las respuestas valoradas, en los resultados obtenidos con la administración de Melatonina tanto a la dosis de 1.0 como a la de 2.0 mg/Kg se observa un efecto ansiolítico importante y el cual es similar al obtenido con Diazepam (1.0 y 2.0 mg/Kg) y Clordiazepóxido (5.0 y 10.0 mg/Kg), principalmente sobre las respuestas de tiempo de inmovilidad y la de buceo. Este mismo

efecto se ha reportado previamente para las Benzodiazepinas, sobre los mismos parámetros (5,9).

En la Fig. 6, se observa que la Melatonina ejerce un efecto de aumento significativo sobre el tiempo de inmovilidad, comparado con los grupos control, estos aumentos son similares a los observados con las dosis mayores de las Benzodiazepinas (Diazepam y Clordiazepóxido) así como para la Buspirona a ambas dosis 5.0 y 10.0 mg/Kg, este efecto permite decir que si la Melatonina incrementa el tiempo de inmovilidad disminuye la ansiedad. Cabe señalar que la Buspirona es un fármaco ansiolítico nuevo, con mecanismo de acción diferente al de las Benzodiazepinas (55), que es de tipo GABAérgico, y el mecanismo de acción para la melatonina aún se desconoce.

En relación a la conducta de bucear, que se representa en la Fig. 7, se observa que la Melatonina, las Benzodiazepinas y la Buspirona ejercen efectos muy similares y significativos de disminución en el número de veces que los animales buceaban, lo que permite establecer una respuesta de menor grado de ansiedad (5,9).

Por último en relación al promedio de bolos fecales excretados; que se presentan en la Fig. 8. primero, en esta prueba se descartó la posibilidad de que el efecto producido por las sustancias se deba a una relajación muscular, que es otro de los efectos clínicamente reconocidos de las benzodiazepinas (5,32), segundo, además encontramos que el número de bolos excretados se encuentra disminuido con la administración de ambas dosis de Melatonina, disminución significativa comparada con los grupos control, así como para diazepam 2.0, clordiazepóxido 5.0 y buspirona 5.0 y 10 mg/Kg.

Esta respuesta nos sugiere nuevamente un efecto ansiolítico de la Melatonina. La respuesta de bolos fecales excretados, indica trastorno emocional (conocido como defecación emocional) y concuerda con las pruebas para Benzodiazepinas en donde el defecar es indicativo de ansiedad del sujeto (22), un número menor de bolos fecales es índice del efecto ansiolítico que han producido los fármacos (5).

Tanto el tiempo de inmovilidad como la conducta de bucear, son considerados como comportamientos emitidos durante la prueba de Nado Forzado que son respuestas sensibles y específicas de fármacos ansiolíticos (5,9). Por esta razón, podemos decir que la Melatonina ejerce efectos ansiolíticos y muy semejantes al diazepam y a la buspirona en el modelo utilizado.

Este modelo es uno de los más empleados en el cernimiento y análisis de los fármacos ansiolíticos (56). Se aprecia que la Melatonina provocó un efecto similar al de las Benzodiazepinas y la buspirona. Es importante hacer notar que la buspirona no esta relacionada químicamente con las benzodiazepinas y carece de los efectos adversos de las mismas (28,66). Tanto el clorodiazepóxido como el diazepam ejercen sus efectos a través de mecanismos Gabaérgicos (10,20,72) mientras que el mecanismo de la buspirona es aún controversial, todo esto por un lado. Por otro lado existen reportes que sugieren una interacción de la buspirona con sistemas dopaminérgicos cerebrales, lo que le ha conferido ser un fármaco dopaminérgico (66,70).

Aunque, hay que tener presente que la ansiedad es producto de toda una interacción de varios sistemas. En términos generales se ha

planteado que la ansiedad es el resultado de un desequilibrio de los sistemas noradrenérgicos y gabaérgicos cerebrales (17).

Los resultados obtenidos en este estudio y con el modelo de Nado Forzado, permiten demostrar que la Melatonina produce efectos ansiolíticos muy similares a los producidos por las benzodiazepinas, y a la buspirona, fármacos cuya actividad ansiolítica ya está ampliamente demostrada (66, 71). Por lo que consideramos que tanto las variables utilizadas; así como el modelo, constituyen un apoyo que permite sustentar esta hipótesis.

ESTA VISTA NO DEBE
SER DE LA BIBLIOTECA

5.2 Conclusiones

1. La Melatonina a 2.0 mg/Kg, produjo efectos marcados sobre el tiempo de inmovilidad y número de buzos en las ratas, estos efectos permiten establecer el carácter ansiolítico de esta sustancia con la prueba de Nado Forzado.
2. La Melatonina produjo efectos ansiolíticos similares a la buspirona (5.0 y 10.0 mg/Kg).
3. La Melatonina ejerció efectos similares a las Benzodiazepinas, en estas sustancias estos efectos ya están considerados como ansiolíticos en el modelo utilizado.

CAPITULO VI

REFERENCIAS

- 1 ANTON-TAY, F.; DIAZ, J.L. y FERNANDEZ-GUARDIOLA, A. (1971).: On the effect of melatonin upon human brain. Its possible therapeutic applications. *Life Sci.*, 10:841-850.
- 2 ANTON-TAY, F. y WURTMAN R.J. (1969).: Regional uptake of ³H-melatonin from blood and cerebrospinal fluid by rat brain. *Nature*, 221:474-475.
- 3 ARMSTRONG, S.M. (1989).: Melatonin and circadian control in mammals. *Experientia*, 45 (10):932-938.
- 4 BALEMANS, M.G.H. (1979).: Indole metabolism in the pineal gland of the rat; some regulatory aspects. *Prog. Brain Res.*, 52:221-229.
- 5 BAUTISTA-PEÑA, S. Y PEREZ-VARGAS, E. : Inventario de respuestas y efecto del aprendizaje en ratas sometidas a nado forzado. (Resumen). Tercer coloquio de investigación en psicología experimental., 1990.
- 6 BECK-FRIIS, J. y WETTERBERG, L.: Melatonin and the pineal gland in depressive disorders. *Horm. Depress.* Raven Press, New York, 1987.
- 7 BENSON, B. (1977).: Current state of pineal peptides. *Neuroendocrinol.*, 24:241-258.
- 8 BOEKMAN D. (1980).: Morfological investigation of the deep pineal of the rat. *Cell. Tissue Res.*, 210:283-294.
- 9 BORSINI, F., y MELI, A. (1988).: Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity?. *Psychopharmacology.*, 94:147-160.
- 10 BRAESTRUP, C. y SQUIRES, R.F. (1977).: Specific benzodiazepine receptors in the brain characterized by high affinity [³H]-diazepam binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:3805-3809.
- 11 BROWN, J., LEWIS, C., BROWN, M.W., HORN, G. y BOWES, J.B. (1978).: Amnesic effects of intravenous diazepam and lorazepam. *Experientia*, 34:501-502.
- 12 CARDINALI, D.P. (1981).: Melatonin: A mammalian pineal hormone. *Endocrine Rev.*, 2:327-343.
- 13 CARDINALI, D.P. y VACA, M.I. (1984).: Pineal gland, photoperiodic responses, and puberty. *J. Endocrinol. Invest.*, 7:157-165.

- 14 CARDINALI, D.P.; LOWENSTEIN, P.R.; ROSENSTEIN, R.E.; GONZALEZ-SOLVEYRA, C.; KELLER-SARMIENTO, M.I.; ROMEO, H.E. y ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Functional links between benzodiazepine and GABA receptors and pineal activity. GABA and Endocrine Function. Giorgio Racagni y Alfredo O. Donoso (eds). Raven Press. New York, 1986, pp. 155-164.
- 15 CASTILLA, S.L. y CRAVIOTO, J.: Estadística simplificada para la investigación en ciencias de la salud. (eds). Trillas., 1ª edición, México D.F., 1991, pp. 87-89, 280-284 y 301-305.
- 16 CHARLES, L.R., BRUCE, T.F., WILLIAM A.G. DAVID W.O. (1979): The pineal complex thermoregulation. Biol. Rev., 72:41-54.
- 17 CHARNEY, D.S. y REDMOND, D.E. (1983): Neurobiological mechanisms in human anxiety. Evidence supporting central noradrenergic hyperactivity. Neuropharmacol., 22:1531-1536.
- 18 COFER, C.N. y APPELEY, M.H.: Motivation: theory and research. En: Psicología de la motivación. Teoría e investigación. PATON L.F. (eds). Trillas., 8ª ed., México D.F., 1987.
- 19 COHEN, M., ROSELLE, D., CHABNER, B., SCHMIDT, T.J. y LIPPMAN, M. (1978): Evidence for a cytoplasmic melatonin receptor. Nature, 274:894-895.
- 20 COOK, L. y SPINWALL, J. (1975): Behavioral analysis of the mechanisms of action of benzodiazepines. Adv. Biochem. Psychopharmacol., 14:1-28.
- 21 CRAMER, H.J., RUDOLPH, J., CONSRUCH, U. y KENDEL, K. (1974): On the effects of melatonin on sleep and behavior in man. Adv. Biochem. Psychopharmacol., 11:187-191.
- 22 DATTA, P.C. y KING, M.G. (1980): Melatonin: effects on brain and behavior. Neur. Biobh. Rev., 4:451-458.
- 23 ELLIS, G. y TUREK, F.W. (1979): Changes in locomotor activity associated with the photoperiodic response of the testes in male Golden Hamsters. J. Comp. Physiol., 132:277-284.
- 24 FALCON, J. y COLLIN, J.P. (1989): Photoreceptors in the pineal of lower vertebrates: Functional aspects. Experientia, 45 (10): 909-913.
- 25 FILE, S.E. (1990): The history of benzodiazepine dependence: a review of animal studies. Neurosci. Biobehav. Rev., 14 (2):135-146.
- 26 FOLEY, P., CAIRNCROSS, K.D. y FOLDES, A. (1986): Pineal indoles: Significance and measurement. Neurosci. Biobehav. Rev., 10: 273-293.

- 27 FREEDMAN, A.M. (1980).: Psychopharmacology in psychotherapy in the treatment of anxiety. *Pharmacopsychiat. Neuropsychopharmacol.*, 13:277-289.
- 28 GOODMAN, A.G., RALL, T.W., NIES, A.S. y TAYLOR, P.: Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutic. En: Las bases farmacológicas de la terapéutica. ARGENTE, H., BELLOSO, W., y DAVARO, R. (eds). Panamericana., 8ª edición, México D.F., 1991, pp.345-363 y420-426.
- 29 HAEFFELY, W.: The biological basis of benzodiazepine actions. En: The benzodiazepines current standards for medical practice. Smith, D.E. y Wesson, D.R. (eds). MTP Press Limited. Boston, 1985, pp. 7-41.
- 30 HAMASAKI, D.I. y EDER, D.J.: Hand book of sensoryphysical. Cap. 9 Adaptive radiation of the pineal system. (eds). CRC Press. Miami, Florida, 1981, pp.498-547.
- 31 HASTINGS, M.H., VANCE, G. y MAYWOOD, E. (1989).: Phylogeny and function of the pineal. *Experientia*, 45(10): 903-909.
- 32 HAWKINS, J., HICKS, R.A., PHILLIPS, N. y MOORE, J.D. (1978).: Swimming rats and human depression. *Nature*, 274:512-513.
- 33 HENDLER, N., CIMINI, C., LANG, T. y LONG, D. (1980).: A comparison of cognitive impairment due to benzodiazepines and to narcotics. *Am. J. Psychiat.*, 137:828-830.
- 34 HETTA, J. (1990).: Evaluation of drugs used in anxiety disorders. *Psychopharmacol.*, 100:563-571.
- 35 HILAKIVICLARKE, L.A. (1992).: Injection of vehicle is not a estressor in Forsolt's swim test. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 42 (1):193-197.
- 36 HISHIKAWA, Y., CRAMER, H. y KHULO, H. (1969).: Natural and melatonin-induced sleep in young chickens. A behavioral and electrographic study. *Exp. Brain Res.*, 7:84-94.
- 37 JARVIK, M.E.: Psychopharmacology in the practice of medicine. Appleton Century Crofts Press. New York, 1977.
- 38 JENSEN D.: The principles of physiology. En: Fisiología. ALVAREZ, K.L., ESPINOSA, Z.R., GARST, A. y cols., (eds). 1ª edición. Interamericana (Ed)., 1979, México D.F., p.p.1090-1122.
- 39 KHAN, R., DAYA S. y POTGIETER, B. (1990).: Evidence for a modulation of the stress response by the pineal gland. *Experientia.*, 46:860-862.

- 40 KHAN, R., BURTON, S., MORLEY, S., DAYA S. y POTGIETER B. (1990).: The effect of melatonin on the formation of gastric stress lesion in rats. *Experientia.*, 46: 88-89
- 41 KLEIN, D.C.: The pineal gland: a model of neuroendocrine regulation. En: *The hypothalamus*. Reichlin. S., Baldessarini, R.J. y Martin, J.B. (eds). Raven Press, New York. 1978, pp. 303-325.
- 42 LAEGREID, L., OLEGARD, R., WALSTRON y CONRADI N. (1989).: Teratogenic effects of benzodiazepine use during pregnancy. *J. Pediatr.*, 114:126-131.
- 43 LOWENSTEIN, P.R., y CARDINALI, D.P. (1983).: Benzodiazepine receptor sites in bovine pineal. *Eur. J.Pharmacology*, 86. 287-289.
- 44 MARANGOS, P.J., PATEL, J., HIRATA, F., SONDHUM, D., PAUL, S.M., SKOLMCK, A. y GOODWIN, F.K. (1981).: Inhibition of diazepam binding by triptophan derivatives including melatonin and its brain metabolite N-acetyl-5-methoxy kynurenamine. *Life Sci.*, 29:259-267.
- 45 MARCZYNSKY, T.J., YAMAGUCHI, N., LING, G.M. y GRODZINSKA, L. (1964).: Sleep induced by the administration of melatonin (5-Methoxy-N-Acetyltryptamine) in the hypothalamus of unrestrained cats. *Experientia*, 20:435-436.
- 46 MARKS, J.: *The Benzodiazepines : Use, Overuse, Misuse, Abuse*. Univ. Cambridge Press. Lancaster, 1978.
- 47 MARKS, J. (1983).: The benzodiazepines for good or evil. *Neuropsychobiol.*, 10:115-126.
- 48 MASON, P., SKINNER, J. Y LUTTINGER, D. (1987).: Two test in rats for antianxiety effects of clinically anxiety attenuating antidepressants. *Psychopharmacol.*, 92:30-34.
- 49 NARANJO, E. y REYES-VAZQUEZ, C. (1991).: Anxiolytic-like actions of melatonin on a conflict procedure. Submitted to *Pharmac. Biochem Behav.*
- 50 NESTOROS, J.N. (1984).: Gabaergic mechanisms and anxiety: an overview and a new neurophysiological model. *Can. J. Psychiatry*. 29:520-528.
- 51 NILES, L.P. WONG, Y.W., MISRA, R.K. y BROWN, G.M. (1979).: Melatonin receptors in brain. *Eur. J. Pharmacol.*, 55:219-220.
- 52 NORDLUN, J.J. y A.B. LERNER (1977). The effects of oral melatonin on skin color and on the release of pituitary hormones. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 45:768-774.

- 53 PARRY, B.L., BERGA, S.L., KRIPKE, D.F., KLAUBER, M.R., LAUGHLIN, G.A., YEN, S.S.C., GILLIN, C. (1990).: Altered waveform of plasma nocturnal melatonin secretion in premenstrual depression. Arch. Gen. Psychiat., 47:1139-1146.
- 54 PAVEL, S. (1978).: Arginine vasotocin as a pineal hormone. J. Neural. Trans., 13 Suppl.:135-155.
- 55 PEROUTKA, S.J. (1985).: Selective interaction of novel anxiolytics with 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors. Biol. Psychiat., 20:971-979.
- 56 PORSOLT, R.D., LE PICHON, M. Y JALFRE, M. (1977).: Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. Nature, 266:730-732.
- 57 REITER, R.J. (1973).: Comparative Physiology. Pineal gland. Ann. Rev. Physiol., 35:302-328.
- 58 REITER, R.J. (1980): The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. Endocr. Rev., 1:109-131.
- 59 REITER, R.J.: Anatomy of the pineal gland of the mammals. En: The pineal. Vol. 6. Reiter, R.J. (ed). Eden Press. 1981, pp. 14-40.
- 60 RELKIN, R.M.D.: The pineal gland. Relkin, R.M.D. (ed). Elsevier Biomedical Press., USA, 1983, pp.1-311.
- 61 REPPERT, S.M., WEAVER, D.R., RIVKES, S.A., STOPA, G.E. (1988).: Putative melatonin receptors in human biological clock. Science., 242:78-81.
- 62 RICCA, J.J. (1972).: Collateral effects induced by benzodiazepines. J. Clin. Pharmac., 12:286-290.
- 63 ROMIJN, H. (1978).: Is the pineal gland a tranquilizing organ?. Life Sci., 23:2257-2274.
- 64 ROSENSTEIN, R.E., CHULUYAN, H.E., DIAZ, M.C. y CARDINALI P.D. (1990).: GABA as a presumptive paracrine signal in Pineal Gland. Evidence on an Intrapineal GABAergic System. Brain Res., 25: 339-344.
- 65 SARASON, I.G.: Psicología Anormal, Ed. Trillas, 4a. Edición. México, 1981.
- 66 SCHUCKIT, M.A. (1984).: Clinical studies of buspirone. Psychopathol., 17: Suppl. 3:61-68.
- 67 SEEM, P., DEMAINE, C. y VOLLRATH, L. (1981).: Electrical responses of pineal cells to melatonin and putative transmitters. Evidence for circadian changes in sensitivity. Exp. Brain Res., 43:361-370.

- 68 SIMONNARDI, V., OUCHOU, A., BURBACH J.P.H., y PEVET, P. (1990).: Vasopressin and oxytocin modulation of melatonin secretion from rat pineal glands. *Peptides.*, 11 (6):1075-1079.
- 69 SUGDEN, D. (1989).: Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia*, 45 (10):922-932.
- 70 TAYLOR, D.P., RIBLET, L.A., STANTON, H.C., EISON, A.S., EISON, M.S. y TEMPLE, D.L. (1982).: Dopamine and antianxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 17 Suppl. 1:25-35.
- 71 TANSELLA, M., ZIMMERMANN, E., TANSELLA, CH., FERRARIO, L., PREZIATI, L. TOGNONI, G. y LADER, M. (1978).: Plasma concentrations of diazepam, nordiazepam and amylobarbitone after short-term treatment of anxious patients. *Pharmacopsychiat.*, 11:68-75.
- 72 TATEBAYASHI, H., y OGATA, N. (1992).: GABA-mediated modulation of the voltage-gated Ca²⁺ channels. *General Pharmacol.*, 23:309-316.
- 73 UNDERWOOD, H. (1989).: The pineal and melatonin. *Regulators of circadian function in lower vertebrates. Experientia*, 45 (10): 914-922.
- 74 URIARTE, V.: *Psicofarmacología*, Ed. Trillas (2a. Ed). México, 1985.
- 75 URRY, R.L., DOUGHERTY, K.A., FREHN, J.L. y ELLIS, L.G. (1976). Factors other than light affecting the pineal gland: Hypophysectomy, testosterone, dihidrotosterone, estradiol cryptorchidism, and stress. *Am. Zool.*, 16:79-91.
- 76 VRIEND, J. (1983).: Pineal-Thyroid interactions. *Pineal Res. Rev.*, 1:183-206.
- 77 WELSH, M.G.: Pineal calcification: structural and functional aspects. *Pineal Res. Rev.*, 3:41-68., Alan R. Liss, INC. 1985.
- 78 WISE, D., BERGER, B.D. y STEIN L. (1972).: Benzodiazepines: anxiety-reducing activity by reduction of serotonin turnover in the brain. *Science*, 177:180-183.
- 79 WURTMAN, R.J. (1975).: The effects of light on man and other mammals. *Ann. Rev. Physiol.*, 37:467-483.
- 80 ZISAPEL, N. (1988).: Melatonin receptors revisited. *J. Neural. Transm.*, 73:1-5.